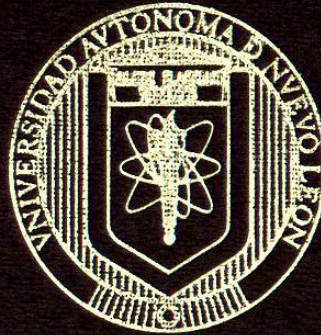


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



ANALISIS DEL PATRON DE EXPRESION ESPACIAL
Y TEMPORAL DEL GEN NURRI EN LA HIPOFISIS
MURINA

Por

Q.F.B. SANDRA CECILIA ESPARZA GONZALEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MORFOLOGIA

AGOSTO 2006

TM

QP356

.22

.E8

2006

c.1



1080146421

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DEL GEN
NURR1 EN LA HIPÓFISIS MURINA**

Por:

Q.F.B. SANDRA CECILIA ESPARZA GONZALEZ

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

Agosto 2006



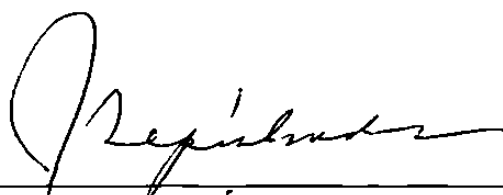
El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, y en el Departamento de Histología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Odila Saucedo Cárdenas y la codirección de el Dr. Julio Sepúlveda Saavedra y el Dr. Roberto Montes de Oca Luna.

**ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN ESPACIAL Y TEMPORAL DEL GEN
NURR1 EN LA HIPÓFISIS MURINA**

Aprobación de la Tesis:



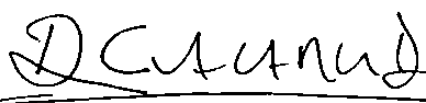
DRA. ODILA SAUCEDO CARDENAS
Director de Tesis



DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Co-Director de Tesis



DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Postgrado

DEDICATORIA

A MI FAMILIA

A mis padres

Quienes siempre me han apoyado y respetado mis decisiones

A mis hermanos

Por ser mis cómplices y darme siempre ánimos para seguir adelante

A mis bebes

Por ser una de las alegrías en mi vida

LOS AMO

GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido llegar hasta aquí y estar conmigo a lo largo de este camino.

A mi mamá, Ma. Teresa González Gtz., por esperarme siempre con sus brazos abiertos y consolarme con sus palabras.

A mi papá, Martín Esparza Hdz., por ser un ejemplo a seguir en mi vida y enseñarme a que los sueños se logran a base de esfuerzo.

A mis hermanos Claudia y Martín, por ser mis cómplices y estar siempre apoyándome en todo momento.

A mis bebés Toño, Danny, Danna, por darme tantos momentos de felicidad y regalarme siempre sus sonrisas.

A mi tía Quika, por ser mi segunda mamá y preocuparse tanto por mí y mi familia.

A la Dra. Odila, por aceptarme en su grupo de trabajo, por tenerme tanta paciencia y por todo lo que me ha enseñado, mil gracias.

Al Dr. Sepúlveda, por haberme aceptado en el postgrado y por la confianza que ha depositado en mí y el apoyo brindado para sacar adelante este trabajo.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por sus valiosas clases de biología molecular y comentarios de los cuales he aprendido.

Al Dr. Arturo Chávez, por ayudarme en la realización de este trabajo.

A mis amigos de la maestría: Adolfo, Blanca, Cristian, Diana, Fito, Jaime, Julio, Lalo, Marcos, Marta, Marichu, y Humberto por ayudarme cuando lo necesite y los buenos ratos en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio CIBIN: Maribel, Rosy, Mario por haberme ayudado tantas veces en el laboratorio pero lo más importante brindarme su amistad.

A mis amigas Bety, Estrella, Nadia y Yessika por que se que siempre cuento con ellas.

Al personal del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL y al 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	v

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Hipótesis	2
1.2 Superfamilia de receptores nucleares	5
1.3 Subfamilia NGFI-B (Nur)	7
1.4 Nurr 1	10
1.5 Genes blanco para el gen Nurr1	10
1.6 Justificación	13
1.7 Objetivos	14
1.7.1 Objetivo General	14
1.7.2 Objetivos Específicos	14
1.8 Estrategia Experimental	15

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS

2.1 Material	16
2.1.1 Origen de los reactivos	16
2.1.2 Material Biológico	17
2.1.3 Materiales	18
2.2 Equipo	18
2.3 Obtención del material histológico	19

2.3.1 Obtención de Embriones de la cepa CD1	19
2.3.2 Disección de cerebros de ratones	19
2.4 Inclusión en parafina	20
2.5 Obtención de los cortes histológicos	20
2.6 Desparafinación de secciones histológicas	21
2.7 Extracción y Purificación de ARN	21
2.7.1 Extracción de ARN	21
2.7.2 Calidad de ARN	22
2.8 Transcripción Reversa-(PCR)	23
2.9 Síntesis de las sondas para los ensayos de hibridación <i>in situ</i>	25
2.9.1 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> , cepa DH5 α	25
2.9.2 Preparación de los plásmidos a gran escala	25
2.9.3 Digestión de los plásmidos	27
2.9.4 Síntesis y marcaje de la sonda Nurr1	27
2.9.5 Síntesis y marcaje de la sonda POMC.....	29
2.10 Técnica de Hibridación <i>in situ</i>	29
2.10.1 Hibridación <i>in situ</i>	29
2.10.2 Autorradiografía	31
2.10.3 Emulsión Fotográfica	31
2.10.4 Revelado y fijación de los cortes histológicos	31
2.10.5 Tinción de los cortes histológicos	32

CAPITULO III. RESULTADOS

3.1 Obtención del ARN en etapas postnatales	33
3.2 Expresión de los genes marcadores de la adenohipófisis	34
3.3 Expresión de Nurr1 en la hipófisis en etapa postnatal	35
3.3.1 Expresión de Nurr1 en la hipófisis en ratones de 2, 4 y 7	
semanas	35
3.3.2 Expresión de Nurr1 en la hipófisis de ratones	
recién nacido	36
3.4 Expresión de Nurr1 en la bolsa de Rathke durante el desarrollo	
embrionario	39
3.4.1 Expresión de Nurr1 a los 14.5 días del desarrollo	
embrionario	39
3.4.2 Expresión de Nurr1 a los 13.5 días del desarrollo	
embrionario	40
3.4.3 Ausencia de la expresión de Nurr1 a los 12.5 días del	
desarrollo embrionario	41
3.5 Expresión de POMC en la hipófisis de ratones postnatal	42

CAPITULO IV. DISCUSIÓN	45
-------------------------------------	-----------

CAPITULO V. CONCLUSIONES	48
---------------------------------------	-----------

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFIA49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos celulares encontrados en la adenohipófisis	4
Tabla 2. Nomenclatura de la subfamilia NGFI-B	7

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Riego sanguíneo de la hipófisis.....	3
2	Desarrollo embrionario de la hipófisis.....	4
3	Estrategia Experimental	15
4	Análisis del ARN total de la hipófisis.....	33
5	Amplificación de genes marcadores de la Adenohipófisis.....	34
6	Expresión postnatal del gen Nurr1 en la hipófisis	35
7	Expresión del gen Nurr1 en el primer día de vida.....	37
8	Expresión de Nurr1 en hipófisis anterior recién nacido mediante análisis de hibridación <i>in situ</i>	38
9	Expresión de Nurr1 en la bolsa de Rathke a los 14.5 dpc	40
10	Expresión de Nurr1 en la bolsa de Rathke a los 13.5 dpc	41
11	Ausencia de la expresión de Nurr1 a los 12.5 dpc en la bolsa de Rathke.....	42
12	Expresión del gen POMC en la hipófisis murina.....	43

NOMENCLATURA

%	Porcentual
°C	Grados centígrados
ACT	Actina
ACTH	H. Adrenocorticotropina
CRF	H.Liberadora de corticotropina
DTT	Ditiotreitol
DEPC	Dietil-pirocarbonato
ADN	Ácido desoxinucleico
ADNc	Ácido desoxinucleico complementario
dpc	días postcoito
dNTP	Trifosfato de desoxinucleósidos
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EtOH	Etanol
FSH	H. folículo estimulante
GH	H. Crecimiento
gr	Gramos
H ₂ O	Agua
MgCl	Cloruro de Magnesio
M	Concentración Molar
mM	Mili molar
mm	Mili metro
µm	Micras
ml	Mili litro
mg	Mili gramo
ng	Nano gramo
µg	Micro gramo
µl	Micro litro
MSH	H. estimulante de melanocitos
NBRE	Elemento de respuesta
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
pb	pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
POMC	Propiomelanocortina
Prl	Prolactina
Rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido Ribonucleico

RNAm
S
SNC
seg
T.A.
Tris-HCl
TSH
TAE
UV
V

RNA mensajero
Azufre
Sistema Nervioso Central
Segundos
Temperatura Ambiente
Trizma-ácido clorhídrico
H. Estimulante de tiroides
Amortiguador de corrida
Ultravioleta
Voltios

RESUMEN

Sandra Cecilia Esparza González

Fecha de graduación: Agosto, 2006

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del trabajo:

**ANALISIS DEL PATRON DE EXPRESION ESPACIAL Y
TEMPORAL DEL GEN NURR1 EN LA HIPOFISIS MURINA**

Número de Páginas: 58

**Candidata para el grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Morfología**

Área de estudio: Morfología

Objetivo y Método del estudio: Nurr1 es un factor de transcripción que se expresa de forma constitutiva en el SNC y es posible su inducción en otros órganos. Nurr1 se expresa en la hipófisis murina en la etapa adulta, sin embargo aún se desconoce cuando y en que región inicia su expresión en la misma. Es por esto, que en el presente trabajo se decidió determinar el inicio de la expresión del gen Nurr1 en la hipófisis murina y correlacionar su expresión con el gen POMC. Mediante estudios *in vitro*, se ha determinado que el gen POMC contiene en su región promotora secuencias NBRE específicas que reconoce el gen Nurr1, de allí la importancia de correlacionar la expresión de ambos genes. Para los objetivos mencionados, se aisló RNA a partir de hipófisis murinas al nacimiento, a las 2, 4 y 7 semanas postnatal para analizar la expresión del gen Nurr1 mediante la técnica de RT-PCR. Mediante análisis de hibridación *in situ* se analizó la expresión del gen Nurr1 durante etapa embrionaria a los 12, 13 y 14 días y al nacimiento. La expresión del gen POMC se analizó mediante hibridación *in situ* a las 7 semanas en etapa postnatal.

Contribuciones y Conclusiones: Se logró determinar el inicio de la expresión del gen Nurr1 a partir del día 13.5 en la bolsa de Rathke (futura adenohipófisis) durante el desarrollo embrionario. Se confirmó la co-expresión del gen Nurr1 y el gen POMC en las regiones intermedia y distal de adenohipófisis murina. De acuerdo a los resultados obtenidos y previos estudios *in vitro*, se sugiere que el gen Nurr 1 participa en la regulación del gen POMC *in vivo*.

DRA. ODILA SAUCEDO CARDENAS
Director de Tesis

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La comunicación intercelular es esencial para el buen funcionamiento de todo organismo. Existen diferentes formas por las cuales las células se mantienen comunicadas, como puede ser por medio de moléculas de superficie celular; mientras otras lo hacen a través de secreción de mensajeros químicos que activan a las células interaccionando con receptores específicos.

De acuerdo a la distancia que tiene que recorrer una molécula señal hasta su célula blanco, podemos hablar de tres tipos de secreción: autocrina, paracrina y endocrina. La secreción autocrina se produce cuando una célula segrega un mensajero químico para que actúe sobre sus propios receptores. La secreción paracrina se produce cuando los mensajeros químicos actúan sobre células adyacentes. La secreción endocrina es la secreción de mensajeros químicos (hormonales) que se transportan en la sangre para que actúen sobre tejidos distantes (1).

El sistema endocrino es muy importante ya que se encarga de realizar funciones como control del metabolismo, mantener la homeostasis, la maduración del SNC, además, participa en procesos como el crecimiento, desarrollo y en la reproducción. Los principales órganos endocrinos son el hipotálamo, hipófisis, tiroides, páncreas endocrino, glándulas suprarrenales y gónadas (2).

1.1 Hipófisis

La hipófisis o glándula pituitaria es la glándula más compleja del sistema endocrino; está compuesta por una porción glandular (adenohipófisis) y una porción nerviosa (neurohipófisis).

La neurohipófisis está formada por prolongaciones neuronales y glia, y posee tres componentes: parte nerviosa (*pars nervosa*) situada por detrás de la hipófisis anterior; el tallo hipofisiario (tallo infundibular), por donde descienden los axones procedentes del hipotálamo; y la eminencia media, una extensión del hipotálamo en forma de embudo. La secreción de la neurohipófisis está controlada por los axones que provienen del hipotálamo. Además la neurohipófisis está formada por células gliales de sostén denominadas pituicitos. Los pituicitos no secretan hormonas, sino que brindan apoyo para un gran número de axones que se originan en los núcleos supraópticos y paraventricular del hipotálamo. Estas terminaciones están situadas en la superficie de capilares, donde secretan dos hormonas:

- Antidiurética (DHA) denominada vasopresina.
- Oxitocina.

Cuando se transmiten los impulsos nerviosos a lo largo de las fibras desde los núcleos supraópticos o paraventricular, la hormona se libera de inmediato de los gránulos secretores de las terminaciones nerviosas mediante exocitosis y se absorbe en los capilares adyacentes (1, 2).

La adenohipófisis esta compuesta por 3 regiones: una parte distal (*pars distalis*) que forma la mayor parte de la glándula; un lóbulo tuberal (*par tuberalis*), compuesta por la capa de células que rodean al tallo hipofisiario y una parte intermedia (*pars intermedia*), que es una zona rudimentaria en el hombre pero que está muy desarrollada en otros mamíferos. Esta parte intermedia consiste en una serie de acinos de tipo glandular revestidos por un epitelio cúbico, estas células son basófilas y sintetizan la prehormona propiomelanocortina (POMC).

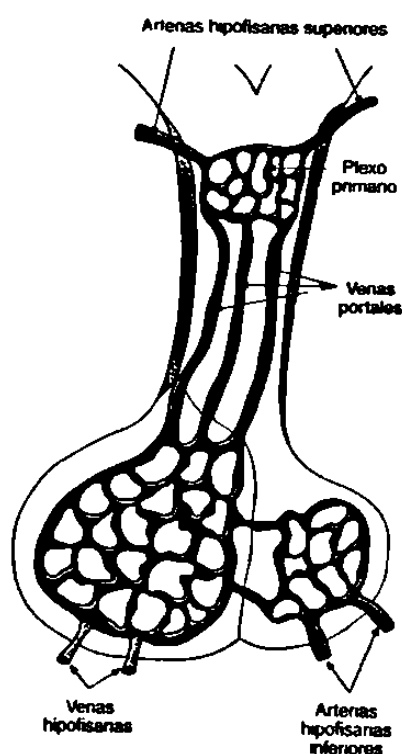


Figura 1. Riego sanguíneo en la hipófisis. El riego sanguíneo en la adenohipófisis esta dado por redes capilares que se conectan a través de las venas portales.

La adenohipófisis es irrigada por el sistema portahipofisiario, que esta formado por redes capilares conectadas por venas portales, la primera red proporciona las hormonas estimuladoras e inhibitoras provenientes del hipotálamo (estas hormonas controlan las células neuroendocrinas de la hipófisis anterior) y la segunda es donde se liberan las hormonas producidas en la parte

distal de la adenohipófisis. Las secreciones de esta última, a su vez, se drenan en las venas hipofisarias y, por lo tanto, al seno venoso carotídeo y a la circulación sistémica.

Actualmente se distinguen cinco diferentes tipos celulares en la adenohipófisis, de acuerdo al tipo de hormona que sintetizan (tabla 1) y que podemos diferenciarlos mediante métodos inmunohistoquímicos. La hipófisis secreta numerosas hormonas que activan células de órganos periféricos, como la glándula adrenal o suprarrenal, la tiroides, los testículos y ovarios.

TABLA 1. Tipos celulares encontrados en la adenohipófisis

Tipo Celular	Hormona Sintetizada
Somatotropas	Hormona de crecimiento (GH)
Lactotropas	Prolactina (Prl)
Corticotropas	Hormona Adrenocorticotropina (ACTH), β -lipotropina (β -LPH), estimulante de melanocitos α (α -MSH) y β -endorfina.
Tirotropas	Hormona estimulante de tiroides (TSH)
Gonadotropas	Hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

La hipófisis es de origen ectodérmico. La neurohipófisis se desarrolla a partir del neuroectodermo (proyección ventral del diencefalo) y la adenohipófisis del ectodermo bucal. El primordio de la adenohipófisis se conoce como bolsa de Rathke, y en su diferenciación participan los genes *Rpx* (gen bolsa de Rathke con homeobox) y los genes *Lhx-3* y *Lhx-4*. Conforme avanza el desarrollo embrionario, estos primordios se unen para formar la hipófisis completa (3, 4).

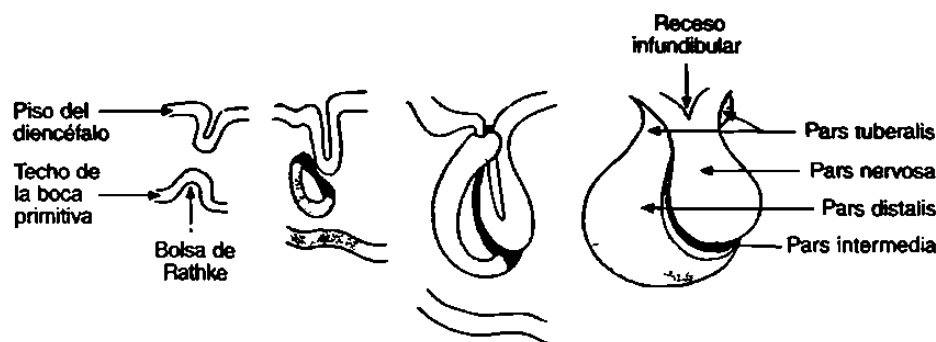


Figura 2. Desarrollo embrionario de la hipófisis. Se muestra el desarrollo de los primordios hasta la formación de cada una de las partes de la hipófisis.

Por otro lado, el factor de transcripción *Nurr1*, miembro de la familia de receptores nucleares, también se ha encontrado que se expresa en la hipófisis murina (13, 41).

1.2 Superfamilia de receptores nucleares

Los receptores nucleares constituyen una gran familia de factores de transcripción regulados por ligando, incluyendo receptores para una variedad de pequeños ligandos lipofílicos, hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona, glucocorticoides, mineralcorticoides y andrógenos), tiroideas y ciertas vitaminas solubles en grasa (vitamina D, ácido retinoico, 9-cis ácido retinoico y ecdisona). Estos factores de transcripción una vez que se unen a su ligando, activan una serie de genes blanco, alterando de esta manera el fenotipo celular (5-7).

Los receptores nucleares constan en general de dos dominios: una región de la proteína que se une específicamente al ADN (DBD) y un dominio menos conservado en el extremo

carboxilo-terminal donde se une el ligando (LBD). Las dos regiones identificadas que son de suma importancia en la activación transcripcional están situadas, una en el extremo amino-terminal (AF1) y otra en el extremo carboxilo terminal (AF2). La región AF-2 ha sido asociada con una regulación positiva o negativa de los receptores nucleares, esto mediante su fosforilación. La región AF2 juega un papel en el cambio de conformación inducido por el ligando dando como resultado la activación transcripcional del receptor. Estudios de cristalografía han demostrado que estos cambios se dan en α -hélice anfipática que contiene esta región (8, 9).

Por otro lado, gracias a la alta conservación de homología del dominio de unión al ADN, los receptores nucleares se han agrupado en familias (10). Los receptores nucleares son capaces de regular la expresión de genes, interactuando ya sea como monómeros, o dímeros (heterodímeros u homodímeros). Se conocen 2 tipos de secuencias específicas de ADN cis activadoras que reconocen los receptores nucleares: AGGTCA y AGAACA (11, 12).

A muchos de estos receptores se les ha determinado cual es su ligando o señal química que modula su actividad transcripcional, sin embargo hay una gran cantidad de estos receptores que aún no se les determina y por esta razón se les denomina “receptores huérfanos”. Entre estas subfamilias esta la Subfamilia NGFI-B (Nur) (13-15).

1.3 Subfamilia NGFI-B (Nur)

La subfamilia NGFI-B de receptores nucleares está formada por 3 receptores nucleares (*Nurr1*, *Nor 1* y *Nurr77*). La nomenclatura que se ha utilizado para los miembros de esta familia ha sido muy variable y se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Nomenclatura de la subfamilia NGFI-B.

Receptor	Nombre Oficial	Especie	Otros Nombres
NGFI-B	NR4A1	Humano	TR3, NAK1, ST-59, NGFI-B α
		Ratón	<i>Nurr77</i> , <i>nurr77</i> , N10, NGFI-B α
		Rata	NGFI-B, NGFI-B α , TIS1
Nurr1	NR4A2	Humano	NOT, NGFI-B β , TINUR, <i>Nurr1</i>
		Ratón	<i>Nurr1</i> , NGFI-B β ,
		Rata	RNR-1, NGFI-B β , <i>Nurr1</i> , HZF-3
Nor 1	NR4A3	Humano	TEC, MINOR, CHN, NOR-1, NGFI-B γ
		Rata	NOR-1, NGFI-B γ .

El gen *Nurr77* ó NGFI-B (factor de crecimiento neuronal) fue originalmente clonado como un gen inducido por un factor de crecimiento nervioso en la línea celular PC12 de un

micetoma de rata (16). *Nurr1* fue aislado de una biblioteca de ADNc de cerebro de ratón, utilizando el sitio de unión al ADN del receptor nuclear COUP-TF como sonda (17). *Nor1* (neuron-derived orphan receptor 1) fue identificado de cultivos de células fetales de cerebro de rata (18).

También poseen un segundo dominio de unión al ligando que se encuentra cercano al carboxilo terminal. En este dominio la proteína contiene secuencias importantes para la dimerización, para la transrepresión y activación dependiente de ligando (19-21).

La subfamilia Nur comprende productos de la expresión de genes tempranos, los cuales son inducidos por estímulos que incluyen AMPc, factores de crecimiento, neurotransmisores, y hormonas polipeptídicas (16, 22). Además, su expresión puede ser inducida por la despolarización de la membrana, agitación mecánica, y campos magnéticos (23-25). Los tres miembros de esta subfamilia tienen una amplia expresión en sistema nervioso central. *Nurr1* y *Nor1* se expresan durante la embriogénesis y su expresión continúa hasta etapa adulta, mientras que *Nurr77* solo se encuentra en el sistema nervioso de cerebro adulto (26). Además se ha encontrado que tienen una alta expresión en hipotálamo, hipófisis y glándula adrenal y se cree que tienen participación en la regulación neuroendocrina del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal a diferentes niveles (27).

Nor1 y *Nurr77* se expresan también en otras regiones como son: timo, pulmón y testículo (16, 22). La expresión en timo es consistente y sugiere una selección negativa de *Nurr77* y *Nor1* sobre las células T inmaduras (28-30). Recientemente se demostró que *Nurr77* responde a

un estímulo de apoptosis y se trasloca desde el núcleo para liberar al citocromo c de la mitocondria, este fenómeno es independiente de su sitio de unión al ADN (31). Nor1 se identificó como un gen fuertemente expresado en células neuronales en apoptosis del cerebro anterior, en corteza adrenal, médula espinal y en el cuerpo estriado en el cerebro (32).

La expresión del gen Nurr1 también ha sido localizada en tejidos periféricos como: en el hígado donde participa en su regeneración (33), en la corteza suprarrenal en respuesta a la estimulación por la hormona adrenocorticotropina (34), así mismo se ha encontrado la expresión de Nurr1 en las células de hueso mediante la estimulación por la hormona paratiroidea (35).

Sorprendentemente, la carencia de Nurr1 no presenta cambios importantes en el fenotipo (36), mientras que en la inactivación del gen Nor1 se han reportado dos fenotipos contrastantes. Uno mostró un leve daño en el interior del oído (37, 38) y en el segundo se observó un severo daño durante la embriogénesis y una gastrulación incompleta (37, 39, 40). Por otro lado, la inactivación génica del tercer miembro, Nurr1, causa un fenotipo letal, ya que los ratones homocigotos para esta mutación mueren durante su primer día de vida. La inactivación de este gen demostró su importancia en la diferenciación y mantenimiento de las neuronas dopaminérgico mesencefálicas (39, 40).

1.4 *Nurr1*

El gen *Nurr1* murino es de aproximadamente 7.6 kilobases y está constituido por 8 exones y 7 intrones. En el exón 3 se encuentra el codón de inicio de la transcripción. El dominio conservado de unión al ADN esta dado por los exones 3 y 4. El exón 5, codifica para el dominio no conservado. Los exones 6 y 7 codifican para secuencias involucradas en la dimerización y un sitio de unión al ligando. En el exón 8 esta el codón de terminación (41).

La expresión del gen *Nurr1* inicia a los 10.5 días del desarrollo embrionario, y se localiza en la capa intermedia del neuroepitelio, en etapa adulta su expresión predomina en diversas estructuras del sistema nervioso central como son: bulbo olfatorio, corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo, hipófisis y médula espinal entre otras, expresándose tanto en poblaciones de neuronas motoras como sensoriales (17, 26, 39, 42). En la región ventral del mesencéfalo, la expresión del gen *Nurr1* es necesaria para la generación del fenotipo neuronal dopaminérgico (40, 43-45).

1.5 Genes blanco para el gen *Nurr1*

Para llevar a cabo su función de transcripción, *Nurr1* puede formar heterodímeros con un receptor del ácido retinóico, el 9-cis (RXR), así mismo puede actuar como homodímero o monómero (46-48). *Nurr1* se une a una secuencia cis de la región promotora de sus genes blanco.

Estas secuencias son llamadas elementos de respuesta hormonal (NBREs), estas secuencias pueden ser: AAACGTG y AAAGAACA (12, 49).

Algunos de los genes que se sabe tienen secuencias NBREs son las enzimas formadoras de esteroides. Análisis comparativos de secuencias revelaron que el gen *Ocn* (osteocalcina) contiene en su promotor dos secuencias NBRE, lo cual dio lugar a la demostración que *Nurr1* regula la expresión de este gen en los osteoblastos (50). Además se conoce que *Nurr1* regula a *CYB11B2* la cual es la encargada de sintetizar aldosterona y mineralocorticoides en la corteza de la glándula adrenal (51). Recientemente se sabe que *Nurr1* regula la expresión del gen *Osteopontina*, cuya proteína está presente en la matriz ósea (52). *Nurr1* también es un activador transcripcional de la tirosina hidroxilasa en neuronas dopaminérgico mesencefálicas (53). Otro de los genes que se sabe que tiene una secuencia NBRE para el gen *Nurr1* es *POMC* (54).

En ensayos *in vitro* se ha demostrado que el gen *Nurr1* se une y regula la expresión de los genes *POMC* y *CRF* (factor liberador de corticotropina) en células de la adenohipófisis de ratón, otros estudios involucran a la proteína cinasa A y a la vía de las proteínas MAP cinasa para llevar a cabo esta regulación (55). *POMC* es un polipéptido el cual mediante modificaciones post-traduccionales da origen a la hormona adrenocorticotropa (ACTH), hormona estimulante de melanocitos (MSH) y otros pequeños péptidos como β -endorfina. Se sabe que el gen *POMC* se expresa en la adenohipófisis en las células basófilas de la parte distal e intermedia.

Previos estudios *in vitro*, sugieren la participación del gen *Nurr1* en la regulación de los genes: *CRF*, *POMC* y *CYB11B2* en la ruta del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal. Más

sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado la regulación de estos genes por *Nurr1* *in vivo*. En este trabajo se logró demostrar la coexpresión de los genes *Nurr1* y *POMC* en la adenohipófisis murina, apoyando de esta manera la posible función *in vivo* del gen *Nurr1* en la regulación de genes importantes dentro del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal.

1.6 Justificación

Aún se desconoce la función del factor de transcripción Nurr1, el cual es esencial para la vida, en diferentes áreas del sistema nervioso central. La realización de este trabajo tiene como meta principal aportar nuevos datos sobre la expresión del gen Nurr1 en la adenohipófisis murina. Los resultados de su expresión nos darán información sobre la posible correlación entre los genes Nurr1 y POMC en el tejido de la hipófisis.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo General

Determinar el inicio de la expresión del gen *Nurr1* en la hipófisis murina y correlacionar su expresión con el gen POMC.

1.7.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el día de inicio de expresión del gen *Nurr1* mediante RT-PCR e hibridación *in situ*.
2. Correlacionar la expresión del gen *Nurr1* con el gen marcador POMC de la hipófisis anterior murina mediante hibridación *in situ*.

1.8 Estrategia Experimental

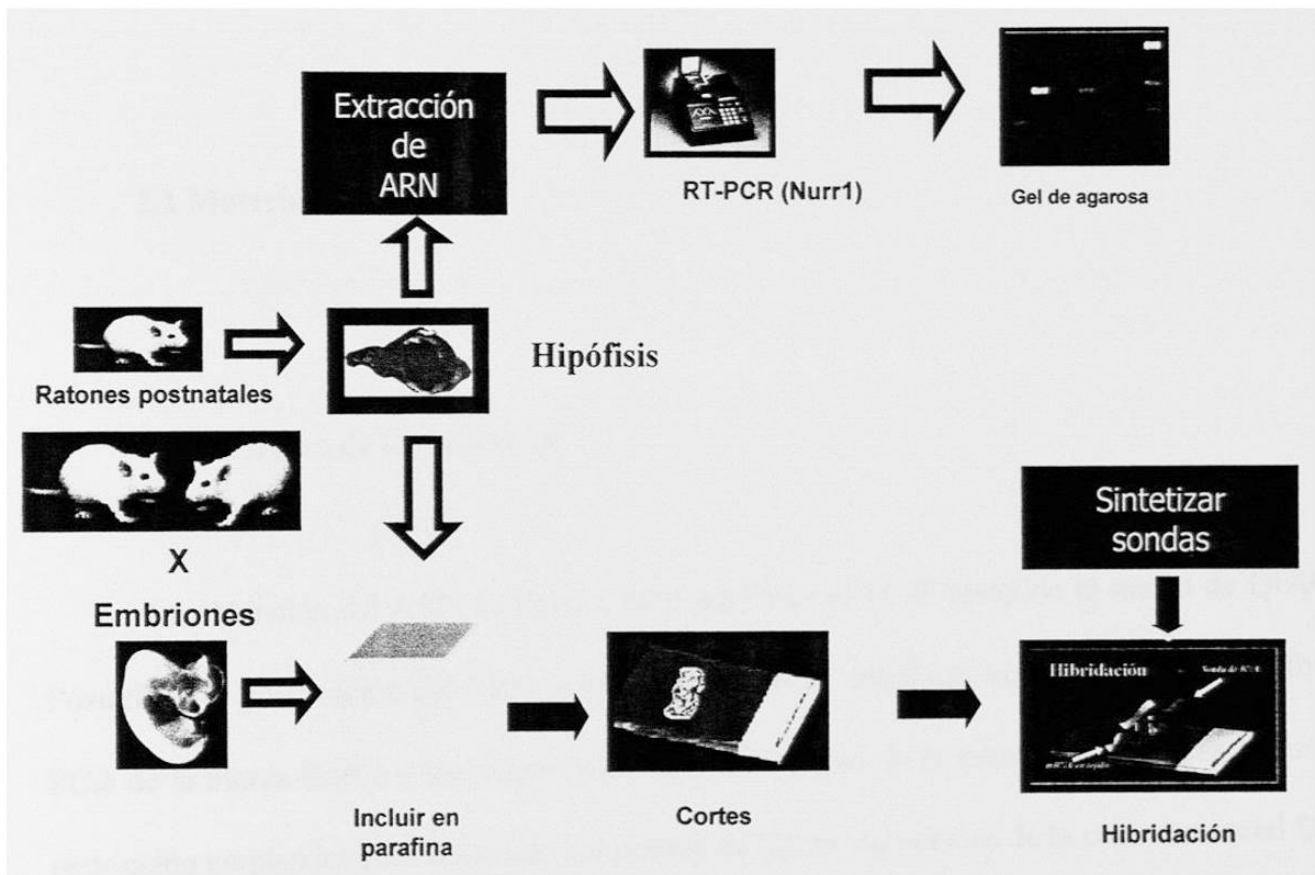


Figura 3. Estrategia experimental utilizada para determinar el patrón de expresión temporal y espacial del gen *Nurr1* en la hipófisis

CAPITULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Origen de los reactivos

La obtención del ARN se llevó a cabo mediante el kit RNeasy de la marca de QIAGEN. Posterior a la purificación del ARN se realizó el RT-PCR mediante el kit de Titan One Tube RT-PCR de la marca Roche y los oligonucleótidos específicos de la marca Operon. Las enzimas de restricción empleadas para linearizar los plásmidos fueron adquiridas de la casa comercial Biolab. El kit Riboprobe de transcripción *in vitro* fue utilizado para la síntesis de las sondas radioactivas para la hibridación *in situ*, este kit es de la marca Promega. El UTP marcado con ^{35}S utilizado en la transcripción *in vitro* fue adquirido de la marca Amersham.

Para realizar los geles de agarosa se utilizaron: agarosa, bromuro de etidio, azul de bromofenol y xilen-cianol los cuales se adquirieron en Invitrogen y Sigma Chemical.

Los reactivos utilizados en la técnica de hibridación *in situ* fueron proteínasa K, trietanolamina, ácido clorhídrico, EDTA, ditioneotriol (DTT), paraformaldehído, anhídrido acético, formamida, β -mercaptoetanol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato monobásico de potasio, fosfato de sodio dibásico, adquiridos en diferentes distribuidores como: Roche, Research Organic, Sigma y Analítica. También se utilizaron RNasa zap de la casa comercial Ambion, y el dietil pirocarbonato (DEPC) de Sigma para proteger el ARN. Para la deshidratación y tinción de las laminillas se utilizó etanol, xilol y hematoxilina, marca Sigma. Tanto para la fijación como para el revelado de las laminillas se utilizaron los reactivos de la marca Kodak.

2.1.2 Material Biológico

Para este trabajo se utilizaron ratones de la cepa CD1 del bioterio del departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL.

Los vectores de clonación empleados así como la cepa de bacterias de *Escherichia coli* DH5 α fueron facilitados por el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste IMSS.

2.1.3 Materiales

Los materiales utilizados en este trabajo como laminillas, cubreobjetos, cajas petri, tubos Falcon de 15 mL, 50 mL, fueron de la marca Corning y los tubos de 0.2 mL, 0.5 mL, 1.5 y 2 mL de la marca Bio Basic Inc.

2.2 Equipo

Para la realización de este trabajo se utilizaron: un estereoscopio Zeiss Stemi S V 6, vortex marca Lab-line. Horno de hibridación con un rango de temperaturas de 30-100°C marca Labnet, placa de calentamiento con agitador magnético Troemner, potenciómetro Beckman, balanza analítica Mettler AJ100, espectrofotómetro BioPhotometer, centrífuga refrigerada Hettich, ultracongelador marca Revco, Transiluminador UV/luz UVP, Gaigger Monitor 4 S.E. InteARNcional, Termociclador PX2 thermo electron, centrífuga Hermle de 1000 a 14,000 rpm, fuente de poder EC 105, cámara de electroforesis horizontal, juego de pipetas calibradas Rainin de 10, 20, 200, 1000 µl, microscopio Axiophot con triple filtro, microtomo, criostato, baño de agua con control de temperatura, incubadora con agitación mecánica New Brunswick Scientific, cámara Olympus, Fotodocumentador y homogenizador manual.

El equipo utilizado para el análisis de datos esta formado por computadoras HP y ACER. Los programas utilizados fueron Microsoft Windows XP, Doct-it.

2.3 Obtención del material histológico

2.3.1. Obtención de Embriones de la cepa CD1

Para obtener los embriones que se utilizaron para realizar este trabajo, se hicieron cruces de ratones hembra y macho de la cepa CD1. Dentro de una jaula se colocaron tanto machos como hembras por la tarde, para que permanecieran toda la noche juntos con el fin de que se aparearan. Las ratonas fueron inspeccionadas al día siguiente por la mañana. A las hembras que se les logró observar un tapón de semen en la vagina fueron separadas del resto y colocadas en jaulas aisladas para su posterior seguimiento. El día en el que se observaba el tapón vaginal se consideró como el 0.5 día de gestación. Las hembras preñadas fueron sacrificadas a diferentes días de gestación desde 12.5 a 14.5 días por el método de dislocación cervical. Los embriones extraídos, se lavaron con PBS 1X para eliminar el exceso de sangre. Posteriormente los embriones fueron procesados para ser incluidos en parafina.

2.3.2 Disección de cerebros de ratones

Para la obtención de las hipófisis utilizadas en este trabajo se sacrificaron los ratones mediante dislocación cervical. Las edades de los ratones fueron: recién nacidos, 2, 4, y 7 semanas de edad. Posteriormente se realizó la disección cerebral para la obtención de las hipófisis. Una vez obtenidas las hipófisis se lavaron en PBS 1X y se embebieron en parafina y otras fueron procesadas inmediatamente para la extracción de ARN.

2.4 Inclusión en parafina

Los embriones así como las hipófisis obtenidas, primero fueron fijados en paraformaldehído al 4%. Posteriormente las piezas fueron deshidratadas de forma gradual con etanol desde el 60% hasta el 100%. Una vez que se ha deshidratado el tejido se procede a remover el etanol por xilol, esto se logra colocando las piezas en xilol y realizando dos cambios una de media hora y otro de una hora. Finalmente se incluyeron en parafina a 60°C durante 4 horas realizando cambios de parafina cada 30 min.

2.5 Obtención de los cortes histológicos.

Los bloques de parafina con las muestras incluidas se procesaron por microtomía para obtener cortes de 6 μm de grosor. Las secciones obtenidas fueron colocadas en baño de agua estéril a 50°C y después se montaron en laminillas especiales que mejoran la adherencia del tejido. Las laminillas se dejan secar toda la noche en una placa la cual tiene una temperatura de 37°C.

2.6 Desparafinación de secciones histológicas

Las laminillas antes de ser sometidas a la técnica de hibridación *in situ*, se les eliminaron la parafina con xilol mediante dos cambios de 5 minutos cada uno y dos cambios de etanol absoluto de 5 minutos cada uno. Posteriormente se dejaron secar por 15 minutos antes de iniciar la hibridación.

2.7 Extracción y Purificación de ARN

2.7.1 Extracción de ARN

Para analizar la expresión del gen *Nurr1* en la hipófisis murina a diferentes etapas postnatales se realizó una extracción de ARN a partir de las hipófisis recolectadas. El tejido se lavó con PBS 1X y después se le agregaron 600 μ L de buffer RLT (10 μ L de β -mercaptoetanol/ 1ml de RLT) para homogenizarlo por 1 minuto a TA. Después el homogenizado fue transferido a una columna QIA shedder y se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm. Se adicionó un volumen de 600 μ L de etOH al 70% y se mezcló por pipeteo. Con una pipeta se aplicaron 700 μ L de la muestra en la columna RNeasy. Enseguida la columna se centrifugó por 25 segundos a 10,000 rpm. El sobrenadante se desechó y se cargó la columna con el volumen restante de la muestra, repitiendo el proceso de centrifugación. Enseguida se le agregaron 350 μ L de buffer RW1 en la columna RNeasy para posteriormente centrifugarla por 15 segundos a 10,000 rpm. Se le

agregaron 71 μl de una solución de ADNasa (1 μL de ADNasa I y 70 μL de 0.01 M MgCl) y se incubó la columna durante 15 minutos a TA. Posteriormente se añadieron 350 μL de buffer RW1 dentro de la columna RNeasy y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 seg. Luego se descartó el eluido. Se transfirió la columna RNeasy a un tubo nuevo de 2 mL. Después se añadieron 500 μL de buffer RPE dentro de la columna y se centrifugó a 10,000 rpm durante 25 seg para lavar. Nuevamente se descartó el eluido. Se repitió el paso anteriormente descrito. Por último se colocó la columna dentro de un tubo nuevo de 1.5 mL y se le añadieron 40 μL de agua libre de ARNsa directamente a la membrana. Después se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto para recuperar el ARN. Se analizaron las muestras (2 μL) en un gel de agarosa.

2.7.2 Calidad de ARN

Para verificar la obtención del ARN, así como su integridad y cantidad fue necesario correr el ARN en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X conteniendo bromuro de etidio a una concentración de 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10 μl de una solución stock de 2 mg/mL por cada 50 mL).

Una vez que el gel de agarosa se solidificó, se colocó en una cámara de electroforesis horizontal y se depositaron cuidadosamente en los pozos las muestras previamente mezcladas con jugo azul. Enseguida se aplicó voltaje suave de 40V hasta que entraron las muestras al gel y luego se aumentó a 90 V. Ya habiendo corrido las muestras dentro del gel, se sacó el gel de la

cámara y se analizó bajo luz UV en un transiluminador. Todo el material usado fue tratado contra ARNasa.

2.8 Transcripción reversa - PCR

Para analizar la presencia de Nurr1 en la hipófisis se procedió a realizar una reacción de RT-PCR a partir del ARN ya purificado. Los oligonucleótidos que se utilizaron estaban localizados, uno en el extremo del exón 1 y el otro en el extremo del exón 3, para generar una banda de 224 pb. Para cada reacción de RT-PCR se colocaron en un tubo eppendorf las siguientes dos mezclas de reactivos:

Mezcla 1

Reactivo	Prueba(μ L)
Agua	10.5
dNTP mix	4
DTTsol.	2.5
ARNsa	1
Prmer R y F (10mM)	2
ARN templado	5
Total	25 μ L

Mezcla 2

Reactivo	Prueba(μ L)
Agua	14
5x-RT-PCR	10
Enzima	1
total	25 μ L

Después se juntaron ambas mezclas (50µl) en un tubo eppendorf de 0.2 mL y se incubó a 50°C por 30 minutos en un termociclador para obtener el ADNc. Posteriormente se procedió a efectuar la reacción de PCR mediante las siguientes condiciones: se inició con una temperatura de 95°C por 5 minutos, y se continuó con 35 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturalización), 60°C por 1 minuto (alineación), 72°C por 2 minutos (elongación), y finalmente a 75°C por 5 minutos.

Con el fin de confirmar la presencia de marcadores específicos del tejido de la hipófisis, se amplificaron los siguientes marcadores de la adenohipófisis: hormona folículo estimulante (Fsh), hormona del crecimiento (Gh), prolactina (Prl) y la hormona estimulante de tiroides (Tsh). La amplificación de estos marcadores se realizó en cada uno de los ARN aislados. Los oligonucleótidos fueron diseñados a partir de la secuencia de cada uno de los genes reportados en el GenBank, esperando los siguientes tamaños en cada una de las amplificaciones.

Hormona	Tamaño (pb)
Fsh	368
Gh	259
Prl	400
Tsh	299

Todas las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones previamente descritas. Finalmente se procedió a analizar los productos obtenidos en un gel de agarosa al 1% .

2.9 Síntesis de las sondas para los ensayos de hibridación *in situ*

2.9.1 Transformación de bacterias *E. coli*, cepa DH5 α

Las bacterias *E. coli* cepa DH5 α fueron transformadas por separado con los plásmidos pKS *Nurr1* que contenía clonada una parte de la secuencia del gen *Nurr1* y el plásmido pGM 7 que tenía parte de la secuencia del gen POMC de la siguiente manera: las bacterias competentes se colocaron en hielo y se les añadieron 2 μ L del plásmido por un tiempo aproximado de 30 minutos. Se realizó un choque térmico, incubando a 42°C por 45 segundos para después incubar nuevamente en hielo por un minuto, posteriormente se les añadieron 100 μ L de medio de cultivo LB y se incubó a 37°C con agitación mecánica a 200 rpm durante una hora. Finalmente se sembraron 100 μ L del cultivo en placas con medio selectivo: LB conteniendo ampicilina.

2.9.2 Preparación de los plásmidos a gran escala

Las clonas obtenidas son procesadas para la obtención de ADN plasmídico utilizando el método de lisis alcalina. Se sembró una colonia bacteriana en 5 mL de caldo de cultivo LB conteniendo 5 μ L de ampicilina (400 μ g), incubando a 37°C a 150 rpm, durante toda la noche. Enseguida, el cultivo se inoculó en 25 mL de caldo LB conteniendo 25 μ L de ampicilina, y se incubó a 37°C, a 150 rpm durante toda la noche. Posteriormente los 30 mL de cultivo se

inocularon a 500 mL de caldo LB conteniendo 500 μ L de ampicilina (1mg/mL), con las mismas condiciones previamente mencionadas. Al día siguiente el medio de cultivo se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó completamente, y se procedió a utilizar el kit de extracción de ADN de QIAGEN. La pastilla bacteriana se resuspendió en 10 mL de solución de lisis I. Entonces se añadieron 10 mL de solución de lisis II (0.2 mL de NaOH 10M, 1.0 mL de SDS 10% y 8.8. mL de agua), se mezcló por inversión y se incubó a TA durante 5 minutos. Pasada la incubación se agregaron 10 mL de solución de lisis III (Acetato de Sodio 3M), se agitó vigorosamente e incubó en hielo por 20 minutos, siguiendo con 30 minutos de centrifugación a 4°C. El sobrenadante se colocó en un tubo Falcón de 50 mL limpio y se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Al mismo tiempo, se equilibró una columna de intercambió iónico con 10 mL de buffer QBT. Enseguida se filtró el sobrenadante y se lavó dos veces la columna con 30 mL de buffer QC. Entonces se eluyó el ADN retenido en la columna con 15 mL de buffer QF, a un tubo limpio. Se removió la columna y se precipitó el ADN con 10.5 mL de Isopropanol. Se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C por 30 minutos. El sobrenadante se desechó y la pastilla de ADN se lavó con 15 mL de etanol al 70%. Nuevamente se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante se decantó, se dejó secar la pastilla de ADN y resuspendió en 500 μ L de TE 1X. Se verificó la obtención del plásmido en un gel de agarosa al 1% y se cuantificó mediante espectrofotometría.

2.9.3 Digestión de los plásmidos

Una vez obtenidos los plásmidos, se linearizaron para sintetizar las sondas que se utilizaron en los análisis de hibridación *in situ*. Para el plásmido que contenía el fragmento de *Nurr1* se digirió con la enzima BamH I para obtener mediante transcripción *in vitro* una secuencia complementaria al mensajero de *Nurr1* (sonda antisentido), así mismo este plásmido también se digirió con la enzima Hind III para obtener una sonda control de la técnica, es decir una sonda del mismo sentido que el ARN celular (sonda sentido). El plásmido que contenía la secuencia de POMC se digirió con la enzima Nco I.

2.9.4 Síntesis y marcaje de la sonda *Nurr1*

Para sintetizar las sondas de ARN del gen *Nurr1* se utilizó un kit de transcripción *in vitro* marca Promega de la siguiente manera: se utilizó 1 µg de cada uno de los plásmidos linearizados. Para obtener las sondas antisentido y sentido se utilizaron la ARN polimerasa T3 y T7, respectivamente. A un tubo conteniendo 1 µg de ADN linearizado se le agregaron 5 µL de H₂O DEPC, 3 µL de DTT 100mM, 6 µL de buffer de transcripción 5X, 3 µL de una mezcla conteniendo los ribonucleótidos 10mM(rATP, rCTP, rGTP), 1 µL de RNAsin y 7 µL (³⁵S)UTP. Posteriormente se incubaron con sus respectivas ARN polimerasas.

Se incubaron a 37°C durante 1 hora. Enseguida se le añadió 17.9 µL de H₂O DEPC, 1.7 µL de MgCl₂ (0.3M), 2.2 µL de DTT (100mM) y 2 µL de ADNasa I (1 U/mL) para digerir el templado de ADN remanente. Se incubó a 37°C durante 20 minutos, después se colocó en hielo y se le añadieron 100 µL de H₂O DEPC, 100 µL de ARN de transferencia de levadura y 250 µL de acetato de amonio 4M. Entonces se precipitó el ARN con 1ml de etanol absoluto durante una hora a 70°C, posterior a esto se centrifugó a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y el botón de ARN se resuspendió en 200 µL de H₂O DEPC, y se le agregaron 200 µL de acetato de amonio 4M. Se precipitó nuevamente con etanol absoluto y se centrifugó. El ARN precipitado se resuspendió en 200 µL de H₂O DEPC. Posteriormente las sondas fueron sometidas a un proceso de hidrólisis esto para lograr un tamaño aproximado de 150 pb el cual es recomendado para obtener una buena hibridación, para hidrolizar la sonda de ARN se le añadieron 8 µL de NaHCO₃ (1M) y 12 µL de Na₂CO₃ (1M), se incubaron a 60°C durante 27 minutos la sonda antisentido y 38 minutos la sonda sentido. Finalmente se neutralizaron las reacciones con 7.33 µL de acetato de sodio (3M) y 11 µL de ácido acético glacial al 10%. Una vez más se vuelve a precipitar con etanol absoluto a temperatura ambiente, seguida de una centrifugación a 12,000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante es desechado y el precipitado es resuspendido en buffer de hibridación conteniendo DTT 0.1M, formamida 50%, dextrán sulfato 10%, SSC 4X y solución Denhardt's 1X. La sonda antisentido es la que tiene la capacidad para reconocer al ARNm del gen de interés ya que por complementariedad con el ARN celular se logra una hibridación y a partir de la cual se analizó la expresión de *Nurr1*. La sonda sentido por ser equivalente al ARNm del tejido, se utilizó como sonda control negativo.

2.9.5 Síntesis y marcaje de la sonda POMC

Para sintetizar la sonda antisentido, se utilizó la ARN polimerasa T7 y la sentido mediante la ARN polimerasa Sp6. La hidrólisis alcalina fue de 48 minutos tanto para la sonda sentido como la antisentido. La sonda antisentido nos sirvió para comparar el patrón de expresión de este gen con el de *Nurr1*.

2.10 Técnica de hibridación *in situ*

2.10.1 Hibridación *in situ*

Los cortes histológicos después de ser desparafinados fueron fijados con paraformaldehído al 4% y permeabilizados con proteinasa K (20 mg/ mL) por ocho minutos a 37°C, después se lavaron con PBS 1X por 5 minutos a temperatura ambiente; se vuelven a fijar con paraformaldehído al 4% en PBS 1X por 5 minutos a temperatura ambiente, luego se colocaron en una solución que contenía trietanolamina (0.1M) durante 3 minutos, posteriormente las laminillas se sumergen en 20 mL de una solución de trietanolamina (0.1M) conteniendo 50 µL de anhídrido acético concentrado por un lapso de 10 minutos. Después las laminillas son lavadas con PBS 1X por 5 minutos y deshidratadas en concentraciones graduales de alcohol desde 30% hasta 100%. Se dejaron secar las laminillas para posteriormente ponerlas en contacto con la sonda previamente sintetizada.

La sonda se calienta por 2 minutos en agua hirviendo, e inmediatamente se colocó en hielo, después se aplicaron 70 μ L de la sonda por laminilla cuidando de no formar burbujas. Se colocaron horizontalmente en una cámara húmeda la cual contenía papel Whatman 3MM humedecido con: 5 mL de formamida y 5 mL de la solución 5X SSC. Esta cámara se incubó de 16-20 horas a 58°C.

Para quitar el exceso de sonda que no haya hibridado se realizó lo siguiente: una vez cumplido el tiempo de la hibridación se sacaron las laminillas de la incubación y se dejaron que se enfriaran a temperatura ambiente, posterior a esto se lavaron con la solución 5X SSC con 142 μ L/ 100mL de β -mercaptoetanol, a 55°C durante 30 minutos para retirar los cubreobjetos de las laminillas. Luego se colocaron en una solución al 50% de formamida, 2X SSC y 142 μ L/ 100ml de β -mercaptoetanol, y se incubó a 65°C por 30 minutos. Enseguida se lavaron las laminillas con una solución V que contenía: NaCl 0.5M, Tris-HCl 10mM, EDTA 5mM, a temperatura ambiente por 10 minutos y a continuación se realizaron 3 lavados consecutivos con esta misma solución V a 37°C por 10 minutos cada uno. Posteriormente se incubó con la enzima ARNasa (20 mg/mL) utilizando esta misma solución V a 37°C por 30 minutos. Al término de la incubación se lavó con esta misma solución V a 37°C por 15 minutos. Después se colocaron las laminillas en una solución al 50% de formamida, SSC 2X y 142 μ L/ 100mL de β -mercaptoetanol, y se dejaron a 65°C por 30 minutos. Luego se lavaron con una solución de SSC 2 X y después con una menor concentración SSC 0.1X durante 15 minutos en cada lavado. Se deshidrataron con alcoholes graduales, del 50% hasta 100% donde los alcoholes de 50% y 70% contenían SSC

20X y DTT para estabilizar la hibridación. Después se dejaron secar por 20 minutos antes de ponerlas en la autorradiografía.

2.10.2 Autorradiografía

Las laminillas se expusieron a una película de rayos X por lo menos 24 horas a temperatura ambiente antes de ser reveladas.

2.10.3 Emulsión Fotográfica

Para observar mejor la presencia del ARN en el tejido, las laminillas fueron tratadas con la emulsión autorradiográfica NTB2 (Eastman Kodak) durante 6 segundos, donde se precipita la radiación de la sonda en forma de gránulos de plata. Las laminillas se dejan secar por un lapso de dos horas, para posteriormente ser guardadas en cajas oscuras y selladas para evitar el contacto con la luz. Y después se incubaron a 4°C durante dos semanas.

2.10.4 Revelado y fijación de los cortes histológicos

Después de las dos semanas a 4°C las laminillas se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos para ser sometidas a un proceso de revelado, que consistió en sumergir por 2 minutos las

laminillas en el revelador Kodak D-19, luego se transfirieron por 2 minutos en agua destilada y posteriormente se sumergieron en el fijador Kodak durante 2 minutos. Y finalmente se dejaron 10 minutos en agua corriente. Después de este tiempo las laminillas ya se pueden exponer a la luz sin afectar el resultado.

2.10.5 Tinción de los cortes histológicos

Las laminillas fueron contrateñidas con hematoxilina para lograr resaltar los núcleos de las células, se tiñeron con hematoxilina por 2 minutos, después se quitó el exceso de colorante con agua de la llave y se procedió a deshidratar con alcoholes graduales (70%, 95%, 100%, 100%) se removió el alcohol con 2 cambios de xilol de 2 minutos cada uno y después se montaron con resina Entellan y se dejaron secar.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Obtención del ARN en etapas postnatales

Para determinar el inicio de la expresión del gen Nurr1 en la hipófisis se aisló el ARN de esta glándula a diferentes edades en etapa postnatal. Se obtuvo el ARN de hipófisis de ratones a la edad de 7 semanas, 4 semanas y 2 semanas. La calidad del ARN total extraído se analizó mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

El ARN purificado mostró una excelente calidad como podemos observar en la figura 4, donde se aprecia una buena relación entre las bandas 28s y 18s del ARN ribosomal.

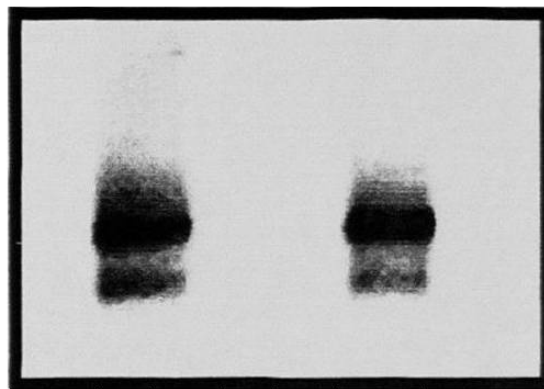


Figura 4. Análisis del ARN total extraído de hipófisis. Extracción del ARN a partir de la hipófisis de ratones en etapa postnatal. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

3.2 Expresión de los genes marcadores de la adenohipófisis

A partir del ARN obtenido de las hipófisis murinas a diferentes etapas postnatales se procedió a amplificar los siguientes marcadores de la adenohipófisis: hormona folículo estimulante (*Fsh*), hormona del crecimiento (*Gh*), prolactina (*Prl*) y la hormona estimulante de tiroides (*Tsh*). Esto se realizó con la finalidad de asegurarnos que el tejido obtenido fuera la hipófisis, ya que su tamaño es muy pequeño, alrededor de 5 mm y se puede llevar el riesgo de tomar un tejido equivocado durante su obtención.

Los productos amplificados con los oligonucleótidos específicos para los marcadores de la adenohipófisis correspondieron al tamaño esperado, como se muestra en la figura 5. Estos resultados nos confirmaron la especificidad del ARN obtenido de las hipófisis murinas, utilizados en el presente estudio.

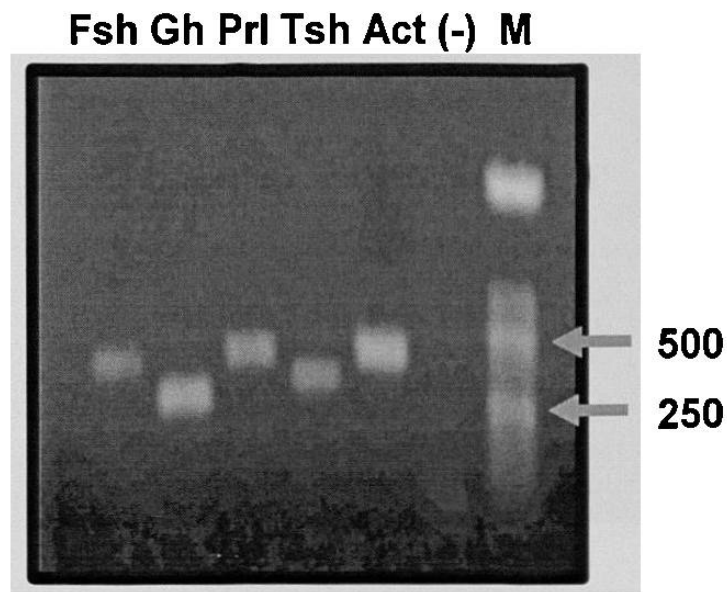


Figura 5. Amplificación de genes marcadores de la adenohipófisis. El ARN obtenido de la hipófisis se sometió a una reacción de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para detectar la expresión de los genes específicos de la adenohipófisis: hormona folículo estimulante (*Fsh*), hormona del crecimiento (*Gh*), prolactina (*Prl*) y la hormona estimulante de tiroides (*Tsh*). M es marcador de peso molecular de 250 pb.

3.3 Expresión de Nurr1 en la hipófisis en etapa postnatal

3.3.1 Expresión de Nurr1 en la hipófisis en ratones de 2, 4 y 7 semanas

Para analizar la expresión de Nurr1 en la hipófisis, una vez obtenido el ARN, éste se sometió a una reacción de RT-PCR, utilizando nucleótidos específicos del gen Nurr1. Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar un fragmento que contuviera más de un exón para asegurar que el producto amplificado sería del ARNm de Nurr1 y no del gen Nurr1. Para esto los oligonucleótidos hibridaron uno en el extremo 3' del exón 1 (forward) y el otro en el extremo 5' del exón 3 (reverso). El tamaño del producto de PCR obtenido, correspondió al esperado, de 224 pb como se muestra en la figura 6.

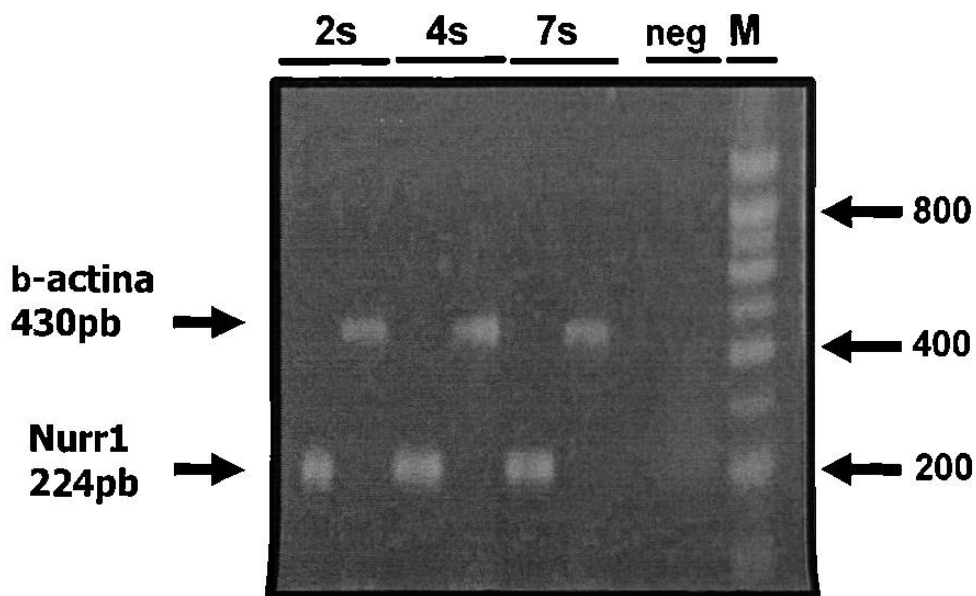


Figura 6. Expresión postnatal del gen Nurr1 en la hipófisis. ARN de hipófisis de ratones a los 2, 4, y 7 semanas (2s, 4s, 7s) se sometieron a una reacción de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen Nurr1 y β -actina. M, corresponde a un marcador de peso molecular de ADN de 100pb.

Los resultados obtenidos indican la presencia del gen *Nurr1* en la etapa de 7 semanas, 4 semanas y 2 semanas. Como un control positivo para verificar la integridad del ARN total purificado a partir de las muestras de hipófisis, se amplificó un fragmento de la proteína β -actina, cuyo tamaño correspondió al esperado de 430 pb.

Debido a la presencia del gen *Nurr1* en las etapas analizadas, procedimos al análisis del ARN total a partir de hipófisis de ratones recién nacidos.

3.3.2 Expresión de *Nurr1* en la hipófisis de ratones recién nacidos

Para determinar si la expresión de *Nurr1* estaba presente a partir del nacimiento, se llevó a cabo una reacción de RT-PCR a partir del ARN total extraído de hipófisis de ratones recién nacidos.

En la figura 7 se muestran los productos de amplificación obtenidos mediante la reacción de RT-PCR a partir del ARN total extraído de las hipófisis murinas de recién nacidos. Los productos observados son un fragmento de 224pb y 400pb, para el ARNm de *Nurr1* y β -actina (control positivo) respectivamente. Los resultados indican que el gen *Nurr1* se expresa también en hipófisis murinas de recién nacido.

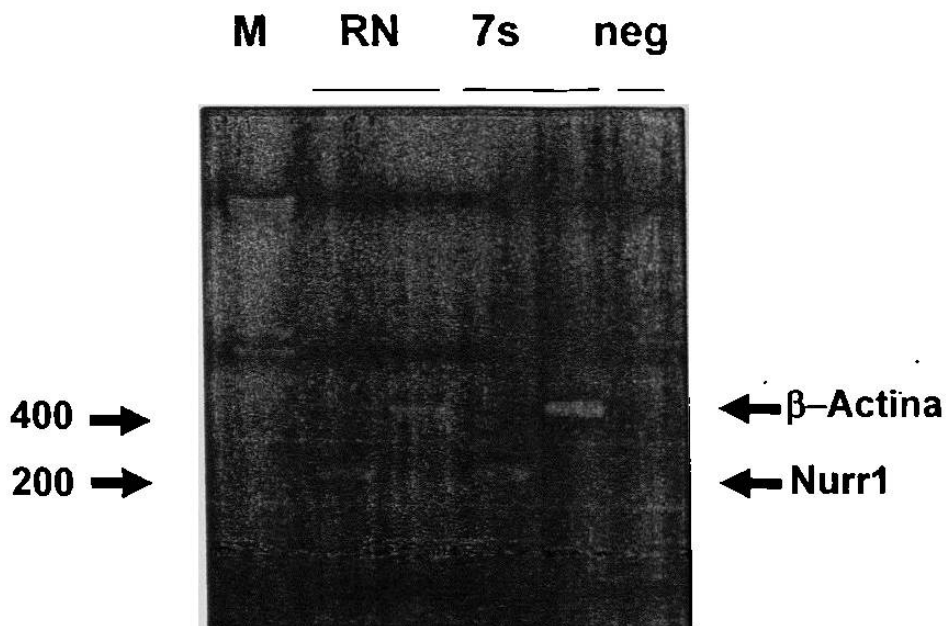


Figura 7. Expresión del gen *Nurr1* en el primer día de vida. ARN de hipófisis de ratones recién nacidos (RN) se sometieron a una reacción de RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *Nurr1* y β -actina. Se utilizó como control positivo ARN de hipófisis de un ratón de 7 semanas (7s). M, corresponde a un marcador de peso molecular de ADN de 100 pb.

Para corroborar la expresión del gen *Nurr1* en la hipófisis de ratones recién nacidos se procedió a analizar dicha expresión mediante la técnica de hibridación *in situ* utilizando sondas específicas para el gen *Nurr1* previamente descritas.

Los resultados obtenidos mediante la hibridación *in situ* confirman lo observado mediante la técnica de RT-PCR. Los análisis de hibridación *in situ* muestran la expresión del gen *Nurr1* en la adenohipófisis murina de ratón recién nacido. Como se observa en la figura 8 la expresión más fuerte se presentó en el lóbulo intermedio y una expresión menos intensa en la parte distal de la adenohipófisis.

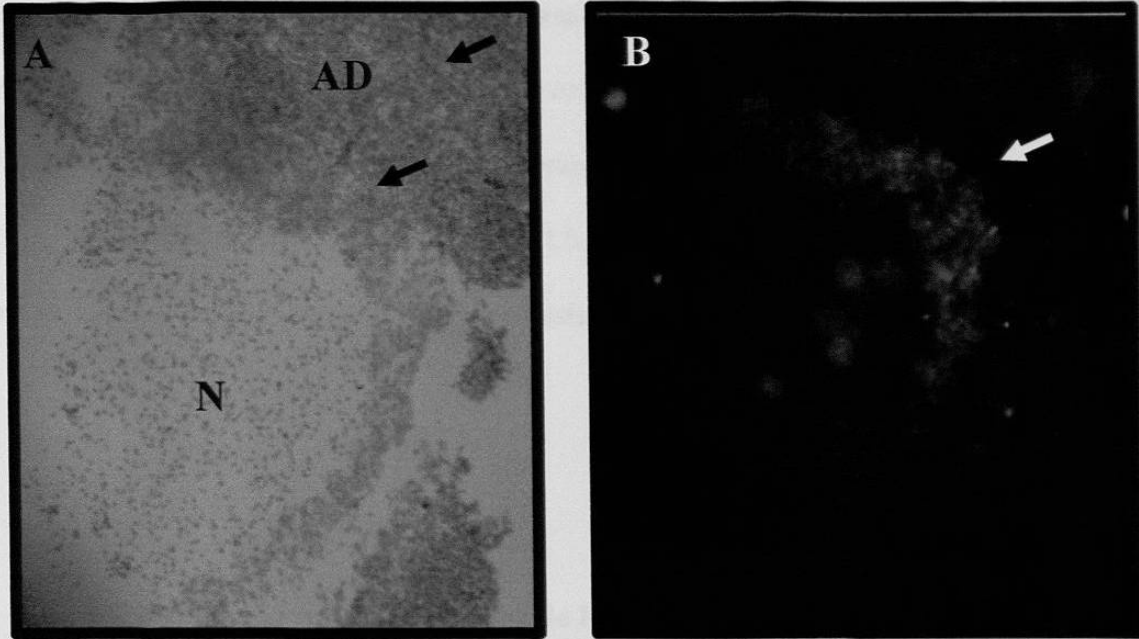


Figura 8. Expresión de Nurr1 en la hipófisis anterior de recién nacido mediante análisis de hibridación *in situ*. Corte transversal de la hipófisis en campo claro (A) y campo oscuro (B). En A, N corresponde a la neurohipófisis donde no se observa expresión del gen Nurr1, AD corresponde a la adenohipófisis, las flechas negras indican la expresión de Nurr1. En B la flecha indica la expresión del gen Nurr1 en la adenohipófisis. (50X)

Los resultados de la expresión del gen Nurr1 sugerían que la expresión de este gen iniciaba durante el desarrollo embrionario, por ello procedimos a realizar estudios de hibridación *in situ* utilizando embriones de ratones a diferentes etapas del desarrollo, se decidió utilizar la técnica de hibridación *in situ* puesto que en el embrión es muy complicado el aislar la hipófisis para seguir sus análisis por RT-PCR. Se empleó la técnica de hibridación *in situ* debido a que es muy difícil aislar la hipófisis durante su desarrollo por que es muy pequeña.

En el embrión la adenohipófisis se desarrolla a partir de una evaginación del ectodermo oral (bolsa de Rathke) que reviste la cavidad oral primitiva. El primordio de la adenohipófisis se conoce como bolsa de Rathke, y en su diferenciación participan los genes *Rpx* (gen bolsa de Rathke con homeobox) y los genes *Lhx-3* y *Lhx-4*. Conforme avanza el desarrollo embrionario, estos primordios se unen para formar la hipófisis completa

3.4 Expresión de *Nurr1* en la bolsa de Rathke durante el desarrollo embrionario

3.4.1 Expresión de *Nurr1* a los 14.5 días del desarrollo embrionario

Los embriones fueron procesados mediante la técnica de hibridación *in situ* para determinar la expresión de *Nurr1* en la bolsa de Rathke. En los resultados se logró observar la presencia de *Nurr1* en el núcleo de algunas células, mediante la precipitación de los gránulos de plata, los cuales se forman a partir de la hibridación dada por el ARNm de la célula y el ARN antisentido sintetizado (figura 9). Debido a que se encontró la expresión de *Nurr1* en este estadio embrionario, se procedió a analizar su expresión a etapas más tempranas del desarrollo embrionario.

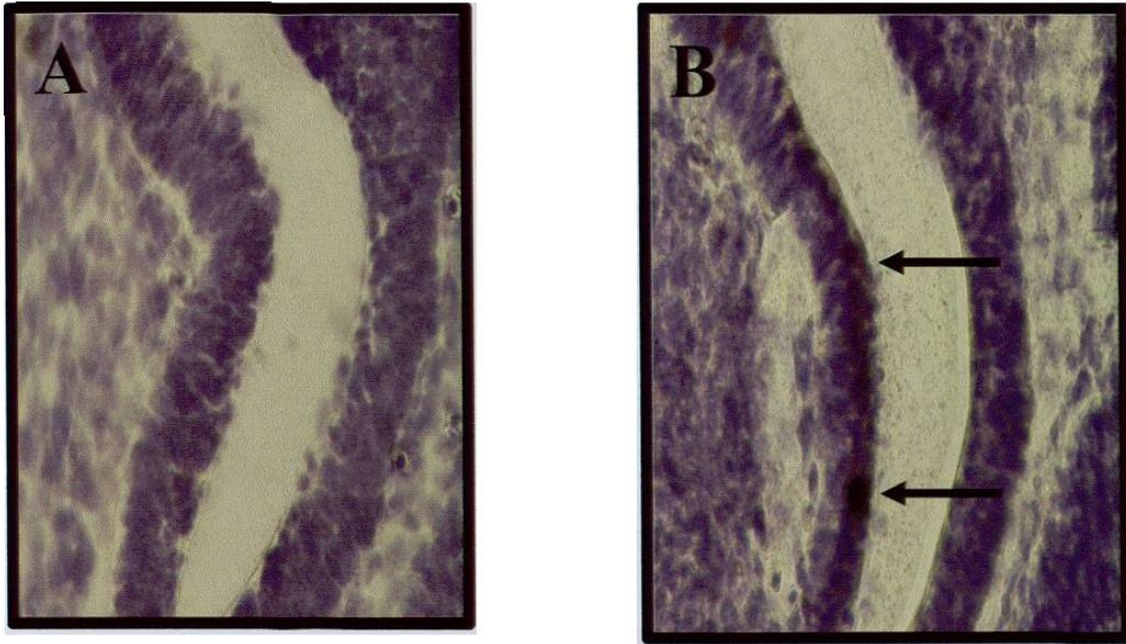


Figura 9. Expresión de *Nurr1* a los 14.5 dpc en la bolsa de Rathke. A) Muestra la hibridación con la sonda sentido utilizado como control negativo. B) Hibridación con la sonda antisentido para determinar la presencia de *Nurr1* en el epitelio de la bolsa Rathke. Las flechas muestran la señal positiva en los núcleos. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina. (400X)

3.4.2 Expresión de *Nurr1* a los 13.5 días del desarrollo embrionario.

Se analizó la expresión de *Nurr1* a los 13.5 días del desarrollo embrionario mediante análisis de hibridación *in situ* en cortes sagitales de ratón. Se observó una intensa expresión del gen *Nurr1* dentro de los núcleos del epitelio de la bolsa de Rathke teñidos con hematoxilina (figura 10). Por lo tanto se procedió a analizar el día 12.5 del desarrollo embrionario.

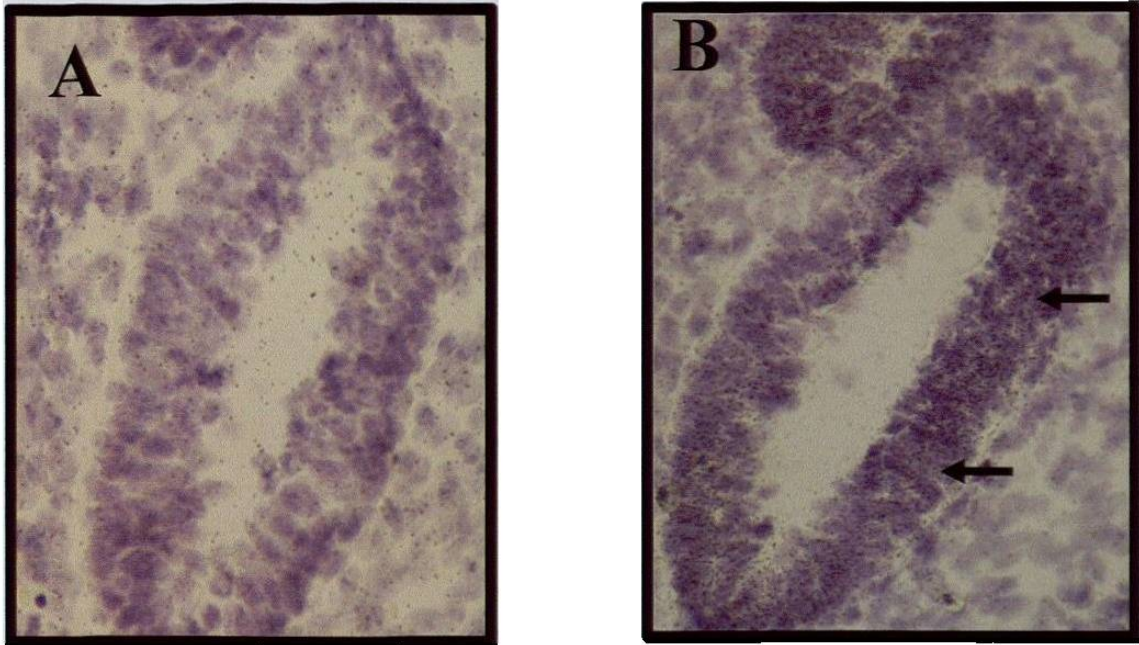


Figura 10. Expresión de *Nurr1* a los 13.5 dpc en el epitelio de la bolsa de Rathke. A) Hibridación con la sonda sentido como control negativo. B) Hibridación con la sonda antisentido, cuya señal positiva para *Nurr1* se observa en los núcleos del epitelio de la bolsa de Rathke (flechas). (400X)

3.4.3 Ausencia de la expresión de *Nurr1* a los 12.5 días del desarrollo embrionario

Los embriones de esta etapa se pusieron en contacto con la sonda sintetizada para analizar la expresión de *Nurr1*. Aún cuando se observa unos gránulos de plata, estos se distribuyen al azar en todo el tejido incluso donde no hay células (figura 11), lo cual nos indica la ausencia de expresión del gen *Nurr1* a los 12.5 días en el epitelio de la bolsa de Rathke murina.

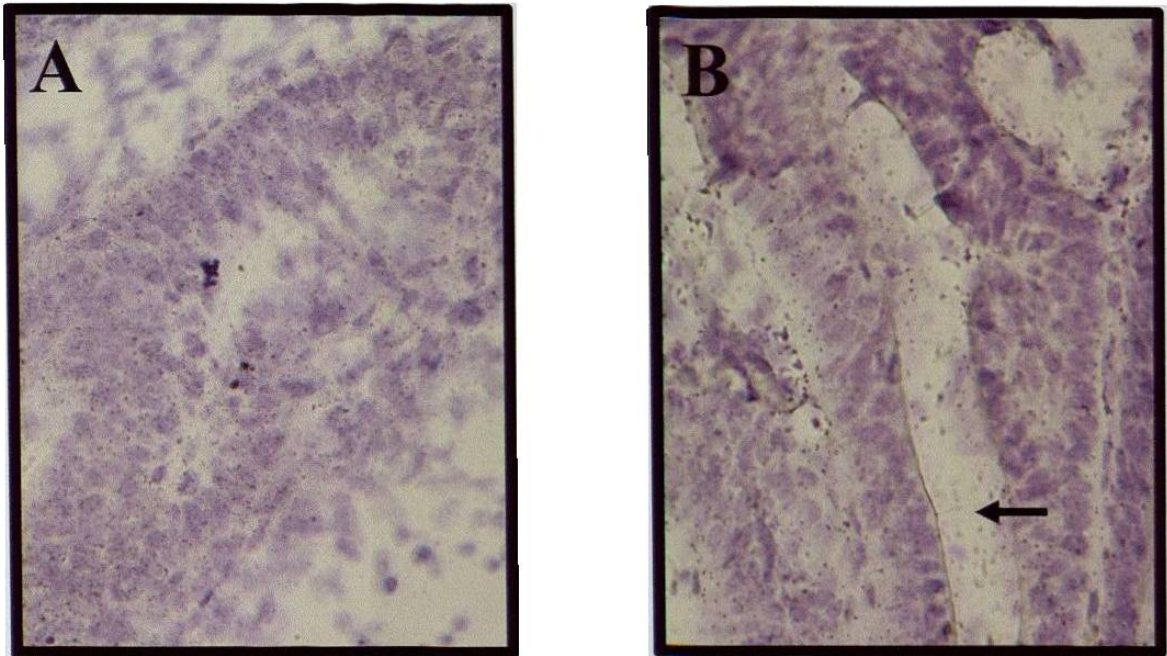


Figura 11. Ausencia de la expresión del gen *Nurr1* a los 12.5 dpc en el epitelio de la bolsa de Rathke. A) Hibridación *in situ* con la sonda sentido como control negativo. B) Hibridación con la sonda antisentido para determinar la expresión de *Nurr1*. La flecha indica la señal en la región donde no hay células. (400X)

Todos los resultados anteriores nos indican que la expresión de *Nurr1* inicia al día 13.5 y ésta continúa hasta etapa adulta.

3.5 Expresión de POMC en la hipófisis de ratones postnatal

La expresión de POMC se observó en ratones de 7 semanas localizada en la adenohipófisis y con mayor intensidad en la parte intermedia; esta expresión es observada por la señal de los gránulos de plata precipitados como se puede observar en la figura 12.

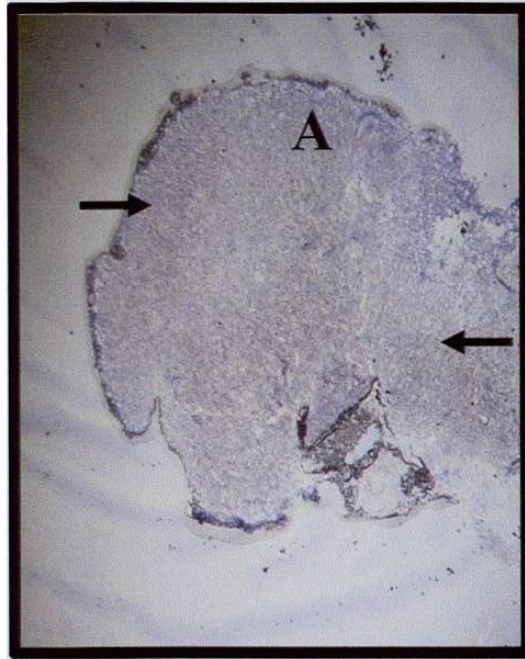


Figura 12. Expresión del gen POMC en la hipófisis murina. A corresponde a la parte de la adenohipófisis. Las flechas indican la expresión del gen POMC en la parte intermedia y distal de la adenohipófisis. (50X)

Analizando los datos que se obtuvieron del gen Nurr1 y comparándolos con los ya reportados del gen POMC podemos establecer una correlación, ya que ambos inician su expresión durante el desarrollo embrionario.

POMC inicia a los 12.5 días y Nurr1 lo hace a los 13.5, donde se observa que en esta fecha la expresión de POMC es incrementada, esto pudiera deberse a la influencia de Nurr1, ya que POMC puede ser activado por Nurr1 al menos en ensayos *in vitro*, mas sin embargo, esto no es concluyente, pero si podemos hablar de una coexpresión en la adenohipófisis entre estos genes.

Estudios previos reportan que el gen POMC se expresa en 2 regiones de la adenohipófisis: en la parte intermedia su expresión inicia a partir del día 14.5 y en la parte distal a partir del día 12.5 del desarrollo embrionario del ratón. De acuerdo a estos datos, se puede establecer que existe una correlación entre la expresión de ambos genes: *Nurr1* y POMC.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

El factor de transcripción *Nurr1* es esencial para la vida. La inactivación de este gen en un modelo animal murino es letal ya que los ratones recién nacidos mueren durante su primer día de vida, y además muestran apoptosis en sus neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

Nurr1 tiene una amplia expresión en el sistema nervioso central y además se expresa en el hígado, hueso, glándula adrenal. Más sin embargo, se desconoce su función en la mayoría de estos tejidos incluyendo la hipófisis, ya que también presenta una intensa expresión en esta glándula en etapa adulta. Los análisis de expresión realizados hasta la fecha, sugieren una participación del gen *Nurr1* a nivel neuroendocrino.

Para analizar la expresión del gen *Nurr1* en la hipófisis murina en etapa postnatal se utilizó la técnica de transcripción reversa-PCR. Los resultados de estos análisis nos confirmaron que la expresión del gen esta presente desde el nacimiento hasta la etapa adulta. Puesto que se observó la amplificación del gen *Nurr1* en las hipófisis de ratones a las 2, 4, 7 semanas y en recién nacido.

La hipófisis se forma a partir de dos primordios ectodérmicos: uno neural (neurohipófisis) y otro oral (adenohipófisis). El primordio llamado bolsa de Rathke que dará origen a la adenohipófisis, aparece a los 9 días de del desarrollo del embrionario murino. En el análisis

realizado para determinar el inicio de la expresión del gen *Nurr1*, observamos que la expresión del gen *Nurr1* comienza a partir del día 13.5 en la bolsa de Rathke y permanece una vez que se ha diferenciado. Cuando se analizó un día antes, a los 12.5 días, no hubo expresión. Para estos estudios se utilizó la técnica de hibridación *in situ* en embriones completos, ya que por su localización y tamaño del primordio sería bastante difícil aislarlo.

Conforme avanza el desarrollo embrionario, los primordios de la hipófisis se van diferenciando, hasta unirse y formar la estructura de esta glándula poco antes del nacimiento. Una de las dificultades que se presentó al realizar este trabajo fue la obtención de la hipófisis ya que su tamaño aproximado es de alrededor de 5 mm. Por ello, decidimos utilizar los genes marcadores de la adenohipófisis, para asegurarnos que estuviéramos obteniendo el tejido correcto, ya que la hipófisis de los ratones es muy pequeña y en el recién nacido es aún mayor la posibilidad de confundirla con tejido conectivo, aún y cuando la disección se realiza con la ayuda del estereomicroscopio. De esta manera, fue que confirmamos la obtención correcta del tejido y la extracción del ARNm ya que los oligonucleótidos utilizados se diseñaron a partir del ARNm de cada hormona.

Previos estudios *in vitro* han determinado que diferentes genes poseen elementos de respuesta para *Nurr1*, en su región promotora. Estos posibles genes blanco de *Nurr1* son: POMC (propiomelanocortina), CRF (factor liberador de Corticotropina) y CRF-BP (proteína unida al factor liberador de corticotropina), los cuales se sabe que tienen importancia en la regulación de las funciones del sistema neuroendocrino. Evidencias experimentales indican que efectivamente *Nurr1* induce la expresión tanto del gen POMC como del gen CRF (27, 54).

En cuanto al gen POMC se sabe que inicia su expresión en el día 12.5 en la región que dará origen a la parte distal de la adenohipófisis y a los 14.5 días aparece en la región que originará la parte intermedia de esta glándula. Los resultados obtenidos en los ensayos de hibridación *in situ* nos demuestran que existe una coexpresión del gen *Nurr1* y el gen POMC en tiempo y espacio en la adenohipófisis. Comparando estos datos con la expresión del gen *Nurr1* observada en este trabajo, podemos sugerir que quizás en alguna de estas regiones la expresión del gen POMC es influenciada por la expresión del gen *Nurr1*. Ya que de acuerdo a estudios previos de la expresión del gen POMC se reporta que su expresión inicia a los 12.5 días, pero a los 13.5 días muestra un incremento importante en su expresión, la cual coincide con el inicio de la expresión del gen *Nurr1*. Por el análisis de los resultados podemos sugerir una posible participación del gen *Nurr1* en la regulación del gen POMC en la adenohipófisis murina.

Ya que POMC inicia su expresión antes que el gen *Nurr1*, indica que su región promotora responde inicialmente a otros factores embrionarios, y esta respuesta podría ser incrementada con la aparición de *Nurr1*. Para comprobar esto sería necesario el analizar la expresión de POMC durante el desarrollo embrionario de ratones carentes de *Nurr1*.

En resumen es la primera vez que se reporta la expresión espacial y temporal de *Nurr1* durante el desarrollo embrionario, y su coexpresión con el gen POMC. *Nurr1* por ser un factor de transcripción, y expresarse desde una fase muy temprana del desarrollo embrionario, en la bolsa de Rathke podría estar influenciando la expresión de genes necesarios para el buen funcionamiento de la hipófisis.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos de este trabajo podemos concluir que:

1. El gen Nurr1 inicia su expresión al día 13.5 del desarrollo embrionario en la bolsa de Rathke y se mantiene hasta la etapa adulta.
2. Existe una coexpresión del gen Nurr1 y el gen POMC en la adenohipófisis.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

1. Stevens, A., *Histología Humana*. Segunda Edición ed, ed. H. Brace. 1998.
2. Gartner, L.P. and J.L. Hiatt, *Atlas de Histología* Segunda Edición ed, ed. Saunders. 1997.
3. Carlson, B.M., *Embriología Humana y Biología del desarrollo*. Segunda Edición ed, ed. H. Brace. 2000.
4. Moore, K.L. and T.V.N. Persaud, *Embriología Clínica*. Sexta Edición ed, ed. M. Graw-Hill. 1999.
5. Beato, M., J. Arnemann, G. Chalepakis, E. Slater, and T. Willmann, *Gene regulation by steroid hormones*. *J Steroid Biochem*. 1987. 27(1-3): p. 9-14.
6. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. *Science*. 1988. 240(4854): p. 889-95.
7. O'Malley, B.W. and M.J. Tsai, *Molecular pathways of steroid receptor action*. *Biol Reprod*. 1992. 46(2): p. 163-7.

8. Darimont, B.D., R.L. Wagner, J.W. Apriletti, M.R. Stallcup, P.J. Kushner, J.D. Baxter, R.J. Fletterick, and K.R. Yamamoto, *Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions*. *Genes Dev.* 1998. 12(21): p. 3343-56.
9. Moras, D. and H. Gronemeyer, *The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function*. *Curr Opin Cell Biol.* 1998. 10(3): p. 384-91.
10. Wilson, T.E., R.E. Paulsen, K.A. Padgett, and J. Milbrandt, *Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors*. *Science.* 1992. 256(5053): p. 107-10.
11. Aranda, A. and A. Pascual, *Nuclear hormone receptors and gene expression*. *Physiol Rev.* 2001. 81(3): p. 1269-304.
12. Wilson, T.E., T.J. Fahrner, and J. Milbrandt, *The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction*. *Mol Cell Biol.* 1993. 13(9): p. 5794-804.
13. Davis, I.J., T.G. Hazel, and L.F. Lau, *Transcriptional activation by Nurr77, a growth factor-inducible member of the steroid hormone receptor superfamily*. *Mol Endocrinol.* 1991. 5(6): p. 854-9.

14. Paulsen, R.E., C.A. Weaver, T.J. Fahmer, and J. Milbrandt, *Domains regulating transcriptional activity of the inducible orphan receptor NGFI-B*. *J Biol Chem*. 1992. **267**(23): p. 16491-6.
15. Baker, K.D., L.M. Shewchuk, T. Kozlova, M. Makishima, A. Hassell, B. Wisely, J.A. Caravella, M.H. Lambert, J.L. Reinking, H. Krause, C.S. Thummel, T.M. Willson, and D.J. Mangelsdorf, *The Drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway*. *Cell*. 2003. **113**(6): p. 731-42.
16. Milbrandt, J., *Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene*. *Neuron*. 1988. **1**(3): p. 183-8.
17. Law, S.W., O.M. Conneely, F.J. DeMayo, and B.W. O'Malley, *Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1*. *Mol Endocrinol*. 1992. **6**(12): p. 2129-35.
18. Ohkura, N., M. Hijikuro, A. Yamamoto, and K. Miki, *Molecular cloning of a novel thyroid/steroid receptor superfamily gene from cultured rat neuronal cells*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994. **205**(3): p. 1959-65.
19. Hard, T., E. Kellenbach, R. Boelens, B.A. Maler, K. Dahlman, L.P. Freedman, J. Carlstedt-Duke, K.R. Yamamoto, J.A. Gustafsson, and R. Kaptein, *Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain*. *Science*. 1990. **249**(4965): p. 157-60.

20. Kliewer, S.A., K. Umesono, D.J. Mangelsdorf, and R.M. Evans, *Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling*. *Nature*. 1992. 355(6359): p. 446-9.
21. Perlmann, T., P.N. Rangarajan, K. Umesono, and R.M. Evans, *Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs*. *Genes Dev*. 1993. 7(7B): p. 1411-22.
22. Maruyama, K., T. Tsukada, S. Bandoh, K. Sasaki, N. Ohkura, and K. Yamaguchi, *Expression of NOR-1 and its closely related members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily in human neuroblastoma cell lines*. *Cancer Lett*. 1995. 96(1): p. 117-22.
23. Bandoh, S., T. Tsukada, K. Maruyama, N. Ohkura, and K. Yamaguchi, *Mechanical agitation induces gene expression of NOR-1 and its closely related orphan nuclear receptors in leukemic cell lines*. *Leukemia*. 1997. 11(9): p. 1453-8.
24. Miyakoshi, J., T. Tsukada, S. Tachiiri, S. Bandoh, K. Yamaguchi, and H. Takebe, *Enhanced NOR-1 gene expression by exposure of Chinese hamster cells to high-density 50 Hz magnetic fields*. *Mol Cell Biochem*. 1998. 181(1-2): p. 191-5.
25. Pena de Ortiz, S. and G.A. Jamieson, Jr., *HZF-3, an immediate-early orphan receptor homologous to NURR1/NOT: induction upon membrane depolarization and seizures*. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996. 38(1): p. 1-13.

26. Zetterstrom, R.H., L. Solomin, T. Mitsiadis, L. Olson, and T. Perlmann, *Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1*. *Mol Endocrinol*. 1996. **10**(12): p. 1656-66.
27. Murphy, E.P. and O.M. Conneely, *Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/Nurr77 subfamily of nuclear receptors*. *Mol Endocrinol*. 1997. **11**(1): p. 39-47.
28. Calnan, B.J., S. Szychowski, F.K. Chan, D. Cado, and A. Winoto, *A role for the orphan steroid receptor Nurr77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection*. *Immunity*. 1995. **3**(3): p. 273-82.
29. Woronicz, J.D., B. Calnan, V. Ngo, and A. Winoto, *Requirement for the orphan steroid receptor Nurr77 in apoptosis of T-cell hybridomas*. *Nature*. 1994. **367**(6460): p. 277-81.
30. Woronicz, J.D., A. Lina, B.J. Calnan, S. Szychowski, L. Cheng, and A. Winoto, *Regulation of the Nurr77 orphan steroid receptor in activation-induced apoptosis*. *Mol Cell Biol*. 1995. **15**(11): p. 6364-76.
31. Li, H., S.K. Kolluri, J. Gu, M.I. Dawson, X. Cao, P.D. Hobbs, B. Lin, G. Chen, J. Lu, F. Lin, Z. Xie, J.A. Fontana, J.C. Reed, and X. Zhang, *Cytochrome c release and apoptosis*

- induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3*. *Science*. 2000. 289(5482): p. 1159-64.
32. Olson, L. and A. Seiger, *Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations*. *Z Anat Entwicklungsgesch*. 1972. 137(3): p. 301-16.
33. Scearce, L.M., T.M. Laz, T.G. Hazel, L.F. Lau, and R. Taub, *RNR-1, a nuclear receptor in the NGFI-B/Nurr77 family that is rapidly induced in regenerating liver*. *J Biol Chem*. 1993. 268(12): p. 8855-61.
34. Mages, H.W., O. Rilke, R. Bravo, G. Senger, and R.A. Kroczeck, *NOT, a human immediate-early response gene closely related to the steroid/thyroid hormone receptor NAK1/TR3*. *Mol Endocrinol*. 1994. 8(11): p. 1583-91.
35. Tetradis, S., O. Bezouglaia, and A. Tsingotjidou, *Parathyroid hormone induces expression of the nuclear orphan receptor *Nurr1* in bone cells*. *Endocrinology*. 2001. 142(2): p. 663-70.
36. Lee, S.L., R.L. Wesselschmidt, G.P. Linette, O. Kanagawa, J.H. Russell, and J. Milbrandt, *Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (*Nurr77*)*. *Science*. 1995. 269(5223): p. 532-5.

37. DeYoung, R.A., J.C. Baker, D. Cado, and A. Winoto, *The orphan steroid receptor Nurr77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis*. J Biol Chem. 2003. 278(47): p. 47104-9.
38. Ponnio, T., Q. Burton, F.A. Pereira, D.K. Wu, and O.M. Conneely, *The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear*. Mol Cell Biol. 2002. 22(3): p. 935-45.
39. Saucedo-Cardenas, O. and O.M. Conneely, *Comparative distribution of NURR1 and NURR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system*. J Mol Neurosci. 1996. 7(1): p. 51-63.
40. Saucedo-Cardenas, O., J.D. Quintana-Hau, W.D. Le, M.P. Smidt, J.J. Cox, F. De Mayo, J.P. Burbach, and O.M. Conneely, *Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. 95(7): p. 4013-8.
41. Saucedo-Cardenas, O., R. Kardon, T.R. Ediger, J.P. Lydon, and O.M. Conneely, *Cloning and structural organization of the gene encoding the murine nuclear receptor transcription factor, NURR1*. Gene. 1997. 187(1): p. 135-9.
42. Zetterstrom, R.H., R. Williams, T. Perlmann, and L. Olson, *Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role*

- in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system.* Brain Res Mol Brain Res. 1996. 41(1-2): p. 111-20.
43. Backman, C., T. Perlmann, A. Wallen, B.J. Hoffer, and M. Morales, *A selective group of dopaminergic neurons express Nurr1 in the adult mouse brain.* Brain Res. 1999. 851(1-2): p. 125-32.
44. Wallen, A., R.H. Zetterstrom, L. Solomin, M. Arvidsson, L. Olson, and T. Perlmann, *Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in NURR1 mutant mice.* Exp Cell Res. 1999. 253(2): p. 737-46.
45. Witta, J., J.S. Baffi, M. Palkovits, E. Mezey, S.O. Castillo, and V.M. Nikodem, *Nigrostriatal innervation is preserved in Nurr1-null mice, although dopaminergic neuron precursors are arrested from terminal differentiation.* Brain Res Mol Brain Res. 2000. 84(1-2): p. 67-78.
46. Aarnisalo, P., C.H. Kim, J.W. Lee, and T. Perlmann, *Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nurr1.* J Biol Chem. 2002. 277(38): p. 35118-23.
47. Perlmann, T. and L. Jansson, *A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1.* Genes Dev. 1995. 9(7): p. 769-82.

48. Sacchetti, P., H. Dwornik, P. Formstecher, C. Rachez, and P. Lefebvre, *Requirements for heterodimerization between the orphan nuclear receptor Nurr1 and retinoid X receptors.* J Biol Chem. 2002. 277(38): p. 35088-96.
49. Wilson, T.E., T.J. Fahrner, M. Johnston, and J. Milbrandt, *Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast.* Science. 1991. 252(5010): p. 1296-300.
50. Pirih, F.Q., A. Tang, I.C. Ozkurt, J.M. Nervina, and S. Tetradis, *Nuclear orphan receptor Nurr1 directly transactivates the osteocalcin gene in osteoblasts.* J Biol Chem. 2004. 279(51): p. 53167-74.
51. Bassett, M.H., T. Suzuki, H. Sasano, P.C. White, and W.E. Rainey, *The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production.* Mol Endocrinol. 2004. 18(2): p. 279-90.
52. Lammi, J., J. Huppunen, and P. Aarnisalo, *Regulation of the osteopontin gene by the orphan nuclear receptor NURR1 in osteoblasts.* Mol Endocrinol. 2004. 18(6): p. 1546-57.
53. Sakurada, K., M. Ohshima-Sakurada, T.D. Palmer, and F.H. Gage, *Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain.* Development. 1999. 126(18): p. 4017-26.

54. Murphy, E.P., A.D. Dobson, C. Keller, and O.M. Conneely, *Differential regulation of transcription by the NURR1/NURR77 subfamily of nuclear transcription factors*. *Gene Expr.* 1996. **5**(3): p. 169-79.

55. Kovalovsky, D., D. Refojo, A.C. Liberman, D. Hochbaum, M.P. Pereda, O.A. Coso, G.K. Stalla, F. Holsboer, and E. Arzt, *Activation and induction of NURR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways*. *Mol Endocrinol.* 2002. **16**(7): p. 1638-51.



DONA ○

