



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**Generación de un modelo para estudiar  
la participación de Nurr1 y Nur77 en la  
muerte de neuronas dopaminérgicas  
asociada al Parkinson**

**TESIS**

que para obtener el grado académico de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**Brenda Sarquiz Martínez**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles



CUERNAVACA, MOR. 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*“No hay ninguna gran tarea difícil que no se pueda  
descomponer en pequeñas tareas fáciles”*

**PROVERBIO BUDISTA**

A mi padre, mi madre y mi hermanita...  
por compartir sueños, edificar proyectos  
y afrontar temores conjuntamente.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Covarrubias Robles, por permitirme realizar bajo su asesoría un acercamiento más sólido a la investigación científica, por enseñarme a ver siempre con ojos críticos cada etapa de la misma.

Agradezco también a mis sinodales: al Dr. Julio Morán, a las Dras. Leda Torres, Leonor Pérez y Viviana Valadez, quienes mostraron un grato interés por mi trabajo y me ofrecieron valiosos comentarios e importantes observaciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme un espacio donde aprender y poder desarrollarme en el ámbito de la investigación.

A CONACYT, por haberme apoyado económicamente durante el transcurso de la maestría.

A David, por ser mi "teacher", por enseñarme a trabajar dentro del laboratorio; por impulsarme a exigirme cada día más. Por todo su apoyo, paciencia y amistad.

A todos los miembros del "labo": Conchita, Osiris, Irma, Manuel, Rocío Hernández, Andrea, Rodrigo, Rocío Rodríguez, Renaud, Xico y Pedro por el apoyo, la asesoría, por todos los pasteles y las risas compartidas. A Graciela y a Cármen por su apoyo al tener el material y reactivos cuando los solicitaba.

A Héctor y Ángel, por su apoyo y guía en muchos experimentos, por las cenas y fines de semana llenos de risas, por todos aquellos momentos para recordar.

A la Unidad de Síntesis por su amabilidad y su disposición ante mis dudas.

A Maribel y Gloria de la Unidad de Docencia, por su amabilidad y disposición con todos los trámites necesarios durante el transcurso de la maestría.

En la otra cara...

Agradezco a mi madre, cuyo incansable sentido de lucha y amor nunca dejaron de motivarme, por su dulzura, simplemente por ser. A mi padre, con quien he aprendido que nunca es suficiente el conocimiento, que una vez que la mente se expande nunca regresa a su estado inicial, por ser motor y soporte, por ser un ejemplo de esfuerzo. A mi hermanita Nadia, por una infancia llena de felicidad, porque es en ella donde encuentro mi reflejo.

Gracias a todos mis tíos, tías, primos, primas y abuelas, por su apoyo y por estar siempre al pendiente del recorrer de mi camino.

Agradezco a todas aquellas almas con quien he recorrido grandes momentos en mi vida, mis amigos...

A Alejandra (feru mayor), mi compañera, mi hermana, porque el lazo que nos une es irrompible, por su inspirable fortaleza y optimismo ante la vida. A Israel, porque el lado bueno de la vida tiene como sinónimo su nombre. A Vane, porque es su espíritu quien me lleva y donde encuentro libertad. A Fredy, reflejo de mi alma y espíritu, porque su sentir es inspiración y su existencia mi "amigdalitis de Tarzán". Por ser cómplice (mi mitad) a lo largo del camino donde se abre un quizás.

A mis amigos del camino "cuernavacuno"...

A Edna, porque con ella la amistad rompe fronteras y refuerza lazos. A Ivette, por ser apoyo, hombro y fuerza. A Magaly, porque aquellos momentos de "reflexión" son inigualables, porque nuestras brújulas siempre estén apuntando a destinos en

común. A Iskra, por que todas esas desveladas llenas de estudio y carcajadas fueron un placer. A Paty, por haber construido de un espacio nuestra casa, por sus cuidados y atenciones. A todas ellas, porque en algún momento nos encontremos en "nuestra Toscaza". A Fernando y Mario (Pachón), porque su visión "ligera" de la vida y de todo este difícil camino me hicieron dar grandes respiros.

A mis fieles escuderos...

A Hazael, mi hermanito, porque a pesar de los tropiezos y lo duro que pueda ser, al final del camino nuestras vidas se encuentran, rien, sueñan y comparten. A Roberto, por su amistad a prueba de daño, por su incansable espíritu alegre y aventurero con quien es un placer convivir. A Claudio, porque es en su mente donde la perseverancia y empeño tiene lugar. A Elena, por compartir sentimientos, dudas y alegrías, porque cada palabra, cada mensaje son fuente de inspiración inagotable. A Mónica, porque su amistad y cariño es a prueba de todo. A Alfredo, por mostrarme las diferentes caras de la vida, por su sensatez y bondad que enternecen, por su espiritualidad que brinda paz, por acompañarme dulcemente en caminos difíciles.

# ÍNDICE

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	1
<b>Lista de figuras</b> .....	2
<b>Lista de tablas</b> .....	4
<b>1. Introducción</b> .....	5
1.1 Inducción neural <i>in vivo</i> .....	5
1.1.1 Desarrollo de neuronas dopaminérgicas.....	6
1.1.2 Diferenciación postmitótica de neuronas-DA. Genes involucrados.....	7
1.2. Células troncales con potencial dopaminérgico y subdiferenciación <i>in vitro</i> .....	11
1.2.1 Diferenciación neuronal dopaminérgica a partir de las ES.....	11
a) Inducción neuronal y neurogénesis en monocultivo.....	12
b) Co-cultivo de células troncales embrionarias (ES) con células estromales (Protocolo SDIA.....	12
c) Neurogénesis basada en el desarrollo embrionario.....	13
1.3. Enfermedad de Parkinson.....	13
1.3.1. Características.....	13
1.3.2. Naturaleza causal del Parkinson.....	14
1.4. Nur77, un receptor huérfano nuclear involucrado en muerte celular.....	15
1.4.1. Características de los receptores nucleares huérfanos. El caso de la subfamilia NR4A.....	15
1.4.2. El papel de Nur77 en la muerte neuronal no apoptótica. Posible implicación en enfermedad de Parkinson. ....	18
<b>2. Antecedentes</b> .....	20
2.1. Modelos de estudio de la enfermedad de Parkinson.....	20
2.1.1. Modelos animales.....	20
2.1.2. Modelos genéticos.....	20
a) Ratón mutante para $\alpha$ -sinucleína.....	21
b) Ratón nulo para Parkina.....	21
c) Ratón nulo para DJ-1.....	22
d) Ratón nulo para Nurr1.....	22
e) Ratón nulo para Pitx3/Aphakia.....	22

2.1.3. Modelos basados en células ES.....	22
2.1.4. Modelos basados en neurotoxinas.....	23
<b>3. Justificación.....</b>	<b>26</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>28</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>28</b>
<b>6. Materiales y métodos.....</b>	<b>29</b>
6.1. Generación de plásmidos de expresión constitutiva de Nurr1 y Nur77.....	29
6.1.1. Subclonación de fragmentos de DNA.....	29
6.2. Generación de líneas celulares.....	30
6.2.1. Cultivo y transfección de células HEK293T.....	31
6.2.2. Cultivo de células STO y preparación de células alimentadoras por inactivación mitótica (“feeders”).....	32
6.2.3. Cultivo de células ES.....	33
6.2.4. Congelación y descongelación de células.....	34
6.3.5. Electroporación de células ES.....	35
6.3. Producción de neuronas dopaminérgicas. Protocolo de diferenciación.....	37
6.3.1 Formación de cuerpos embrionarios (EBs).....	38
6.3.2. Selección de células positivas para nestina (precursores neurales).....	39
6.3.3. Expansión de células positivas para nestina.....	39
6.3.4. Diferenciación de neuronas dopaminérgicas.....	40
6.4. Detección de niveles de expresión de Nurr1 y Nur77.....	40
6.4.1. RT-PCR.....	40
6.4.2. Western blot.....	42
6.4.2.1. Extractos de proteína.....	42
6.4.2.2. Electroforesis de proteínas en gel desnaturalizante (SDS-PAGE).....	42
6.4.2.3. Western Blot para Nurr1 y Nur77.....	43
6.4.3. Inmunocitoquímica.....	44
<b>7. Resultados.....</b>	<b>45</b>
7.1. Generación de plásmidos de expresión de Nur77 y Nurr1.....	45
7.2. Selección y establecimiento de líneas celulares que expresen Nur77 y Nurr1...47	47



<b>8. Discusión.....</b>	<b>56</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>61</b>
<b>10. Perspectivas.....</b>	<b>62</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>63</b>
<b>12. Anexos: Soluciones , medios de cultivo y tablas.....</b>	<b>70</b>

## ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
AADC	Descarboxilasa de $\alpha$ -aminoácidos carboxílicos
CMV-CBA	Citomegalovirus “enhancer”/promotor “chicken- $\beta$ -actin”
DAT	Transportador de la dopamina
DV	Eje Dorso-Ventral
EB	Cuerpo embrionario
En 1-2	Engrailed 1 y 2
ES	Células troncales embrionarias
ES-Nurr1	Células troncales que expresan Nurr1
ES-Nur77	Células troncales que expresan Nur77
ES-Wt	Células troncales embrionarias silvestres
Fgf	Factor de crecimiento fibroblástico
hES	Células troncales embrionarias humanas
ICM	Masa celular interna
IsO	Organizador del Istmo
LB	Cuerpo de Lewy
LIF	Factor inhibidor de leucemia
MAO-B	Monoamino oxidasa $\beta$
MPTP	Toxina parkinsoniana real
NBRE	Elemento responsivo a NGFI-B (Nur77)
Neuronas-DA	Neuronas dopaminérgicas
NGF	Factor de crecimiento neural
NRs	Receptores nucleares
NurRE	Elemento responsivo a Nur
pCMV	Promotor del citomegalovirus
Pitx3	gen “pituitary homebox 3”
RC	Eje Rostro-Caudal
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
ROS	Especies reactivas al oxígeno
RXR	Receptor del ácido retinoico
SDIA	Actividad inductora de diferenciación neural
SNC	Sistema nervioso central
Shh	Sonic Hedgehog
SN	Sustancia nigra
SP	Sustancia P
TE	Trofectodermo
Tgf- $\beta$	Factor transformante $\beta$
TH	Tirosina hidroxilasa
UPS	Sistema ubiquitin-proteasoma
VTA	Zona tegmental ventral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Señales inductivas durante el desarrollo del tubo neural.....	6
<b>Figura 2.</b> La interacción entre señales anteroposteriores y dorsoventrales especifica identidades neuronales en la frontera mes-met.....	7
<b>Figura 3.</b> Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo del ratón.....	8
<b>Figura 4.</b> Vía biosintética de las catecolaminas.....	10
<b>Figura 5.</b> Inducción neural por medio de actividad inducida derivada de células estromales PA6 (SDIA).....	12
<b>Figura 6.</b> Protocolo de 5 etapas para promover la neurogénesis a partir de células ES.....	13
<b>Figura 7.</b> Mecanismos de neurodegeneración.....	15
<b>Figura 8.</b> Estructura de los receptores nucleares huérfanos.....	16
<b>Figura 9.</b> Metabolismo del MPTP.....	24
<b>Figura 10.</b> Esquema del protocolo de diferenciación dopaminérgicas a partir de células ES.....	38
<b>Figura 11.</b> Plásmidos de expresión constitutiva de Nur77 y Nurr1 bajo el promotor de CMV-CBA.....	45
<b>Figura 12.</b> Expresión transitoria de CMV-CBA/Nurr1 y CMV-CBA/Nur77 en células HEK293T.....	45
<b>Figura 13.</b> Niveles de expresión del RNAm Nurr1 y Nur77 exógeno en células HEK293T en análisis por RT-PCR.....	46
<b>Figura 14.</b> Niveles de expresión de Nurr1 y Nur77 en células 293 mostrados en análisis por Western Blot.....	46
<b>Figura 15.</b> Niveles de expresión de expresión del RNAm en clones de Nurr1 y Nur77 constitutivos.....	47

<b>Figura 16.</b> Niveles de expresión de Nurr1 y Nur77 en clonas seleccionadas.....	48
<b>Figura 17.</b> Expansión de células ES silvestres y de clonas seleccionadas de Nurr1 y Nur77.....	49
<b>Figura 18.</b> Desarrollo de cuerpos embrionarios (EBs) y detección del RNAm Nurr1 y Nur77 en células silvestres y clonas.....	50
<b>Figura 19.</b> Etapa de selección del protocolo de diferenciación en la línea AB2.2 y clonas seleccionadas con expresión estable de Nurr1 y Nur77.....	51-52
<b>Figura 20.</b> Etapa de expansión.....	53
<b>Figura 21.</b> Etapa de diferenciación.....	54-55

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Zona de Expresión y Fenotipo de mutantes nulos para los receptores nucleares huérfanos Nurr1, Nor1 y Nur77.....	17
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos utilizados para detección de la expresión de genes por RT-PCR.....	77
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos primarios.....	78
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpo secundarios.....	78

## RESUMEN

Nurr1 y Nur77 son receptores nucleares pertenecientes a la superfamilia de factores transcripcionales NR4A que controlan una amplia variedad de procesos del desarrollo, fisiológicos y de conducta. Según diversos reportes, Nurr1 y Nur77 pueden unirse al mismo elemento responsivo. Estos genes han sido implicados en una amplia variedad de procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación, y muerte celular. Se expresan como genes tempranos en diferentes tipos celulares siguiendo varios estímulos y dependiendo de ellos es su actividad. Nurr1 se expresa mayoritariamente en las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, las células que se mueren en la enfermedad de Parkinson. Su ausencia en el ratón resulta en la pérdida de dichas neuronas, así como la muerte del animal debido a una disminución motora que le impide succionar leche. Nur77 se encuentra en la corteza, cerebelo, hipocampo, bulbo olfatorio y de manera significativa en el estriado. El ratón mutante para Nur77 no muestra fenotipo, sugiriendo la existencia de proteínas redundantes con funciones similares a Nur77. Diversos autores han implicado a Nurr1 en el desarrollo y mantenimiento del fenotipo neuronal dopaminérgico, así como en la sobrevivencia de sus precursores neurales; sin embargo, el mecanismo por el cual Nurr1 promueve la diferenciación neuronal aun no está claro. Por su parte, Nur77 ha sido ampliamente estudiado en la muerte apoptótica y, recientemente, también se ha implicado en la activación de la muerte no-apoptótica. Considerando entonces que en la neurodegeneración la muerte celular no es predominantemente apoptótica, y el hecho de que Nur77 en su forma fosforilada participa en un tipo de muerte no apoptótica en células neuronales, pudiera ser que Nur77, a través de modificaciones postraduccionales que le ocurren, participe como mediador de los factores causantes de la neurodegeneración en padecimientos como la enfermedad de Parkinson. Por otro lado, debido a que Nurr1 y Nur77 pueden unirse al mismo elemento responsivo, Nurr1 pudiera hacer susceptibles a las propias neuronas-DA a morir, denotando una actividad similar a la de Nur77. Así entonces, Nurr1 o Nur77 podrían contribuir a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la enfermedad de Parkinson. Nuestro trabajo consiste en generar líneas de células troncales embrionarias que expresen Nurr1 y Nur77 constitutivamente (células ES-Nurr1 y ES-Nur77, respectivamente), ya que de esta manera se puede analizar la protección o la sensibilidad que pudiera brindarle Nurr1 o Nur77 a las neuronas dopaminérgicas derivadas de dichas células. La expresión constitutiva de Nur77 nos puede mostrar que Nurr1 y Nur77 pueden activar los mismos genes, y por tanto sus funciones *in vivo* pudieran ser similares, aunque en diferentes tipos o contextos celulares. Los resultados obtenidos muestran que el proceso de diferenciación se desarrolló de forma habitual, observándose una tasa de crecimiento acelerado aparente de las células ES-Nurr1 y ES-Nur77 en comparación con las células ES silvestres (Wt); sin embargo, el número obtenido de células Tub<sup>+</sup> de las ES-Nurr1 fue mayor a las Wt y las de ES-Nur77 fue menor. Nestina (un marcador de precursor neural) se expresó en todas las líneas sin embargo, la TH (tirosin hidroxilasa, un marcador de neuronas dopaminérgicas) se expresó de forma diferencial entre las líneas y en comparación con las Wt: en las clonas de Nurr1 se observó un incremento de un promedio 1.6 veces, mientras que las de Nur77 disminuyen a más de la mitad. Por tal motivo, podría pensarse que la sobre-expresión de Nur77 bloquea la diferenciación hacia el fenotipo dopaminérgico mediante un secuestro de Nurr1 endógeno por Nur77 exógeno, o induce muerte durante el proceso de la diferenciación neuronal o en las mismas neuronas dopaminérgicas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Inducción neural *in vivo*

El desarrollo de los mamíferos placentados está definido por 3 fases: la **preimplantación**, que ocurre en el oviducto, no es dependiente de la madre y culmina con la formación del blastocisto; la fase de **implantación**, que resulta de las interacciones adhesivas entre el blastocisto y el útero, y marca el comienzo del período dependiente de la madre; y finalmente la fase de **postimplantación**, que incluye la gastrulación, formación de la placenta, organogénesis y crecimiento (Downs 2001).

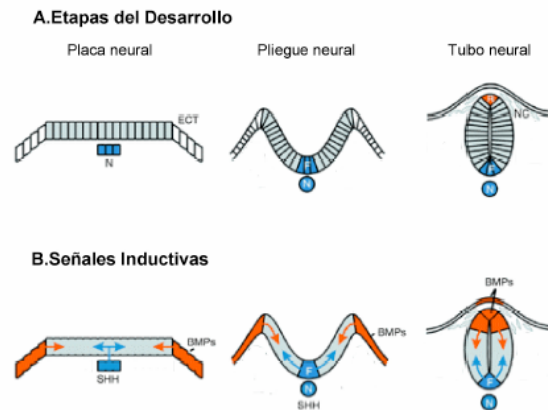
El primer evento de diferenciación en el desarrollo embrionario es la formación del *blastocisto*, que se encuentra constituido por el trofotodermo (TE), formado de células polarizadas; la masa celular interna (ICM, inner cell mass), con células no polarizadas; y una cavidad llamada blastocele. Los derivados del TE formarán células requeridas para la implantación y los componentes del disco coriónico, mientras que la ICM originará el *hipoblasto* (endodermo primitivo) y el *epiblasto* (ectodermo primitivo), siendo de este último de donde surgirá el linaje neural (revisado en Gilbert 2003).

Durante la gastrulación el epiblasto genera el surco primitivo. Mientras este se va expandiendo hacia el extremo distal del embrión, las células del epiblasto se translocan dentro de él, emergiendo como mesodermo. Finalmente el surco primitivo, cuando alcanza el extremo distal del embrión, se condensa para formar el **nodo** (también llamado *organizador*, por su habilidad de inducir tejido neural). Este promueve la formación de una capa interna endodérmica, una mesodérmica y un ectodermo externo. El mesodermo dorsal dirige al ectodermo a la parte anterior del embrión, promoviendo la formación del neuroectodermo, es decir, su **neuralización** (revisado en Downs 2001).

La inducción neural ocurre debido a la interacción entre las cascadas de señalización de los factores de crecimiento fibroblástico (Fgfs), las proteínas *Wnt* y de las pertenecientes a gradientes de concentración de una subfamilia de los *Tgf- $\beta$*  (*Bmps*). La señalización de estas últimas es inhibida en el ectodermo embrionario por sus antagonistas (*Noggin*, *Chordin*), evitando la inducción epidermal y permitiendo su neuralización. Es entonces cuando la porción central del ectodermo comienza a pseudoestratificarse y diferenciar hacia la **placa neural**. Esta va cambiando morfológicamente debido a la interacción de las fuerzas de las células localizadas en ella (fuerzas intrínsecas) y de los tejidos adyacentes (fuerzas extrínsecas), como la epidermis. La placa neural comienza a invaginarse por la línea media, formando progresivamente un surco profundo y dos pliegues neurales que al fusionarse formarán el **tubo neural** (Tanabe y Jessel 1996) (figura 1). Ambos, la placa y el tubo neurales, poseen precursores neurales, células multipotentes que se caracterizan por expresar marcadores como *nestina*, *musashi*, *Sox1*, *Sox2*, y la molécula de adhesión N-CAM. Posteriormente, estos diferenciarán a los principales tipos celulares del sistema nervioso central (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos), así como del periférico (revisado en Gilbert 2003).

A continuación, el tubo neural es polarizado a lo largo del eje dorso-ventral (DV). El patrón ventral es impuesto por la notocorda, mientras que el dorsal es inducido por la epidermis. La especificación del eje DV es iniciado por dos factores: Sonic hedgehog (*Shh*), secretado por la notocorda, quien contribuye a la adquisición de diversos destinos celulares de la mayor parte de la porción ventral del tubo neural; y las

proteínas de la familia  $TGF-\beta$  (*Bmp2*, *Bmp4* y *Bmp7*), que dan identidad dorsal (figura 1).



**FIGURA 1. Señales inductivas durante el desarrollo del tubo neural.** A. Etapas del desarrollo del tubo neural: La placa neural se genera como un epitelio columnar al que subyacen células del mesodermo axial de la notocorda (N) y flanquea el ectodermo epidérmico (ECT). Durante la neurulación, la placa neural se invagina por la línea media conformando a los pliegues neurales y a la placa del piso (F). El tubo neural se forma por medio de la fusión de las puntas dorsales de los pliegues neurales, generando a la placa del techo en su línea media dorsal (R) y a células de la cresta neural (NC), quienes emigran desde el tubo neural dorsal. B. Shh proveniente de la notocorda y de la placa del piso del tubo neural interactúa con los Bmps que surgen del ectodermo epidérmico y de la placa del techo, estableciendo gradientes que instruyen a las células neuroepiteliales hacia linajes neuronales ubicados en distintos niveles del eje dorso-ventral (modificada de Tanabe *et al.*, 1996).

El tubo neural temprano de los mamíferos es una estructura continua, sin embargo antes de que la porción posterior sea formada, la región anterior sufre cambios drásticos generando las 3 vesículas primarias: el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo. Posteriormente, estas darán lugar a las vesículas secundarias: del prosencéfalo surgirán el telencéfalo y diencefalo; el mesencéfalo formará una con el mismo nombre; y del rombencéfalo se generarán el metencéfalo y mielencéfalo.

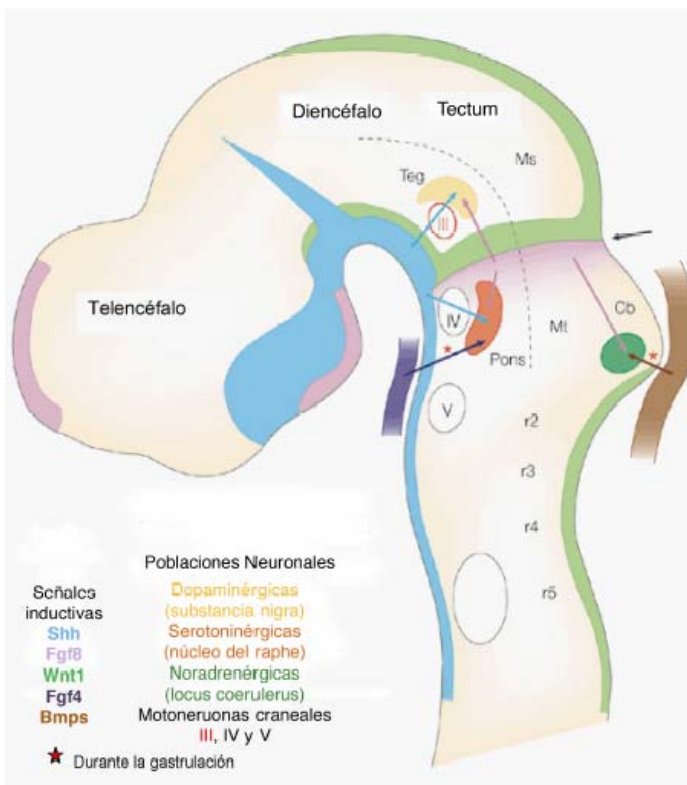
### 1.1.1 Desarrollo de neuronas dopaminérgicas

Diversos tipos de células neuronales son generados en el sistema nervioso a partir de progenitores neurales. La identidad posicional de éstos se logra vía gradientes de moléculas señalizadoras secretadas a través de los ejes dorso-ventral (DV) y rostro-caudal (RC) del tubo neural; además, existen unos organizadores secundarios que actúan como centros locales para refinar el número de poblaciones celulares a nivel RC. Una vez que esta tasa neuronal ha sido determinada por esas señales extrínsecas entran en acción señales intrínsecas —frecuentemente factores de transcripción— para fomentar la diferenciación a neuronas maduras y postmitóticas (Maxwell, 2005).

Las neuronas-DA son generadas en la vecindad de dos centros organizadores: la placa del piso y el organizador del Istmo (IsO, isthmie organizer), este último localizado en la frontera del mesencéfalo y rombencéfalo, y cuya posición determina la localización y tamaño de la población de las neuronas-DA (Brodski et al, 2003) (figura 2).



Diversos estudios muestran que en el desarrollo del ratón, los progenitores de las neuronas-DA se especifican antes del 11° día embrionario (E11, Embryonic day 11). Posteriormente, el fenotipo dopaminérgico se logra debido a la intersección de 2 proteínas señaladoras *Shh*, secretado a partir de la placa del piso, y *Fgf8*, secretado en la cercanía del IsO, lo que crea un centro inductivo para los progenitores de neuronas-DA justo en el lado rostral del IsO. Se ha demostrado que *Shh* es necesario y suficiente para la inducción de neuronas-DA a lo largo del eje DV, mientras que *Fgf8* es responsable de su posición a lo largo del eje antero-posterior del tubo neural (revisado en Wurst y Bally-Cuif, 2001). Maxwell (2005) menciona que *Fgf8* funciona también para inducir y mantener la expresión de genes reguladores tempranos. Ambos factores pueden actuar en la proliferación y sobrevivencia de los precursores neurales, pero su función en el caso de la diferenciación dopaminérgica es aún desconocido (Ye et al, 1998) (figura 2).



**FIGURA 2.** La interacción entre señales anteroposteriores y dorsoventrales especifica identidades neuronales en la frontera mes-met. Visión sagital de un ratón en el estadio E11 con el extremo anterior a la izquierda. Las señales inductivas (representadas por flechas) se originan de la placa neural a nivel de la frontera mes-met (*Fgf8*) y de la placa del piso (*Shh*), al igual que de tejidos no neurales durante la gastrulación (*Fgf4* y *Bmps*). Las neuronas dopaminérgicas en el *tegmentum* requieren de una combinación de *Shh* y *Fgf8*. Las neuronas serotoninérgicas en el puente, responden a *Fgf4* y posteriormente a *Fgf8* y *Shh*. Las neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus* requieren de *Fgf8* y *Bmp4*. La flecha negra indica la frontera mes-met. (Bmp, "bone morphogenetic protein"; Fgf, factor de crecimiento fibroblástico; *Shh*, "sonic hedgehog"; Cb, cerebelo; Ms, mesencéfalo; Mt, metaencéfalo; r, rombómeros; Teg, *tegmentum*) (modificada de Wurst y Bally-Cuif, 2001).

### 1.1.2 Diferenciación postmitótica de neuronas-DA. Genes involucrados

Las neuronas dopaminérgicas (neuronas-DA) se ubican en diferentes zonas del cerebro, tales como el bulbo olfatorio, la retina, el hipotálamo, y residiendo la mayor parte de ellas (75%) en la parte ventral del mesencéfalo; ya dentro de esta zona se localizan en la **sustancia nigra** (SN) y la **zona tegmental ventral** (VTA, ventral tegmental area). Las neuronas de la SN se proyectan al estriado dorsolateral, el putamen caudado, formando así la vía nigroestriatal, involucrada en el control del movimiento (Perlmann y Mackenzie, 2004).

Las primeras neuronas-DA postmitóticas aparecen alrededor del E10.5 en ratón y, según diversos estudios en el desarrollo del cerebro de rata, la mayoría de las células del sistema dopaminérgico emergen entre E11-15, mostrando un pico entre E13-14 en la SN, y entre E14-15 para la VTA (Maxwell, 2005). Una vez formadas las neuronas-DA, migran a posiciones medias y laterales del cerebro medio.

El mecanismo de desarrollo y diferenciación de las neuronas-DA es regulado por varios genes y factores de transcripción como *Lmx1b*, *Pitx3* y *En1/2*, el receptor nuclear *Nurr1* (figura 3), incluyendo los factores solubles *Shh* y *Fgf8* (como ya se había mencionado, involucrados en la formación de los progenitores dopaminérgicos).

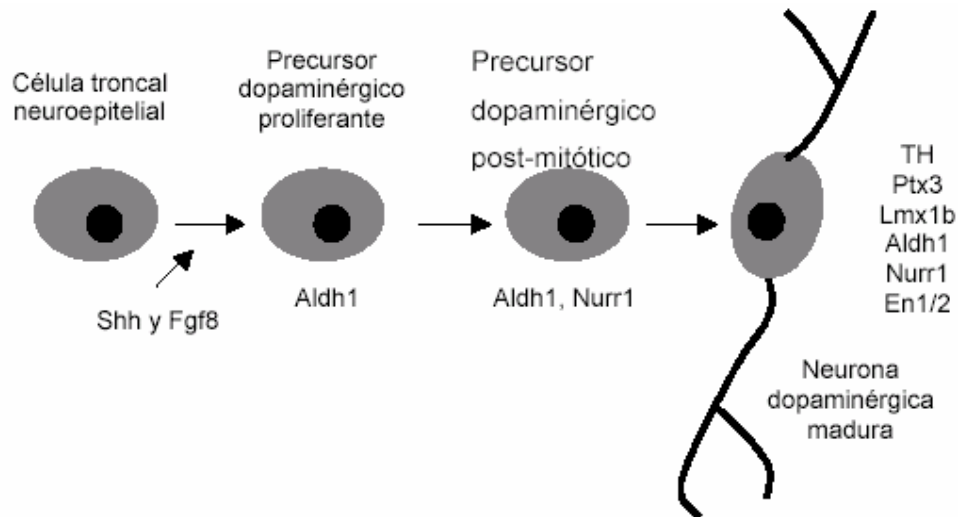


FIGURA 3. Desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo del ratón. *Shh* y *Fgf8* especifican a la célula precursora dopaminérgica proliferante que expresa a la *Aldh1*. Cuando estas células se convierten en post-mitóticas se induce la expresión de *Nurr1* seguida de *En1* y *En2* (modificada de Wallén y Perlmann, 2003).

### ***Lmx1b***

Este factor se expresa en el SNC y en la periferia, donde es necesario para el patrón dorso-ventral. Es detectado a partir del E7.5 en ratón a lo largo del mesencéfalo y diencéfalo. Es un factor con homeodominio Lim 1B que se localiza en la SN y VTA alrededor del E12. Estudios recientes han revelado que el ratón nulo para *Lmx1b* muestra un desarrollo defectuoso de neuronas-DA. Alrededor del E12.5 se observa una reducción en el número de neuronas TH+ (tirosin hidroxilasa positivas) y ausencia de la expresión de *Pitx3*. Sin embargo, la expresión de *Nurr1* se encuentra intacta (Smidt et al, 2000). A pesar de lo anterior, su participación en el desarrollo de neuronas-DA aun no se ha determinado.

### ***Pitx3***

El factor de transcripción “pituitary homebox” (*Pitx3*) es una proteína que dentro del SNC se expresa exclusivamente en neuronas-DA en el E11.5 en ratón. El ratón nulo para *Pitx3* muestra un fenotipo llamado *Aphakia*. Este muestra una pérdida de células que expresan TH —enzima limitante en la biosíntesis de las catecolaminas: dopamina, adrenalina y noradrenalina (figura 4) —en la SN, y las de la VTA están afectadas en

menor grado. Al respecto, Van Den Munckhof et al (2004) sugiere que la pérdida en la SN se debe a una expresión diferencial de *Pitx3* en la parte ventral de la SN. A pesar de ello, resulta intrigante el hecho de que los defectos en *Aphakia* sean específicos de la SN siendo que *Pitx3* se expresa tanto en esta como en VTA; sugiriendo de esta manera que podría existir una dependencia diferencial de *Pitx3* por diversas neuronas-DA (Maxwell, 2005).

Se ha propuesto que *Pitx3* puede participar en la inducción de la expresión de TH al unirse a los elementos responsivos y activar el promotor de la misma (Lebel et al, 2001). Por otro lado, cuando se sobreexpresa *Pitx3* no se observan efectos en la expresión de marcadores de las neuronas-DA. Al respecto, Cazorla et al (2000) sugiere que *Nurr1* y *Pitx3* podrían cooperar para regular la expresión de TH. Esto implica que *Pitx3* requiere factores específicos para regular la expresión de ellos, pudiendo estar involucrado en el mantenimiento de la expresión de la TH.

### ***Engrailed 1 y 2***

*Engrailed* es un factor de transcripción que en los vertebrados tiene 2 homólogos, *En1* y *En2*. Ambos se expresan en el cerebro de ratón en E8 a un lado del Iso. Ya en el adulto su expresión es más limitada, encontrándose *En1* en la SN y VTA en niveles altos, mientras que *En2* es expresado en bajos niveles y restringido a un grupo de células que expresan *En1*.

En el ratón nulo para *En1* se observan defectos en el cerebro durante su desarrollo, sin embargo las neuronas-DA están presentes y *En2* se expresa en grandes cantidades (Simon et al, 2001). En contraste, en ratones mutantes en ambos (*En1*\2) muestran en E13 neuronas TH positivas con señales de apoptosis, y en E14 se observa una completa ausencia de neuronas-DA tanto en la SN como en VTA. Otros defectos son la pérdida del Iso y niveles reducidos de *Fgf8* y *Shh*. Por todo esto, resulta complicado hacer conclusiones sobre la función de *En1*\2 en el desarrollo de las neuronas-DA, ya que estructuras claves del mesencéfalo y factores de señalización importantes para su desarrollo, son aberrantes (Albieri et al, 2004).

### ***Nurr1***

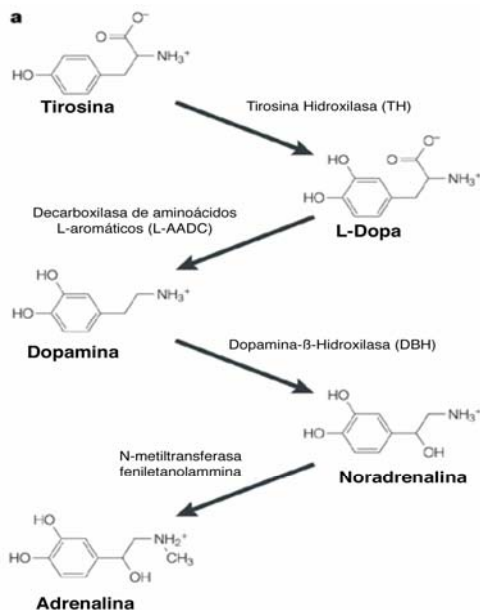
Es un miembro de la familia de receptores nucleares huérfanos que funcionan como factores transcripcionales. *Nurr1* es expresado en la parte ventral del mesencéfalo en el E10.5 de ratón (revisado en Zetterstrom et al, 1996) pero también se encuentra en otras partes del cerebro, incluyendo la neocorteza, hipotálamo, hipocampo y cerebelo. Cabe mencionar que está presente a lo largo del desarrollo, disminuyendo sus niveles en la etapa adulta (Jankovic et al 2005).

Diversos autores han implicado a *Nurr1* en el desarrollo y mantenimiento del fenotipo neuronal dopaminérgico, así como en la sobrevivencia de los precursores neurales (Zhou et al, 1995; Saucedo-Cárdenas et al, 1996; Saturada et al, 1999; Torii et al, 1999; Saucedo-Cárdenas et al 2001) sin embargo, el mecanismo por el cual *Nurr1* promueve la diferenciación neuronal aun no está claro. Existen trabajos como el de Witta (2000) donde han mostrado que ratones mutantes nulos en *Nurr1* experimentan una formación normal del cerebro medio y diferenciación neuronal, incluyendo el

establecimiento de proyecciones normales al estriado, pero no se expresan los marcadores del fenotipo dopaminérgico, como la tirosin hidroxilasa, TH. Otros estudios muestran el papel crítico de *Nurr1* en la generación de neuronas-DA al observar que, en ratones mutantes para *Nurr1*, marcadores de otros grupos catecolaminérgicos están intactos, mientras algunos de tipo dopaminérgico están ausentes y otros sólo se encuentran en etapas muy tempranas del desarrollo (Wallén y Perlmann, 2003).

Para reforzar la influencia positiva que ejerce *Nurr1* en la diferenciación dopaminérgica, existen trabajos en los que se ha sobreexpresado este factor en células troncales embrionarias (ES, embryonic stem cells), detectándose la expresión de genes involucrados en el desarrollo neural dopaminérgico, tales como *Pitx3* y *En1*, así como marcadores dopaminérgicos como el *AADC* (ácido carboxílico de los aminoácidos aromáticos), la tirosin hidroxilasa (*TH*) y el transportador de la dopamina (*DAT*); descartándose la presencia de marcadores noradrenérgicos y glutamaérgicos. Para demostrar el hecho de que las células obtenidas eran verdaderas neuronas-DA, se llevaron a cabo pruebas electrofisiológicas para caracterizarlas funcionalmente. Finalmente, se observó que cuando las neuronas-DA obtenidas son transplantadas a roedores tratados con neurotoxinas, regeneran las funciones de dicho fenotipo (revisado en Chung et al, 2002; Kim et al, 2002).

También se ha observado que existe una relación estrecha entre *Nurr1* y la TH pues, al parecer, hay un decremento en *Nurr1* con la edad que está correlacionado con la disminución de la expresión de la TH, en el cerebro humano (revisado en Chung et al; 2002). Esto se observó tiempo atrás, cuando un estudio reveló que *Nurr1* regula transcripcionalmente al gen de la TH al unirse a su elemento responsivo NBRE localizado en la región 5' no traducida, permitiendo la producción de dopamina (Sakurada et al 1999; Jankovic et al 2005). El mecanismo participante en la regulación de la expresión de la TH en las neuronas-DA es aun desconocido, sin embargo la TH, al parecer, no se requiere para el desarrollo de dichas células. Esto se ve reforzado con la generación del ratón nulo para TH, que posee aparentemente intacto el sistema dopaminérgico, mostrando proyecciones normales (revisado en Zhou y Palmiter, 1995).



**Figura 4. Vía biosintética de las catecolaminas.** La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante. Esta cataliza la adición de un grupo hidroxilo en la posición meta de la tirosina, generando la L-DOPA. La descarboxilasa de aminoácidos aromáticos cataliza la remoción del grupo carboxilo de la L-DOPA, dando lugar a la dopamina. En algunas células ésta es convertida a otras catecolaminas (noradrenalina y adrenalina (modificado de Goridis y Rohrer, 2002).

## **1.2. CELULAS TRONCALES CON POTENCIAL DOPAMINÉRGICO Y SUBDIFERENCIACION *IN VITRO*.**

### **1.2.1 Diferenciación neuronal dopaminérgica a partir de las ES**

Las células ES son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna del blastocisto, antes de su implantación. En cultivos *in vitro*, las ES de ratón se mantienen en estado indiferenciado y pluripotente en presencia del “leukaemia inhibitory factor” (LIF) sobre una base de células alimentadoras, permitiendo su división mitótica simétrica. Cuando se remueve dicho factor y las células alimentadoras, las ES inician su diferenciación originando células de las tres capas germinales. Otra condición más eficaz de generarlas es formando agregados celulares en suspensión, conocidos como cuerpos embrionarios (EBs, embryoid bodies) (revisado en Baizabal et al 2003). Por tal motivo, las ES proveen un sistema celular importante para estudios de desarrollo, permitiendo procesos de diferenciación, los cuales pueden mostrar dificultades en sistemas animales.

Debido a que las ES son fácilmente accesibles para manipularse genéticamente, sin comprometer o alterar su pluripotencia, pueden ser usadas para estudiar expresión de transgenes durante la diferenciación (Kim et al 2003). Además, también pueden emplearse para estudiar el funcionamiento de diversas drogas, y para proveer una fuente ilimitada de material para terapia celular en enfermedades degenerativas (Lee et al 2000; Barberi, 2003). Es en relación a esto que la generación de neuronas-DA, a partir de precursores neuronales provenientes de ES, es una de las metas con más interés por parte de las investigaciones avocadas al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson.

Aunque los precursores neurales y neuronas, en general, pueden ser derivados a partir de las ES con alta frecuencia, la producción de neuronas-DA es menos eficiente. Por ello, diversos protocolos basados en la diferenciación de las células ES han sido desarrollados.

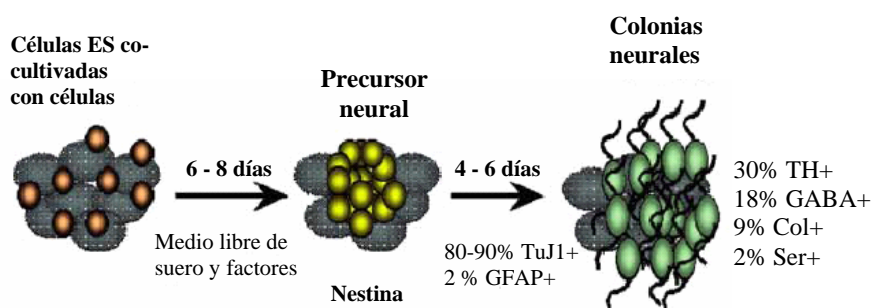
#### **a) Inducción neuronal y neurogénesis en monocultivo**

El uso de diferentes condiciones de cultivo permiten la diferenciación de los precursores neurales hacia células gliales y diferentes subtipos de neuronas (incluyendo las TH positivas) cuando los factores Fgf8 y Shh están presentes. En este protocolo, la adición de Fgf fue un requerimiento crítico para la inducción neuronal, demostrando que este factor juega un papel importante en la especificación neural de las células ES de mamífero (revisado en Ying et al 2003).

Una característica importante de este protocolo fue la inducción de las ES hacia un linaje neuroectodérmico sin pasar por la formación de los EBs. Sin embargo, en diversos estudios donde se utiliza este tipo de monocultivos se ha reportado que, aunque las células ES transplantadas adquieren espontáneamente características neuroectodermales también desarrollan teratomas obteniendo resultados heterogéneos.

## b) Co-cultivo de células ES con células estromales (Protocolo SDIA)

Kawasaki y sus colaboradores (2000) identificaron una actividad inductora de diferenciación neural (SDIA, *stromal cell-derived inducing activity*) en las células estromales cuando las cultivaron simultáneamente con células ES, obteniendo a partir de estas una alta proporción de neuronas TH positivas. Este método consistió en co-cultivar células estromales PA6 (derivadas de médula ósea) con células ES, sin involucrar la formación de EBs. Las neuronas TH positivas aparecen entre el día 6-8 del período de inducción, y constituyen el 30% del total de neuronas en el cultivo. Posteriormente dichas neuronas, después de 12 días de diferenciación, fueron transplantadas al estriado de un ratón tratado con 6-OHDA (6 hidroxidopamina, droga comúnmente usada para generar modelos de Parkinson en animales). Aunque no se reportó ningún dato funcional, las neuronas sobrevivieron y se integraron al entorno cerebral perfectamente. No obstante la alta eficiencia de la producción de neuronas, la función de la línea estromal en este paradigma de diferenciación aun no es claro (figura 5).



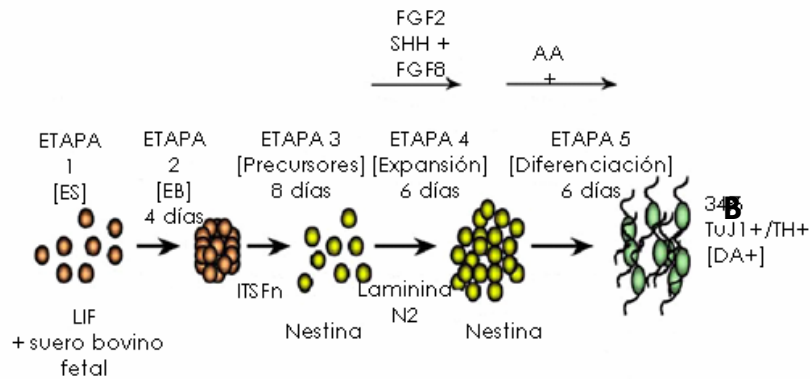
**Figura 5. Inducción neural por medio de actividad inducida derivada de células estromales PA6 (SDIA).** El protocolo está basado en la propiedad inductiva de las células PA6, las cuales derivan de médula espinal. Las ES crecen en presencia de células PA6 en condiciones libres de suero y factores, generando precursores neurales (nestina+). El 80-90% de esas células se convierten en TuJ1+, mientras que el 2% diferencian a astrocitos GFAP+, indicando la fuerte inducción neural de este protocolo. Después de 12 días de cultivo, la mayoría de las neuronas TuJ1+ (30%) tienen un fenotipo TH+, mientras que el 18%, 9% y 2% fueron gabaérgicas (GABA+), colinérgicas (Col+) y serotoninérgicas (Ser+), respectivamente (modificado de Sonntag et al, 2004).

## c) Neurogénesis basada en el desarrollo embrionario

Una forma diferente para dirigir la diferenciación hacia neuronas-DA a partir de células ES fue desarrollada por Lee y sus colaboradores (2000). Este protocolo está basado en reproducir el proceso de diferenciación “normal” de los precursores neurales del mesencéfalo en la embriogénesis en las ES *in vitro*. Este consiste en 5 etapas: la primera es la expansión de células ES; la segunda consiste en la formación de EB's la tercera es la selección de precursores neurales; en la cuarta se expanden dichos precursores; y finalmente la quinta es la diferenciación hacia neuronas-DA (ver detalle en metodología). A partir de este método un 20% de las neuronas totales son células TH positivas.

Este protocolo ha sido adaptado y modificado por diversos grupos, entre los que cabe destacar el realizado por el equipo de Kim (2002), que demostró que la obtención

de neuronas-DA a partir de células ES en presencia de Fgf8, Shh y Nurr1, bajo el promotor del citomegalovirus (pCMV), aumentó hasta un 78% TH+ de las células totales, contrastando con el 20% obtenido sólo en presencia de Fgf8 y Shh; además de mostrar características propias del fenotipo dopaminérgico (figura 6). En el mismo proyecto se generó un modelo murino de Parkinson donde fue analizada la capacidad terapéutica de las neuronas-DA obtenidas. Los resultados mostraron la habilidad de dichas neuronas para sobrevivir, reintegrarse y funcionar en animales hospederos y responder ante drogas de forma parecida a las neuronas mesencefálicas. Esto fue comprobado después en otros trabajos donde observaron que Nurr1, además de incrementar el número de neuronas-DA, aumenta la habilidad de estas células a producir y liberar dopamina en respuesta a la despolarización (Chung et al 2002).



**Figura 6. Protocolo de 5 etapas para promover la neurogénesis a partir de células ES.** Este protocolo fue desarrollado con la intención de recapitular las características del desarrollo "normal" de las ES permitiendo la formación de células a partir de las 3 capas germinales en los EBs en presencia de suero bovino fetal. Después de 4 días, los EBs son cultivados en condiciones adherentes en medio libre de suero, usando insulina, transferrina, selenito de sodio y fibronectina para seleccionar la población de precursores neurales (nestina +). Después, estas células son propagadas en platos cubiertos de laminina en medio N2 y FGF2. La etapa final consiste en remover FGF2 y diferenciar las células neurales de 6 a 12 días. El resultado de este protocolo es un alto porcentaje de neuronas con fenotipo mesencefálico ventral. Para producir neuronas TH+, las condiciones de cultivo fueron modificadas por adición de FGF8 y SHH en la etapa 4 y ácido ascórbico (AA) en la etapa 5, lo que incrementa la cantidad, obteniendo hasta un 34% de neuronas TH+ funcionales (modificado de Sonntag et al 2004).

### 1.3. ENFERMEDAD DE PARKINSON

#### 1.3.1. Características

La dopamina es uno de los neurotransmisores más importante del sistema nervioso central (SNC) teniendo como función el control motor, comportamiento emocional y cognición. Una de las vías del sistema dopaminérgico, como ya se había mencionado, es la proyección de neuronas-DA de la SN al cuerpo estriado dorsal (vía nigroestriada), regulando el control motor. Cuando esta ruta se daña provoca la enfermedad de Parkinson (Saucedo et al 2001; Torii et al 1999).

El mal de Parkinson es el segundo desorden neurodegenerativo más común, afectando aproximadamente al 3% de la población arriba de 60 años (Kahle y Haass, 2001), aunque adultos jóvenes y aun niños pueden ser también afectados. En general, su patología no obedece a una historia familiar, ocurriendo espontáneamente en la mayoría de los casos (Dauer et al; 2003). Los síntomas observados son bradikinesia

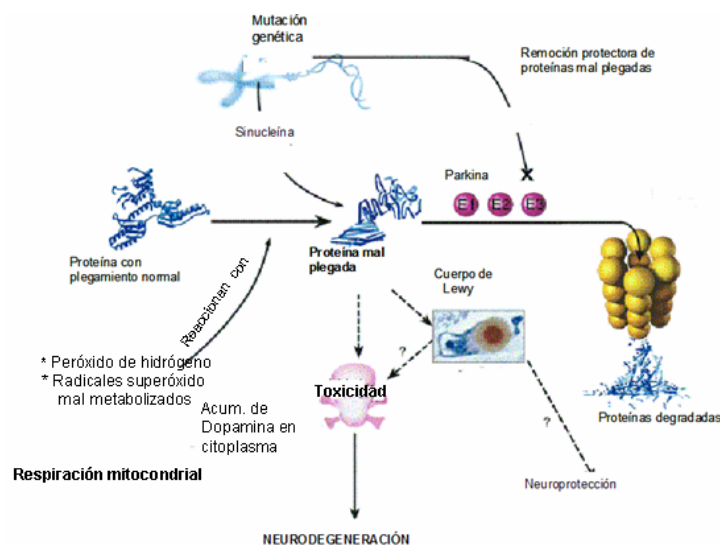
—movimientos lentos—, rigidez, postura inestable y temblor incontrolado (Schober 2004). Se caracteriza por una pérdida masiva de neuronas-DA en la sustancia nigra (alrededor del 50-70%) y una dramática reducción de los niveles de dopamina en el estriado; además de eso también se presentan inclusiones esféricas citoplásmicas llamadas cuerpos de Lewy (LBs, Lewy's bodies), compuestas de agregados de proteínas como  $\alpha$ -sinucleína, parkina, ubiquitina y neurofilamentos (Mel y Pallanck 2003; Dauer et al; 2003).

### 1.3.2. Naturaleza causal del Parkinson

Dentro de los posibles factores causantes de la enfermedad se han propuesto dos hipótesis: la primera, postula que la **agregación de proteínas con plegamientos incorrectos** provoca la muerte de las neuronas-DA en la SN. Estos agregados son considerados tóxicos, ya que podrían causar daño directamente deformando a la célula o interfiriendo con el tráfico intracelular en neuronas, o bien secuestrar proteínas importantes para la sobrevivencia celular. Además, existe también la posibilidad de que mutaciones (que podrían ser provocadas por la exposición a herbicidas o pesticidas) puedan inducir conformaciones anormales en las proteínas haciéndolas tóxicas, o bien interfiriendo con los procesos que normalmente las reconocerían para su consecuente degradación (Bussell et al; 2001); e.g. la disfunción del proteasoma por mutaciones en parkina —proteína con función ubiquitin-ligasa E3, funcionando como parte del sistema UPS (sistema ubiquitin-proteasoma) y cuyo blanco son proteínas con plegamientos incorrectos para su degradación—.Esto, y la consecuente acumulación de proteínas pueden provocar un círculo vicioso, con exceso de proteínas mal plegadas que fomentarían la inhibición del ya comprometido proteasoma. La segunda hipótesis se refiere al **funcionamiento incorrecto de la mitocondria y el consecuente estrés oxidativo**, que pudiera ser exacerbado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por el propio metabolismo de la dopamina. Al respecto, cerca del 100% del oxígeno molecular es consumido en la respiración mitocondrial, produciendo poderosos oxidantes como bioproductos, incluyendo peróxido de hidrógeno y radicales superóxido, que si no son metabolizados correctamente pueden convertirse en tóxicos. Normalmente, el metabolismo de la dopamina es llevado a cabo en el citoplasma, y estos productos son secuestrados inmediatamente en vesículas sinápticas, donde la  $\alpha$ -sinucleína está presente regulando la formación de éstas. Las mutaciones en esta proteína puede reducir el número de vesículas, permitiendo la acumulación de dopamina en el citoplasma, e incrementando el estrés oxidativo (revisado en Lotharius et al, 2002) (figura 7).

Estas moléculas, el peróxido de hidrógeno y los radicales superóxido, pueden causar daño al reaccionar con ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, y/o dañar al complejo I de la cadena de transporte electrónico, aumentando la producción de ROS (Cohen, 2000). Entonces, la presencia de ellas puede provocar un incremento en la cantidad de proteínas con plegamiento incorrecto (figura 7).





**Figura 7. Mecanismos de neurodegeneración.** Hay dos hipótesis respecto al origen del Parkinson, la primera, donde mutaciones patógenas pueden inducir directamente conformaciones anormales de las proteínas (como en el caso de la sinucleína) o bien sufren daño que les impide habilitar la maquinaria de degradación de proteínas plegadas incorrectamente (Parkina). La segunda, respecto al daño oxidativo ligado a la disfunción mitocondrial y al metabolismo anormal de la dopamina, que también pueden promover conformaciones erróneas en las proteínas. Aun no se sabe con exactitud si los LBs causan toxicidad directamente o protegen a la célula de proteínas mal plegadas, secuestrándolas en compartimentos insolubles. El estrés oxidativo y la activación de la maquinaria de muerte celular también pueden ser considerados factores que disparan la muerte de neuronas-DA en Parkinson (modificada de Dauer et al, 2003).

A pesar de que se ha identificado la participación de caspasas en algunas enfermedades neurodegenerativas (Vila y Przedborski et al, 2003), entre ellas el Parkinson, pareciera que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la muerte de neuronas-DA en esta enfermedad es de tipo no apoptótico (Dauer et al, 2003). Se ha propuesto que algunos receptores nucleares podrían estar asociados a procesos de muerte neuronal; tal es el caso del estudio realizado por Castro-Obregón et al (2004), donde se muestra que existe muerte no apoptótica en células neuronales y no neuronales provocada por la fosforilación del factor Nur77, misma que se induce por interacción del neurotransmisor Sustancia P (SP) con su receptor NK1R, ambos implicados en padecimientos donde se observa muerte neuronal, como la epilepsia.

## 1.4. NUR77, UN RECEPTOR HUÉRFANO NUCLEAR INVOLUCRADO EN MUERTE CELULAR

### 1.4.1. Características de los receptores nucleares huérfanos. El caso de la subfamilia NR4A

Los receptores nucleares (NRs, por sus siglas en inglés) comprenden una superfamilia de factores transcripcionales relacionados estructuralmente, que controlan una variedad de procesos del desarrollo, fisiológicos y de conducta. El genoma humano contiene alrededor de 50 receptores nucleares de los que cerca de la mitad son receptores huérfanos, considerados así por tener un ligando desconocido (Kucharova y Farkas, 2002; Wu Q et al 2002).

Dentro de dichos receptores, se encuentra la subfamilia NR4A, cuyos miembros son Nur77, Nurr1 y Nor1, quienes activan la expresión genética de una manera independiente de ligando. Este subgrupo se encuentra implicado en una amplia variedad de procesos biológicos incluyendo proliferación, diferenciación, muerte celular; y en forma interesante para el proyecto, participan durante el desarrollo del SNC y en respuestas adaptativas después de cambios en el medio ambiente neuronal, tales como isquemia, lesiones o después de exposición a drogas que afecten los sistemas neurotransmisores en el SNC en un estado maduro (Gilbert et al 2006). Además, algunos de sus miembros han sido relacionados con hipertrofia, esquizofrenia, maniaco-depresión, enfermedades autoinmunes y la enfermedad de Parkinson (Wansa et al 2002).

Su expresión puede ser detectada en bajos niveles en muchos tejidos; mientras que se encuentran elevados cuando se estimulan de forma externa, incluyendo suero o factores de crecimiento (DeYoung et al 2003). Se les conoce como genes tempranos debido a que se inducen rápidamente después de estimulaciones sin síntesis de proteínas *de-novo* (Torii et al 1999).

La estructura general de estos receptores nucleares huérfanos consta de un dominio de unión a DNA altamente conservado (90% de homología), formado por dos dedos de zinc. Es por medio de este dominio que se unen a elementos responsivos en el DNA actuando como reguladores transcripcionales de genes como Lmx1b, Pitx3, Wnts, GDNF (Ret y FGFs), TH, DAT, y al receptor del ácido retinoico, RXR). Posee un dominio C-terminal de unión a ligando (región AF-2), moderadamente conservado que tiene cadenas de residuos hidrofóbicos muy grandes, por lo que se cree que no existe cavidad para algún ligando. Y finalmente, un dominio N-terminal (región AF-1), que está involucrado en la transactivación y que puede ser activado por MAPK debido a un estímulo del medio (Maira et al 1999; Sakurada et al 1999; De Young et al 2003; Maxwell y Muscat, 2005) (figura 8).



**Figura 8. Estructura de los receptores nucleares huérfanos.** De izquierda a derecha se observan el dominio N terminal de transactivación (AF-1), seguido del de unión a DNA (DBD) y finalmente el dominio de unión a ligando C terminal (AF-2)(modificado de Wallén y Perlmann, 2003).

Nurr1 (también llamado TINUR, NOT, RNR-1/HZF-3, Nr4a2), Nor-1 (conocido como MINOR, TEC, CHN, Nr4a3) y Nur77 (nombrado también NGFI-B, TR3, Nr4a1, NAKI, N10, ST59, TIS1) se unen al DNA y activan la transcripción al unirse a su correspondiente elemento responsivo. Según diversos reportes, Nurr1 y Nur77 pueden unirse al mismo: como **monómeros**, cuando lo hacen por medio del elemento responsivo NBRE (NGFI-B responsive element, AAAGGTCA); como **homodímeros**, cuando involucran al elemento NurRE (TGACCTTTCCTCAAAGGTCA, que comprende dos secuencias canónicas de NBRE, haciéndolo más responsivo que éste); y también como **heterodímeros** (al interactuar con el RXR para luego unirse al elemento DR-5); o bien cuando interactúan las proteínas de Nurr1\Nur77, cooperando

para activar la transcripción dependiente de NurRE (Wilson et al 1991 y 1993; Philips et al 1997). Este último caso ha sido observado *in vivo* e *in vitro*, exhibiendo más potencia transcripcional en comparación con los homodímeros y monómeros de ambos receptores (Maira et al 1999; Winoto 2002).

Para Nurr1, Nur77 y Nor1 el RNAm así como la proteína, parecen ser inestables *in vivo* debido a que su inducción es transitoria según la estimulación que reciban. La regulación de la expresión de la proteína se debe a modificaciones postraduccionales consistentes en fosforilaciones o sumoilaciones (Wingate y Arthur, 2006). Sin embargo, Nurr1 también posee múltiples isoformas debido al “splicing”, reaccionando de distinta manera a los estímulos (Jankovic et al, 2005).

Estos receptores nucleares se expresan como genes tempranos en diferentes tipos celulares (Winoto et al, 2002). Nurr1 se expresa en el cerebro medio-ventral, la corteza, el hipocampo y la espina dorsal (Wallén y Perlmann, 2003). Diversos estudios han identificado tres isoformas de Nurr1 en neuronas mesencefálicas (hcNurr1-2, hcNurr1-1, hacNurr1-8) y es debido a esta multiplicidad de isoformas que Nurr1 posee la habilidad de reaccionar de forma distinta a los diversos estímulos (Jankovic et al 2005). Por otro lado, un estudio realizado por Xu y Le (2004), demostró que existe una isoforma (Nurr1-c) identificada en linfocitos, hígado, músculo y riñón. Ésta posee 25 aminoácidos deletados en el C<sup>o</sup> Terminal del exón 5, sin embargo, en diversos análisis comparativos con Nurr1, Nurr1-c muestra una disminución en la actividad de luciferasa. En otros trabajos, se ha demostrado que su ausencia en ratón desencadena la muerte inmediata después del nacimiento del animal, ya que debido a la pérdida de la producción de neuronas-DA en la SN y la VTA, la función motora del animal disminuye, impidiéndole la succión de leche (De Young et al, 2003; Jankovic et al 2005). Por su parte, Nor-1 se expresa en la glándula adrenal y el timo; su ausencia provoca la muerte del embrión en el útero, debido a que este receptor es necesario para la migración celular durante la gastrulación (De Young et al, 2003). Nur77, además de colocalizar con Nor1, se encuentra en la corteza, cerebelo, hipocampo, bulbo olfatorio y de manera significativa en el estriado. El ratón mutante para Nur77 no muestra fenotipo (De Young et al, 2003), sugiriendo la existencia de proteínas redundantes con funciones similares a Nur77 (tabla 1).

Tabla 1. Zona de Expresión y Fenotipo de mutantes nulos para los receptores nucleares huérfanos Nurr1, Nor1 y Nur77.

RECEPTOR NUCLEAR	ZONA DE EXPRESIÓN	FENOTIPO EN MUTANTE NULO
Nurr1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cerebro medio ventral (SN y VTA)</li> <li>- Corteza</li> <li>- Hipocampo</li> <li>- Espina dorsal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muerte inmediata después del nacimiento por disminución de función motora (succión de leche)</li> <li>- Pérdida de neuronas-DA en SN y VTA</li> </ul>
Nor1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glándula adrenal</li> <li>- Timo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Muerte dentro del útero (inhibición de migración celular)</li> </ul>

<b>Nur77</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glándula adrenal</li> <li>- Corteza</li> <li>- Cerebelo</li> <li>- Hipocampo</li> <li>- Bulbo olfatorio</li> <li>- Estriado</li> </ul>	- Sin fenotipo (funciones redundantes de los otros miembros)
--------------	---	--

Se ha encontrado que Nur77, junto con Nurr1, están involucrados en el desarrollo y maduración de grupos neuronales, pero el mecanismo de acción es aún desconocido (Winoto et al, 2002). El hecho de que Nur77 co-localice con Nurr1 en el sistema límbico y cerebelo, sugiere la existencia de redundancia en la producción de proteínas importantes en funciones de comportamiento y cognición, así como del mantenimiento del equilibrio (Saucedo, et al; 1996).

#### **1.4.2. El papel de Nur77 en la muerte neuronal no apoptótica. Posible implicación en enfermedad de Parkinson**

De manera general, se ha propuesto que Nur77 puede producir apoptosis por 2 mecanismos: en el primero, actúa como factor de transcripción, induciendo genes blanco que participan en este tipo de muerte. En este caso se ha observado que Nur77 se expresa constitutivamente en la selección negativa de linfocitos T y B, actuando como un factor proapoptótico. En el caso de células nerviosas, se induce por tratamiento con NGF (nerve growth factor), o en respuesta a lesiones mecánicas (Winoto et al 2002). Al respecto, un trabajo realizado por Newman (2000) detectó en cerebros de pacientes con Alzheimer un incremento en los niveles de expresión de Nur77 observado en regiones corticales y el hipocampo, zonas lesionadas en dicha enfermedad. Este incremento, bajo circunstancias de neurodegeneración, sugiere que Nur77 puede mediar una vía que conlleva a la pérdida de neuronas. En el segundo mecanismo Nur77 se transloca a la mitocondria, liberando citocromo c, quien activa a Apaf-1 y a la cascada de caspasas (Winoto et al, 2002); sin embargo la forma en como lo lleva a cabo aun no es clara, ni tampoco como es que causa la liberación de citocromo c. Es interesante ver que la sobreexpresión de Bcl-2 no bloquea la apoptosis mediada por Nur77 en células T, sugiriendo que éste podría jugar un papel en el inicio de la apoptosis en estas células, o bien que Nur77 inicia una vía de apoptosis independiente de Bcl-2 (Winoto et al 2002).

Nur77 ha sido ampliamente estudiado en muerte apoptótica (donde se ha estudiado su participación pero por sí mismo es incapaz de llevarla a cabo), sin embargo se ha reportado que su forma fosforilada participa en muerte de tipo no apoptótico en células neuronales (corticales, del hipocampo y estriado) y no neuronales que ectópicamente expresan su receptor. Esta forma fosforilada se genera cuando la sustancia P (SP) —quien juega un papel importante en estados patológicos donde la muerte celular ocurre, como epilepsia e isquemia—, se une a su receptor Nk1R (implicado en padecimientos de esquizofrenia y depresión), y activa la vía de las MAPK donde ERK2 permite la fosforilación de Nur77 cuya actividad es esencial para este tipo de muerte (Castro-Obregón et al, 2002). Esto se vio reforzado al observar que la mutante dominante negativa de Nur77 muestra una inhibición de esta muerte celular no apoptótica (alrededor del 100%).

A pesar de la participación de Nur77 en procesos de muerte, Davis et al (1994) demostró que este receptor potencialmente puede actuar como mediador de respuestas hormonales y neurogénicas. Este estudio se llevó a cabo en células PC12 (células derivadas de la médula adrenal que muestran fenotipo similar al neuronal en respuesta a NGF), donde se activó Nur77 por medio de despolarización de membrana y por tratamiento con NGF. Además observó que Nur77 junto con Nurr1 también puede inducirse químicamente, usando drogas como metrazol, en neuronas de hipocampo. Dado que Nur77 se expresa en áreas blanco para neuronas-DA, como el estriado y la corteza prefrontal, diversos estudios han demostrado que en tales áreas existe una fuerte modulación de dicho gen que ha sido observada después de manipular la neurotransmisión en las neuronas-DA con antagonistas para los receptores dopaminérgicos o con psicoestimulantes (Zetterstrom et al 1996; Beaudry et al 2000). En un estudio realizado por Gilbert y sus colaboradores (2006) observaron que en el ratón nulo para Nur77, se encuentra alterada la actividad bioquímica de las neuronas-DA y el recambio de la dopamina, pudiendo deberse a una respuesta resultante de la pérdida de eventos de señalización que involucran a Nur77. Además, en ratones WT como en el ratón nulo para Nur77, se logró inducir la expresión de este gen en células TH<sup>+</sup> en la SN y la VTA utilizando diversas drogas. Esto sugiere que la actividad transcripcional de Nur77 puede ocurrir junto con Nurr1 en neuronas-DA, pudiendo influenciar la actividad de éste bajo diversas condiciones.

Considerando entonces que en la neurodegeneración la muerte celular no es predominantemente apoptótica (Dauer et al 2003), sumado al hecho de que Nur77 en su forma fosforilada participa en un tipo de muerte no apoptótica en células neuronales, pudiera ser que Nur77, a través de modificaciones postraduccionales que le ocurren, participe como mediador de los factores causantes de la neurodegeneración. Por otro lado, debido a que Nurr1, (considerado como factor importante para el desarrollo de las neuronas-DA), y Nur77 pudieran unirse al mismo elemento responsivo; además de su actividad como mediador potencial en respuestas neurogénicas, podría pensarse que Nur77 es capaz de “recapitular” la función de Nurr1, pudiendo participar también en procesos de neurogénesis. Así mismo, la sobreexpresión de Nurr1 pudiera resultar tóxica o hacer más susceptibles a las propias neuronas-DA, denotando actividad similar a la de Nur77.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Modelos de estudio de la enfermedad de Parkinson**

#### **2.1.1. Modelos animales**

Un requerimiento crucial para estudiar una enfermedad como el Parkinson es contar con un modelo etiológico, es decir un modelo que reproduzca los síntomas de la enfermedad. La ventaja de dichos modelos es que no dependen de genes relacionados con la enfermedad, sino sólo utilizan fármacos para mimetizar la pérdida selectiva de neuronas-DA. Las estrategias están basadas en la premisa de que las neuronas-DA tienen una cascada de muerte celular estereotipada que puede ser inducida por la acción de los fármacos sobre dichas células. Esta definición en la cascada de eventos puede permitir la identificación de nuevas moléculas de potencial relevancia sobre la patogénesis del Parkinson o para su tratamiento (revisado en Jackson-Lewis et al 2000). Estos modelos, también llamados “sintomáticos o patofisiológicos”, han mostrado recapitular los síntomas motores de la enfermedad, y son utilizados para desarrollar terapias sintomáticas.

Dentro de los modelos más utilizados se encuentran la rata y el ratón. Un punto a considerar en estos modelos etiológicos es que, la organización del sistema motor entre roedores y humanos es diferente, por lo que la validez de los estudios realizados en ratón se enfoca más hacia la disfunción dopaminérgica en el estriado que a la similitud de los síntomas del Parkinson (revisado en Dauer et al 2003). Los primates no-humanos son los modelos que mimetizan con más precisión los síntomas de la enfermedad, por lo que son los más convenientes para tales estudios.

#### **2.1.2 Modelos genéticos**

El descubrimiento de genes es atractivo porque teóricamente permite la generación de modelos nuevos de gran significado, ya que la información genética podría ayudar a dirigir los esfuerzos hacia una vía clave para la enfermedad. Los genes que han sido identificados y estudiados a más detalle en Parkinson son la  $\alpha$ -sinucleína, parkina y la hidrolasa C-terminal con función de ubiquitina, quienes participan en la vía del proteasoma, y además forman los agregados de proteína (LBs) que caracterizan al Parkinson. Aunque se han identificado recientemente mutaciones causadas en el gen DJ-1, esta proteína también parece tener una relación con el proteasoma y como elemento importante en la respuesta ante el estrés oxidativo (revisado en Takahashi et al 2001; Martinat et al 2004).

La mayor parte de la investigación con modelos genéticos se enfoca a la actividad normal y a la interacción funcional entre esas proteínas, y cómo sus funciones son modificadas por mutaciones patógenas. Sin embargo, estos estudios son los más costosos, ya que se requiere la obtención de animales transgénicos, lo que conlleva un aumento de recursos materiales así como de tiempo en su obtención, restringiendo su uso a determinados proyectos.

#### a) **Ratón mutante para $\alpha$ -sinucleína**

Esta proteína se detectó como el componente principal de los LB's. Se han identificado mutaciones y multiplicaciones genómicas que han llevado a los expertos a investigar sobre su participación en el Parkinson. La existencia de polimorfismos en el promotor del gen de la  $\alpha$ -sinucleína sugiere que los niveles de expresión podrían ser un factor de riesgo (revisado en Holzman et al 2003).

Muchas líneas de ratones transgénicos, incluyendo el ratón nulo o donde se sobreexpresa la versión humana de la proteína han sido generadas. El primero muestra una disminución en el contenido de dopamina en el estriado, así como un menor número de vesículas en el hipocampo. Estas características tienen fundamento *in vivo*, ya que se ha visto que la  $\alpha$ -sinucleína participa en la plasticidad sináptica y en el mantenimiento de dichas vesículas. En el caso de ratones con sobreexpresión de la proteína, sólo pocos han mostrado alteraciones en el sistema dopaminérgico y, aunque en ninguno se detectó pérdida de neuronas, la sobreexpresión de una doble mutación bajo el promotor de la TH presenta una muerte progresiva de neuronas en la SN, aunque el número de neuronas TH positivas se mantiene estable. En el ratón con sobreexpresión de la  $\alpha$ -sinucleína humana, se detectan inclusiones en la SN así como impedimentos sensoriomotores que van empeorando con la edad (Richfield et al 2002; Fleming et al 2005).

Estos animales usualmente se utilizan como modelos de Parkinson juvenil debido a la similitud de las mutaciones; además de que muestran comportamientos y patologías que simulan las observadas en los pacientes.

#### b) **Ratón nulo para Parkina**

Otra proteína relacionada con el Parkinson juvenil es la parkina, descubierta poco después que la  $\alpha$ -sinucleína. La parkina actúa como una ligasa de tipo E3 en la ubiquitinación, una especie de "marcaje" de proteínas que deben ser degradadas por el proteosoma; por tal motivo, sus mutaciones provocan una acumulación de sustratos tales como  $\alpha$ -sinucleína, sinfilina, Pael-R, entre otros (Fleming et al 2005)

En los ratones nulos para parkina se han deletado los exones 3 y 7. En el primer caso, el ratón no muestra pérdida de neuronas TH positivas en la SN o de sus proyecciones en el estriado, sin embargo se detecta un incremento en la dopamina extracelular, reducción en la sinapsis e impedimentos sensoriomotores progresivos. Además, denota pérdida de peso, reducción de la respiración mitocondrial y de la capacidad antioxidante. El ratón con delección del exón 7 posee un fenotipo diferente, existiendo pérdida de neuronas TH positivas en el locus coreolus, así como en los niveles de norepinefrina en el bulbo olfatorio y espina dorsal (Goldberg et al 2003).

Como puede verse, este modelo es limitado debido a la ausencia de pérdida de neuronas-DA. Además, el fenotipo del ratón es más modesto que el de la  $\alpha$ -sinucleína; sin embargo, muestra cambios crónicos en la liberación de la dopamina y disfunciones sinápticas en el estriado, conformándose como una herramienta útil para detectar efectos tempranos *in vivo*.

### **c) Ratón nulo para DJ-1**

El gen DJ-1 se ha identificado en diversos casos de parkinson temprano, sin embargo las mutaciones parecen ser menos frecuentes que las de parkina. DJ-1 es una proteína multifuncional, que se identificó como un producto oncogénico e implicado en respuesta al estrés oxidativo. En el ratón nulo para este gen se ve aumentada la vulnerabilidad a la inhibición del proteosoma y al daño oxidativo. De manera similar a los ratones nulos de  $\alpha$ -sinucleína y de parkina, el de DJ-1 no pierde neuronas-DA en la vía nigroestriada, aunque la actividad de TH y de la dopamina se ven claramente reducidas. Las neuronas de la SN responden menos a la estimulación y son más vulnerables a la intoxicación por paraquat y MPTP. Así mismo, el ratón muestra disminución en su actividad locomotora (Fleming et al 2005; Kim et al 2005).

### **d) Ratón nulo para Nurr1**

Las mutaciones en Nurr1 alteran la transcripción del gen de la TH, sugiriendo que las mutaciones en dicho gen podrían incrementar la susceptibilidad para presentar Parkinson.

Como se ha mencionado, Nurr1 es esencial para el desarrollo de neuronas-DA, por tanto el ratón nulo no desarrolla tales células en la SN y muere poco después de haber nacido. En contraste, el ratón heterocigoto sobrevive y muestra niveles normales de neuronas-DA, empero exhibe vulnerabilidad a drogas como el MPTP. Recientemente, se demostró que este ratón muestra niveles bajos de dopamina en el estriado así como de neuronas-DA y disminución de la actividad locomotora (Le et al 1999).

### **e) Ratón nulo para Pitx3/“Aphakia”**

Similar a Nurr1, Pitx3 está involucrado en el desarrollo de neuronas-DA. El ratón nulo para este gen tiene pérdida de neuronas-DA y una reducción de un 90% en el contenido de dopamina en el estriado. Este ratón también muestra daños locomotores (Hwang et al 2003).

Tanto el ratón heterocigoto de Nurr1 como el nulo de Pitx3 son buenos modelos para estudiar el Parkinson, ya que muestran una pérdida de neuronas-DA además de que su validez radica en los daños progresivos observados que pueden revertirse con medicamentos, tal como se realiza con los pacientes.

## **2.1.3. Modelos basados en células ES**

DJ-1 es un gen que ha sido involucrado en respuestas celulares ante estrés oxidativo provocado por sustancias como paraquat y ácido ascórbico (Mitsumoto y Nakagawa, 2001; Nobel et al 2001). Basado en esto, Martinat y sus colaboradores (2004) desarrollaron un modelo de estudio para el Parkinson que se hereda de manera recesiva. El trabajo consistió en generar clones de células ES deficientes en DJ-1, y fue por medio de co-cultivos de estas células con una línea murina estromal que se indujo la diferenciación hacia neuronas-DA. Posteriormente, se observó que estas neuronas eran más sensibles al estrés oxidativo y por lo tanto mostraban una supervivencia menor comparadas con neuronas-DA derivadas de ES heterocigotas. De esta manera, se concluyó que el gen DJ-1 es un componente importante de la respuesta al estrés oxidativo en neuronas-DA, además de que demostraron la utilidad de las neuronas



obtenidas a partir de ES genéticamente modificadas en el estudio de desórdenes neurodegenerativos.

#### **2.1.4. Modelos basados en neurotoxinas**

Como se mencionó anteriormente, la vulnerabilidad selectiva de neuronas-DA en la enfermedad de Parkinson aun no es clara, pero se ha postulado que la inhabilitación del proteasoma puede ser un factor causante, impidiendo la degradación de proteínas acumuladas con plegamientos incorrectos. Sumado a esto, un ambiente altamente oxidativo encontrado en la SN de los pacientes de Parkinson (debido a productos del metabolismo de la dopamina), pudieran también vulnerar estas neuronas (Mytilineou C et al, 2004).

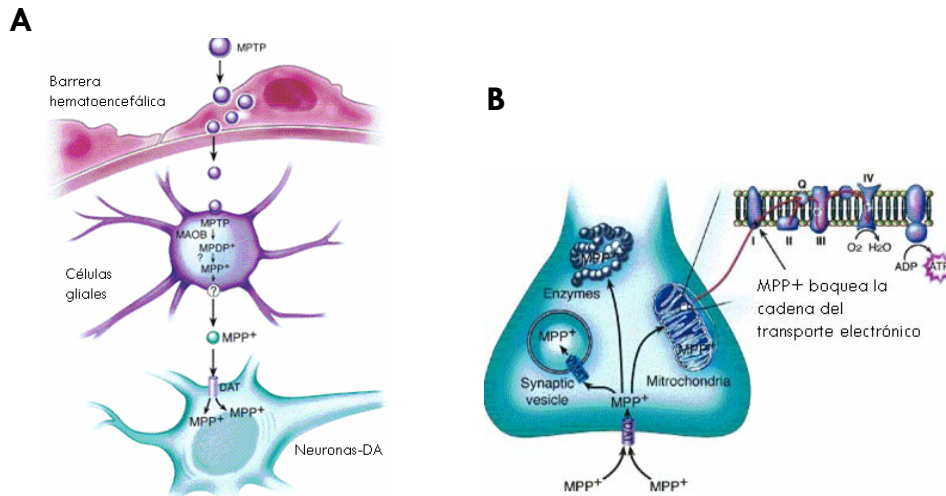
Existen drogas que han sido utilizadas para generar modelos que representen los síntomas existentes en la enfermedad de Parkinson. Entre estas neurotoxinas se destacan por su eficiencia las siguientes (Dauer et al, 2003):

#### **6-hidroxidopamina (6-OHDA)**

Ampliamente utilizada, aunque la patología que induce es diferente al Parkinson debido a que no presenta formación de LBs. Su toxicidad reside en que es preferencialmente incorporada por los transportadores de dopamina. La 6-OHDA se acumula en el citosol de la neuronas, generando estrés oxidativo. Este compuesto ha sido usado en modelos animales de Parkinson, inyectándolo en la sustancia nigra o en el estriado. Su efecto comienza 24 hrs después de su administración mostrando muerte de neuronas-DA sin morfología apoptótica.

#### **MPP+, Forma oxidada de MPTP (Toxina Parkinsoniana Real)**

En humanos y monos, produce Parkinson de manera irreversible y severa. El síndrome provocado muestra todas las características de la enfermedad, incluyendo temblor, movimientos lentos y postura inestable. Daña a las neuronas-DA de manera similar al padecimiento, incluyendo pérdida de estas en la sustancia nigra, en la zona tegmental ventral. El MPTP es altamente lipofílico, por lo que atraviesa la barrera hemato-encefálica en pocos minutos. Ya en el cerebro es oxidado a MPP+ por la monoamino oxidasa B (MAO-B), localizada en la glia y neuronas serotoninérgicas. De esta forma, la toxina ya es activa y liberada al espacio extracelular por mecanismos desconocidos, así el MPP+ es concentrado en neuronas-DA debido a que es un sustrato de alta afinidad para el DAT, permitiéndole entrar a dichas células (figura 10). Ya dentro de las neuronas, el MPP+ puede seguir tres rutas: la primera, donde se puede translocar a las vesículas sinápticas vía transportadores monoamino vesiculares (protegiendo a las células de sus efectos); la segunda, interaccionando con enzimas citoplásmicas; y la tercera, concentrándose dentro de la mitocondria. Dentro de este organelo provoca el aumento de la producción de ROS, y disminuye la producción de ATP al bloquear el complejo I de la cadena de transporte electrónico (figura 9).



**Figura 9. Metabolismo del MPTP.** **A**, Después de una administración sistémica, el MPTP atraviesa la barrera hemato-encefálica. Una vez en el cerebro, el MPTP es convertido a MPP<sup>+</sup> por la MAO-B dentro de células gliales y neuronas serotonérgicas (no mostradas) por un mecanismo desconocido. De allí el MPP<sup>+</sup> es liberado, (también de forma no conocida) al espacio extracelular. El MPP<sup>+</sup> es concentrado en neuronas-DA via el transportador de dopamina (DAT). **B**, Dentro de las neuronas-DA, el MPP<sup>+</sup> puede tomar 3 rutas: (1) interacción con enzimas citosólicas; (2) ser secuestrado en vesículas presinápticas; (3) concentrándose en la mitocondria. Dentro de esta, el MPP<sup>+</sup> bloquea el complejo I de la cadena de transporte de electrones; tal perturbación aumenta la producción de especies reactivas al oxígeno (no mostradas) y disminuye la síntesis de ATP (modificado de Dauer et al 2003).

### Paraquat

Es un herbicida que posee similitud estructural con el MPP<sup>+</sup>. Su toxicidad se debe a la formación de radicales superóxido, causando degeneración de neuronas dopaminérgicas; acompañada de la formación de inclusiones que contienen  $\alpha$ -sinucleína, componente principal de los cuerpos de Lewy.

### Rotenona

Es el miembro más potente de la familia de los rotenoides, causantes de compuestos citotóxicos naturales, extraídos de plantas tropicales. Es ampliamente usado como insecticida o veneno para peces. La rotenona es altamente lipofílica, accediendo rápidamente a todos los órganos. Causa degeneración de neuronas dopaminérgicas acompañada de formación de cuerpos de Lewy. Los animales intoxicados por rotenona desarrollan posturas anormales y lentitud en movimiento, pero se desconoce si tales características son revertidas por administración de levodopa (droga usada en el tratamiento de Parkinson). Este modelo es el primer enlace a una toxina ambiental de relevancia en tal enfermedad.

**MG132 (Cabobenzoxyl-L-leucyl-Leucyl-L-leucinal)**

Es un inhibidor del proteosoma que induce la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína y otras proteínas con plegamiento incorrecto. Muestra una reducción de 4-15% de neuronas dopaminérgicas, en concentraciones de  $1\mu\text{M}$ . (Mytilineou et al, 2004).

**Lactocistina**

Es un inhibidor selectivo e irreversible del proteosoma que inhibe la adquisición de dopamina alrededor de un 60-90% en concentraciones de  $10\mu\text{M}$  en un período de 24 y 48 hrs. (Mytilineou et al, 2004).

**L-dopa**

Es una droga comúnmente utilizada para el tratamiento de síntomas de Parkinson; sin embargo, tiene el potencial de generar peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y otras especies oxidantes debido al metabolismo enzimático o por auto-oxidación. En altas concentraciones, es tóxica para neuronas dopaminérgicas en cultivos de tejido, pero no muestra una inducción de degeneración en modelos in vivo (Mytilineou C et al, 2004).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Parkinson es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, aproximadamente el 3% de las personas mayores de 65 años la sufren y las probabilidades de adquirirla también aumentan con la edad. Hasta la fecha no se conoce cura, sin embargo si no se trata con medicamentos paliativos, puede resultar incapacitante y conllevar a una muerte prematura. Actualmente es considerado uno de los más sorprendentes y complejos desórdenes neurológicos, ya que su causa sigue siendo un misterio, pero la investigación en esta área es constante y activa.

El hecho de que se considere el estudio de los receptores nucleares Nurr1 y Nur77 como moléculas con posible implicación en el Parkinson es porque, a pesar de que Nur77 ha sido ampliamente estudiado en muerte apoptótica en la selección negativa de linfocitos T y B, trabajos recientes realizados con modelos neuronales han mostrado que Nur77 también podría participar en muerte no apoptótica, como la que se observa en la enfermedad. Puesto que como se mencionó anteriormente, existe la posibilidad de que Nur77 se una a los mismos elementos responsivos que Nurr1, entonces ambos pudieran activar los mismos genes en diferentes condiciones. De ser este el caso, Nurr1 pudiera ser un factor que sensibilice a las neuronas-DA a morir.

Como se ya mencionó, se han diseñado varios modelos de estudio del Parkinson. Los basados en el uso de animales presentan la ventaja de poder observar la sintomatología propia de la enfermedad, sin embargo debido a la presencia de diversos factores endógenos, podrían complicarse el análisis y la interpretación de resultados. Adicionalmente, la sobreexpresión o delección de un gen, en este caso alguno relacionado a la enfermedad de Parkinson, pudiera generar letalidad temprana del ratón, impidiendo así su estudio en la etapa adulta; tal es el caso del ratón nulo para Parkina. En el caso de los cultivos primarios de células mesencefálicas, su principal ventaja es que se trabaja con auténticas neuronas-DA, sin embargo el uso de éstos resulta un tanto limitante, debido al bajo rendimiento de neuronas-DA, además de que las neuronas provenientes de cultivos primarios son post-mitóticas limitando la vida del cultivo, requiriéndose en poco tiempo un cultivo nuevo.

En contraste, un sistema fácil de manipular, que brinda la posibilidad de estudiar el desarrollo del sistema nervioso son los cultivos de células ES. Su capacidad de proliferar indefinidamente provee una fuente ilimitada de muchos tipos celulares *in vitro*. Un mecanismo para lograr esto es el la formación de cuerpos embrionarios que, aunque no poseen la organización morfogénica de un embrión, sí sufren un proceso de diferenciación parecido, generando una cavidad equivalente a la proamniótica y la formación de derivados de las tres capas germinales. Otra ventaja es su habilidad para reintegrarse al embrión en desarrollo, generando descendencia fértil que posee la información genética brindada por las ES, demostrando de ese modo la estabilidad genómica de las mismas, con capacidad de derivar tipos celulares maduros. Además, el poseer un cariotipo diploide estable les permite ser accesibles de manipularse por ingeniería genética, permitiendo realizar análisis específicos. Existen también las células embrionarias humanas (hES) o las provenientes de primates, que reaccionan de manera similar ante los factores usados en protocolos murinos y han mostrado un desarrollo en cultivo semejante a estos. No obstante, características como una tasa de crecimiento más lenta, la posibilidad de formar tejido trofoectodérmico y requerimientos desconocidos para mantener su estado indiferenciado, las hacen menos

útiles en este momento que las ES murinas. Los protocolos de diferenciación realizados en células ES son los que ofrecen mayor obtención de neuronas-DA, en comparación con los cultivos primarios. Es justamente el protocolo de diferenciación de 5 etapas desarrollado por Lee et al (2000), el que muestra los mejores resultados.

Es por todas estas ventajas que ofrecen las neuronas dopaminérgicas derivadas de células ES, que constituyen un buen modelo alternativo y una herramienta para el estudio y posiblemente útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson.

## **4. HIPOTESIS**

Nur77 es un factor que contribuye a la muerte de las neuronas-DA y tiene un papel relevante en el proceso de neurodegeneración. Por su parte, Nurr1 es un factor que, al sobreexpresarse, podría generar susceptibilidad a morir por parte de las neuronas-DA.

## **5. OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Determinar la participación de Nurr1 y Nur77 en la diferenciación y muerte experimental de neuronas dopaminérgicas.

### **PARTICULARES**

1. Generar plásmidos de expresión constitutiva de Nurr1 y Nur77 bajo el control del promotor CMV-CBA (citomegalovirus “enhancer”/promotor “chicken- $\beta$ -actin”).
2. Generar líneas celulares que expresen constitutivamente Nurr1 y Nur77.
3. Determinar si la sobreexpresión de Nurr1 dirigida por el promotor CMV-CBA incrementa la producción de neuronas-DA a partir de células ES.
4. Determinar si Nur77 recapitula los mismos mecanismos que Nurr1 durante la formación de neuronas-DA.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE NURR1 Y NUR77

Para lograr la expresión constitutiva se decidió utilizar el promotor CMV-CBA (Citomegalovirus “enhancer”/promotor “chicken- $\beta$ -actina”) ya que se ha comprobado que promueve una expresión ubicua en células indiferenciadas así como en las no diferenciadas a diferencia del CMV, el cual sólo permite su expresión en células diferenciadas, tales como los precursores neurales (Chung et al 2001; Kim et al 2002).

El vector constitutivo que codifica para TR3 se derivó de un plásmido basado en el vector pCDNA3.1 (Invitrogen) al cual se le reemplazó la secuencia promotora original por el promotor CMV-CBA, mismo que se encontraba clonado en el vector pKS – pBluescript IKS, Stratagene-. Este vector generado, al cual se le llamó CMV-CBA/Nur77, se generó digiriendo los plásmidos pCDNA3.1-TR3\_FL con *Nde I* y *Xba I*, y pKS/CMV-CBA con *Nde I* y *Spe I*. En el primer caso se purificó un fragmento de 6768 pb que contenía la secuencia de TR3; en el segundo, se purificó un fragmento de 1492 pb correspondiente al promotor CMV-CBA, luego se ligaron ambos fragmentos.

Referente al plásmido CMV-CBA/Nurr1 primero se procedió a cambiar el promotor CMV del vector pCDNA3.1 (Invitrogen) por el CMV-CBA. Para ello se digirió dicho vector en los sitios *Nde I* y *Xba I*, obteniéndose un fragmento de 4921 pb correspondiente al vector sin promotor; y el pKS/CMV-CBA con *Nde I* y *Spe I*, purificándose un fragmento de 1492 pb que correspondía al promotor CMV-CBA; después se ligaron ambos fragmentos generando el vector pCDNA/CMV-CBA. Al mismo tiempo el plásmido CMX-Nurr1 se cortó en los sitios *Hind III* y *Nhe I* que flanqueaban a Nurr1 obteniéndose el fragmento de interés de 1796 pb; este se subclonó en *Hind III* y *Xba I* en el vector pKS para “ganar” los sitios de restricción *Xho I* y *Not I* y así poder clonar en estos sitios el “cassette” de Nurr1 en el ya generado pCDNA/CMV-CBA.

Las dos construcciones se verificaron estructuralmente por medio de su patrón de restricción con diferentes endonucleasas y por secuenciación utilizando el oligo CB-pCDNA (ver anexo, tabla 1), y funcionalmente al ser transfectadas a las células HEK-293T.

#### 6.1.1. Subclonación de fragmentos de DNA

Procedimiento:

1. Digerir las moléculas parentales de DNA con endonucleasas de restricción requeridas, incubando de 1-2 hrs a 37 °C.

Para una reacción de 20  $\mu$ l:

x  $\mu$ l de DNA (.5 a 4  $\mu$ g en agua)  
2  $\mu$ l de buffer de restricción 10X  
Enzima de restricción (1 a 5 U/ $\mu$ g de DNA)  
Agua c.b.p. 20  $\mu$ l

2. Separar los fragmentos de DNA digeridos por medio de electroforesis en gel de agarosa Sea Plaque de bajo punto de fusión (BioWhittaker Molecular Applications # 50100).
3. Cortar la banda de interés usando una lámpara de Dark Reader para visualizar el DNA. Extraer el DNA del gel utilizando el Gel Extraction Kit (Qiagen #20021).
4. Cuantificar el DNA purificado usando un gel de agarosa.
5. Mezclar el vector con el inserto en una proporción 1:5 para una reacción de 100 ng totales. Si el volumen final es muy grande, precipitar el DNA:
  - a) Añadir 1  $\mu$ l de glicógeno (20  $\mu$ g/ $\mu$ l) y 300  $\mu$ l de etanol absoluto.
  - b) Congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.
  - c) Centrifugar 5 minutos a  $15700 \times g$ .
  - d) Eliminar el sobrenadante y secar el pellet al vacío.
  - e) Resuspender el DNA en 5  $\mu$ l de agua.
6. Poner la reacción de ligación. Incubar toda la noche a  $16$  o  $4^{\circ}\text{C}$ .
 

Para una reacción de ligación de 5  $\mu$ l:

  - a) 3.5  $\mu$ l de DNA
  - b) 1  $\mu$ l de buffer de ligación con ATP 5X
  - c) 0.5  $\mu$ l de DNA ligasa T4
7. Una vez concluida la reacción, añadir 500  $\mu$ l de butanol para precipitar el DNA. Mezclar en vórtex y centrifugar a 14000 r.p.m. durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
8. Lavar el pellet con 100  $\mu$ l de etanol al 70% frío. Centrifugar a  $220 \times g$  durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y secar al vacío. Resuspender el pellet en 10  $\mu$ l de agua.
9. Transformar las células *E. coli* electrocompetentes con los productos de ligación. Seleccionar las transformantes en función de la resistencia al antibiótico incluido en el vector (en este caso, ampicilina).
10. Para cada transformante, purificar el DNA plasmídico por medio de una minipreparación de DNA. Posteriormente, verificarlas estructuralmente mediante enzimas de restricción. Ya identificadas las clonas de interés, amplificar el plásmido obtenido por medio de un maxiprep.

## 6.2. GENERACIÓN DE LINEAS CELULARES

Para verificar que los plásmidos generados fueran funcionales, se transfectaron transitoriamente en las células HEK 293T, provenientes de riñón de embrión humano.

Para los cultivos de células ES, se utilizó la línea AB2.2 de ratón, misma que se utilizó para generar posteriormente las líneas CMV-CBA/Nurr1 y CMV-CBA/Nur77 por medio de transfección estable. Para mantener estas células indiferenciadas, se utilizó la línea de fibroblastos murinos STO mitomizados.



## 6.2.1. Cultivo y transfección de células HEK293T

### a) Cultivo de células HEK 293T

Procedimiento:

1. Aspirar el medio utilizando la bomba de vacío.
2. Lavar 1 vez con 1 ml PBS.
3. Añadir 1 ml de tripsina 0.25% a cada plato de 10 cm (Corning #430167).
4. Incubar 3 minutos a 37°C.
5. Agregar 3 ml de medio de crecimiento (DMEM suplementado) para inactivar la tripsina y dispersar las células con pipeteo suave.
6. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml (Corning #430790).
7. Centrifugar 4 minutos a 220 ×g.
8. Retirar el sobrenadante utilizando la bomba de vacío.
9. Resuspender el pellet en 10 ml de medio. Tomar una alícuota de 10 µl y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
10. Sembrar  $1 \times 10^6$  células en platos de 10 cm para mantener la línea, y  $3.5 \times 10^5$  células en cajas de 6 pozos (Costar #3506) en 2 ml de medio.
11. Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### b) Transfección transitoria de células HEK 293T

La transfección transitoria se llevó a cabo utilizando CaCl<sub>2</sub>. Las condiciones se estandarizaron utilizando el plásmido pQB125-GFP que contiene a la proteína verde fluorescente, cuya expresión esta controlada por el promotor CMV.

Procedimiento:

Un día antes (24 hrs)

1. Sembrar  $3.5 \times 10^5$  células por pozo en 1.5 ml de medio de crecimiento en cajas de 6 pozos. Ajustar los volúmenes para obtener un volumen final de 2ml.

Transfección

1. Aspirar el medio con pipeta de 1 ml.
2. Agregar 1 ml de medio de crecimiento.
3. Mezclar para cada muestra:
  - 6.25 µl de CaCl<sub>2</sub> 2M
  - 5 µg de DNA
  - 38.75 µl de H<sub>2</sub>O estéril.Volumen total: 50 µl (ajustar con agua si el volumen de DNA cambia).  
Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar la mezcla de 50 µl de HBS 2X pH6.95 y resuspender por pipeteo.
5. Incubar 2 minutos a 37°C.
6. Agregar la mezcla a cada pozo por goteo y dispersar la solución moviendo la caja gentilmente.

7. Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
8. Cambiar el medio 17 hrs después de la transfección.

### **6.2.2. Cultivo de células STO y preparación de células alimentadoras por inactivación mitótica (“feeders”)**

Las células ES de la línea utilizada requieren de una capa alimentadora que las ayuda a mantenerse indiferenciadas. Esta consiste de fibroblastos STO inactivados mitóticamente. Las células STO se mantuvieron en crecimiento en platos de 10 cm cubiertos por una solución de gelatina 0.1% la cual debe dejarse por 2 hrs. a temperatura ambiente y luego aspirarse.

#### **a) Cultivo de células STO**

Procedimiento:

1. Aspirar el medio STO usando la bomba de vacío.
2. Lavar 2 veces con PBS.
3. Añadir 1 ml de tripsina 0.25% a cada plato de 10 cm e incubar a 37°C por 5 minutos.
4. Agregar al menos un volumen de medio STO para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando suavemente.
5. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml y centrifugar 5 minutos a 220 × g.
6. Retirar el sobrenadante con la bomba de vacío.
7. Resuspender el pellet en 5 ml de medio STO. Tomar una alícuota de 10 µl y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
8. Sembrar 1 x 10<sup>6</sup> células por cada plato de 10 cm previamente gelatinizado.

#### **b) Inactivación mitótica de células STO**

Las células alimentadoras se prepararon a partir de cultivos confluentes de células STO, las que se inactivaron mitóticamente con mitomicina C (Roche # 107409).

Procedimiento:

1. Añadir 200 µl de mitomicina C 50X (0.5 mg/ml en PBS) a cada plato de 10 cm. Esparcir la droga moviendo la caja gentilmente.
2. Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, por 2 hrs.
3. Después de la incubación, retirar el medio con bomba de vacío y lavar 2 veces con PBS.
4. Añadir 1 ml de tripsina 0.25% a cada plato e incubar a 37°C por 5 minutos.
5. Agregar al menos un volumen de medio STO para inactivar la tripsina y dispersar las células por pipeteo suave.

6. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml y centrifugar 5 minutos a 220 ×g.
7. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
8. Resuspender el pellet en 5 ml de medio STO. Tomar una alícuota de 10 µl y contar el número de células en cámara de Neubauer.
9. Sembrar 1 x 10<sup>6</sup> células por cada plato de 6 cm (NUNC #150288) en 5 ml de medio STO; 3 x 10<sup>6</sup> por cada plato de 10 cm en 10 ml de medio; 25,000 células/pozo de caja de 96 pozos en 200 µl de medio; 152,000 células/pozo de caja de 24 pozos en 2 ml de medio, previamente gelatinizados. Bajo estas condiciones, las células pueden mantenerse hasta por una semana en la incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para ello, es necesario cambiar periódicamente el medio para evitar su acidificación y revisar bajo el microscopio para verificar que la monocapa se mantenga en buenas condiciones.

### 6.2.3. Cultivo de células ES

Las células ES después de ser descongeladas deben ser subcultivadas al menos una vez para poder manipularse (electroporación, diferenciación, etc.). Durante el tiempo de cultivo deben mantenerse subconfluentes y evitar que las colonias se toquen unas a otras para prevenir cualquier tipo de diferenciación espontánea, para lo cual deben revisarse diariamente bajo el microscopio.

#### a) Subcultivo de células ES

Procedimiento:

1. Cambiar el medio 2-3 hrs. antes de subcultivar las células.
2. Aspirar el medio con bomba de vacío.
3. Lavar 2 veces con PBS.
4. Añadir 1 ml de tripsina 0.25% a cada plato de 6 cm e incubar a 37°C por 10 minutos.
5. Agregar al menos un volumen de medio M15 para inactivar la tripsina y dispersar las células pipeteando suavemente.
6. Transferir las células a un tubo estéril de 15 ml y centrifugar 5 minutos a 220 ×g.
7. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
8. Resuspender el pellet en 5 ml de medio M15. Tomar una alícuota de 10 µl y contar el número de células en cámara de Naubauer.
9. Sembrar 1 x 10<sup>6</sup> células por cada plato de 6 cm de células alimentadoras en 5 ml de medio M15.
10. Cambiar el medio diariamente para evitar que el medio se acidifique (tornándose color amarillo) hasta que el cultivo llegue a subconfluencia.

## 6.2.4. Congelación y descongelación de células

### a) Descongelación

Procedimiento:

1. Sacar el vial de congelación de las células requeridas del tanque de nitrógeno líquido y transferirlo inmediatamente a un baño de cultivo a 37°C (aproximadamente 1-2 minutos).
2. Transferir la suspensión celular a un tubo estéril de 15 ml y agregar 5 ml de medio correspondiente lentamente por la pared del tubo. Mezclar suavemente por inversión. Centrifugar a 220 ×g por 5 minutos.
3. Retirar el sobrenadante con la bomba de vacío.
4. Resuspender las células en 5 ml del medio apropiado. Tomar una alícuota de 10 µl y registrar la viabilidad celular en la cámara de Neubauer utilizando azul tripano (GIBCO #15250-061).
5. Sembrar las células en las condiciones apropiadas según el tipo celular:
  - 1 x 10<sup>6</sup> células HEK 293T en una caja de 6 cm
  - Al menos 5 x 10<sup>5</sup> células STO en una caja de 6 cm previamente gelatinizada
  - 1 x 10<sup>6</sup> células ES en una caja de 6 cm con células alimentadoras.
6. Cambiar el medio al día siguiente.

### b) Congelación

Procedimiento:

1. Tripsinizar las células en forma habitual. Para el caso de las células ES, cambiar el medio 2-3 horas antes.
2. Resuspender el pellet de células en una cantidad conocida de medio correspondiente. Tomar una alícuota de 10 µl y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
3. Centrifugar a 220 × g por 5 minutos.
4. Etiquetar los crioviales (Corning #2028) con el nombre de la línea celular, número de pase, cantidad celular y fecha.
5. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
6. Resuspender el pellet en la mitad del volumen de medio en requerido para obtener una densidad de 5 x 10<sup>6</sup> células/ml.
7. Agregar gradualmente, ya sea por la pared del tubo o por goteo, un volumen de medio de congelación 2X, agitando constantemente el tubo.
8. Alicuotar rápidamente en los crioviales previamente etiquetados, colocando de 0.5 – 1 ml de la suspensión celular por vial.
9. Transferir los crioviales a -70°C por 24 hrs. Transferir posteriormente al tanque de nitrógeno líquido para su almacenaje.

### 6.3.5. Electroporación de células ES

La transfección estable de las células ES de la línea AB2.2 se llevó a cabo mediante electroporación. Por cada evento de electroporación se usaron  $1.1 \times 10^7$  células (2 platos de 6 cm a densidad óptima) y 10µg de DNA previamente linearizado. Los plásmidos CMV-CBA/Nurr1 y CMV-CBA/Nur77 se linearizaron con la enzima *Ssp I*. El DNA debe estar libre de cualquier residuo de sales y compuestos orgánicos para poderse introducir a las células ya linearizado, por tal motivo se extrajo una vez con un volumen fenol/cloroformo y una vez con un volumen de cloroformo, se precipitó y se lavó 2 veces con etanol al 70%, se dejó secar el pellet y se resuspendió en el volumen requerido para obtener una concentración de 1 µg/µl en buffer TE 0.1X estéril.

Procedimiento:

1. Cambiar el medio 2-3 horas antes de realizar la electroporación.
2. Tripsinizar de forma habitual.
3. Resuspender el pellet de células en un volumen conocido de PBS. Tomar una alícuota de 10 µl y contar el número de células en la cámara de Neubauer.
4. Centrifugar a  $220 \times g$  por 5 minutos.
5. Retirar el sobrenadante usando la bomba de vacío.
6. Resuspender el pellet de células en un volumen de PBS requerido para obtener una densidad de  $1.1 \times 10^7$  células/ml.
7. Colocar 10 µg de DNA previamente linearizado sobre la pared interna de la celda de electroporación (Bio-Rad #165-2088).
8. Transferir 900 µl de la suspensión celular a la celda de electroporación y homogeneizar con la solución de DNA pipeteando suavemente, evitando hacer burbujas.
9. Colocar la celda en el electroporador y verificar que los parámetros sean los correctos:
  - el extensor de capacitancia debe estar a su máximo
  - el voltaje a 0.230 V
  - Capacitancia a 0.500 µF
10. Dar un pulso presionando los dos botones simultánea y rápidamente. La máquina hace un “beep” cuando la electroporación está completa y muestra la constante de tiempo, cuya lectura debe ser entre 5.6 y 7.0.
11. Ya en la campana de cultivo, transferir el contenido de la celda a un tubo de 50 ml estéril (Corning #430828) con medio M15.
12. Resuspender y repartir la solución en 2 platos de 10 cm con células alimentadoras. Las células electroporadas se tornan viscosas, por lo que hay que resuspender perfectamente pero sin hacer burbujas.
13. Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>

#### a) Selección

Después de 24 horas de haberse electroporado, se inició la selección de aquellas células que integraron el vector. Para ello, se adicionó antibiótico en dosis letales para las células ES excepto para aquellas que expresaran el gen que brinda la resistencia al agente selector, en este caso, los dos vectores contenían el gen de resistencia a neomicina. Por tal motivo, se utilizaron 300 µg/ml de G-418 (Gibco #10131-035). La

selección tomó de 12-15 días, durante la cual se fueron formando colonias que podían verse a simple vista.

Un día antes de finalizar la selección se prepararon platos de 96 pozos con fondo plano (Corning #3595) con células alimentadoras.

#### **b) Aislamiento de colonias**

Una vez concluida la selección se aislaron 50 colonias, eligiendo aquellas que fueran ligeramente más pequeñas que la punta de un tip para pipeta de 20  $\mu$ l y que tuvieran los bordes claramente definidos. El aislamiento tomó aproximadamente 4-5 días.

Procedimiento:

1. Cambiar el medio M15 2-3 horas antes.
2. Observar las células bajo el microscopio y señalar aquellas que vayan a escogerse.
3. Lavar las células con PBS y añadir 7 ml de PBS a cada plato de 10 cm.
4. A una caja de 96 pozos de fondo de U (Costar #3799) agregar 25  $\mu$ l de tripsina 0.25% por pozo, para la posterior trispinización de la colonia a escoger.
5. Con el tip de la pipeta de 20  $\mu$ l trazar un pequeño círculo alrededor de la colonia y raspar cuidadosamente desde la periferia hacia el centro para desprender la colonia del plato.
6. Aspirar la colonia con un solo movimiento y colocarla en un pozo de la caja de 96 pozos de fondo de U con tripsina 0.25% previamente agregada.
7. Repetir los pasos 5 y 6 con el resto de las colonias.
8. Incubar la caja con las colonias por 12 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
9. Durante la incubación, reemplazar el medio STO de la caja de 96 pozos con las células alimentadoras por medio M15 (100  $\mu$ l por pozo).
10. Detener la trispinización añadiendo 25  $\mu$ l de medio M15 a cada pozo del plato con tripsina. Dispersar las colonias mecánicamente por pipeteo suave, alrededor de unas 10 veces.
11. Transferir los 50  $\mu$ l de la suspensión celular a la caja de 96 pozos con células alimentadoras. Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
12. Cambiar el medio diariamente.

#### **b) Expansión y congelamiento de colonias**

Una vez que las células ES electroporadas sembradas en los platos de 96 pozos alcanzaron el 70% de confluencia, la mitad se subcultivó a platos de 24 pozos (Corning #3524) con células alimentadoras y posteriormente a cajas de 6 cm, y la otra mitad se congeló.

Procedimiento:

1. Cambiar el medio 2-3 horas antes.
2. Lavar 2 veces con PBS.
3. Agregar 50  $\mu$ l de tripsina 0.25% e incubar a 37°C por 12 minutos.

4. Durante la incubación, reemplazar el medio de cultivo de una caja de 24 pozos con células alimentadoras por 1 ml medio M15.
5. Detener la trispinización añadiendo 50  $\mu$ l de medio de congelación 2X y pipetear 6-10 veces para disgregar las colonias.
6. Transferir 50  $\mu$ l (0.5 del volumen total) al plato con las células alimentadoras.
7. Incubar 3-5 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Cambiar el medio diariamente.
8. La caja de 96 pozos con los restantes 50  $\mu$ l envolverla en parafilm y congelarla a -70°C.
9. Cuando las células cultivadas hayan alcanzado el 70% de confluencia, subcultivarlas a platos de 6cm con células alimentadoras. Para ello, seguir los pasos 1-5, aumentando la cantidad de PBS a 500  $\mu$ l y el volumen de tripsina y de medio M15 para inactivar la trispinización a 100  $\mu$ l cada uno.

### **6.3. PRODUCCIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS. PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN**

El protocolo utilizado para diferenciar neuronas-DA a partir de células troncales embrionarias, fue el establecido por Lee et al (2000), el cual se ha estandarizado para las condiciones del laboratorio sobre la línea de células troncales embrionarias AB2.2. El mismo se realizó previamente en células silvestres para comprobar la obtención de resultados dentro del rango de los reportados. Este consta de 5 etapas: la primera corresponde a la expansión de células ES indiferenciadas sobre una capa de células alimentadoras; la segunda, se induce la formación de cuerpos embrionarios (EBs, por sus siglas en inglés) en suspensión; la tercera es la selección de los precursores neurales a partir de la adhesión de dichos EBs en medio definido (ITSFn); en la cuarta etapa se parte de una densidad conocida de precursores seleccionados ( $1.5-2 \times 10^5$  /cm<sup>2</sup> cels) y se expanden en presencia de Fgf2, Fgf8 y Shh; finalmente, la quinta corresponde a la inducción de diferenciación de los precursores neurales expandidos por medio de remoción de los factores del medio (figura 10). Es en la etapa de selección y diferenciación donde se llevan a cabo inmunicitoquímicas para detectar células positivas para nestina (marcador de los precursores neurales) y para tubulina (marcador de neuronas maduras), respectivamente.

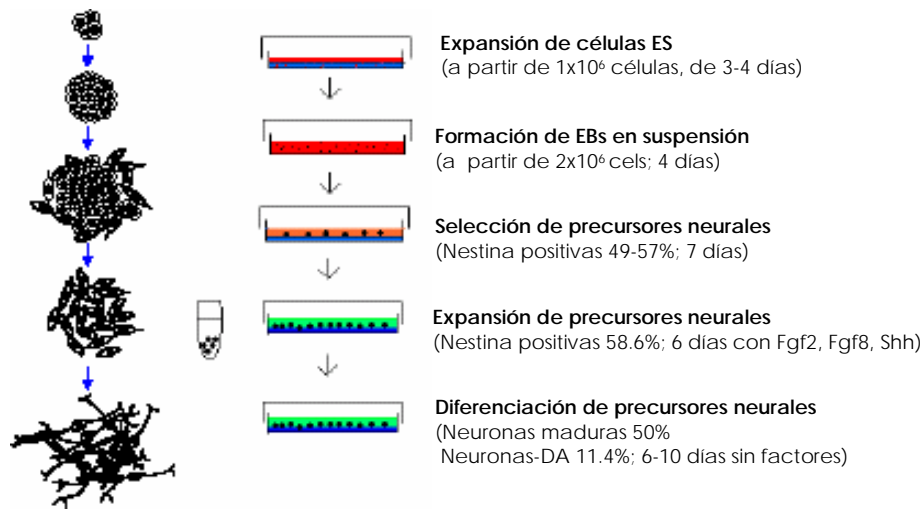


FIGURA 10. Esquema del protocolo de diferenciación dopaminérgica a partir de células ES.

### 6.3.1 Formación de cuerpos embrionarios (EBs)

Procedimiento:

1. Subcultivar las células ES a una densidad de  $3 \times 10^6$  células en una caja de 10 cm previamente gelatinizado.
2. Agregar medio M15 suplementado con 1000 U de LIF (Chemicon, LIF2010).
3. Cultivar las células por 3-4 días cambiando el medio diariamente.
4. Aspirar el medio y lavar 2 veces con PBS.
5. Agregar 1 ml de tripsina 0.25% e incubar a  $37^\circ\text{C}$  por 10 minutos.
6. Inactivar la tripsina con al menos un volumen de medio M15 y transferir a un tubo de 15 ml estéril.
7. Centrifugar  $220 \times g$  por 5 minutos. Resuspender las células en 5 ml de medio M15.
8. Tomar una alícuota de  $10 \mu\text{l}$  y contar en la cámara de Neubauer. Se esperan aproximadamente  $1.5 \times 10^7$  células por plato de 10 cm.
9. Sembrar  $2 \times 10^6$  células en un plato bacteriológico de 10 cm en 10 ml de medio M15.
10. Cultivar las células por 4 días a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Cambiar el medio en el día 2 de la siguiente manera:
  - a) Transferir los EBs a un tubo de 15 ml estéril con una pipeta de 10 ml para evitar dañar a los EBs.
  - b) Dejar que se asienten en el fondo del tubo.
  - c) Aspirar el medio con la bomba de vacío evitando llevarse los EBs, y resuspender suavemente en 10 ml de medio M15.
  - d) Transferir gentilmente los EBs con una pipeta de 10 ml a la caja bacteriológica original.
11. En el día 4 pasar a la selección de células positivas para nestina.



### **6.3.2. Selección de células positivas para nestina (precursores neurales)**

Procedimiento:

1. Transferir los EBs a un tubo de 15 ml estéril con una pipeta de 10 ml.
2. Permitir que se asienten al fondo del tubo (aproximadamente 5 minutos).
3. Aspirar el medio con bomba de vacío y añadir 10 ml de medio M15.
4. Transferir los EBs a una caja de 10 cm previamente gelatinizada. Incubar por 24 hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
5. Cambiar el medio M15 por 10 ml de medio ITSFn.
6. Cultivar los EBs por 7 días cambiando el medio ITSFn cada 2 días y al séptimo día pasar a la expansión de precursores neurales. Al finalizar puede realizarse una inmunocitoquímica contra nestina para detectar la presencia y determinar el porcentaje de los precursores neurales.

### **6.3.3. Expansión de células positivas para nestina**

Procedimiento:

1. Preparar 2 días antes de pasar a la etapa de expansión las cajas correspondientes:
  - a) Cubrir con 0.5 ml de Poly-D-Lysina (Sigma # P7886) 10 µg/ml una caja de 24 pozos. Incubar toda la noche a 37°C.
  - b) Al siguiente día lavar 2 veces con PBS.
  - c) Incubar con 0.5 ml de PBS toda la noche a 37°C.
  - d) Al siguiente día lavar 1 vez más con PBS.
  - e) Cubrir los pozos con 0.5 ml de fibronectina (Gibco # 33016-015) 1 µg/ml. Incubar a 37°C al menos por 3 hrs.
  - f) Lavar 1 vez con PBS antes de usarse (las cajas pueden mantenerse a 4°C en PBS hasta por una semana).
2. Aspirar el medio ITSFn con la bomba de vacío.
3. Lavar 2 veces con PBS.
4. Agregar 1 ml de tripsina 0.05%
5. Incubar por 5-7 minutos a 37°C.
6. Inactivar la tripsina con al menos 1 volumen de medio M15. Transferir a un tubo de 15 ml estéril y esperar 5 minutos para permitir que los EBs se asienten en el fondo del tubo, y tomar la suspensión restante.
7. Centrifugar a 220 × g por 5 minutos.
8. Aspirar el medio y resuspender en medio de expansión sin factores para contar en la cámara de Neubauer.
9. Centrifugar nuevamente y resuspender en medio de expansión (con Fgf2, Fgf8 y Shh) para obtener una densidad de 1.5-2 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> (300-400,000 células por pozo de caja de 24). Sembrar en las cajas de 24 pozos pre-tratadas. Incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.
10. Cambiar el medio de expansión al tercer día y diariamente hasta el sexto día.

### **6.3.4. Diferenciación de neuronas dopaminérgicas**

Procedimiento:

1. Cambiar el medio de expansión por medio de diferenciación e incubar las células a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por otros 6 días.
2. Cambiar el medio de diferenciación cada dos días.

## **6.4. DETECCIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE NURR1 Y NUR7**

Para detectar los niveles de expresión de Nurr1 y Nur77 exógeno en las células HEK 293T y en las clonas de las células ES seleccionadas por neomicina, se llevaron a cabo análisis mediante RT-PCR a partir de RNA de dichas células utilizando los oligos Nurr1 5' y Nurr1 3'; TR3 5' y TR3 3', respectivamente (ver anexo, tabla 2). También se detectó la expresión de las proteínas mediante un ensayo tipo western blot (en el caso de la expresión transitoria en las células 293T) a partir de extractos de proteína de las mismas.

### **6.4.1. RT-PCR**

#### **A) Extracción de RNA**

La extracción del RNA de las células 293 así como de las clonas de células ES se llevó a cabo mediante el uso de TRIzol, un reactivo que incorpora la mezcla estable de fenol, isothiocinato de guanidina, colorantes y estabilizantes que facilitan el aislamiento del RNA.

Procedimiento:

1. Tripsinizar las células de manera habitual.
2. Centrifugar a 220 × g por 5 minutos.
3. Aspirar el sobrenadante con bomba de vacío.
4. Resuspender el pellet en un volumen conocido de PBS y tomar una alícuota de 10 µl y contar en cámara de Neubauer.
5. Volver a centrifugar a 220 ×g por 5 minutos y agregar PBS de forma que sólo cubra el pellet y resuspender cuidadosamente.
6. Añadir 1 ml de TRIzol (Invitrogen #15596-026) por cada 5-10<sup>6</sup> células por pipeteo.
7. Incubar las muestras homogeneizadas 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación de los ácidos nucleicos.
8. Agregar 200 µl de cloroformo a cada tubo por cada ml de TRIzol.
9. Agitar con vortex suave por 10 segundos y dejar 5 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar 157 ×g por 15 minutos. Se formarán tres fases: la fase acuosa, interfase, y una fase rojiza; tomar la acuosa y evitar llevarse la interfase, la cual lleva el DNA y las proteínas.

11. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y añadir 500  $\mu$ l de isopropanol a cada tubo por cada ml de TRIzol; mezclar suavemente por inversión para precipitar el RNA. Dejar por 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Centrifugar 157  $\times$ g por 10 minutos. Se formará un pellet el cual es el RNA.
13. Quitar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 75% y dar vortex.
14. Centrifugar 157  $\times$ g por 15 minutos.
15. Quitar el etanol y dejar secar a temperatura ambiente.
16. Redisolver el RNA en agua DEPC (libre de RNAsas) por pipeteo.
17. Determinar la concentración de RNA mediante la lectura en el espectrofotómetro a 260nm y su correspondiente corrimiento en un gel de formaldehído.
18. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
19. Para eliminar el DNA genómico, agregar al RNA DNAsa RNAsas free (Roche # 11119915001) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Inactivar a  $70^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

## B) cDNA

Mezcla para cDNA por reacción de 30  $\mu$ l:

H <sub>2</sub> O bidestilada estéril (DEPC)	8.9 $\mu$ l
Buffer RT 5X	6 $\mu$ l
DTT 0.1M 10X	3 $\mu$ l
dNTPs 10 mM	0.6 $\mu$ l
Oligo dT 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
Transcriptasa reversa	0.5 $\mu$ l
RNA	1 $\mu$ g en 12 $\mu$ l

Procedimiento:

1. Resuspender 1  $\mu$ g de RNA en 12  $\mu$ l de agua DEPC por vortexeo con dos pulsos de 30 segundos. Colocar en hielo.
2. Calentar el RNA a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos.
3. Colocar en hielo inmediatamente.
4. Agregar la mezcla para cDNA al RNA y mezclar por pipeteo.
5. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas.
6. Al término de la incubación tomar 6  $\mu$ l de la reacción y agregarlos a la mezcla del PCR. El resto guardarlo a  $4^{\circ}\text{C}$  para períodos cortos o bien almacenarlo a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## C) PCR

Mezcla para PCR por reacción de 50  $\mu$ l:

H <sub>2</sub> O bidestilada estéril (DEPC)	32 $\mu$ l
Buffer Taq DNA polimerasa 10X	5.0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	2.5 $\mu$ l
dNTPs 10 mM	2 $\mu$ l

Oligonucleótido 5´(200 ng/μl)	1.0 μl
Oligonucleótido 3´(200 ng/μl)	1.0 μl
Taq DNA polimerasa 5 U/μl	0.5 μl
cDNA	6 μl

Procedimiento:

1. Colocar los tubos en el termociclador llevando el protocolo de ciclos y temperatura adecuado al par de oligos utilizados.
2. Correr en un gel de agarosa 5-8 μl de la reacción para observar los resultados.

### **6.4.2. WESTERN BLOT**

Para llevar a cabo análisis tipo western blot de los extractos de proteína se utilizó un anticuerpo policlonal anti-Nurr1 (Chemicon #AB5778) y anti-Nur77 (Santa Cruz Biotechnology #sc-5569), y posteriormente un anticuerpo anti-conejo IgG acoplado a peroxidasa (Sigma #A0545).

#### **6.4.2.1. Extractos de proteína**

Procedimiento:

1. Tripsinizar las células en forma habitual.
2. Lavar el pellet de células con PBS.
3. Agregar un volumen de buffer de lisis igual al volumen del pellet de las células.
4. Colocar las células en hielo y lisarlas por sonicación (3 ciclos de 10 segundos).
5. Centrifugar 17500 ×g durante 10 minutos a 4°C. Tomar el sobrenadante.
6. Determinar la concentración de proteínas en el espectrofotómetro por medio de una curva de Bradford.

#### **6.4.2.2. Electroforesis de proteínas en gel desnaturizante (SDS-PAGE)**

Procedimiento:

1. Preparar un gel desnaturizante de acrilamida (ver anexo).
2. Agregar el buffer de carga a 80-100 μg de muestra (el volumen final no debe exceder de 20 μl). Calentar a 99°C por 5 minutos y cargar en el gel.
3. Pre-correr el gel a 50V para que las muestras atraviesen el stacking gel (15 minutos, aprox.). Posteriormente correrlo a 100-200 V hasta que el colorante llegue al final (1 hora, aprox).
4. Separar el gel de los cristales con ayuda de una espátula.

#### **6.4.2.3. Western Blot para Nurr1 y Nur77**

Procedimiento:

1. Correr el gel de proteína.
2. Preparar el buffer de transferencia y enfriarlo a 4°C.
3. Cortar la membrana de nitrocelulosa de acuerdo a las dimensiones del gel (utilizar guantes durante todo el proceso).
4. Equilibrar el gel, sumergir la membrana (pre-humedecida en metanol), dos hojas de papel filtro y las 2 fibras en buffer de transferencia por 15 minutos.
5. Preparar el “sandwich” de transferencia:
  - a. Poner sobre una superficie limpia el cassette con la cara negra hacia abajo.
  - b. Colocar sobre esa misma cara una fibra, enseguida una hoja de papel filtro, el gel ya equilibrado, sobre este la membrana. Encima, colocar la otra hoja de papel filtro y al final la segunda fibra.
  - c. Eliminar cualquier burbuja de aire que se haya formado deslizando sobre el “sandwich” una pipeta cuidadosamente.
6. Cerrar el cassette firmemente y colocarlo dentro del módulo de transferencia. Igualmente, colocar la unidad de enfriamiento, previamente congelada. Llenar la cuba con buffer de transferencia.
7. Transferir las proteínas a la membrana de nitrocelulosa en la cámara Mini Protean 3 System (Bio-Rad) 1 hora a 100V y 350 mA, o bien 12 horas a 30V, 90mA.
8. Terminada la transferencia, hacer 3 lavados de la membrana con TBST: 1 de 10 minutos, y luego 2 de 5 minutos, en agitación.
9. Bloquear la membrana con una solución de leche al 5% en TBST durante 1 hora a temperatura ambiente, o bien 12 horas a 4°C, en agitación.
10. Incubar con el anticuerpo primario (anti-Nurr1 o Nur77 1:200 en leche al 5% en TBST) durante 1-2 horas a temperatura ambiente, ó 12 horas a 4°C.
11. Hacer 1 lavado con TBST de 15 minutos, y luego otros 2 de 10 minutos.
12. Incubar el anticuerpo secundario (anti-conejo acoplado a peroxidasa 1:12,000 en leche al 5% en TBST) durante 30-45 minutos a temperatura ambiente.
13. Repetir el paso 11.
14. Eliminar el exceso de agua de la membrana.
15. Hacer una mezcla 1:1 de las soluciones del Western Blotting Detection Reagents 1 y 2 (Amersham #RPN2106) e inmediatamente ponerla por una esquina de la membrana sobre una superficie limpia. Dejar reposar 1 minuto.
16. Inmediatamente colocar la membrana en una papel seco y escurrir el exceso de la mezcla anterior. Envolverla en papel cleanpack limpio y bien estirado, y pegarla al cassette de exposición; de esta manera llevarla al cuarto oscuro.
17. Ya en oscuridad, cortar un film del tamaño de la membrana y colocarlo sobre esta. Cerrar el cassette y dejar exponer 1-3 minutos.
18. Revelar por 1 minuto con GBX Developer (Kodak #1901875) y fijar también 1 minuto con GBX fixer (Kodak #1900943). Lavar el film con agua y dejar secar.

### 6.4.3. INMUNOCITOQUÍMICA

Para detectar la presencia de precursores neurales (nestina) y de neuronas postmitóticas (Tubulina- $\beta$ -III) en los cultivos donde se llevó a cabo el proceso de diferenciación dopaminérgica, se realizaron inmunocitoquímicas al finalizar la etapa de selección y la de diferenciación, respectivamente. Al principio este diagnóstico se hizo en los precursores y neuronas obtenidas de las ES silvestres para demostrar que el protocolo marchaba correctamente.

Para realizar análisis cuantitativo de los precursores y las neuronas presentes se tomaron fotografías utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300) y una cámara digital (CoolSNAP RS, Photometrics).

Procedimiento:

1. Quitar el medio usando la bomba de vacío.
2. Lavar 2 veces con PBS (en el caso de las células 293, 1 sólo lavado y retirar con pipeta).
3. Fijar las células con 200  $\mu$ l de PFA 4% fresco por 10 minutos.
4. Lavar 3 veces con PBS (para células 293, sólo 2 lavados).
5. Bloquear con 200  $\mu$ l de SS 10%, Tritón X-100 0.1% en PBS por 30 minutos en agitación.
6. Incubar el anticuerpo primario (ver anexo, tabla 3) por 1 hr a temperatura ambiente en agitación (la dilución correspondiente se realiza en solución de bloqueo).
7. Lavar 3 veces con PBS.
8. Incubar el anticuerpo secundario (ver anexo, tabla 4) por 30 minutos a temperatura ambiente, cubierto con papel aluminio y en agitación (se diluye la concentración correspondiente en SS 10%, Tritón X-100 1% en PBS).
9. Lavar 3 veces con PBS.
10. Teñir con DAPI 1:1000(Molecular Probes #D-1306) por 2 minutos.
11. Lavar 1 vez con PBS y agregar 200  $\mu$ l de solución de montaje.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE NUR77 Y NURR1

Para conseguir la expresión constitutiva de Nur77 y Nurr1 en las células ES así como en neuronas-DA formadas a partir de éstas, se generaron los vectores de expresión bajo el control del promotor CMV-CBA.

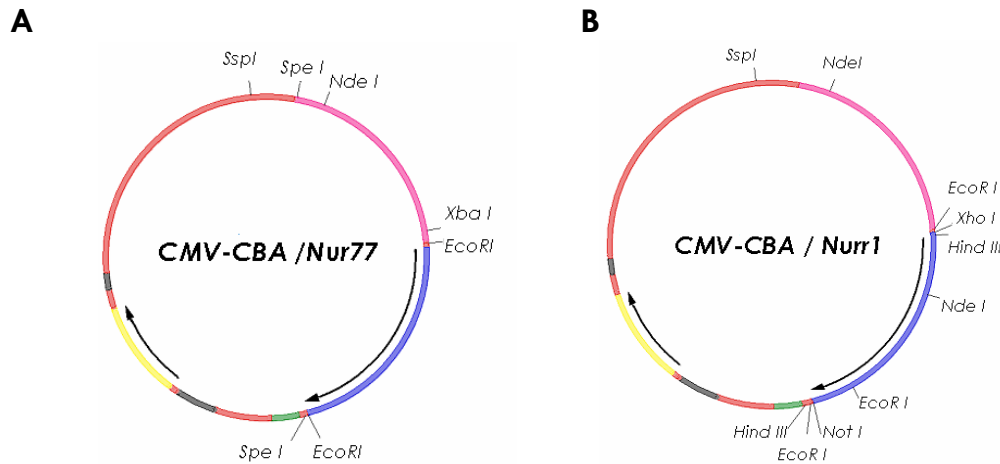


Figura 11. Plásmidos de expresión constitutiva de Nur77 y Nurr1 bajo el promotor de CMV-CBA. En ambos vectores el promotor CMV-CBA corre de la posición 230 a la 1950 (en magenta). En el caso de Nur77 (A), el gen va del sitio 1982 al 3821, en el de Nurr1 (B) este corre de la 1982 a la 3821 (ambos en azul). En verde se señalan los sitios BGHPA, en negro la señal de poliadenilación SV40 y en amarillo la secuencia para neomicina. Las flechas indican los marcos de lectura iniciados con ATG. Ambos plásmidos se linealizaron para su transfección en el sitio *Ssp I*.

Para verificar que los plásmidos resultantes fueran funcionales, se transfectaron transitoriamente a las células 293T. Después de 48 horas de la transfección se les realizó una inmunocitoquímica, cuyos controles positivos fueron aquellos vectores con la expresión del gen bajo el promotor CMV, los cuales ya habían sido probados en reportes anteriores (Castro-Obregón, 2004; Maira 1999). Ambas construcciones con el promotor CMV-CBA se expresaron en dichas células (figura 12).

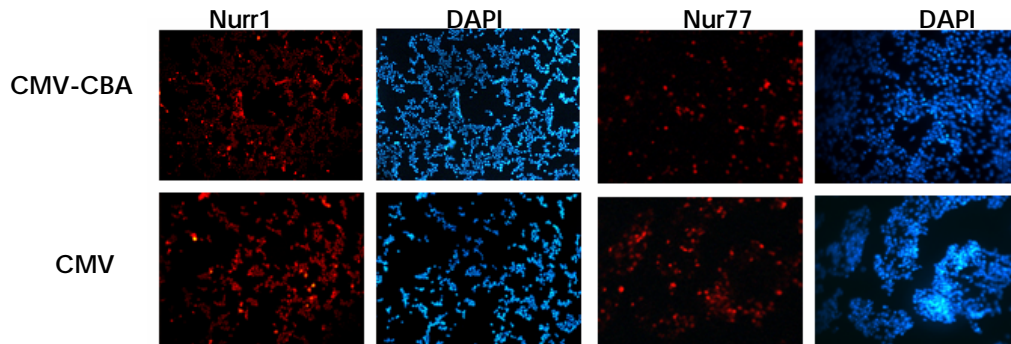


Figura 12. Expresión transitoria de CMV-CBA/Nurr1 y CMV-CBA/Nur77 en células HEK293T. Ambas construcciones muestran una expresión de Nurr1 así como de Nur77 similar o incluso un poco mayor que aquellos bajo el promotor CMV. En rojo se observa el anticuerpo para los dos genes, en azul los núcleos teñidos con DAPI.

Análisis por RT-PCR de las células 293T transfectadas mostraron la expresión del RNAm (RNA mensajero) de Nurr1 y de Nur77 exógeno al utilizar para su amplificación los oligos Nurr1 5', Nurr1 3'; y TR3 5', TR3 3', respectivamente (Figura 13).



Figura 13. Niveles de expresión del RNAm Nurr1 y Nur77 exógeno en células HEK293T en análisis por RT-PCR. Cultivos confluentes de células 293T se transfectaron transitoriamente con los plásmidos CMV-CBA/Nurr1 y CMV-CBA/Nur77. Pasadas 48 horas, se les extrajo el RNA y se llevó a cabo el RT-PCR con los oligos correspondientes a cada gen. **A**, Expresión de Nurr1 exógeno en células 293T sin transfectar (Wt) y transfectadas. **B**, Expresión de Nur77 exógeno en células 293T Wt y transfectadas.

Posteriormente, análisis por western blot realizados a partir de extractos de proteína de células 293T transfectadas, confirmaron finalmente la expresión de Nurr1 y Nur77. Para Nurr1, las células 293T transfectadas mostraron la banda esperada y respecto a Nur77 se localizó una banda de ~70 KDa, ambas más intensas que sus respectivos controles positivos (figura 14). En ambos casos se detectaron otras bandas además de las esperadas que pudieran ser modificaciones postraduccionales como sumoilaciones o fosforilaciones.

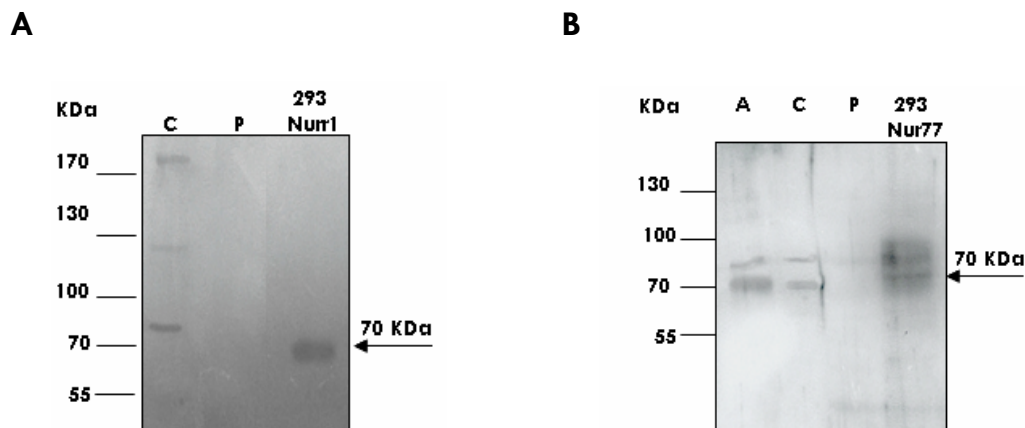


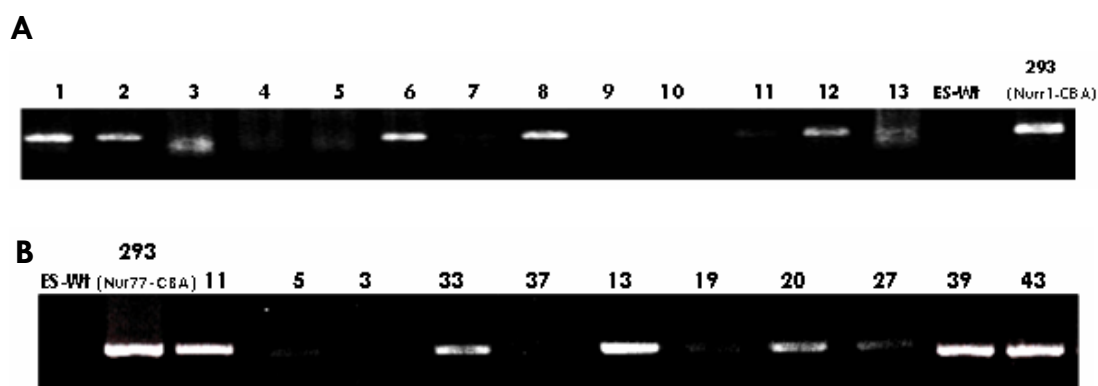
Figura 14. Niveles de expresión de Nurr1 y Nur77 en células 293T mostrados en análisis por western blot. 48 horas después de la transfección, las células se lisaron para obtener el extracto de proteína. Se cargaron 100 µg de proteína en un gel desnaturalizante al 10% y se analizaron por medio de un western blot con el respectivo anticuerpo. **A**, Expresión de Nurr1: C, cerebro (control positivo); P, pulmón (control negativo), 293T-Nurr1 (células transfectadas) **B**, Expresión de Nur77: A: glándula adrenal (control positivo); C, cerebro; P, pulmón (control negativo), 293T-Nur77 (células transfectadas). Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína de interés. Las bandas que aparecen además de las de interés pueden deberse a posibles fosforilaciones o sumoilaciones que sufriera la proteína.



## 7.2. SELECCIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES QUE EXPRESEN NUR77 Y NURR1

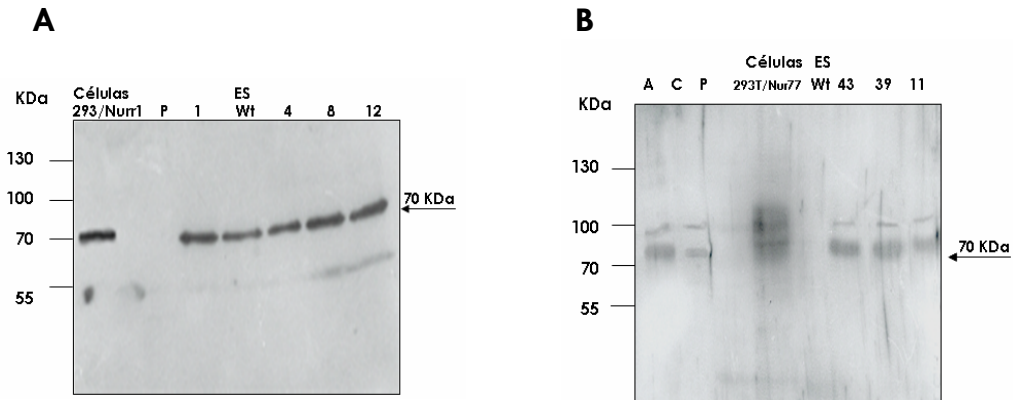
Ya demostrado el funcionamiento de los plásmidos generados, se procedió a obtener las líneas de células ES que expresaran estable y constitutivamente Nurr1 y Nur77 (ES-Nurr1 y ES-Nur77, respectivamente). Para ello, las células ES silvestres (ES-Wt) fueron transfectadas con los vectores linearizados correspondientes, seleccionando posteriormente a las clonas que fueran resistentes a G-418. En base a lo anterior, se escogieron 50 clonas por cada construcción, las cuales se aislaron y expandieron después para analizar la expresión de cada uno de los genes.

Respecto a Nurr1, el primer análisis se realizó mediante RT-PCR para 13 clonas y para Nur77 se analizaron 11 clonas. Para ambos genes se encontró que aproximadamente el 50% de las clonas escogidas expresaban el RNAm de interés, sin embargo entre estas difería el nivel de expresión del mismo (figura 15).



**Figura 15. Niveles de expresión del RNAm en clonas de Nurr1 y Nur77 constitutivos.** Cultivos confluentes de células ES fueron transfectadas con las construcciones de Nurr1 y Nur77 bajo el promotor CMV-CBA. Las clonas obtenidas fueron sometidas a una selección de resistencia ante G-418. Posteriormente fueron aisladas y expandidas, y de estas últimas una parte fue congelada y la otra sirvió para extracción de RNA. A partir de este, se llevó a cabo el análisis por RT-PCR. **A**, Expresión del RNAm de Nurr1 en células ES transfectadas, donde el control negativo corresponde a las células ES-Wt, y el positivo a las células 293 transfectadas con CMV-CBA/Nurr1. **B**, Expresión del RNAm Nur77 en células ES transfectadas. El control positivo son las células 293 transfectadas con CMV-CBA/Nur77, y el control negativo las células ES-Wt. Los números indican el número de clona.

En base a este análisis, se eligieron aquellas clonas que expresaran altos niveles del RNAm para analizarlas posteriormente por western blot (figura 16). Para esto, se procedió a expandir dichas clonas para luego lizarlas y obtener así el extracto de proteína correspondiente.

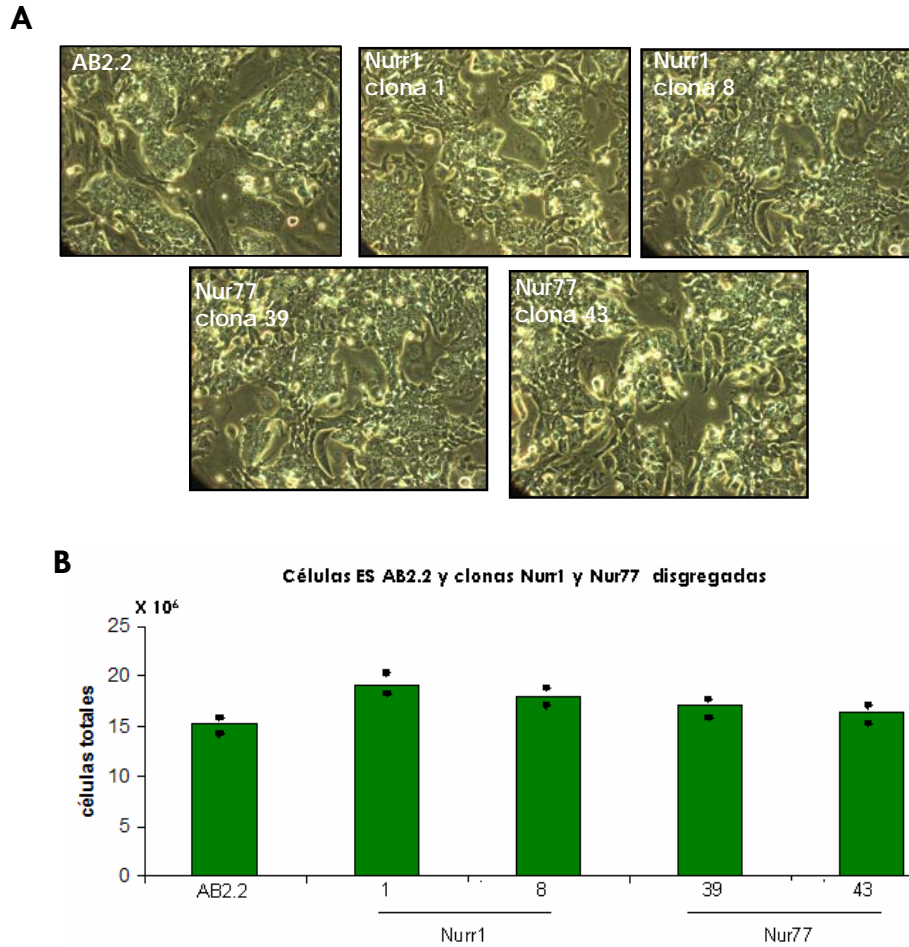


**Figura 16. Niveles de expresión de Nurr1 y Nur77 en clonas seleccionadas.** Aquellas clonas que expresaron mayores niveles de Nurr1 y Nur77 se expandieron y luego se lisaron para obtener el extracto de proteína necesario para verificar los niveles de expresión de ambos genes. **A**, Expresión de Nurr1 en clonas 1, 4, 8 y 12. Las células ES-Wt expresan también Nurr1 pero en menor cantidad que las clonas donde se sobreexpresa el gen y que la clona 4, cuya expresión del RNAm fue baja. El control positivo son las células 293 transfectadas y el control negativo el pulmón (P). **B**, Expresión de Nur77 en clonas 43, 39 y 11. El control positivo son las células 293 transfectadas, así como la glándula adrenal (A) y el cerebro (C). Como control negativo se tiene al extracto de proteína del pulmón y de las ES-Wt. Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína de interés.

Los resultados obtenidos denotan que a pesar de que Nurr1 se expresa en las células ES silvestres (figura 16A) se logró una sobreexpresión del gen en las clonas analizadas. Esto se basa en la intensidad de las bandas del western blot y a la presencia de un fragmento de ~400 pb en el RNAm (proveniente de la construcción) de las clonas, mas no de las silvestres. En contraste, Nur77 no se observa en las células silvestres pero sí se logra su sobreexpresión en las clonas.

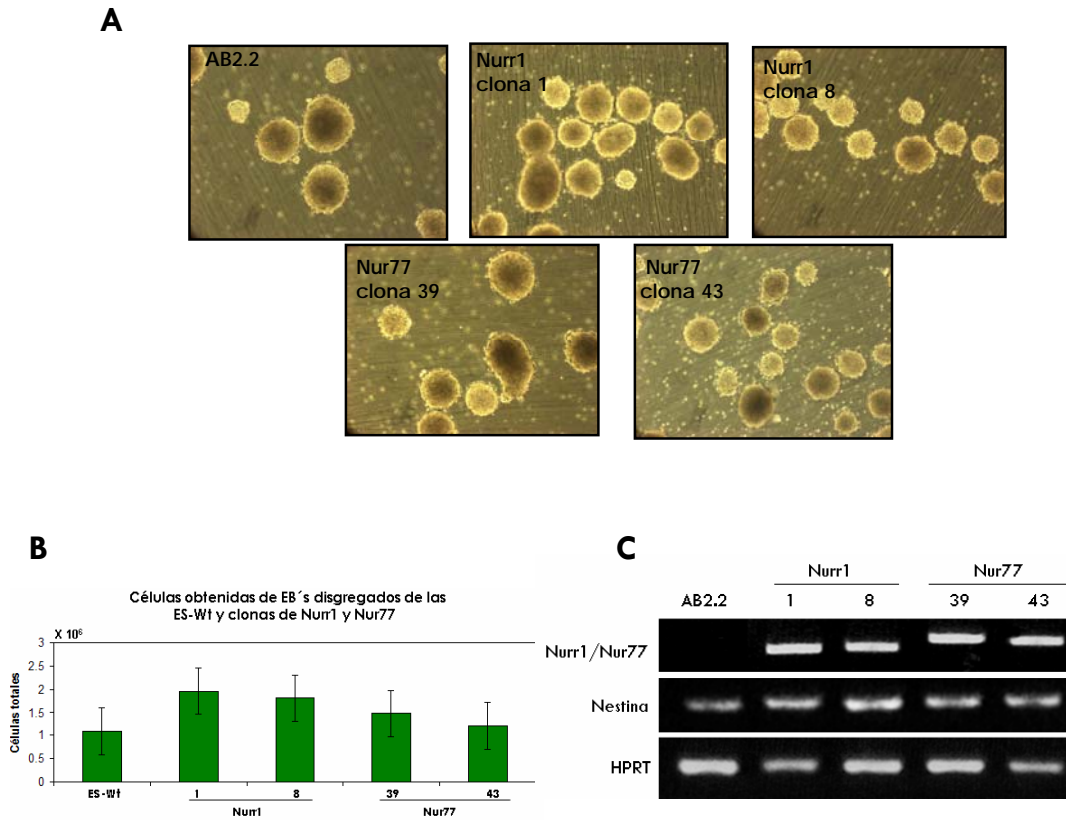
Posteriormente, para verificar la expresión constitutiva de ambos genes, se escogieron las clonas que mostraron mayores niveles de proteína –para Nurr1 las clonas 1 y 8, y para Nur77 las clonas 39 y 43– para expandirlas sobre células alimentadoras (figura 17) y luego diferenciarlas a neuronas-DA a partir de la previa formación de EBs (figura 18A), tal como lo indica el protocolo de diferenciación (Lee, 2000).

Durante la etapa de expansión de células ES se detectó que las clonas ES-Nurr1 así como las ES-Nur77 crecían de forma aparentemente más acelerada que las ES-Wt. Esto se estimó a partir del conteo de células totales obtenidas: ES-Wt:  $15.3 \pm 0.5 \times 10^6$ ; Nurr1, clona 1:  $19.2 \pm 0.5 \times 10^6$ ; clona 8:  $18 \pm 0.5 \times 10^6$ ; Nur77, clona 39:  $17 \pm 0.5 \times 10^6$ ; clona 43:  $16.4 \pm 0.5 \times 10^6$ . Así mismo, se notó una diferencia en su morfología, ya que las colonias se tornaban más expandidas y con bordes no tan definidos como las silvestres (figura 17).



**Figura 17. Expansión de células ES silvestres y de clonas seleccionadas de Nurr1 y Nur77.** **A**, Las clonas de Nurr1 y Nur77 se cultivaron sobre células alimentadoras al igual que las ES silvestres de la línea AB2.2. Posteriormente se expandieron en medio M15 suplementado con LIF. En estas condiciones se observaron diferencias en la morfología de las colonias de células ES-Nurr1 y ES-Nur77 respecto a las ES-Wt. **B**, Gráfica que muestra el número de células disgregadas de células ES obtenidas en la fase de expansión. Al parecer, el crecimiento observado por las clonas ES-Nurr1 y ES-Nur77 fue aparentemente más acelerado que las de la línea AB2.2.

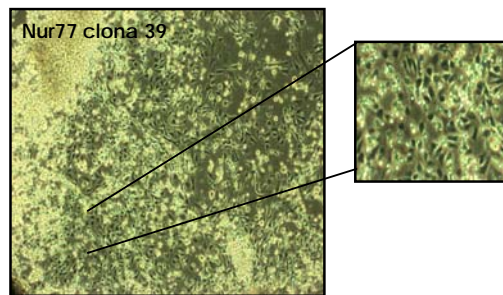
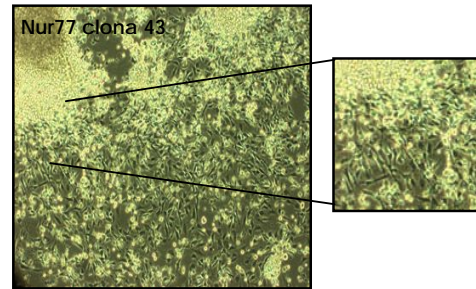
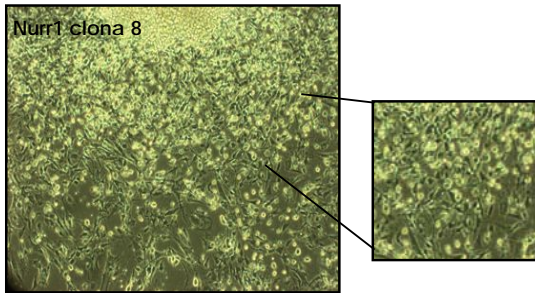
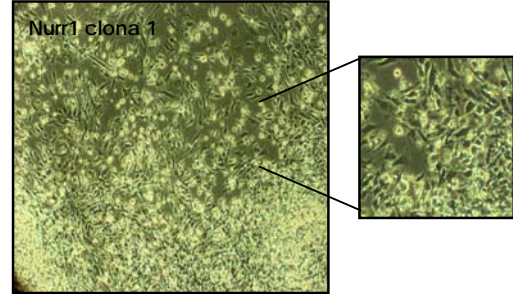
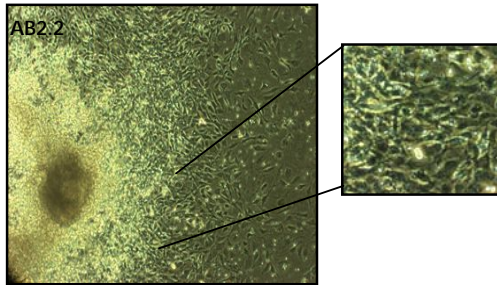
La fase de formación de los EBs, se llevó a cabo por duplicado, ya que una caja se usó para disgregarse y adherir una parte de las células obtenidas, sin usar células alimentadoras, para promover su diferenciación “en corto” y así realizarse una inmunodetección rápida de estos genes que permitiría detectar si su expresión era ubicua. En los conteos realizados de células individuales se obtuvieron números relativamente mayores en las células provenientes de ES-Nurr1 y ES-Nur77: ES-WT:  $1.08 \pm 0.5 \times 10^6$ ; Nurr1, clona 1:  $1.95 \pm 0.5 \times 10^6$ , clona 8:  $1.8 \pm 0.5 \times 10^6$ ; Nur77 clona 39:  $1.47 \pm 0.5 \times 10^6$ , clona 43:  $1.2 \pm 0.5 \times 10^6$  (figura 18B). Las células restantes se utilizaron para detectar la presencia de Nurr1 y Nur77 por RT-PCR, usando el producto de la amplificación del gen HPRT como control de carga (ver anexo, tabla 1). La otra caja con EBs se usó para llevar a cabo el protocolo de diferenciación hacia neuronas-DA. Cabe mencionar que las inmunocitoquímicas contra Nurr1 y Nur77 en las células adheridas provenientes de los EBs no dieron señal positiva, sin embargo el RT-PCR mostró la presencia del RNAm de ambos genes en un nivel de expresión muy parecida entre clonas del mismo gen (figura 18C).



**Figura 18. Desarrollo de cuerpos embrionarios (EBs) y detección del RNAm Nurr1 y Nur77 en células silvestres y clones.** **A**, Después de haber expandido las ES-WT, las ES-Nurr1 y ES-Nur77, se procedió a formar los Ebs a partir de dichas células por 4 días. Los correspondientes a Nurr1 y Nur77 no mostraron cambios morfológicos aparentes. **B**, Al ser disgregados los Ebs se procedió a contar el número de células totales. Puede verse el aumento en los correspondientes a Nurr1 y Nur77. **C**, Posteriormente se procedió a realizar análisis de RT-PCR contra ambos genes. La expresión del RNAm de Nurr1 así como de Nur77 se mantiene.

Durante la etapa de selección se observó abundante muerte celular y las células adheridas mostraron la morfología y crecimiento esperados (figura 19A). Además, se detectó un mayor número de células totales por parte de los precursores proveniente de ES-Nurr1 y ES-Nur77 que en los Wt: silvestres:  $1.2 \pm 0.25 \times 10^6$ ; Nurr1 clona 1:  $1.9 \pm 0.25 \times 10^6$ , clona 8:  $1.87 \pm 0.25 \times 10^6$ ; Nur77 clona 39:  $1.8 \pm 0.25 \times 10^6$ , clona 43:  $1.6 \pm 0.25 \times 10^6$  (Figura 19C). En relación con la expresión de tubulina- $\beta$ -III, el porcentaje de células positivas –obtenido por medio del conteo de células disgregadas– se encuentra un poco más abajo de lo reportado pero dentro del rango esperado para las Wt tomadas como control ( $15.4 \pm 2\%$  obtenido, contra  $17.4 \pm 2.24\%$  reportado); las clonas de Nurr1 mostraron un aumento respecto a las control que cae dentro de lo esperado (clona 1:  $19 \pm 2.4\%$ ; clona 8:  $17.18 \pm 3.36\%$ ); mientras que las clonas de Nur77 un número menor (clona 39:  $10.88 \pm 0.69$ ; clona 43:  $8.16 \pm 1.04$ ) (Figura 19 B y D). En el caso de nestina, marcador de precursores neurales, no pudo detectarse por inmunocitoquímica, por tanto no pudieron realizarse los conteos correspondientes. Alternativamente se hizo un RT-PCR contra dicho marcador utilizando los oligos NesRat 5' y NestRat 3' (ver anexo, tabla 2). La expresión del RNAm de Nurr1 y Nur77 se mantuvo en esta etapa (figura 19E).

**A**



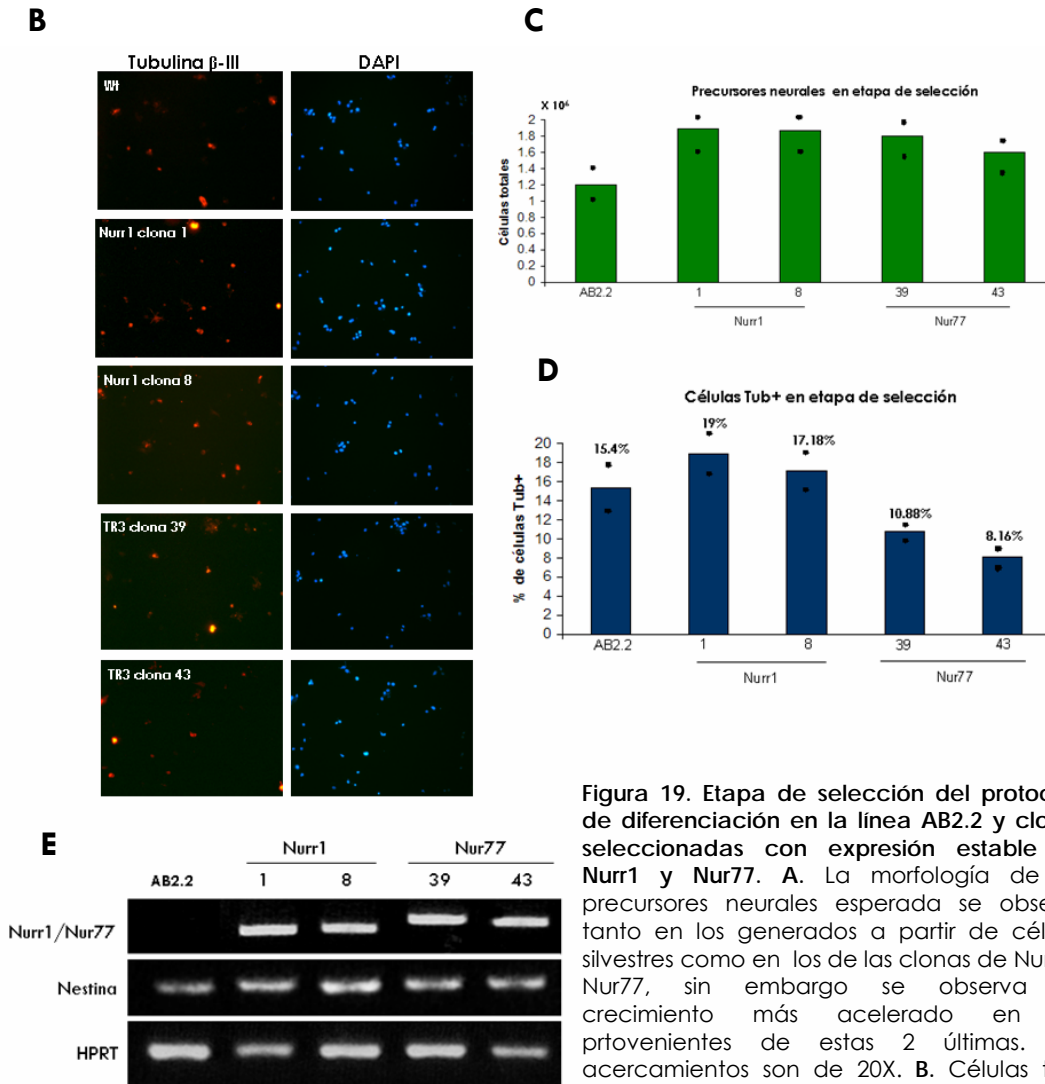
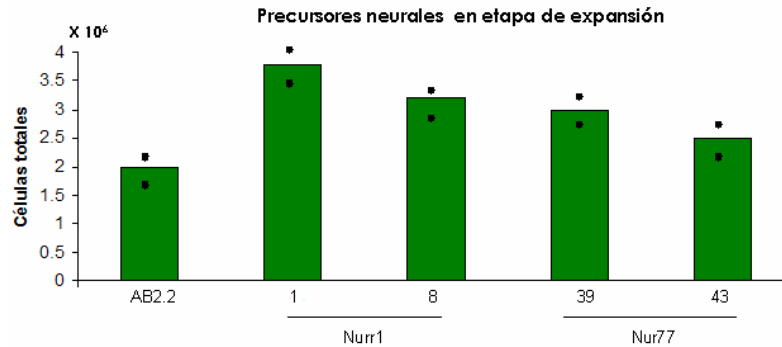


Figura 19. Etapa de selección del protocolo de diferenciación en la línea AB2.2 y clonas seleccionadas con expresión estable de Nurr1 y Nur77. **A.** La morfología de los precursores neurales esperada se observa tanto en los generados a partir de células silvestres como en los de las clonas de Nurr1 y Nur77, sin embargo se observa un crecimiento más acelerado en los provenientes de estas 2 últimas. Los acercamientos son de 20X. **B.** Células tub+ disgregadas a los 5 días y adheridas por 2 hrs (en rojo se observa la expresión de tubulina- $\beta$ -III, en azul los núcleos teñidos con DAPI). **C.** Número de células disgregadas totales. **D.** Porcentaje de células positivas para tubulina- $\beta$ -III. Los datos representan las medias  $\pm$  desviación estándar. **E.** Expresión del RNAm de Nurr1, Nur77 y nestina en los precursores neurales. La expresión de nestina se detectó en las células control y en las clonas. En el caso de las células ES-Wt se probaron los dos juegos de oligos mostrando la ausencia de bandas, sin embargo aquí sólo se muestra uno como referencia.

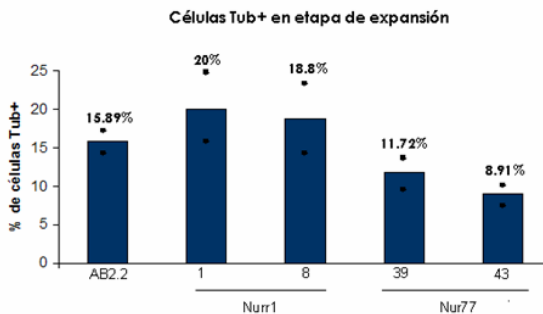
En la fase de expansión, las células control proliferaron un poco por debajo del rango esperado aunque con una cantidad aceptable para seguir el protocolo ( $2 \pm 0.25 \times 10^6$  obtenido, contra  $2.4 \pm 0.5 \times 10^6$  reportado), mientras que las clonas de Nurr1 y Nur77 mostraron cierto incremento (Nurr1 clona 1:  $3.8 \pm 0.25 \times 10^6$ ; clona 8:  $3.2 \pm 0.25 \times 10^6$ ; Nur77, clona 39:  $3 \pm 0.25 \times 10^6$ ; clona 43:  $2.5 \pm 0.25 \times 10^6$ ) (Figura 20A). Tal como se ha reportado, los porcentajes de tubulina- $\beta$ -III en esta etapa no se modificaron

notoriamente, ya que las células silvestres incrementaron muy poco ( $15.89 \pm 1.15\%$ ). Para Nurr1 y Nur77, prácticamente no hubo un aumento notorio en relación a lo obtenido en la fase de selección (Nurr1, clona 1:  $20 \pm 4.7\%$ ; clona 8:  $18.8 \pm 4.66\%$ . Nur77, clona 39:  $11.72 \pm 2.02\%$ ; clona 43:  $8.91 \pm 1.42\%$ ) (figura 20B). De manera similar a la selección, la expresión del RNAm de Nurr1 y Nur77 se conservó, lo mismo se observó para el marcador nestina (figura 20C).

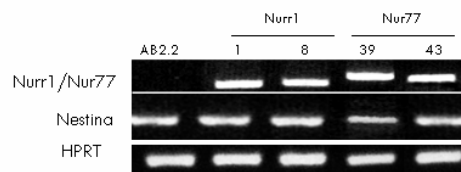
**A**



**B**



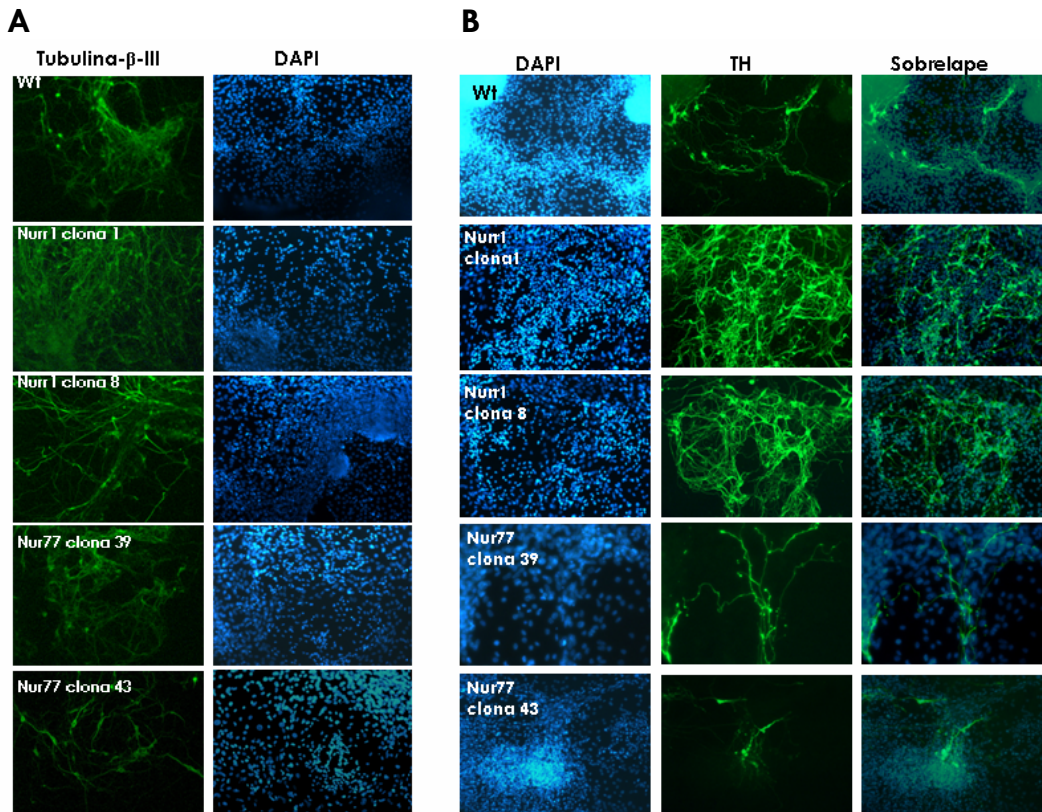
**C**



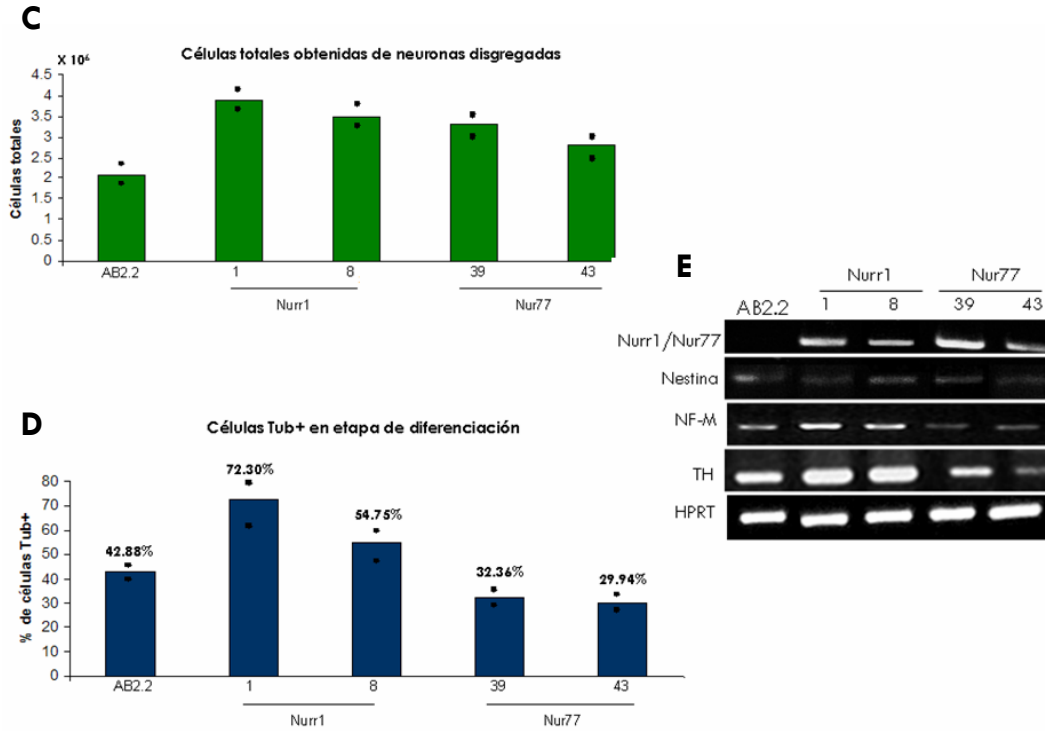
**Figura 20. Etapa de expansión.** A. Las células silvestres proliferaron dentro del rango esperado, mientras que las clonas de Nurr1 mostraron un aumento; no obstante las clonas de Nur77 aunque se encuentra dentro del rango reportado muestra un número menor en comparación con las de Nurr1. B. Porcentaje de células tub<sup>+</sup>. C. Expresión del RNAm de Nurr1, Nur77 y nestina.

Finalmente, durante la diferenciación las células también observaron un crecimiento y morfología habitual. Al final de la diferenciación se realizaron inmunotinciones para tubulina- $\beta$ -III y TH, no obstante sólo pudieron realizarse conteos para tubulina ya que en células disgregadas no se detectó muy bien la señal de TH (Figura 21A). Sin embargo, en una inmunocitoquímica llevada a cabo directamente sobre el cultivo sí se detectó expresión de TH (figura 21B). Referente al número total de células, el control se mantuvo muy similar a la expansión, aunque siguiendo un poco debajo del rango esperado pero de carácter aceptable ( $2.06 \pm 0.25 \times 10^6$  obtenido, contra  $2.3 \pm 0.45 \times 10^6$  reportado). Mientras tanto, las células que sobreexpresaban Nurr1 y Nur77 mostraron un ligero incremento respecto a las control (Nurr1 clona 1:

$3.9 \pm 0.25 \times 10^6$ , clona 8:  $3.3 \pm 0.25 \times 10^6$ ; Nur77 clona 39:  $3.5 \pm 0.25 \times 10^6$ , clona 43  $2.8 \pm 0.25 \times 10^6$ ) (figura 21C). A pesar de lo anterior, las clonas de Nur77 generaron un menor número de células tubulina- $\beta$ -III (clona 39:  $32.36 \pm 1.8\%$ ; clona 43:  $29.94 \pm 2.12\%$ ), en comparación con el control que se encontraba dentro de lo esperado ( $42.88 \pm 2.21\%$  obtenido, contra  $50 \pm 11.4\%$  reportado). No obstante, Nurr1 muestra un incremento (clona 1:  $72.30 \pm 6.19\%$ , clona 8:  $54.75 \pm 5.27\%$ ) (figura 21D). Así mismo se llevó a cabo un RT-PCR para detectar el RNAm de Nurr1, Nur77, nestina, neurofilamentos y TH, utilizando para estos dos últimos los oligos NF-M 5' y NF-M 3'; TH5' y TH 3', respectivamente (ver anexo, tabla 2). En el primer caso, Nurr1 y Nur77 se conservan aun en las neuronas; para nestina se observó una disminución en relación a las dos etapas precedentes (como era lo esperado). Referente a la detección de NF-M, ésta correlaciona con los porcentajes de tubulina en los conteos. Finalmente para TH, en base a los análisis por densitometría, se observa un aumento de aproximadamente 1.8 y 1.4 veces por parte de Nurr1 (clona 1 y 8, respectivamente) respecto a las Wt, y una disminución de 0.3 y 0.5 veces para Nur77 (clona 39 y 43, respectivamente) que más o menos corresponde a lo detectado en las inmunotinciones sobre las neuronas en cultivo (Figura 21E).







**Figura 21. Etapa de diferenciación.** Al sexto día de expansión, los precursores fueron cultivados en el medio correspondiente para diferenciar hacia neuronas-DA; al sexto día de cultivo una parte se tripsinizó para detectar la expresión de los marcadores correspondientes. **A** y **B**. Inmutinciones para tubulina y TH (ambas en verde, núcleos teñidos con DAPI en azul). Se observa un incremento notorio para ambos marcadores por parte de las neuronas obtenidas de las ES-Nurr1. **C**. Las neuronas con Nurr1 y Nur77 denotan un aumento de células totales en contraste con las Wt. **D**. Sin embargo, el porcentaje de células Tub<sup>+</sup> en las provenientes de ES-Nurr1 es mayor y de las de ES-Nur77 es menor.

**E**. Detección del RNAm para Nurr1, Nur77, nestina, NF-M y TH. La expresión de los dos primeros se conserva en las neuronas en un nivel similar a las otras etapas. Nestina disminuye mientras que el nivel de expresión de NF-M correlaciona con los números obtenidos de células Tub<sup>+</sup>. Para TH se observa un incremento para las neuronas con Nurr1 en un promedio de 1.6 veces (análisis por densitometría), mientras que las de Nur77 disminuyen a más de la mitad, ambos en comparación con las silvestres.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 PROPIEDADES DE NURR1

Como ya se mencionó, Nurr1 influye positivamente en la diferenciación dopaminérgica así como en la sobrevivencia y/o mantenimiento de los precursores neuronales y de las propias neuronas-DA (Saucedo-Cárdenas,2001; Kim et al 2002). En base a esto, diversos autores han reportado que neuronas-DA derivadas de diversas líneas de células ES que expresan Nurr1 (cuyas neuronas no expresan Nurr1 exógeno, ya que usaron el promotor pCMV) conservan las características morfológicas, propiedades electrofisiológicas y de comportamiento de neuronas propias del cerebro medio; así mismo presentan expresión de marcadores como Tub- $\beta$ -III, NeuN y TH (Lee et al 2000; Kim et al 2002; Chung et al 2002; Yamashita et al 2006). Además, recientemente se ha propuesto que las células ES que expresan Nurr1 podrían diferenciar a células neuronales más eficientemente que las ES silvestres ya que se ha observado una morfología neuronal más definida y un aumento en el porcentaje de los marcadores neuronales arriba mencionados (Yamashita et al 2006).

En base a lo anterior, nuestros resultados mostraron que las neuronas obtenidas de las clonas de ES-Nurr1 mostraron características morfológicas similares a las de las provenientes de las ES-Wt. Sin embargo denotaron un incremento en el número de células totales así como células Tub+, acompañado de un aumento en la expresión del RNAm de TH. Esto último probablemente se deba, como lo han propuesto algunos autores, a una cierta influencia positiva de Nurr1 debido a su unión con el elemento responsivo localizado en el promotor de la TH (Sakurada et al 1999; Hermanson et al 2006).

Se ha hablado también sobre el mantenimiento y protección que Nurr1 podría brindar a las células que lo expresan, no obstante podría convertirse en un factor de susceptibilidad cuando se mantiene su expresión en neuronas. En un estudio realizado por Ae Lee y sus colaboradores (2002) reportaron que las neuronas generadas de una línea inmortalizada de ES neurales con expresión de Nurr1 son altamente resistentes a la droga MPP+ pero muy sensibles a tratamientos con 6-OHDA, mostrando diferencias en el tipo de muerte (mientras que el MPP+ producía muerte por necrosis, la 6-OHDA generaba apoptosis). Según el reporte, esto podría deberse a que la presencia de Nurr1 promueve una respuesta diferente al ser sobreexpresado, es decir, modifica diferencialmente las 2 vías de muerte, generando una susceptibilidad a las drogas. Entonces, Nurr1 podría participar como un modulador positivo/negativo en la neurotoxicidad presentada por las neuronas-DA, y las variaciones de su expresión podrían ser un factor de susceptibilidad para la neurodegeneración, tal como lo han planteado otros autores (Ae Lee et al 2002; Jankovic et al 2005). En relación a esto y dado que las neuronas-DA que obtuvimos expresaron constitutivamente el gen de Nurr1, sería interesante saber si esto les beneficia o constituye un factor de susceptibilidad ante drogas del tipo de las usadas en el trabajo arriba mencionado. De igual manera, sería interesante analizar la sensibilidad ante otras drogas como la rotenona y el peróxido de hidrógeno que simulan otros daños observados en la enfermedad de Parkinson (como la disfunción mitocondrial y daño oxidativo), ya que en un estudio realizado por Yamashita y colaboradores (2006) muestran que neuronas-DA obtenidas de ES que expresan Nurr1, se protegen del estrés y la muerte celular ocasionados por estas drogas. Sin embargo, dichas células no mantuvieron la expresión de Nurr1 sino sólo se detectó hasta la etapa de precursor neural.

## 8.2 PROPIEDADES DE NUR77

Inicialmente, Nur77 fue reconocido por su participación en apoptosis durante la selección negativa de linfocitos T; sin embargo, también se ha detectado su expresión en diversos tipos de cáncer, estimulando el ciclo celular así como la proliferación de células cancerosas (Moll et al 2006). Otros estudios han revelado que el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF-A) induce la expresión de TR3 en células endoteliales, promoviendo la formación de vasos sanguíneos así como su supervivencia (Zeng et al 2006). En consistencia con esto, nuestros resultados muestran que las clonas de ES-Nur77 denotaron un incremento aparente en el número de células totales y un desarrollo morfológico normal en todas las etapas. Esto confirma que Nur77 puede tomar distintos modos de acción, dependiendo del tipo celular y la naturaleza de la señal recibida.

Por otro lado, diversos autores han involucrado a Nur77 en el desarrollo de grupos neuronales aunque su mecanismo aun se desconoce (Saucedo-Cárdenas et al 1996; Winoto et al 2002). Además también se ha detectado su activación por tratamiento con NGF en células PC12, cuyo fenotipo es similar al neuronal, así como su inducción en neuronas del hipocampo (Davis et al 1994). Consistente con nuestros resultados, la obtención de neuronas Tub<sup>+</sup> confirman una participación, aunque muy limitada, en el desarrollo de neuronas y en específico de células TH<sup>+</sup>. Lo anterior podría deberse a diversos factores puesto que, a pesar que se ha reportado que la interacción Nurr1-Nur77 provoca una reacción de activación genética (Maira et al 1999), el bajo número de células Tub<sup>+</sup> y la baja expresión del RNAm de TH podría deberse a una especie de secuestro de Nurr1 endógeno por Nur77 en la etapa de precursor neural, impidiendo la unión de Nurr1 al promotor de la TH o de algún mecanismo que impida la supervivencia de células involucradas en la diferenciación neuronal dopaminérgica.

En base a nuestras observaciones, el transcurso del desarrollo a partir de las células ES hasta la formación de EBs es similar entre las clonas de Nur77, Nurr1 con las Wt, no obstante podría ser que a partir de la fase de selección no tengan los mismos blancos y se dirijan hacia vías distintas del desarrollo, incluyendo el neural.

## 8.3 EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE NURR1 Y NUR77 EN LAS CÉLULAS ES

La capacidad que poseen las células ES de generar todos los tipos celulares junto con la manipulación genética y procedimientos de diferenciación *in vitro*, constituyen un poderoso sistema para generar animales experimentales y líneas celulares que permiten analizar la participación de genes a lo largo de la diferenciación celular. Es en este tipo de estudios donde se han evaluado diversos promotores tanto virales como celulares, y dentro de los más populares se ha estudiado el del citomegalovirus (CMV) debido a su fuerte actividad en la mayoría de las líneas celulares. Sin embargo, diversos estudios donde se ha examinado la expresión estable de transgenes en células ES indiferenciadas y durante la diferenciación neural, han reportado la inactividad de dicho promotor en las primeras y en los EBs detectando solamente su función en el precursor neural (Chung et al 2001; Kim et al 2002). En contraste, el promotor del citomegalovirus “enhancer”/promotor “chicken- $\beta$ -actina” (CMV-CBA) demostró una actividad estable en las diferentes etapas de la diferenciación (Chung et al 2001; Zeng et al 2003). Consistente con esto, existen diversos trabajos donde se han generado neuronas-DA a partir de células ES que expresaban Nurr1 bajo el promotor CMV y donde estos reportes mencionan que Nurr1 se expresó solamente en precursores neurales (Kim et al 2002; Yamashita 2006). Diversos autores proponen que esta

diferencia en la actividad de los promotores pudiera deberse a que las células ES sólo permiten la expresión de un número limitado de genes mientras mantienen una capacidad pluripotente (Suwabe e al 1998; Boeuf et al 1997). Por tanto, podrían limitarse a expresar sólo algunos (co) factores necesarios para la actividad del promotor viral CMV, limitando su función. En cambio, pudieran tener todos los componentes necesarios para una actividad transcripcional completa de promotores celulares (como el CMV-CBA y EF) actuando de manera ubicua (Chung et al 2001).

Considerando lo anterior, nos interesamos por utilizar el promotor CMV-CBA para lograr una expresión constitutiva de Nurr1 y Nur77 con la finalidad de estudiar la participación de ambos genes a lo largo del proceso de obtención de neuronas-DA a partir de células ES, y posteriormente estudiar la resistencia o susceptibilidad de las neuronas obtenidas ante drogas utilizadas para generar modelos de Parkinson. Nuestros resultados demostraron la eficiencia del promotor, ya que la expresión ubicua del RNAm de dichos genes se detectó en cada etapa del protocolo de diferenciación.

En los mismos trabajos mencionados, reportan que la morfología de las neuronas es convencional pero que el porcentaje de marcadores neurales aumentó, sin embargo no mencionan nada sobre cambios morfológicos en las células ES. Nosotros notamos que, en contraste con las colonias redondeadas y con bordes definidos de las ES-Wt, las colonias de Nurr1 así como de Nur77 generan colonias extendidas y de bordes irregulares. Además, otra particularidad que detectamos fue el aparente crecimiento acelerado de las ES-Nurr1 y ES-Nur77. Respecto a Nurr1 estas características no parecieran deberse a su expresión, ya que las ES-Wt lo expresan de forma endógena y no muestran tal fenotipo; sin embargo tal vez se deba a que el promotor, al generar una expresión ubicua, “incrementa” la expresión de Nurr1 y eso pudiera modificar su estructura. Para el caso de Nur77 podría deberse a su expresión exógena, sin embargo esto es mera especulación, ya que hasta la fecha no se ha reportado que la sobreexpresión de Nurr1 o Nur77 genere modificaciones morfológicas en dichas células. Cabe mencionar que en nuestro laboratorio al expresar en células ES el gen mutado de la superóxido dismutasa ( $SOD1^{A4V}$ ) se observa un fenotipo similar, por tal motivo, sería interesante en un futuro analizar esto en detalle, debido a que aparentemente en nuestros resultados no se debe a un efecto de la transfección, ya que en células consideradas como control (i.e., células transfectadas con el plásmido no muestran expresión de RNAm de Nurr1 o Nur77), las colonias no muestran tales cambios morfológicos. Sin embargo, a pesar de las características mencionadas, en las clonas de ES-Nurr1 el proceso de diferenciación dopaminérgica no se vio afectado, no así para las ES-Nur77.

## **8.4 PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN DOPAMINÉRGICA**

En el 2000 Lee y sus colaboradores demostraron la generación de neuronas-DA a partir de células ES basado en un protocolo que consta de 5 etapas basado en el desarrollo “normal” de las ES durante la embriogénesis *in vitro*. En dicho trabajo se reporta la obtención de hasta un 20% de células TH<sup>+</sup> al haber expandido los precursores con Fgf2, Fgf8 y Shh. Sin embargo, una modificación realizada por el mismo equipo en el 2002 consistió en transfectar a las ES con Nurr1 bajo el promotor CMV, logrando un incremento de hasta un 70% de células totales que mostraban características propias del fenotipo dopaminérgico. De igual manera, el estudio realizado por Yamashita et al (2006) observó un incremento de células TH<sup>+</sup> ( $45\pm 5\%$  a  $77\pm 10\%$ ) y de Tub<sup>+</sup> ( $42\pm 5\%$  a

75±10%). Otro trabajo llevado a cabo en el mismo año por Chung et al (2002) generó también neuronas-DA bajo la misma premisa que Lee sólo que utilizando un promotor similar al CMV-CBA llamado EF –“elongation factor  $\alpha$  promoter”–. La expresión del RNAm de Nurr1 se logró detectar desde las células ES hasta las neuronas-DA, siendo más intensa en el precursor neural. A pesar de ello, las células obtenidas mostraron un fenotipo propio expresando marcadores dopaminérgicos sin coexpresar aquellos de tipo serotoninérgico o gabaérgico. También se observó que un 61.9± 3.9% de las neuronas Tub<sup>+</sup> fueron TH<sup>+</sup>, sin embargo el número total de Tub<sup>+</sup> entre su control y sus clonas fue similar. Así mismo, reportaron la formación de cúmulos celulares con un aumento aparente de células TH<sup>+</sup>.

Basado en lo anterior, como ya se mencionó, en nuestro trabajo nos interesaba conocer el efecto de Nurr1 y Nur77 desde las células ES hasta las neuronas-DA. De igual manera, la expresión constitutiva de Nur77 nos permitiría ver si el proceso de diferenciación se lleva a cabo de forma habitual o se convierte en letal para las neuronas-DA. Nuestros resultados muestran que la expresión del RNAm de Nurr1 se mantuvo desde las ES hasta las neuronas-DA en niveles similares, generando neuronas-DA aparentemente idénticas a las Wt. Además, se encontró un aumento en el número de células totales (dato que no se menciona en los reportes analizados) (Wt: 2.06±0.25 x 10<sup>6</sup>; Nurr1, clona 1: 3.9±0.25 x 10<sup>6</sup>, clona 8: 3.3±0.25 x 10<sup>6</sup>) así como de Tub<sup>+</sup> en comparación con las silvestres (Wt: 42.88±2.21%; clona 1: 72.30±6.19%; clona 8: 54.75±5.27%), coincidiendo con lo reportado por Yamashita et al (2006). Referente al número de TH<sup>+</sup> en nuestros resultados, no pudimos llevar a cabo los conteos correspondientes debido a problemas con la intensidad de la señal en células disgregadas, no obstante en inmunotinciones directas sobre los cultivos se detectó también la formación de cúmulos que mostraban un aparente aumento de células TH<sup>+</sup>, tal como lo reportó Chung et al (2002). Un indicio semicuantitativo del aumento de la expresión de TH lo obtuvimos por densitometría en base a los resultados del RT-PCR, donde se encontró un aumento de 1.8 (clona 1) y 1.4 (clona 8) veces en relación a la silvestre. Cabe mencionar que en los conteos de células totales, así como los de células Tub<sup>+</sup> de las etapas analizadas muestran un error relativamente grande debido al método de conteo utilizado ya que, para el final de este trabajo, no se lograron hacer las repeticiones necesarias, entonces se escogieron distintos campos de un solo plato para conteos representativos. A pesar de ello es conveniente que para obtener números más precisos se hagan repeticiones de los experimentos para reducir el grado de error. De igual modo deben repetirse para realizar los conteos de las células TH<sup>+</sup> en células disgregadas para obtener una cuantificación correspondiente y lograr compararlo con los otros reportes.

Por su parte, el RNAm de Nur77 también se detectó durante todo el protocolo de diferenciación mostrando de igual forma un incremento en el número de células totales (clona 39: 3.5±0.25 x 10<sup>6</sup>; clona 43: 2.8±0.25 x 10<sup>6</sup>); no obstante, el número de células Tub<sup>+</sup> disminuyó (clona 39: 32.36±1.8%; clona 43: 29.94±2.12%); de igual forma sucedió con la expresión del RNAm de TH, donde el análisis de densitometría nos mostró una reducción de 0.3 y 0.5 veces para la clona 39 y 43, respectivamente. Cabe mencionar que la expresión de TH se manifestó más dentro de los cúmulos celulares.

En un principio la idea de detectar la expresión de Nurr1 así como de Nur77 fue por medio de inmunohistoquímicas, sin embargo esto no se logró. Se variaron algunas condiciones dentro de la técnica sin tener éxito, por lo cual se decidió detectarlos por RT-PCR que de alguna forma constituyó una manera rápida de obtener un indicio preliminar de su expresión. No obstante, es necesario realizar repeticiones de los

experimentos para llevarse a cabo westerns blot que consoliden los resultados obtenidos.

Tal como lo han mencionado varios estudios, aparentemente la expresión de Nurr1 exógeno tiene un efecto específico en la diferenciación dopaminérgica ya que la formación de otros subtipos neuronales, a partir de células ES que expresan Nurr1, parece inalterada. Del mismo modo, se ha reportado también que Nurr1 no genera efectos detectables en la formación de poblaciones de células gliales como astrocitos y oligodendrocitos, sugiriendo que Nurr1 influencia concretamente al linaje neuronal (Kim et al 2002, Yamashita et al 2006). Diversos mecanismos pueden ser la base del incremento de TH<sup>+</sup> debido a la sobreexpresión de Nurr1 y tal vez en conjunto con otras moléculas señalizadoras. Primero, pudieran facilitar la neurogénesis a nivel de la formación del neuroprogenitor o de las mismas neuronas. Relacionado con esto, diversos análisis en ratones nulos para Nurr1 mencionan que dicho gen actúa en una etapa tardía de la diferenciación dopaminérgica (Zetterstrom et al, 1996; Saucedo-Cárdenas et al 2001; Witta et al 2000). Existen otros donde se trabaja con líneas celulares que expresan Nurr1 y han observado que su expresión más alta la encuentran a nivel de precursor neural en comparación con las otras etapas (Lee et al 2000; Kim et al 2002; Chung et al 2002). Otro posible mecanismo por el cual Nurr1 incrementa en número de neuronas-DA es por influenciar la sobrevivencia de una población de células específicas. En el raton nulo para Nurr1, Saucedo-Cárdenas (1996) observó el incremento de apoptosis y una disminución de células del cerebro medio en ratones neonatales nulos para el gen, indicando que Nurr1 es importante en la sobrevivencia y/o mantenimiento de las neuronas-DA.

Como puede verse, el proceso de diferenciación de las ES-Nurr1 se desarrolló de forma habitual, obteniéndose un número arriba de lo reportado en las ES-Wt. Pero fueron las ES-Nur77 donde se vió afectado el número de neuronas Tub<sup>+</sup> y la generación de neuronas-DA tal vez por un secuestro de Nurr1 endógeno por parte de Nur77 durante un proceso importante en el ambiente neuronal, como podría ser el impedimento de la unión de Nurr1 a su elemento responsivo en el promotor de la TH, desencadenando así una diferenciación ineficiente. Otra posibilidad es que en la fase de precursor neural diverjan en las vías de diferenciación neuronal debido a distintos blancos de acción. En el trabajo de Gilbert y colaboradores (2006) encontraron que ratones nulos para Nur77 (Nur77<sup>-/-</sup>) denotan un aumento en su locomoción tornándose hiperactivos, además los niveles del RNAm de Nurr1 y de TH aumentaron así como la actividad de esta última, modificando la tasa de recambio de la dopamina. Según los autores, esto puede deberse en parte, a una respuesta compensatoria resultante de la pérdida de eventos de señalización que requieren expresión de Nur77 en el estriado, zona donde inervan las neuronas-DA. En nuestros resultados, dichos aumentos en la expresión de Nurr1 y TH en las neuronas-DA derivadas de ES-Nurr1, podrían deberse a una aparente ausencia de Nur77, sin embargo es importante detectar más adelante si es que existe una expresión endógena tanto de Nurr1 como de Nur77 a lo largo de todo el protocolo de diferenciación para poder tener conclusiones más acertadas en relación a esto. Sin embargo, es cierto que en presencia de Nur77 existe una especie de bloqueo hacia el fenotipo dopaminérgico, ya sea por el mencionado impedimento para que Nurr1 active a la TH o bien porque induzca muerte durante el proceso de la diferenciación neuronal.

## 9. CONCLUSIONES

- ❖ La sobre-expresión de Nurr1 y Nur77 en células ES indiferenciadas no afectó su potencial de diferenciación a neuronas dopaminérgicas.
- ❖ Nurr1 y Nur77 incrementan aparentemente la proliferación de células ES. Además, ambos muestran colonias con diferencias morfológicas (bordes irregulares y colonias extendidas) en comparación con las ES-Wt.
- ❖ Nurr1 aumenta de forma aparente el número de derivados de las células ES durante el protocolo de diferenciación-DA (EB's, precursores neurales y neuronas-DA) sin afectar el proceso de diferenciación.
- ❖ Nur77 denota una disminución de las células Tub+ y TH+ en comparación con las obtenidas por Nurr1 y las Wt.

## 10. PERSPECTIVAS

- Determinar la presencia o ausencia de Nur77 endógeno durante el proceso de diferenciación dopaminérgica.
  
- Implementar modelos de muerte de neuronas-DA generadas a partir de las ES-Nurr1 y ES-Nur77 por medio de neurotoxinas empleadas en generar modelos de Parkinson. De esta manera se puede estudiar la protección o susceptibilidad de dichas neuronas cuando expresan Nurr1 y Nur77.



## 10. REFERENCIAS

1. Ae M, Souk H, Soo H, Cho K, Kwan B, Sohn S, Seek Y, Ichinose H, Up S (2002). Overexpression of midbrain-specific transcription factor Nurr1 modifies susceptibility of mouse neural stem cells to neurotoxins. *Neuroscience Letters*. 74-78.
2. Albieri L, Sgado P, Simon HH (2004). Engrailed genes are cell-autonomously required to prevent apoptosis in mesencephalic dopaminergic neurons. *Development* 132: 3229-3236.
3. Baizabal, J, Furlán, M, Santa-Olalla, J, Covarrubias, L (2003). Neural Stem Cells in development and regenerative medicine. *Archives of Medical Research*. 572-588
4. Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY (2003). Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nature Biotechnology* 21, 1200-7 gene promoter. *J Neurochemistry* 74: 1829-1837.
5. Beaudry G, Langlois M, Weppe I, Rouillard C, Lévesque D (2000). Contrastalng patterns and cellular specificity of transcriptional regulation of the nuclear receptor nerve growth factor-inducible B by haloperidol and clozapine in the rat forebrain. *Journal of Neurochemistry* 75: 1649-1702.
6. Boeuf H, Hauss C, Graeve FD (1997). Laeukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *Journal of Cell Biology* 138: 1207-1217.
7. Bussell R, Jr, and Eliezer D (2001). Residual estructure and dynamics in Parkinson´s disease-associated mutants of alpha synuclein. *Journal of Biol. Chem.* 276: 45995-46003
8. Castro-Obregón S, Rao R, del Río G, Chen S, Poksay K., Rabizadeh S, Vesce S, Zhang X, Swanson R, Bredesen D (2004). Alternative, Nonapoptotic Programmed Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 17543-17553.
9. Cazorla P, Smidt MP, O´Malley KL, Burbach JP (2000). Aresponse element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter. *Journal of Neurochemistry*. 74: 1829-1837.
10. Cohen, G (2000). Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson´s disease. *Ann N Y Acad. Sci.* 899. 112-120.
11. Chung S, Sonntag KC, Andersson T, Bjorklund LM, Park, JJ, Kim DW, Kang UJ, Isacson O, Kim KS (2002). Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur. Neurosciences*. 16: 1829-1838.

12. Chung S, Andersson T, Sontag KC, Björklund L, Isacson O, Kim K (2001). Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 20: 139-145
13. Dauer W, Przedborski S (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron* 39: 889-909.
14. Davis I, Lau L (1994). Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Molecular and Cellular Biology*. 14: 3469-3483.
15. de Nobel H, Lawrie L, Brul S, Klis F, Davis M (2001). Parallel and comparative analysis of the proteome and transcriptome of sorbic acid-stressed *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 18:1413–1428.
16. DeYoung R, Baker J, Cado D, Winoto A (2003). The orphan steroid Nur77 Family Member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis. *The journal of Biological Chemistry*. 278: 47104-47109.
17. Downs, KM (2001). Mouse early development: Molecular basis. *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. Londres, Nature Publishing Group. 1-6 <http://www.els.net/>
18. Gilbert, S (2003) *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Seventh Edition.
19. Gilbert, F, Morissette M, St-Hilaire M, Paquet B, Rouillard C, Di Paolo T, Levésque D (2006). Nur77 gene knockout alters dopamine neuron biochemical activity and dopamine turnover. *Biol Psychiatry*. Article in press.
20. Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A, Meloni EG, Wu N, Ackerson LC, Klapstein GJ, Gajendiran M, Roth BL, Chesselet MF, Maidment NT, Levine MS, Shen J (2003). Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 278: 43628–43635.
21. Holzmann C, Kruger R, Saecker AM, Schmitt I, Schols L, Berger K, Riess O (2003) Polymorphisms of the  $\alpha$ -synuclein promoter: expression analyses and association studies in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 110: 67–76.
22. Hwang DY, Ardayfio P, Kang UJ, Semina EV, Kim KS (2003). Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain Res Mol Brain Res* 114: 123–131.
23. Jackson-Lewis V, Vila M, Djaldetti R (2000). Developmental cell death in dopaminergic neurons of the substantia nigra of mice. *J. Comp. Neurol.* 424: 476-488.

24. Jankovic J, Chen S, Le WD (2005). The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*. 77: 128-138.
25. Kahle P, Haass C (2001). How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease? *Journal of Neurochem*. 5: 681-685.
26. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28: 31-40.
27. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernuante R, Bankiewicz K, McKay R (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 41: 50-56.
28. Kim JY, Koh HC, Lee JY (2003). Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *Journal of Neurochemistry* 85: 14443-1454.
29. Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, Wakeham A, You-Ten AJ, Kalia SK, Horne P, Westaway D, Lozano AM, Anisman H, Park DS, Mak TW (2005). Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*
30. Kucharova S, Farkas R (2002). Hormone Nuclear Receptors and Other Ligands: Role in Programmed cell death. *Endocrine Regultaions*. 36: 37-60
31. Le W, Conneely OM, He Y, Jankovic J, Appel SH (1999). Reduced Nurr1 expression increases the vulnerability of mesencephalic dopamine neurons to MPTP-induced injury. *J Neurochem* 73: 2218-2221.
32. Lebel M, Gauthier Y, Moreau A, Drouin J (2001). Pitx3 activates mouse tyrosine hydroxylase promoter via a high-affinity binding site. *Journal of Neurochemistry* 77: 558-567.
33. Lee SH, Lumeinsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons form mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 18: 675-679
34. Lotharius J, Brundin P (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and  $\alpha$ -synuclein. *Nature* 3: 932-942.
35. Maira M, Martens C, Philips A, Drouin J (1999). Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Molecular and Cellular Biology*. 19: 75 49-7557.

36. Martinat C, Shendelman S, Jonason A, Leete T (2004). Sensitivity to oxidative stress in DJ-1-deficient dopamine neurons: An ES-derived cell model of primary parkinsonism. *PLOS Biol.* 11: 327-249.
37. Maxwell M, Muscat G (2005). The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *The Open Access Journal of the Nuclear Receptor Signaling Atlas (NURSA)*. Vol.4: 1-8.
38. Maxwell S, Li M (2005). Midbrain dopaminergic development in vivo and in vitro from embryonic stem cells. *Journal of Anatomy.* 207: 209-218.
39. Mel F, Pallanck L (2003) Parkin: A multipurpose Neuroprotective Agent? *Neuron* 38: 13-16.
40. Mitumoto A, Nakagawa Y (2001). DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res.* 35:885–893.
41. Moll UM, Marchenko N, Zhang X-K (2006). P53 and Nur77/TR3- transcription factors directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene.* 25: 4725-4743.
42. Mytilineou G, McNaught P, Shashidharan P, Yabut J, Baptiste R, Parnandi A, Olanow C (2004). Inhibition of proteasome activity sensitizes dopamine neurons to protein alterations and oxidative stress. *Journal of Neural Transmisi3n.* 111: 1237-1251.
43. Newman S, Bond B, Crook B, Darker J, Edge C, Maycox P (2000). Neuron-specific localisation of the TR3 death receptor in Alzheimer's disease. *Brain Research.* 857: 131-140.
44. Perlmann T, Mackenzie W (2004). Nurr1, an orphan nuclear receptor with essential functions in developing dopamine cells. *Cell Tissue Res.* 318:45-52.
45. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira M, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J (1997). Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Molecular and Cellular Biology.* 17: 5946-5951.
46. Richfield EK, Thiruchelvam MJ, Cory-Slechta DA, Wuertzer C, Gainetdinov RR, Caron MG, Di Monte DA, Federoff HJ (2002). Behavioral and neurochemical effects of wild-type and mutated human  $\alpha$ -synuclein in transgenic mice. *Exp Neurol* 175: 35–48.
47. Sakurada K, Ohshima-Sakurada M, Palmer T, Gage F (1999). Nurr1, an orphan nuclear factor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosin hydroxylase in neural progenitors cells derived from adult brain. *Development* 126: 4017-4026.
48. Saucedo-Cardenas O, Conneely, O (1996). Comparative distribution of Nurr1 and Nur77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *Journal of Molecular Neuroscience.* 1: 51-63

49. Saucedo-Cardenas O, Montes (2001). Pérdida de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas por la inactivación de Nurr1. *Ciencia UANL*. 4: 42-47.
50. Schober, A (2004) Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research*. 318: 215-224.
51. Suwabe N, Takahashi S, Nakano T, et al (1998). GATA-1 regulates growth and differentiation of definitive erythroid lineage cells during in vitro ES cell differentiation. *Blood* 92: 4108-4118.
52. Simon HH, Saueressig H, Wurst W, Goulding MD, O'Leary DD (2001). Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *Journal of Neuroscience* 21: 3126-3134.
53. Smidt MP, Asbreuk CH, Cox JJ, Chen H, Jonson RL, Burbach JP (2000). A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nature Neuroscience* 3: 337-341.
54. Sonntag, K, Simantov R, Kim K, Isacson, O (2004). Temporally induced Nurr1 can induce a non-neural dopaminergic cell type in embryonic stem cell differentiation. *European Journal of Neuroscience*. 19: 1141-1152
55. Takahashi, K, Taira T, Niki T, Seino C, Iguchi-Arigo SM, Ariga H (2001). DJ-1 positively regulates the androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor. *Journal of Biol. Chem.* 276: 37556-37563.
56. Tanabe Y, Jessel MT (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science*, 274: 1115-1123.
57. Torii T, Kawarai T, Nakamura H, Kawakami H (1999). Organization of the human orphan nuclear receptor Nurr1 gene. *Gene* 230: 225-232
58. Van Den Munckhof P, Luk KC, Ste-Marie L (2004). Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 130: 2535-2542.
59. Vila M and Przedborski S (2003). Neurological diseases: Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 4: 365-375.
60. Wallén A, Perlmann T (2003). Transcriptional control of dopamine neuron development. *Annals of New York Academy of Sciences*. 991: 48-60.
61. Wansa KD, Harris J, Muscat G (2002). The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment. *The Journal of Biological Chemistry*. 277: 33001-11.
62. Wilson T, Fahrner T, Johnston M, Milbrant J (1991). Identification of the DNA Binding site for NGFI-B by genetic Selection in yeast. *Science* 252: 1296-1300.

63. Wilson T, Fahrner T, Milbrant J (1993). The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA Interaction. *Molecular and Cellular Biology*. 13: 5794-5804.
64. Witta J, Baffi J, Palkovits M, Mezey E, Castillo S, Nikodem V (2000). Nigrostriatal innervation is preserved in Nurr1-null mice, although dopaminergic neuron precursors are arrested from terminal differentiation. *Brain Research Molecular*. 84: 67-78.
65. Winoto A, Littman D. (2002). Nuclear hormone receptors in T lymphocytes. *Cell*. 109: S57- S66
66. Wu Q, Liu S, Ye X, Huang Z, Su W (2000). Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. 23: No. 10.
67. Wurst W y Bally-Cuif L. 2001. Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nature Neuroscience*, 2: 99 –108.
68. Xu PY; Le WD. (2004). Novel splicing variant of the human orphan nuclear receptor Nurr1 gene. *C.M.J.* 117: 899-903.
69. Yamashita H, Nakamura T, Takahashi T, Pagano Y, Hiji M, Hirabayashi T, Amano T, Yagi T, Sakai N, Kohriyama T, Matsumoto M. (2006). Embryonic stem cell-derived neurons models of Parkinson's disease exhibit delayed neuronal death. *Journal of Neurochemistry*. 98: 45-56.
70. Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA y Rosenthal A. 1998. Fgf y Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*. 93: 755-766.
71. Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nature Biotechnology* 21: 183-186
72. Zeng H, Qin L, Zhao D, Tan X, Manseau EJ, Van Hoang M, Senger DR, Brown LF, Nagy JA, Dvorak HF. (2006). Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 regulates VEGF-A-induced angiogenesis through its transcriptional activity. *Journal Exp. Med.* 20:719-729
73. Zeng X, Chen J, Sanchez F, Coggiano M, Dillon-Carter O, Petersen J, Freed W (2003). Stable Expression of hrGFP by mouse embryonic stem cells: promoter activity in the undifferentiated state and during dopaminergic neural differentiation. *Stem Cells*. 21: 647-653.
74. Zetterstrom RH, William R, Perlmann T, Olson, L (1996). Cellular expression of the immediate-early transcription factors Nurr1 and NGF-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Molecular Brain Research*. 5: 111-120

75. Zhou QY, Palmiter RD (1995). Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell*. 83: 1197-1209.

## 10. ANEXO

### SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

#### ➤ CULTIVO DE CÉLULAS

##### **Dulbecco's Modified Tagle Médium. DMEM (Gibco 12100-046)**

Para 1 lt:

- Disolver el medio en polvo en 800 ml de H<sub>2</sub>O grado cultivo en un vaso de precipitado de 1 lt mediante agitación suave.
- Añadir 3.7 g de NaHCO<sub>3</sub> y agitar hasta disolver.
- Ajustar el pH a 6.9, entre 0.2 y 0.3 unidades de pD por debajo del requerido durante las condiciones de trabajo, ya que usualmente incrementan entre 0.1 y 0.3 con la filtración. Se recomienda usar HCl 1N en agua de cultivo.
- En campana, aforar a 1 lt y esterilizar por filtración a través de membrana 0.22 µm.
- Almacenar a 4°C y utilizar en un período máximo de 2 meses.

##### **D-MEM/F12 sin HEPES (Gibco #12500-039)**

Para 1 lt:

- Preparar igual que el DMEM pero se le añade 2.438 g de NaHCO<sub>3</sub>.

##### **Suero bovino fetal (FBS, "fetal bovine serum") (Gibco #16000-044)**

- Inactivar las proteínas del suero calentándolo a 56°C por 30 minutos.
- Alicuotar y almacenar a -20°C.
- Para usar, descongelar una alícuota y mantener a 4°C hasta por 1 mes.

##### **GPS 100X. Glutamina + Penicilina + Estreptomicina**

Para 100ml:

100 ml de Glutamax 200mM (Gibco #35050-061)

300 mg de penicilina

500 mg de estreptomicina

- Transferir 10 ml de Glutamax a un tubo falcon de 15 ml.
- Agregar la penicilina y la estreptomicina. Disolver.
- Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22µm y agregar la solución al Glutamax restante y mezclar homogéneamente.
- Alicuotar y almacenar a -20°C.
- Para utilizarse, descongelar y mantener a 4°C hasta por 1 mes.

##### **PBS 1X**

Para 1lt:

8 g de NaCl

0.2 g de KCl

1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

H<sub>2</sub>O

- Disolver y esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22 µl.



### **β-Mercaptoetanol (BME)100X**

Para 25 ml:

5 ml de BME 55mM (Gibco #21985-023)

20 ml de PBS 1X

☛ Almacenar a 4°C hasta por 2 meses.

### **Tripsina 0.25% (Gibco 15090-046)**

Para 10 ml:

1 ml de tripsina 2.5% en H<sub>2</sub>O grado cultivo

18 ml de Verseno (Gibco #15040-066)

☛ Almacenar a 4°C hasta por 1 mes

### **Mitomicina C (Roche 107409)**

Preparar un stock 50X:

1. UTILIZAR GUAANTES Y CUBREBOCAS YA QUE ES MUY TÓXICA.

2. Tomar 0.5 ml de PBS 1X con jeringa de 1 ml y clavarlo en la tapa de plástico del frasco de mitomicina (2 mg) para despresurizarlo, e inyectar el PBS y disolver.

3. Verificar que esté disuelta antes de sacar la tapa.

4. Destapar con cuidado y tomar el contenido con la jeringa tratando de tomar todo sin que queden trazas en las paredes del frasco.

5. Agregarlo a 3.5 ml de PBS 1X en un tubo falcon de 15 ml.

6. Almacenar a 4°C en oscuridad hasta por 1 mes. La solución deber verse azul-violeta.

### **Medio HEK**

Para 250 ml:

220 ml de DMEM

25 ml de FBS (10% final)

2.5 ml de GPS (1% final)

2.5 ml de Piruvato de sodio 100X (1X final) (Gibco #11360-070)

### **Medio STO**

Para 250 ml:

230 ml de DMEM

17.5 ml de FBS (7% final)

2.5 ml de GPS 100X (1X final)

### **Medio M15**

Para 250 ml:

204.75 ml de DMEM

37.5 ml de FBS (15% final)

2.5 ml de piruvato de sodio 100X (1X final)

2.5 ml de aminoácidos no esenciales 100X (1X final) (Gibco #11140-050)

250 µl de BME (1X final)

2.5 ml de GPS 100X (1X final)

### **Medio ITSFn**

Para 100 ml:

96.825 ml DMEM/F12 sin HEPES

125 µl de Insulina (5 µg/ml final) (Gibco 13007-018)  
1.25 ml de Transferrina (50 µg/µl final) (Gibco 13008-016)  
300 µl de Selenito de sodio (30 nM final) (Aldrich #21,448-5)  
500 µl de Fibronectina (5 µg/ml final) (Gibco 33016-015)  
1 ml de GPS 100X (1X final)

- ✦ Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.
- ✦ Almacenar a 4°C hasta por 1 semana.

### **Medio de Expansión de precursores neurales**

Para 70 ml:

68.517 ml DMEM/F12 sin HEPES  
700 µl de Suplemento N2 (1X final) (Gibco 17502-048)  
82.25 µl de Laminina (1 µg/ml final) (Gibco 680-3017IV)  
400 µl GPS 1X

- ✦ Esterilizar por membrana de 0.22 µm.
- ✦ Almacenar a 4°C hasta por 1 semana en la oscuridad.
- ✦ Para utilizarse agregar: FGF2 (10 ng/ml) (Gibco 13256-029), FGF8 (100 ng/ml) (Peprotech 100-25), SHH (500 ng/ml) (Peprotech 100-45).
- ✦ Las alícuotas de los factores deben prepararse en medio DMEM/F12 sin HEPES y albúmina 1 mg/ml, en un volumen tal que no se agregue más del 10% del volumen final al utilizarlas.
- ✦ Esterilizar por filtración de membrana 0.22 µm.

### **Medio de diferenciación**

Para 20 ml:

19.37 ml de DMEM/F12 sin HEPES  
200 µl de Suplemento N2 1X  
200 µl de GPS 1X  
200 µl de ácido ascórbico (100µM final) (Sigma A-4544)  
23.53 µl de laminina

- ✦ Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm.
- ✦ Almacenar a 4°C hasta por 1 semana.

### **Medio de congelación 2X**

Para 10 ml:

6 ml de DMEM  
2 ml dew FBS (20% final)  
2 ml de DMSO (20% final) (Sigma #D2650)

### **HBS 2X**

Para 50 ml:

0.8 gr de NaCl  
0.037 g de KCl  
0.02 g de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0.1 Dextrosa  
0.5 g de HEPES

- ✦ Disolver en 45 ml de H<sub>2</sub>O
- ✦ Guardar a -70°C. Después de usarlo, tirar.

### **CaCl<sub>2</sub> 2M**

Para 15 ml:

4.4106 g de CaCl<sub>2</sub>  
15 ml de agua estéril

☛ Filtrar

### **Gelatina 1% (Sigma # G1890-100G)**

Para 300 ml:

3 gr de gelatina  
300 ml de H<sub>2</sub>O grado cultivo

- ☛ Calentar en horno de microondas hasta disolver.
- ☛ Esterilizar en autoclave y posteriormente filtrar por membrana .22 μm.
- ☛ Almacenar a temperatura ambiente hasta por 2 meses.
- ☛ Antes de usar llevar la solución al 0.1% en H<sub>2</sub>O grado cultivo.

### **Cajas de expansión**

Para 2 cajas de 4 pozos:

40 μl de Poly-D-Lysina  
4 ml de H<sub>2</sub>O grado cultivo

☛ Esterilizar por filtración 0.22 μm.

Para 2 cajas de 4 pozos:

4 μl de fibronectina  
4 ml de H<sub>2</sub>O grado cultivo

### **LIF (Factor Inhibidor de Leucemia) (Chemicon #LIF2010)**

Stock:

1 x 10<sup>5</sup> U/ml en PBS + BSA 10% (Sigma #A3059)

☛ Almacenar a 4°C.

## ➤ **EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA**

### **TRIzol Reagent (Invitrogen 15596-026)**

### **Agua DEPC**

Para 1 lt: 1 lt de H<sub>2</sub>O miliQ

1 ml de DEPC (Diethyl pyrocarbonate 97%) (Sigma #D5758)

☛ Agregar 1 ml de DEPC al 1 lt de agua miliQ y dejar que se disuelva toda la noche. Al día siguiente esterilizar por autoclaveo.

### **MOPS 10X ph 5.5 - 7.0**

Para 1 lt: 41.86 g de MOPS 0.2M

4.1 g de Acetato de sodio 0.05M

20 ml de EDTA 0.01M

800 ml de H<sub>2</sub>O estéril

☛ Calibrar el pH con ácido acético glacial y llevar a 1 lt con agua estéril.

✦ Autoclavear (se torna color amarillo).

#### **Buffer de muestra**

Para 1 ml: 600  $\mu$ l de formamida pura  
179  $\mu$ l de formaldehído 37% (Sigma #F-1635)  
100  $\mu$ l de MOPS 10X  
8.3  $\mu$ l de Bromuro de etidio 10mg/ml  
113  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC

#### **Buffer de corrida**

Para 500 ml: 50 ml de MOPS 10X  
9 ml de formaldehído 37%  
441 de H<sub>2</sub>O estéril

#### **Gel de formaldehído 1%**

Para 50 ml: 0.5 g de agarosa  
5 ml de MOPS 10X  
44 ml de H<sub>2</sub>O estéril  
0.9 ml de formaldehído 37%

✦ Fundir la agarosa en el MOPS 10X y dejar enfriar hasta 56°C aproximadamente y agregar el formaldehído.

### ➤ **WESTERN BLOTS**

#### **a) Extractos de Proteína**

##### **Buffer de lisis.**

Para 10 ml: 200  $\mu$ l de HEPES 1M  
100  $\mu$ l de DTT 10 mM  
10  $\mu$ l de desferal (Mesilato de deferoxamina) 100mM  
9.59 ml de H<sub>2</sub>O

✦ Antes de usar, adicionar 100  $\mu$ l de PMSF 100mM.

##### **HEPES 1M (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazinetansulfónico) (Sigma #H-6147)**

Para 10 ml: 2.383 g de HEPES  
10 ml de H<sub>2</sub>O

✦ Esterilizar por filtración Y almacenar a -20°C.

##### **1,4-Ditiotreitol (DTT) 100 mM (Merck #12013)**

Para 10 ml: 154.5 mg de DTT  
10 ml de acetato de sodio 0.01M, pH 5.2

✦ Esterilizar por filtración y almacenar en alícuotas de 1ml a -20°C.

##### **Mesilato de deferoxamina 100mM (Sigma #D-9533)**

Para 10 ml: 956.8 mg de mesilato de deferoxamina  
10 ml de H<sub>2</sub>O

✦ Almacenar en alícuotas de 500  $\mu$ l a -20°C.

**PMSF 100mM**

- Para 10ml: 174 mg de PMSF  
10 ml de isopropanol  
✦ Almacenar en alícuotas de 1 ml a -20°C.

**b) Geles desnaturalizantes para SDS-PAGE****Solución de Archilamida/Bisacrilamida 30%, 37.5:1 (Bio-Rad # 161-0158)****Tris-HCl 1.5M, pH 8.8**

- Para 150 ml: 27.23 de Tris base  
100 ml de H<sub>2</sub>O  
✦ Ajustar pH 8.8 con HCl 6N.  
✦ Aforar con H<sub>2</sub>O y almacenar a 4°C.

**Tris-HCl 0.5M, pH 6.8**

- Para 100 ml: 6 g de Tris base  
60 ml de H<sub>2</sub>O  
✦ Ajustar el pH 6.8 con HCl 6N  
✦ Aforar con H<sub>2</sub>O y almacenar a 4°C

**HCl 6N**

- Para 100 ml: 49.87 ml de HCl  
50.13 de H<sub>2</sub>O

**Persulfato de amonio (APS) 10% (Bio-Rad #161-0700)**

- Para 1ml: 100 mg de APS  
1 ml de H<sub>2</sub>O  
✦ Almacenar a 4°C.

**TEMED (Bio-Rad #161-0801)****Buffer de carga 5X**

- Para 9.5 ml: 3.55 ml de H<sub>2</sub>O desionizada  
1.25 ml de Tris-HCl 0.5M, pH 6.8  
2.5 ml de glicerol  
2 ml de SDS 10%  
200 µl de azul de bromofenol 0.5%  
✦ Almacenar a temperatura ambiente.  
✦ Antes de usar, añadir 50 µl de β-mercaptoetanol (Bio-Rad #161-0710) a cada 950 µl de buffer. En estas condiciones, almacenar a -20°C.

**Buffer de corrida 1X**

- Para 1 lt: 3.03 g de Tris base  
14.4 g de glicina  
1 g de SDS  
H<sub>2</sub>O

### c) Western Blot

#### Buffer de transferencia 1X

- Para 1 lt:      3.03 g de Tris base  
                    14.4 g de glicina  
                    1 g de SDS
- ♣ Disolver en H<sub>2</sub>O, aforando a 800 ml.
  - ♣ Añadir 200 ml de metanoll.

#### TBST 1X

- Para 1 lt:      6.05 g de ml de Tris base  
                    8.76 g de NaCl
- ♣ Disolver en 800 ml de H<sub>2</sub>O y ajustar el pH a 7.5 con HCl 6N
  - ♣ Aforar a 1 lt.
  - ♣ Añadir 1 ml de Tween 20 (Research Organics #3061T)

#### ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham RPN2106)

#### Revelador GBX developer (Kodak #190 0943)

#### Fijador GBX fixer (Kodak # 190 1875)

## ➤ INMUNOCITOQUÍMICA

#### Paraformaldehído (PFA) 4%. (Sigma # P6148-500G). Preparar fresco.

- Para 10 ml:    0.4 g de paraformaldehído  
                    H<sub>2</sub>O
- ♣ UTILIZAR GUANTES Y CUBREBOCAS.
  - ♣ Calentar 8 ml de H<sub>2</sub>O por 10-15 segundos en horno de microondas, cuidando que no hierva.
  - ♣ Adicionar 0.4 g de PFA
  - ♣ Añadir 2 µl de NaOH 2.5M. Agitar en vortex hasta que la solución se vea clara.
  - ♣ Añadir 1 ml de PBS 10X.
  - ♣ Aforar con H<sub>2</sub>O dejar enfriar 10 minutos en hielo.
  - ♣ Filtrar a través de membrana de 0.22 µm.

#### PBS 1X

#### PBS 10X

- Para 50 ml:    4 gr de NaCl  
                    0.72 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                    0.12 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                    0.1 g de KCl  
                    H<sub>2</sub>O
- ♣ Disolver y ajustar el pH a 7.4 con HCl.
  - ♣ Esterilizar por filtración a través de membrana de 0.22µm.

#### Suero de oveja (Sigma #S-2262)

**Tritón X-100** (Bio-Rad # 161-0407)

**DAPI** (Molecular Probes # D-1306)

**Solución de montaje**

Para 10 ml: 5 ml de NaHCO<sub>3</sub> 0.1M, pH 9  
5 ml de glicerol

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para detección de la expresión de genes por RT-PCR.

Nombre del oligonucleótidos	Secuencia	Observaciones
CBA-pCDNA	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'	Utilizado para secuenciar la parte 3' del promotor CMV-CBA insertado en el plásmido pCDNA. Amplifica alrededor de 500-700 pb. TM: 55°C
Nurr1 5'	5' GAGAGTGGGAAGAGCTACAAAAC 3'	Se une al lado amino terminal de la secuencia de Nurr1 de ratón. TM: 66°C
Nurr1 3'	5' AGGGGCAAACAACAGATGG 3'	Se une al lado carboxilo terminal de la secuencia de Nurr1 de ratón. TM: 66°C
TR3 5'	5' CGTGGCTTCGGGGACTGGAT 3'	Se une al lado amino terminal de la secuencia de Nur77 de humano (TR3). TM: 66°C
TR3 3'	5' GAGGGGCAAACAACAGATGG 3'	Se une al lado carboxilo terminal de la secuencia de Nur77 de humano (TR3). TM: 66°C
HPRT 1	5' CCTGCTGGATTACATTAAGCACTG 3'	Se une al lado amino terminal de la secuencia de HPRT de ratón. TM: 60.8°C
HPRT 2	5' GTCAAGGGCATATCCAACAACAAC 3'	Se une al lado carboxilo terminal de la secuencia de HPRT de ratón. TM: 60.8°C
NesRat 5'	5' CTACCAGGAGCGCGTGGCTCACAT 3'	Se une al lado amino terminal de la secuencia de nestina de ratón. TM: 57°C
NesRat 3'	5' GGCTTCCACAGCCAGCTGGAAGT 3'	Se une al lado carboxilo terminal de la secuencia de nestina de ratón. TM: 57°C
NF-M 5'	5' GCCGAGCAGAACAAAGGAGGCCATT 3'	Se une al lado amino terminal de la secuencia de neurofilamentos de ratón. TM: 67°C
NF-M 3'	5' CTGGATGGTGTCTGGTAGCTGCT 3'	Se une al lado carboxilo terminal de la secuencia de neurofilamentos de ratón. TM: 67°C

TH 5'	5' TACGCCACGCTGAAGGGCCTCTAT 3'	Se une al lado amino terminal de la secuencia de TH de ratón. TM: 57°C
TH 3'	5' AGGTGAGGAGGCATGACGGATGTA 3'	Se une al lado carboxilo terminal de la secuencia de TH de ratón. TM: 57°C

Tabla 3. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Dilución de uso	Fuente
Anticuerpo monoclonal anti-nestina	1:100	Chemicon, Temecula, CA
Anticuerpo monoclonal anti-tubulina- $\beta$ -III	1:100	Chemicon, Temecula, CA
Anticuerpo policlonal anti-tubulina- $\beta$ -III	1:2000	Covance, Berkeley, CA
Anticuerpo policlonal anti-TH	1:500	Chemicon, Temecula, CA

Tabla 4: Anticuerpos secundarios.

Anticuerpo	Dilución de uso	Fuente
Alexa Fluor 594 anti-ratón IgG hecho en cabra.	1:1000	Molecular Probes (Eugene, OR)
Alexa Fluor 488 anti-ratón IgG hecho en cabra.	1:1000	Molecular Probes (Eugene, OR)
Alexa Fluor 488 anti-conejo IgG hecho en cabra	1:1000	Molecular Probes (Eugene, OR)