



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y
FISIOLOGÍA MOLECULAR

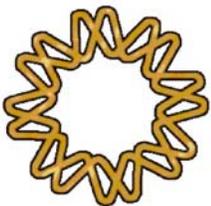
**“Análisis de la expresión de la subfamilia NR4A en las
extremidades del embrión de ratón en desarrollo”**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS PRESENTA:

BIOL. ANDREA MENDOZA CAMPOS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SUSANA CASTRO OBREGÓN



CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 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.

*Si yo hablare lenguas humanas y angélicas, y no tengo amor,
vengo a ser como el metal que resuena.
Si repartiese todos mis bienes para dar de comer a los pobres,
y si entregase mi cuerpo, y no tengo amor, de nada me sirve.
Y si tuviese toda la fe, de tal manera que trasladase los montes,
y si entendiese todos los misterios de la ciencia, y no tengo amor, nada
soy.*

1 Co. 13. 1-3

DEDICADA

A los mejores padres que un hijo pudiera desear, gracias mami por guiarme con todo tu amor, dedicación y confianza. Gracias papi por tu entrega, esfuerzo y trabajo diario, con lo que me has enseñado a luchar por mis ideales, pero sobre todo gracias por tu apoyo incondicional.

A mis maravillosas hermanas, quienes representan una enorme alegría en mi vida. A ti Adris por la gran madurez que siempre te he admirado y estoy segura te ayudará el resto de tu vida, así como ese espíritu decisivo que en todo momento me ha de enseñar algo. A ti Angeles por tu ingenio y carisma que le dan una chispa especial a mis días.

A mis abuelos por todo su amor, enseñanzas y experiencias que comparten conmigo. Doña Lidia, muchas gracias por escucharme y estar a mi lado siempre.

A aquellos grandes seres que me han brindado su sincero amor y me han permitido ser parte de su vida. Gracias por llenar mi vida de las cosas más bellas que cualquiera pudiese imaginar.

AGRADEZCO

Profundamente a Dios y la vida misma por esta gran oportunidad de ser y estar.

Con gran respeto y admiración a la doctora Susana Castro-Obregón, quien dirigió este proyecto, gracias por todos los conocimientos, tiempo y dedicación que me brindaste.

Al doctor Luis Covarrubias por permitirme trabajar y cometer errores en su laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, así como a aquellas personas que directa o indirectamente participaron en la realización de esta tesis. Con especial aprecio a Irma, gracias por tu constante apoyo teórico y práctico, pero sobre todo gracias por tu amistad. Gracias Osiris y Rocio por estar cuando más lo necesite y por sus honestos consejos.

A todos mis amigos, a quienes no mencionare de uno por uno para evitar omisiones involuntarias, gracias por quererme y confiar en esta simple mortal.

Además agradezco a CONACYT por el apoyo económico, registrado con el número 191136, durante el período agosto de 2004 a julio de 2006, en el cual fue realizado este proyecto.

Este trabajo fue realizado en el departamento de genética del desarrollo y fisiología molecular del IBt, bajo la dirección de la Doctora Susana Castro Obregón, y fue apoyado por PAPIIT IN202005 y CONACYT P46174-Q, otorgados a Susana Castro Obregón

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Muerte celular	9
1.1.1. Necrosis	10
1.1.2. Tipos de muerte celular programada (MCP)	11
1.1.2.1. MCP tipo I o Apoptosis.	12
1.1.2.2. MCP tipo II o Autofagia	17
1.1.2.3. MCP tipo III o Degradación vesicular no lisosomal (muerte citoplásmica)	19
1.2. MCP no apoptótica durante el desarrollo y la neurodegeneración	20
1.2.1. MCP en los interdígitos	23
1.3. Subfamilia NR4A	25
1.3.1. Nur77 en la apoptosis	28
2. ANTECEDENTES	29
2.1. Nur77 media muerte no apoptótica	29
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS	32
6. MATERIAL Y MÉTODOS	32
7. RESULTADOS	39
8. DISCUSIÓN	54
9. CONCLUSIONES	57
10. PERSPECTIVAS	58
11. REFERENCIAS	59
12. APENDICE (Soluciones)	64

RESUMEN:

Durante el desarrollo embrionario, la muerte celular juega un papel crucial para una morfogénesis correcta. En mamíferos, por ejemplo, permite la formación de los dígitos o la adecuada formación del sistema nervioso.

De acuerdo a las características morfológicas, hay diferentes tipos de muerte celular. El entender los mecanismos moleculares y las bases bioquímicas de estos eventos, nos permitirá entender procesos de desarrollo de un organismo; como ocurren estos procesos en enfermedades degenerativas o como se inhiben los mecanismos normales de muerte celular en el cáncer, además podremos interpretar aspectos evolutivos de los programas de muerte.

Se conocen varias proteínas que participan en la muerte celular. Dentro de éstas, se consideran a los tres miembros de la subfamilia NR4A (Nur77, Nurr1 y Nor-1) como reguladores de la muerte celular programada (MCP). En el caso de Nur77, se induce en diversas patologías donde ocurre muerte neuronal; sin embargo, en cuanto a la muerte durante el desarrollo embrionario, se ha estudiado muy poco la expresión de los tres miembros. Para determinar si estos miembros modulan la muerte celular, *in vivo*, tanto en el desarrollo embrionario como en la neurodegeneración, se generará un ratón transgénico con una mutante dominante negativa de los tres miembros, para el cual se logró realizar una subconstrucción.

Por otra parte, es de gran utilidad conocer el patrón de expresión de los miembros de la subfamilia NR4A, durante el desarrollo, en regiones donde ocurre muerte celular programada como los interdígitos. Para ello, mediante western blots e inmunofluorescencias se determinó que los tres miembros de la subfamilia se expresan en los interdígitos de embriones de ratón, no obstante, también se expresan en el resto de las extremidades de los 11.5 a los 15.5 días de gestación. A nivel celular, se localizan tanto en citoplasma como en núcleo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Muerte celular

La muerte es uno de los procesos celulares más importantes a lo largo de la vida de cualquier organismo multicelular. Muchas células se mueren cuando requieren ser removidas o eliminadas, debido a que ya no son necesarias para el organismo, porque han terminado su función, porque están en exceso, o bien porque podrían ser potencialmente dañinas. En general, durante el desarrollo embrionario, la muerte celular es crucial para una morfogénesis exitosa, tal como la formación de los dígitos o la eliminación de neuronas durante la construcción del sistema nervioso. En organismos adultos, la muerte celular también ocurre y en este caso mantiene la homeostasis de los tejidos, es decir, genera un equilibrio entre el número de células que mueren y que proliferan para que cada tejido funcione correctamente; además realiza funciones críticas de defensa en patogénesis y carcinogénesis. Sin embargo, la muerte celular puede tener efectos adversos ya que una gran cantidad de células pueden ser eliminadas de los diferentes tejidos de un organismo como consecuencia de daños físicos o genéticos.

Históricamente el término de muerte celular como un evento fisiológico ha sido introducido hace poco más de 150 años. Y no es, sino hasta 1972 que el grupo de Kerr, tratando de describir una nueva forma de muerte celular, morfológicamente distinta de la necrótica (donde la célula se rompe teniendo efectos inflamatorios), propuso una clasificación de la muerte celular en dos categorías: “necrosis y apoptosis” (Kerr et al., 1972). Actualmente se reconoce que los términos de necrosis y apoptosis, no abarcan todas las características que se observan en los diversos tipos de muerte celular (**Fig. 1**).

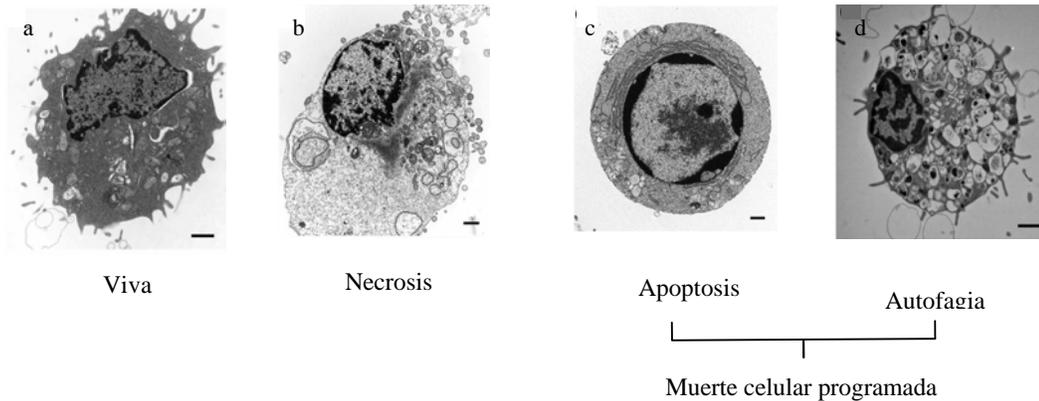


Figura 1. Diferencias morfológicas entre los tipos de muerte celular. a) Célula viva, b) célula con características necróticas, c) célula con cromatina condensada como característica de la apoptosis y d) célula apoptótica. Los rasgos apoptóticos están bien definidos y diferenciados de la necrosis y autofagia, mientras que las diferencias entre estas dos últimas son menos claras. Barra de escala 1 μ M (modificada de Edinger et al., 2004).

1.1.1. Necrosis

La necrosis celular se presenta como un suceso desorganizado resultado de un daño bioenergético, ocurre una disminución de ATP a niveles incompatibles con la sobrevivencia. Se trata de células que se mueren accidentalmente, inducidas por intoxicación o por daños físicos. Se presenta en desordenes agudos como lo son la isquemia o traumas en el sistema nervioso (Edinger, 2004; Proskuryakov et al., 2002).

Morfológicamente, la célula se caracteriza por presentar pignosis, cariorexis y cariólisis, es decir, una vacuolación del citoplasma, los organelos se distorsionan y degradan; la célula va aumentando de tamaño y concluye en el rompimiento de la membrana plasmática (**Fig. 1b**). Esto induce la liberación de su contenido citoplásmico y de moléculas proinflamatorias al espacio extracelular, por lo que se dispersan sobre las células vecinas ocasionando una respuesta inflamatoria potencialmente dañina. La célula necrótica podría exhibir cambios en la morfología nuclear pero la cromatina no se condensa ni se fragmenta (Edinger, 2004; Alberts et al., 2002).

1.1.2. Tipos de Muerte Celular Programada (MCP)

Anteriormente consideraban a la apoptosis sinónimo de Muerte Celular Programada (MCP), en cambio, ahora se sabe que la MCP no esta confinada a la apoptosis. El término de MCP se refiere a una muerte celular activada por un programa interno, controlado por la misma célula, durante el desarrollo de un organismo se da en un tiempo y posición programados. Esta muerte no induce inflamación, por lo que se considera como una forma fisiológica de muerte celular (Lawen, 2003). Las células usan diferentes vías para activar procesos de autodestrucción que están reflejados por diferentes morfologías. Así la MCP se clasifica en varias categorías (**Fig. 2**): Tipo I conocida como muerte nuclear o apoptótica; Tipo II o muerte celular autofágica; y Tipo III que es la degradación vesicular no lisosomal o muerte citoplásmica no lisosomal (Clarke, 1990).

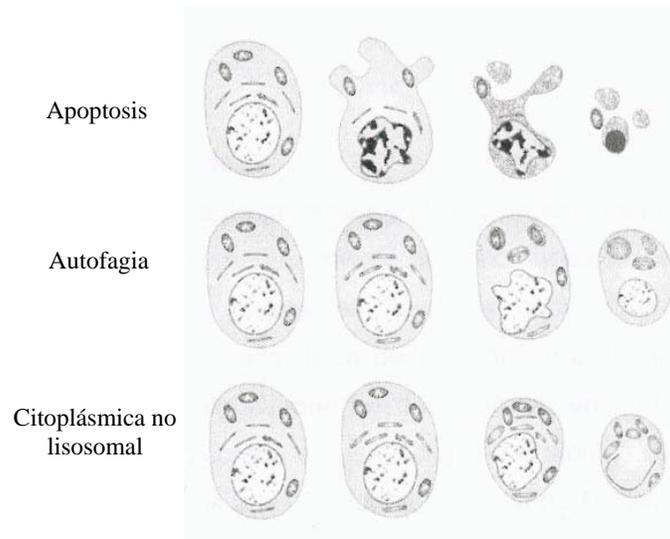


Figura 2. Tipos de Muerte Celular Programada. Esquemas de las características morfológicas (descritas más adelante), distintivas entre los 3 tipos de MCP (Modificada de Clarke, P. 1990).

Se ha identificado una gran cantidad de factores involucrados en la MCP, pero la forma en la que estos son integrados con procesos del desarrollo o degenerativos aún no se ha comprendido. La morfología celular y algunos mecanismos moleculares conocidos de la MCP se describen a continuación:

1.1.2.1. MCP tipo I o Apoptosis

Siendo un proceso evolutivamente conservado, la apoptosis parece jugar un papel opuesto pero complementario a la mitosis, en cuanto a la regulación de poblaciones celulares. Durante el desarrollo, compensa la proliferación celular al llevar a cabo la eliminación regulada de células que ya no son necesarias o que son dañinas para el organismo (Bursch et al., 2000; Samali et al., 1999). Por otro lado, se han mostrado rasgos comunes a la apoptosis en varias enfermedades neurológicas crónicas, incluyendo Esclerosis Lateral Amiotrófica, enfermedad de Huntington, Parkinson, Alzheimer y demencia HIV-1 (Raymond et al., 2003).

Este proceso puede ser iniciado o inhibido por estímulos tanto fisiológicos como patológicos. La célula apoptótica se separa de las células vecinas, se contrae pero no derrama su contenido citoplásmico (**Fig. 1c**). La cromatina se condensa, la envoltura nuclear se desensambla y el DNA nuclear se fragmenta (Alberts et al., 2002). El citoesqueleto se colapsa y da lugar a una gran cantidad de pliegues en la membrana plasmática. La fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido componente de la membrana plasmática, normalmente se localiza en la cara interna de ésta, mientras que en la apoptosis moléculas de PS se translocan a la superficie externa de la membrana plasmática. Finalmente la célula se fragmenta en pequeños corpúsculos rodeados por membrana (**Fig. 2**), mejor conocidos por “cuerpos apoptóticos”, los cuales son engullidos por células vecinas (Steller, 1995).

Las bases genéticas de la apoptosis fueron descritas hace ya más de una década. A partir de experimentos realizados en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, se determinó que la activación de la proteasa CED-4 activa a la proteasa CED-3, ambas están involucradas en la muerte celular y son inhibidas por CED-9 (requerida para bloquear la muerte celular). Este tipo de modelos son muy importantes ya que dan bases para buscar proteínas homólogas en diferentes organismos (**Tabla 1**), como es el caso de los mamíferos donde se probó que el oncogen Bcl-2 es el ortólogo de CED-9. Esta proteína Bcl-2 es representativa de la subfamilia antiapoptótica, mientras que la subfamilia proapoptótica está representada por Bax (Danial et al., 2004).

La ejecución molecular requiere de energía y está mediada por la proteólisis de una cascada de caspasas (por su nombre en inglés Cysteine-dependent ASPartyl-specific proteASE), éstas se encuentran dentro de la célula en forma inactiva como zimógenos

(denominadas procaspasas) y se clasifican en iniciadoras y ejecutoras. Al interactuar con proteínas adaptadoras, las caspasas iniciadoras se reclutan y son capaces de autoactivarse, de tal forma que al liberarse del complejo activan a las caspasas efectoras, las cuales a su vez cortan un gran número de proteínas, que bien se pueden activar o inactivar para que se lleven a cabo los procesos característicos de la muerte apoptótica (Samali et al., 1999; Danial et al., 2004). Esta forma de amplificar la señal de apoptosis a partir de las caspasas proporciona un punto irreversible de este tipo de muerte.

Tabla 1. Conservación evolutiva de la apoptosis (Modificada de Lawen, A. 2003)

	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>		Mamíferos	
		<u>Intrínseca</u>	<u>Extrínseca</u>	<u>Intrínseca</u>	<u>Extrínseca</u>
Promotor de apoptosis	EGL-1	Debcl	Wengen/Eiger	Bax, proteínas BH3	Fas/FasL, TNFR1/TNF- α , DR4,5/TRAIL
Inhibidor	CED-9	Buffy (?)		Bcl-2, Bcl-x _L	cFLIP
Adaptador	CED-4	Dark	dFADD	Apaf-1	FADD TRADD
Caspasa iniciadora	CED-3	Dronc	Dredd	Caspasa-9	Caspasa-8
Inhibidor de caspasas		Diap-1	Diap-1	IAP	IAP
Inhibidor de IAP		Reaper, Grim, Hid	Reaper, Grim, Hid	Smac/Diablo Omi/HtrA2	Smac/Diablo
Caspasa efectora	CED-3	Dcp-1, Drice	Dcp-1, Drice	Caspasa-3, -7, -6	Caspasa-3, -7, -6

La cascada de caspasas puede desencadenarse por dos vías: una extrínseca y una intrínseca. La vía extrínseca (**Fig. 3**) inicia cuando ligandos extracelulares activan a receptores específicos (conocidos como receptores de muerte) en la membrana plasmática. Entre los receptores de muerte se reconocen a TNFR-1 y Fas/CD95, estos contienen un dominio conocido como dominio de muerte (DD), que les permite interactuar con proteínas adaptadoras. La proteína transmembranal Fas en su porción intracelular se une a un factor intermediario denominado FADD (factor associated death domain), el cual contiene un dominio DED, mediante el cual permite la activación de las caspasas-8 o 10. Además, si la parte interna del receptor Fas se asocia a otra proteína de interacción llamada Daxx permite su unión con ASK1 (cinasa 1 regulada

por señal apoptótica), aumentando la apoptosis mediada por Fas (Wang et al., 1996; Yang, 1997).

Algo similar sucede con el receptor TNFR-1. Su porción intracelular se une a proteínas intermediarias como TRADD (TNF receptor associated death domain), RIP (Receptor interacting protein) y TRAF2 (TNF receptor associated factor-2) que activan caspasas iniciadoras formando un complejo llamado DISC (por sus siglas en inglés, Death-Inducing Signaling Complex). Una vez que la caspasa iniciadora activada es liberada del complejo, puede activar a las caspasas efectoras -3, -6 o -7 (sin involucrar a la mitocondria), las cuales son capaces de cortar importantes substratos celulares, incluyendo ICAD (inhibidor de DNAsa activado por caspasas), PARP (Enzima de reparación de DNA), actina, fodrina y lamina, entre otras proteínas (Danial et al., 2004).

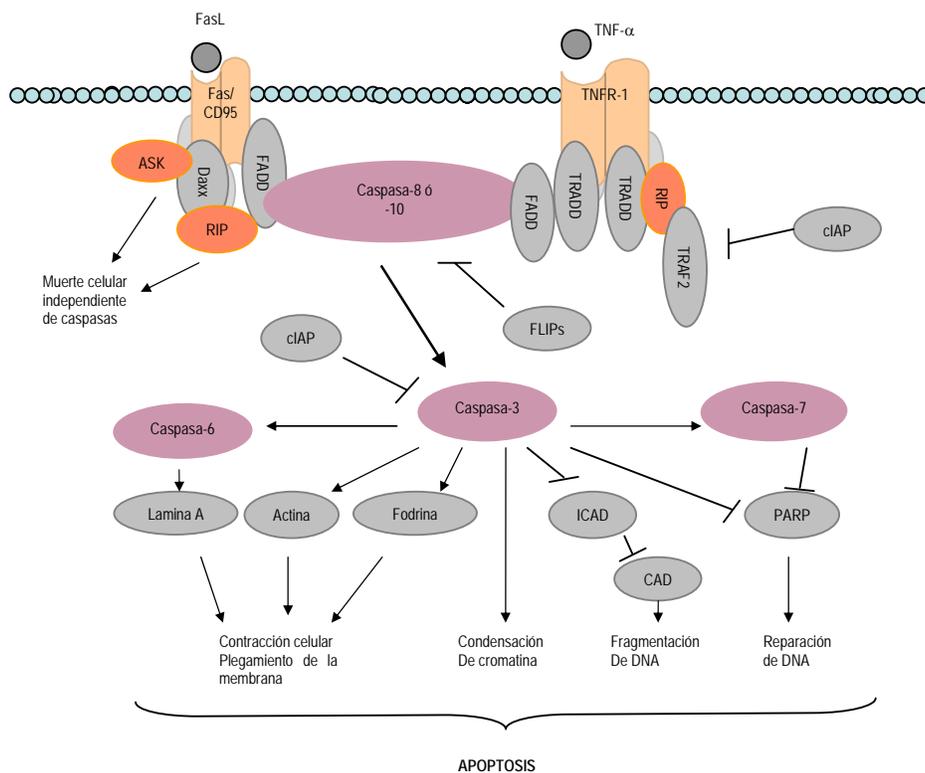


Figura 3. Apoptosis inducida por la vía extrínseca. Ligandos extracelulares se unen a receptores de muerte desencadenando la activación de las caspasas. (Basado en Cell Signalling 2003).

La apoptosis mediada por la vía intrínseca (**Fig. 4**) se promueve por una variedad de estrés extracelular o intracelular y requiere la participación de la mitocondria para amplificar la señal de muerte. Se estimula la liberación de moléculas proapoptóticas de la mitocondria, como el citocromo c; éste induce la oligomerización

de la proteína adaptadora Apaf-1 en el citosol y recluta a la procaspasa-9 formando un complejo conocido como apoptosoma. Ya activada la caspasa-9 se libera del complejo para procesar a las caspasas efectoras (Samali et al., 1999; Raymond et al., 2003; Danial et al., 2004).

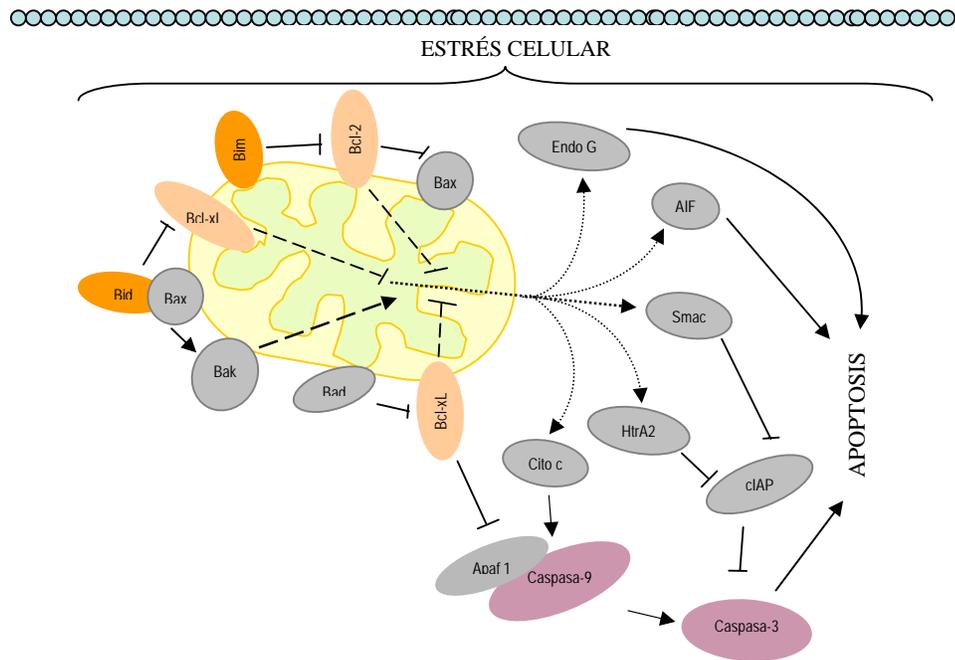


Figura 4. Apoptosis inducida por la vía intrínseca. Señales de estrés resultan en la activación de esta vía, la cual dirige la liberación de citocromo c y muchas proteínas más de la mitocondria. (Basado en Cell Signalling 2003).

En adición a la liberación del citocromo c, también se liberan la endonucleasa G (Endo G) y el factor AIF, éste último se trata de una oxidoreductasa mitocondrial filogenéticamente conservada, que al translocarse al núcleo parece inducir la condensación de cromatina y fragmentación de DNA en ausencia de caspasas. Otros polipéptidos liberados de la mitocondria son Smac/Diablo y HtrA2, quienes permiten la apoptosis al secuestrar a los IAPs (Inhibitors of Apoptotic Proteins). Los IAPs son una familia de proteínas antiapoptóticas, ya que, mediante sus dominios BIR, se unen a caspasas bloqueando el sitio catalítico o facilitando la ubiquitinación y degradación de las caspasas unidas (Kaufmann et al., 2001).

Existen más moléculas que impiden a diversos niveles, se desencadene la apoptosis. Por ejemplo, la formación del complejo DISC se puede inhibir por la

expresión de cFLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein), ésta es una proteína parecida a la procaspasa-8, tiene un dominio catalítico como las caspasas, pero inactivo; interactúa con las proteínas adaptadoras y se recluta en el complejo DISC de tal modo que lo inactiva (Chang et al., 2002). En el caso de la familia Bcl-2, se incluyen miembros proapoptóticos y antiapoptóticos. Con base en criterios estructurales y funcionales, la familia Bcl-2 se ha dividido en tres grupos: 1) las proteínas antiapoptóticas, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo/Diva y Nrf3, se caracterizan por conservar cuatro dominios de Homología Bcl-2 (BH1-BH4); 2) entre las proteínas proapoptóticas se encuentran Bax, Bak y Bok/Mtd, son muy similares al grupo 1 en la estructura, pero pierden el dominio BH4 N-terminal; y 3) las proteínas con un solo dominio BH3, Bid, Bad, Bik, Bim, Blk, Bmf, Hrk, Bnip3, Nix, Noxa y Puma, responden a una gran variedad de estímulos proapoptóticos. Los miembros antiapoptóticos son reguladores clave que impiden la liberación de moléculas proapoptóticas como el citocromo c y otros factores inductores de apoptosis, provenientes de la mitocondria (Lawen, 2003; Kaufmann et al., 2001).

Un solapamiento e integración entre la muerte inducida por receptores y la vía mitocondrial puede ocurrir a partir de Bid, el cual pertenece a las proteínas con un solo dominio BH3 de la familia Bcl-2. La caspasa-8 media el corte de Bid, la resultante Bid truncada (tBid) se transloca a la mitocondria e induce la liberación del citocromo c, dirigiendo la activación de la caspasa-9 y -3. Finalmente la caspasa efectora -3 procesa proteínas sustrato para ejecutar el programa apoptótico (Danial et al., 2004).

1.1.2.2. MCP tipo II o Autofagia

La autofagia, como su nombre lo indica, se refiere a comerse (“phagy”) a si mismo (“auto”), se considera el principal sistema de degradación y reciclamiento de proteínas de vida media larga y organelos citoplásmicos en células eucariotas; además, tiene aparentemente dos funciones: salva a la célula de morir (en estado de ausencia de nutrientes) o bien, es el mecanismo por el cual la célula degrada o moviliza sus

constituyentes al morir. Para efectuar el recambio de componentes celulares, se transportan porciones de citoplasma a vacuolas lisosomales, donde son digeridas. A su vez, los productos finales de degradación o reciclamiento son reguladores negativos para el proceso de autofagia (Yoshimori, 2003; Reggiori et al., 2002).

Por lo menos se han descrito tres tipos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia y la microautofagia difieren en como el material de carga es entregado a los lisosomas (Reggiori et al., 2002); por un lado, la microautofagia involucra el engullimiento directo del material de carga en los lisosomas, mientras que, en la macroautofagia se forman vesículas de doble membrana que engullen el material de carga formando los autofagosomas. Estos se fusionan con los lisosomas (**Fig.5**) (Levine et al., 2004).

La principal característica del tercer tipo de autofagia es su selectividad en cuanto a los substratos degradados por esta vía. Todas las proteínas a degradar, contienen un motivo blanco bioquímicamente relacionado al pentapéptido KFERQ. Este motivo esta presente en aproximadamente el 30% de las proteínas citosolicas y es reconocido por una chaperona citosólica, la hsc70. La interacción con esta chaperona, dirige al substrato a la membrana lisosomal, donde éste interactua con la proteina lisosomal conocida como lamp2 (Kiffin et al., 2004).

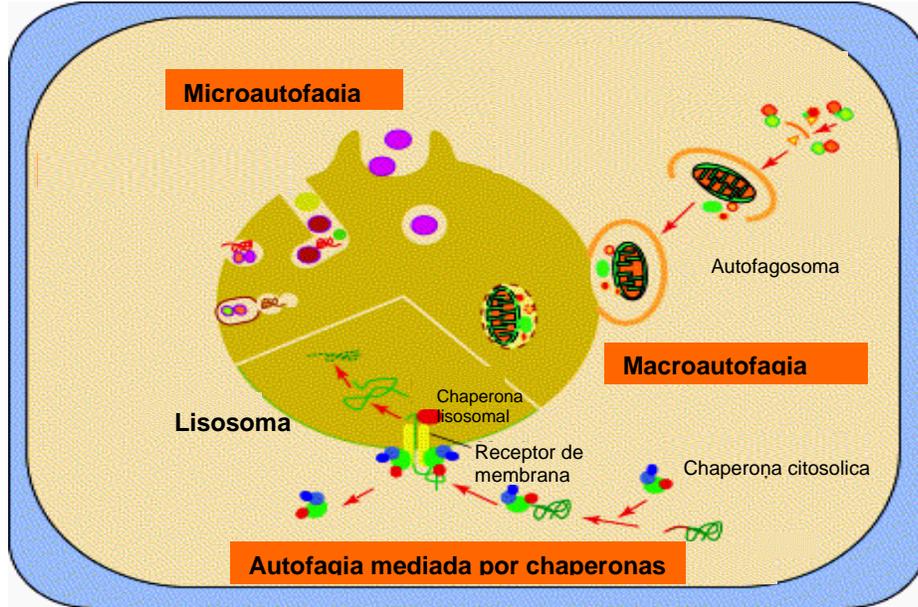


Figura 5. Modelo de los diferentes tipos de autofagia. En la macroautofagia una porción de citoplasma es aislado por la membrana autofágica, la cual eventualmente resulta en una estructura de doble membrana, llamada autofagosoma. La microautofagia es constitutiva, mientras que los otros dos tipos se estimulan por señal de estrés. En la microautofagia la membrana original es lisosomal. La autofagia mediada por chaperonas está mediada por receptores, situados en la membrana lisosomal. (Basada en Mizushima, et al., 2005; Levine, et al., 2004; Kiffin, et al., 2004)

La macroautofagia es la que puede concluir en MCP tipo II, ésta se caracteriza por la formación de vesículas autofágicas que capturan componentes citoplásmicos. Se da una dilatación de organelos como la mitocondria, el retículo endoplásmico (**Fig. 6**) y aumenta la actividad lisosomal. La degradación de los organelos se da tempranamente, pero el citoesqueleto se mantiene conservado hasta etapas tardías. Existe una condensación parcial de la cromatina independiente de caspasas (Gozuacik et al., 2004; Levine et al., 2005).

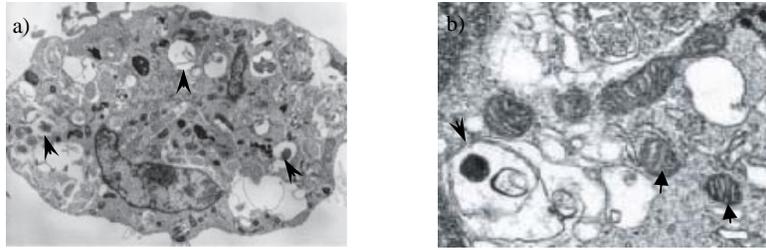


Figura 6. Características morfológicas de muerte autofágica. Inducción de autofagia en fibroblastos embrionarios (MEFs) de ratones Bak^{-/-}/Bax^{-/-} tratados con etoposido (inhibidor de topoisomerasa II y agente apoptótico). a) MEF conteniendo un gran número de autofagosomas/autolisosomas (▲), aunque el núcleo se ve deformado, no se muestra ni condensación de cromatina, ni fragmentación nuclear. b) Amplificación con vesículas citoplásmicas, mitocondrias (▲) y retículo endoplásmico dilatados. (Modificada de Shimizu 2004)

1.1.2.3. MCP tipo III o Degradación vesicular no lisosomal (muerte citoplásmica)

El proceso de MCP no apoptótica de tipo III está mucho menos descrito y se desconocen los mecanismos moleculares que participan en esta muerte. Morfológicamente se caracteriza por la formación de vesículas citoplásmicas que no se fusionan a los lisosomas; hay una dilatación de organelos (**Fig. 2**), no existe activación de caspasas pero puede darse una fragmentación nuclear tardía (Yoshimori, 2003; Reggiori et al., 2002; Levine et al., 2004; Broker et al., 2005).

El comprender los mecanismos moleculares y las bases bioquímicas de los diversos tipos de muerte celular, nos permitirá entender procesos de desarrollo durante la vida de un organismo. A partir de esto, podremos interpretar aspectos evolutivos de los programas de muerte; como es que ocurren estos procesos durante el desarrollo, enfermedades degenerativas o como se inhiben los mecanismos normales de muerte celular en el cáncer. Esto a su vez, nos podría revelar nuevos blancos para la intervención de estas enfermedades.

1.2 MCP no apoptótica durante el desarrollo y la neurodegeneración

Aunque la apoptosis no hace mucho se consideraba como el único proceso que ocurre tanto en el desarrollo como en la muerte neuronal, evidencias recientes basadas en la morfología de las neuronas muertas por varias condiciones patológicas (Fukuda et al., 1999; Ikegami et al., 2003; Turmaine et al., 2000; Sperandio et al., 2000) o en el desarrollo de mamíferos (Oppenheim et al., 2001; Chautan et al., 1999), han mostrado rasgos diferentes a la apoptosis. Así, la identificación morfológica de distintos tipos de muerte celular, hace necesario considerar programas de muerte alternativos a la apoptosis para el estudio de procesos degenerativos y en el desarrollo.

Por mencionar algunos ejemplos donde ocurre muerte no apoptótica, incluimos el caso en que exploran el daño ocasionado al cerebro, causado por isquemia hipóxica en ratones deficientes de caspasa-3. Los ratones sufrieron una ligación unilateral de la carótida a los 7 días de nacidos, seguido por una exposición de oxígeno al 8% durante 45min. Extrañamente, la pérdida de neuronas a los 14 días del neonato fue significativamente mayor en los ratones sin caspasa-3 comparados con ratones silvestres (wt) de la misma camada. Sin embargo, entre estos ratones, sin caspasa-3 y wt, no encontraron diferencias en la morfología nuclear o en la detección de DNA a partir de la escalera de DNA. Esta escalera consiste en detectar los fragmentos característicos de DNA (longitud de 180pb o múltiplos de este) que se forman en células apoptóticas. Los fragmentos de DNA forman una típica escalera al realizar una electroforesis en gel de agarosa. Tampoco detectaron alguna activación compensatoria de otras caspasas, ya que el producto generado de PARP-1 (cortada por caspasa-3) no apareció en los ratones deficientes de caspasa-3. Esto sugiere que en caso de una inhibición crónica de caspasa-3 puede ocurrir muerte celular por vías independientes de caspasas (West et al., 2005). Por otra parte, Oppenheim y colaboradores (2001), basados en el hecho de que la caspasa-3 y -9 son esenciales para que ocurra una MCP en varias neuronas, analizaron el efecto que tiene la eliminación de la caspasa-3 ó -9 en la morfología y DNA de neuronas en desarrollo y postmitóticas. Encontraron que ocurren malformaciones en el cerebro anterior tanto en embriones como en etapas postnatales de ratones deficientes de caspasa-3. Para los ratones sin caspasa-9 se analizaron sólo las etapas embrionarias debido a que estos se mueren en la etapa 16.5. En ambos embriones, es decir, sin

caspara-3 o -9, el número de células muertas fue comparable con el control. Sin embargo, las neuronas muertas tanto en el embrión como en el neonato (analizados hasta los 42 días) presentaron características morfológicas distintas al control, (**Fig. 7a**), es decir, características no apoptóticas como una extensiva vacuolación citoplásmica, hinchamiento de organelos como mitocondria y retículo endoplásmico, poca condensación de cromatina y disminución en el número de células TUNEL(+) (Oppenheim et al., 2001). Esta técnica nos permite marcar en las células, DNA fragmentado. Con esto, concluyeron que vías independientes de caspasas pueden mediar la muerte neuronal en regiones específicas del cerebro y tipos celulares, a edades específicas. Independientemente a lo anterior, al inducir isquemia-hipóxica en el hipocampo de ratones adultos wt, una pequeña población de tejido granular dentado mostraron características apoptóticas. No obstante, la mayoría de las neuronas muertas mostraron características morfológicas distintas a la apoptosis. Esto, con base en las pruebas TUNEL, donde se observó que las células del hipocampo son TUNEL negativas (no se detecta DNA fragmentado); el núcleo mantuvo su forma oval y con la membrana nuclear intacta, no hubo daños en la membrana plasmática ni la mitocondrial. Además, la cromatina se agregó en masas discretas alrededor de la membrana nuclear y en el citoplasma detectaron formación de “masas intracelulares” siendo diferentes de los cuerpos apoptóticos. Lo cual sugiere una nueva forma de muerte celular en neuronas maduras *in vivo* (Fukuda et al., 1999).

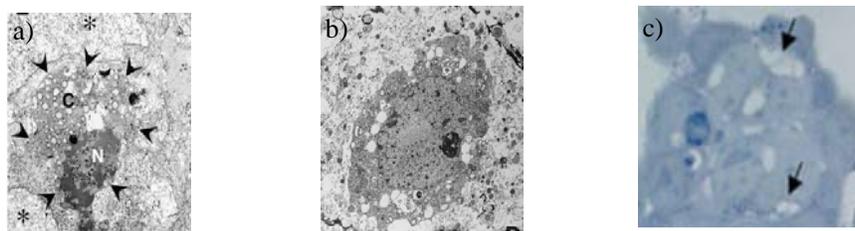


Figura 7. Formación de vesículas citoplásmicas como una característica morfológica de la MCP no apoptótica. a) Neuronas en desarrollo sin caspasa-3 ejecutan una MCP con características diferentes a la apoptosis, con las flechas se delimita la célula, C=citoplasma, N=núcleo (Oppenheim 2001). b) Neurona degenerada por la enfermedad de Huntington muestra vesículas citoplásmicas (Turmaine 2000). c) SP induce muerte no apoptótica en células 293T, al unirse al receptor NK₁R (Castro-Obregón 2002).

Así mismo, en ratones transgénicos que expresan una mutante del gen Huntingtina de humano (Htt, que provoca la enfermedad de Huntington ya que consta de varias repeticiones de CAG en el exon 1), se induce muerte neuronal en la corteza

anterior, en el estriado dorsal y en el cerebelo, ocasionando defectos y entorpecimiento en los movimientos del ratón. Estas mismas áreas del cerebro son afectadas regularmente en pacientes que mueren con la enfermedad de Huntington. Las neuronas degeneradas se detectaron por su alta afinidad a la tinción con azul de toluidina, también exhibieron una condensación nuclear y citoplásmica. Pero no se detectó fragmentación de cromatina, y, en las etapas tempranas de la muerte, los organelos se mantuvieron intactos. No encontraron formación de cuerpos apoptóticos, en cambio, observaron la formación de vesículas en el citoplasma (**Fig.7b**) (Turmaine et al., 2000). Por otro lado, en el proceso de degeneración de neuritas inducida por vinblastina (alcaloide que pertenece a un grupo de los agentes antineoplásicos), se muestran algunas características no apoptóticas como el estrés energético que se presenta en cuanto se pierden las mitocondrias, ocasionando que la concentración de ATP disminuyan drásticamente; conjuntamente estas células presentan fragmentación nuclear y el inhibidor de caspasas z-VAD no tiene ningún efecto en esta degeneración, ni se detecta alguna actividad significativa de caspasas en este tipo de muerte (Ikegami et al., 2003).

Como anteriormente mencionamos, la muerte celular programada es esencial en sitios donde ocurren cambios morfogénicos, es decir, en un gran número de estructuras embrionarias como la formación de extremidades (Salas-Vidal et al., 1998) o cuando se cierra el tubo neural (Boya et al., 2005). Se propone que cuando se eliminan células aisladas se activa la apoptosis, mientras que si se elimina una estructura completa, como en la metamorfosis, se activa la muerte autofágica (Saunders., 1966). En cuanto a la muerte celular programada no apoptótica que ocurre en estos procesos, no se sabe con exactitud el mecanismo que desencadena esta muerte *in vivo*.

1.2.1. Muerte en los interdígitos

La MCP ha sido ampliamente propuesta para participar en la morfogénesis de diferentes órganos y tejidos. Las extremidades embrionarias en desarrollo proporcionan uno de los mejores ejemplos en los cuales la MCP ejerce una de las mayores funciones morfogénicas (Zuzarte et al., 2005), por lo cual se han establecido como un modelo

clásico para el estudio de la MCP; sin embargo, aún falta información sobre los procesos moleculares que contribuyen a este proceso.

Las áreas de muerte celular formalmente se denominan zonas necróticas interdigitales (INZs), se localizan entre los dígitos en desarrollo y la parte con mayor muerte está formada por células mesodermales indiferenciadas (Zuzarte et al., 2005). La individualización de los dígitos ocurre por un balance entre proliferación y muerte celular, reduciendo el crecimiento interdigital comparado con el crecimiento de los dígitos. En los ratones, la mayor parte del tejido interdigital se degenera a los 13.5 días postcoito. Con base en la detección de células apoptóticas, se ha encontrado que los patrones de muerte interdigital son dinámicos y ocurren con gradientes orientados de acuerdo a los principales ejes de las extremidades, anteroposterior, dorsoventral y distoproximal (**Fig. 8**) (Salas-Vidal et al., 2001).

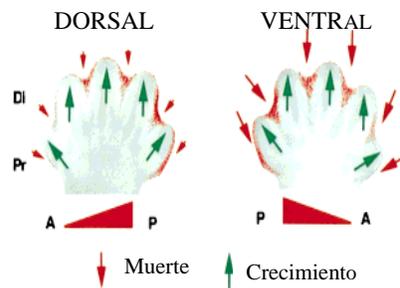


Figura 8. Patrones de crecimiento y muerte celular de acuerdo a los principales ejes de desarrollo en las extremidades. Extremidades de ratón en los 13.5 días postcoito, en estos modelos se muestran los gradientes de muerte y crecimiento celular en los ejes anteroposterior, proximal-distal y dorsoventral. Las flechas indican la dirección de los eventos, las verdes están asociadas al crecimiento y las rojas están asociadas con la muerte celular. (Modificada de Salas-Vidal 2001).

Diferentes estudios han establecido que la muerte en las INZs ocurre a través de procesos apoptóticos dependientes de caspasas (Zuzarte et al., 2002; Zuzarte et al., 2004; Zuzarte et al., 2005; Zuzarte et al., 2006), y la caspasa-3 ha sido identificada como la mayor caspasa efectora durante la regresión de los interdígitos (Mirkes et al., 2001). Sin embargo, es perceptible que el tratamiento de extremidades con inhibidores específicos de caspasa-3, solamente reducen pero no bloquean la apoptosis (Huang et al., 2002). Además, ratones deficientes para caspasa-3 no muestran fenotipo en los dígitos, y la muerte interdigital sigue ocurriendo (Zuzarte et al., 2006). Al analizar la liberación de factores apoptóticos de la mitocondria en extremidades del embrión de

pollo (6-8 días de gestación), se determinó que AIF, siendo uno de los principales factores pro-apoptóticos, se transloca de la mitocondria al núcleo, donde promueve condensación de cromatina y fragmentación de DNA en una forma independiente de caspasas (Zuzarte et al., 2006). Por otra parte, cuando las caspasas son inhibidas aún ocurre muerte interdigital (Chautan et al., 1999), esto puede revelar la existencia de mecanismos de muerte alternativos a la apoptosis en los interdígitos. Las características morfológicas que distinguen a estas células son sus núcleos moteados y la cromatina condensada sin llegar a fragmentarse (**Fig. 9**), se observa dilatación de mitocondrias y vacuolas citoplásmicas.

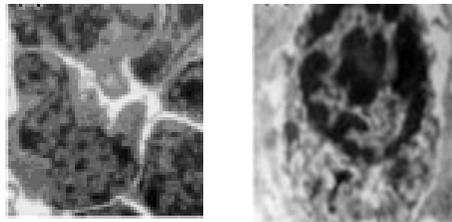


Figura 9. Células muertas en los interdígitos. La muerte interdigital sigue ocurriendo aún en ausencia de caspasas. Las figuras muestran células muertas del interdígito de un ratón sin Apaf-1, es decir con la vía intrínseca inhibida. (Modificada de Chautan 1999)

Varios factores, candidatos para jugar un papel en la muerte celular interdigital, se han inferido de sus patrones de expresión. Por ejemplo, el receptor de ácido retinoico- β (rar- β) (Mendelsohn et al., 1992), los genes homeobox, msx-1 y -2 (Coelho et al., 1991) y varios miembros de la familia de las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP) (Francis et al., 1994), están expresados en las regiones interdigitales en el tiempo en que ocurre la muerte celular. A pesar de ello, en un análisis reciente, a partir de hibridaciones *in situ*, estos genes no correlacionan ni tienen la máxima expresión en zonas donde existe la mayor cantidad de muerte celular (Salas-Vidal et al., 2001), por lo que aún queda la duda de cómo participan estos factores en la muerte interdigital o si hay otros genes que estén participando en la degradación de los interdígitos.

1.3. Subfamilia NR4A

La subfamilia de receptores nucleares NR4A (también conocida como Nur77, TR3 o NGFI-B α , etc.) está constituida por tres miembros, Nur77 (NR4A1, TR3, NAK-1, NGF-IB, N10, ST59 o TIS1) de 64kDa, Nurr1 (NR4A2, RNR1, TONOR, Not o HZF-3) de 66kDa y Nor-1 (NR4A3, MINOR, CHN o TEC) de 68kDa.

En general, los receptores nucleares son proteínas que se pueden unir a elementos reguladores (elementos de respuesta) de DNA específicos, pertenecen a una gran superfamilia de factores de transcripción activados por ligando y están relacionados con el control del desarrollo embrionario, importantes funciones en la fisiología de diferentes órganos, diferenciación celular y homeostasis (Novac et al., 2004).

Los miembros de la subfamilia NR4A se consideran receptores nucleares huérfanos, es decir, no se conoce ningún ligando que los active (Kucharova et al., 2002).

Comúnmente los receptores nucleares se clasifican de acuerdo a la conservación de sus dominios. El rasgo estructural (**Fig. 10**) que distingue a la subfamilia NR4A, es su dominio central de unión a DNA (DBD). Estos receptores se unen al elemento de respuesta a NGFI-B (NBRE), como monómeros. Al elemento de respuesta a Nur (NurRE), se unen como homodímeros o formando heterodímeros entre los mismos miembros de esta subfamilia. En la región N-terminal constan de un dominio involucrado en la transactivación (región AF-1); y en la región C-terminal llevan un dominio de unión al ligando (LBD) (Hsu et al., 2004).

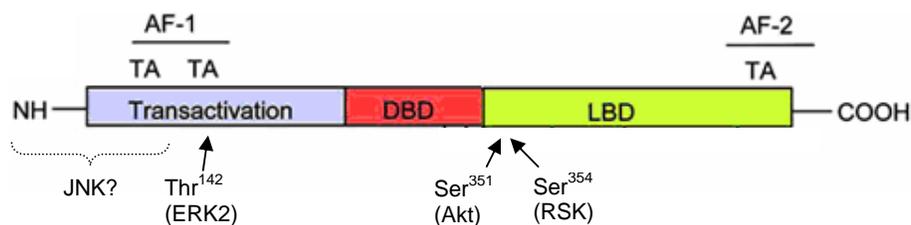


Figura 10. Estructura general de los receptores nucleares. Constan de tres dominios, en su región amino terminal tiene un dominio de transactivación, un dominio de unión a DNA en la región central y un dominio de unión al ligando en la región carboxilo terminal. En la parte inferior, con las flechas se señalan algunos sitios de fosforilación de Nur77. (Modificado de Hsu 2004)

El DBD comprende dos módulos, cada uno de los cuales contiene cuatro motivos cisteína/zinc. Este dominio es altamente conservado, entre los miembros de la subfamilia NR4A presenta más de un 90% de homología, el LBD está medianamente conservado (~60% de homología); mientras que el dominio de transactivación es el menos conservado, presentando una homología del 27% entre Nur77 y Nurr1, o del 21% entre Nur77 y Nor-1 (Maira et al., 2003). El DBD de Nur77, contiene dos señales de localización nuclear (NLS). Éstas se encuentran entre los residuos 278-283 y en 308-313. El primero está localizado dentro del segundo dedo de zinc y el segundo está localizado en la caja A, que es una secuencia necesaria para la unión de Nur77 al DNA. Por otra parte, su LBD contiene tres señales de exporte nuclear (AA₄₀₈₋₄₁₇, AA₄₆₇₋₄₇₆, AA₅₂₀₋₅₃₀), estas son ricas en leucina, composición crítica para dirigir proteínas fuera del núcleo (Hsu et al., 2004).

Los tres receptores de la subfamilia NR4A son codificados por genes inmediatos, ya que son activados transitoria, rápida y directamente (sin intermediarios) en respuesta a una gran variedad de estímulos celulares. Pueden actuar como moduladores positivos o negativos de transcripción para otros receptores. Participan en una gran variedad de procesos biológicos, que van desde la formación de neuronas hasta la muerte celular (Winoto et al., 2002; Hazle et al., 1988; Castro-Obregón et al., 2002). Están relacionados con procesos degenerativos como esquizofrenia, maniaco-depresión, inducción de isquemia, enfermedad de Parkinson y enfermedades autoinmunes (Senaldi et al., 2002; Bras et al., 2000; Cheng et al., 1997; Honkaniemi et al., 1999; Li et al., 2000; Li et al., 1998; Lin et al., 2004; Quartara et al., 1997; Suzuki et al., 2003; Uemara et al., 1998; Walton et al., 1999).

Muchos tejidos muestran diferentes niveles de expresión de los miembros de esta subfamilia y su función depende del contexto en el que se encuentre la célula (Hsu et al., 2004; Ke et al., 2004). El receptor Nur77 es ampliamente expresado en varios tejidos de la rata adulta, incluyendo timo, músculo, hígado, ovarios, próstata, varias regiones del cerebro; en las glándulas adrenal, tiroidea y pituitaria. Nurr1 se ha detectado en cerebro, timo, osteoblastos, hígado y glándula pituitaria; y Nor-1 se expresa a altos niveles en la glándula pituitaria y en bajos niveles en el timo, riñón, corazón, músculo esquelético y glándula adrenal (Zetterstrom et al., 1996;).

Durante el desarrollo fetal en ratón, Nor 1 se detecta desde el día 7 de la

gestación y la inactivación génica de éste es letal entre los 8.5 u 9.5 días de gestación, debido a que este receptor es necesario para la migración celular durante la gastrulación (Young et al., 2003). Por ello se considera que tiene un papel importante en el desarrollo temprano. Su expresión también es importante para la formación normal del oído interno de ratón (Ponnio et al., 2001).

Nurr1 se puede detectar en el día 6.5 del embrión de ratón. El ratón deficiente de Nurr1 no es letal en etapas embrionarias, pero no sobrevive después de nacer debido a que pierde la producción de neuronas dopaminérgicas (Zetterstrom et al., 1997). Por otra parte, al silenciar a Nurr1 mediante iRNA (RNA de interferencia), en la línea celular HeLa se indujo apoptosis, sugiriendo un papel de sobrevivencia para Nurr1 (Ke et al., 2004)

En cuanto a la expresión de Nur77, al estudiar tejidos del sistema nervioso e inmune, Nur77 se detectó hasta la etapa 16.5 en la corteza adrenal y el timo pero no en el sistema nervioso central a diferencia de Nor-1 y Nurr1 (Zetterstrom et al., 1996; Meaux et al., 2004). Nur77 es requerido para la apoptosis en la selección negativa de células T (Liu et al., 1994). Sin embargo, el ratón deficiente de Nur77 no muestra fenotipo en la muerte de las células T, ya que al inducir apoptosis por TCR, no hay diferencias significativas entre el ratón mutante y el silvestre, en cuanto al número de células muertas (Lee et al., 1995). Esto sugiere la existencia de proteínas redundantes con funciones similares, que bien podría ser Nor-1, puesto que su patrón de expresión sobrelapa con Nur77 ejerciendo funciones apoptóticas (Meaux et al., 2004).

Nur77 es una fosfoproteína que regula su actividad transcripcional por eventos de fosforilación, la cual puede ser efectuada mediante diversas cinasas (**Fig. 10**). Por ejemplo, la cinasa Akt fosforila a Nur77 en la serina 351 (localizada en el dominio de unión a DNA) disminuyendo su potencial como activador transcripcional, y como consecuencia disminuye la muerte celular en células T (Zuzarte et al., 2004). Al estimular a células cancerosas con 3-Cl-AHPC, análogo de AHPN (inductor de apoptosis), Nur77 es fosforilado (en la región N-terminal) por la cinasa JNK induciendo apoptosis (Han et al., 2006). Esta fosforilación permite la salida de Nur77 del núcleo. La fosforilación de Nur77 en la serina 354 impide la unión de Nur77 al DNA. Aunque aún no se ha establecido que cinasa es la responsable de esta fosforilación, Nur77 es fosforilado en este sitio por RSK (Ribosomal S6 Kinase) en respuesta a estimulación mitogénica. Sin embargo, la fosforilación por RK no afecta la actividad transcripcional

de Nur77 (Wingate, et al., 2006). Erk 2 puede fosforilar a Nur77 en la treonina 142. En este caso, la fosforilación se da bajo la estimulación de EGF, lo cual evita la exportación nuclear de Nur77 permitiendo la sobrevivencia de las células (Slagsvold et al., 2002). En cambio, al inducir muerte con el neurotransmisor SP, Nur77 es fosforilado también por ERK2, sin embargo, no se ha determinado el sitio de fosforilación ni el efecto en la actividad de Nur77, aunque se sabe que esto induce muerte no apoptótica (Castro-Obregón et al., 2004).

1.3.1. Nur77 en la apoptosis

Nur77 puede participar en la MCP a través de diferentes mecanismos, dependiendo del tipo celular y del estímulo que induce la muerte. Diversas evidencias muestran que Nur77 regula la apoptosis. Cuando se induce apoptosis en líneas celulares de cáncer de pulmón (Li et al., 1998) y próstata (Uemara et al., 1998), se induce la expresión de Nur77, mientras que al inhibir la apoptosis su expresión de Nur77 se ve deteriorada. Además, la sobreexpresión del RNA antisentido de Nur77 inhibe la muerte. Por el contrario, Nur77 tiene un papel antagónico a la apoptosis al inducir su sobreexpresión con TNF (Factor de necrosis tumoral) en fibroblastos de embrión de ratón (Suzuki et al., 2003); o al inducir la sobreexpresión ectópica de Nur77 en células A20 B, les da a éstas resistencia contra la apoptosis inducida por ceramida (Bras et al., 2000).

En la selección negativa de células T, Nur77 y Nor-1 inducen la apoptosis por la vía extrínseca, al transcribir Fas y FasL. Cuando se expresa una mutante dominante negativa de Nur77 sin el DBD se inhibe esta muerte (Cheng et al., 1997).

Células cancerosas de próstata estimuladas con el ester forbol TPA, translocan a Nur77 del núcleo a la mitocondria. En este modelo, Nur77 induce apoptosis a partir de la liberación del citocromo c (Li et al., 2000). Al translocarse Nur77 a la mitocondria interactúa con la región N-terminal de Bcl-2 induciendo cambios conformacionales que exponen el dominio BH3 de Bcl-2, resultando en una conversión de una función antiapoptótica a una proapoptótica (Lin et al., 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1. Nur77 media muerte no apoptótica

Recientemente se describió una vía alterna de la muerte celular programada no apoptótica, que es inducida por la unión de un neurotransmisor llamado Substancia P (SP) a su receptor Neurokinina-1 (NK₁R). Este tipo de muerte presenta vacuolación citoplásmica y algunos fagolisosomas. La membrana nuclear parece intacta y no presentan cuerpos apoptóticos. En cultivos primarios de neuronas se observó que estas células mueren en una forma independiente de caspasas, pues al bloquear, con zVAD, células inducidas con SP, no hubo inhibición de la muerte (Castro-Obregón et al., 2002). De hecho, en situaciones donde ocurre muerte neuronal, como en la inducción de isquemia (Walton et al., 1999) o durante la epilepsia inducida por la administración de ácido kaínico (Honkaniemi et al., 1999) se detecta un aumento en la expresión de Nur77.

La SP es un neurotransmisor que pertenece a la familia de taquininas. NK₁ es el receptor de SP y pertenece al grupo de receptores acoplados a proteínas-G. En vías independientes, este receptor, puede activar varios tipos de mensajeros secundarios, y participa en procesos biológicos como la transmisión de dolor, regula la función respiratoria y cardiovascular en el Sistema Nervioso Central, se involucra en el reflejo de náuseas, y se ha relacionado con la depresión y esquizofrenia (Quartara et al., 1997). Cuando se une el neurotransmisor SP al receptor NK₁R, la parte intracelular de este receptor interactúa con la proteína de andamiaje arrestina-2; ésta a su vez, se une a un complejo que activa una cascada de MAPK (constituida al menos por Raf-1, MEK2 y ERK2), la cual desencadena la fosforilación del receptor nuclear Nur77 (**Fig. 11**). Aún no se sabe bien como es que Nur77 induce la muerte no apoptótica, pero es esencial para que ocurra, pues la expresión de mutantes dominantes negativas de Nur77 inhiben la muerte inducida por SP/NPK₁R, lo cual también ocurre al silenciar Nur77 con iRNA (Castro-Obregón et al., 2004).

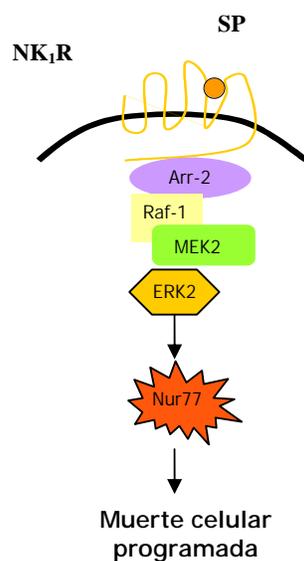


Figura 11. Mecanismo molecular inductor de la muerte celular mediada por SP. Cuando se une SP a NK1R, este último interactúa con Arrestina 2 y recluta al complejo de MAPK, el cual desencadena la fosforilación de Nur77 e induce la MCP no apoptótica.

3. JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios *in vitro* sugieren que Nur77 es un regulador de la muerte celular programada a través de diferentes mecanismos. Dependiendo del estímulo inductor de muerte y del tipo celular, Nur77 puede participar en la regulación de apoptosis o en la muerte no apoptótica. Dado que Nur77 se induce en diversas patologías donde ocurre muerte neuronal, se propone que participe en la neurodegeneración. Sin embargo, en cuanto al desarrollo embrionario, se ha estudiado muy poco la expresión tanto de este gen como de los otros dos miembros de la subfamilia NR4A en la MCP que se efectúa durante este proceso.

Para determinar, *in vivo*, si los miembros de la subfamilia NR4A modulan la muerte vesicular que se observa tanto en el desarrollo embrionario como en la neurodegeneración, se pretende generar un ratón transgénico que exprese de manera regulable una mutante dominante negativa de los tres miembros, para lo cual es necesario conocer su patrón de expresión durante el desarrollo en regiones donde ocurre muerte celular programada, tanto apoptótica como no apoptótica. Como previamente se mencionó, los tres miembros pueden tener funciones redundantes y probablemente alguno de estos miembros se expresa en las regiones donde se ha observado MCP, por lo tanto, en este trabajo se propone determinar los patrones de expresión de cada miembro de la subfamilia NR4A durante la muerte interdigital del ratón.

4. HIPÓTESIS

Debido a que los miembros de la subfamilia NR4A están relacionados con procesos de muerte celular, es probable que se localicen en los interdígitos, donde ocurre muerte tanto apoptótica como vesicular.

5. OBJETIVOS

- I. Determinar mediante western blot, la presencia de los miembros de la subfamilia NR4A en las extremidades del embrión de ratón, cuando ocurre la muerte interdigital.
- II. Analizar *in situ*, el patrón de expresión de los miembros de la subfamilia NR4A en los interdígitos, así como comparar los patrones de expresión de cada miembro de esta subfamilia.
- III. Establecer alguna correlación entre las zonas de muerte celular programada y los patrones de expresión de los miembros de la subfamilia NR4A.
- IV. Construir vectores para la generación de ratones transgénicos que expresen de forma regulable una mutante dominante negativa de Nur77.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de tejidos: Las extremidades de ratón se obtuvieron de embriones de 11.5, 12.5, 13.5, 14.5 y 15.5 días de gestación, debido a que son las etapas que presentan muerte celular en los interdígitos, es a los 13.5 días que se presenta un máximo de muerte. Los tejidos control, que son cerebro, pulmón y glándula adrenal, se tomaron de la madre (ratón adulto).

Anticuerpos: Se ocuparon anticuerpos comerciales, los cuales se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpo	Especie hospedera	Dilución		Marca
Primario:		Westerns:	Inmunos:	
Anti-Nur77	Conejo(policlonal)	1:200	1:50	Santa Cruz #sc-5569
Anti-Nurr1	Conejo(policlonal)	1:500	1:50	Chemicon Internacional, Inc. AB5778
Anti-Nor-1	Conejo (policlonal)	1:500	1:50	Santa Cruz #sc-30154
Anti-Erk1/2	Conejo (policlonal)	1:2000		Cell Signal #9102
Anti-actina	Ratón (monoclonal)		1:50	Sigma #AC-40
Anti-NeuN	Ratón (monoclonal)		1:100	Chemicon #MAB377B
Secundario:				
Alexa fluor 488, cabra anti-conejo IgG			1:1000	Invitrogen Molecular probes #A11008
Alexa fluor 488, cabra anti-ratón IgG			1:1000	Invitrogen Molecular probes #A11001
Anti-conejo IgG (HPR)		1:10000		Sigma #A0545

Western blot: Cada muestra fue homogenizada en dos volúmenes de buffer de lisis (lista de soluciones) por sonicación, para los tejidos mas chicos (glándula adrenal y extremidades de embrión) se dan tres ciclos de 20seg con una amplitud de 35%, mientras que para los tejidos mas grandes (pulmón y cerebro) se dan cinco ciclos de igual forma. Las soluciones lisadas se centrifugaron (15min a 14000rpm) y se recuperó el sobrenadante, donde van las proteínas. La cantidad de proteínas se igualó (40µg) a partir del método de Bradford, realizando previamente una curva, usando albúmina bovina como estándar. Se llevó a cabo el sistema SDS-PAGE usando buffer Tris/glicina y geles desnaturalizantes de poliacrilamida con gradiente del 10% al 15% (ver apéndice). Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinileno (PVDF) millipore #PVH00010 (previamente humedecida en metanol). Las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5% en TBST (12h a 4°C) antes

de la incubación con el anticuerpo primario por 2h. Luego las membranas fueron lavadas con TBST 3 veces por 10min, seguido por la incubación del correspondiente anticuerpo secundario durante 45min a temperatura ambiente. Las proteínas inmunoteñidas fueron visualizadas sobre películas BioMax Kodak (Sigma #Z370398) usando los reactivos de detección para quimioluminiscencia ECL (Armsham Biosciences #RPN2106).

Inmunofluorescencia: Para determinar el patrón de expresión de las proteínas Nur77, Nurr1 y Nor-1 en las extremidades de los embriones de ratón se realizan inmunofluorescencias en cortes de 10 μ m, obtenidas en micrótomo. Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido, directamente embebidos en gel para criocortes (Cryo-M-Bed, embedding compound. Bright instrument company). Las microsecciones son de cerebro de ratón adulto y de extremidades de embriones de ratón de 13.5 días de gestación, basándonos en el hecho de que es la etapa en que mayor muerte celular se presenta en los interdógitos. Los cortes fueron fijados por 10min con paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente. Fueron permeabilizados con PBS 1X/ Tritón 1% por 5min y se bloqueó por 1h 1hr con PBS 1X/ suero de cabra 10%/ Tritón 0.2%. Se incubó el anticuerpo primario correspondiente por 2hr, diluido en PBS 1X/ suero de cabra 10%/ Tritón 0.2% en una cámara húmeda. Después de los lavados se incubaron los correspondientes anticuerpos secundarios por 2hr, diluidos en PBS 1X/ suero de cabra 10%/ Tritón 0.2%. Finalmente se contratiñeron las muestras con Dapi diluido en PBS 1X, durante 2min y se montaron en glicerol/buffer de fosfatos.

Construcciones: En cuanto al objetivo IV, obtuvimos dos subconstrucciones para generar el ratón transgénico. Este ratón expresará en forma regulada una mutante dominante negativa de Nur77. El sistema de regulación utilizado en este proyecto, es el sistema de regulación por tetraciclina Tet-ON. En términos generales, este sistema consiste en expresar por un lado el gen de interés bajo el control de un promotor mínimo que contenga el operador que responde a tetraciclina (pTRE). Por otro lado, a partir de un promotor constitutivo (pC) se expresa el transactivador (rtTA), el cual permite la activación transcripcional del gen de interés al unirse al promotor responsivo a tetraciclina, únicamente en presencia del antibiótico (**Fig. 12**).

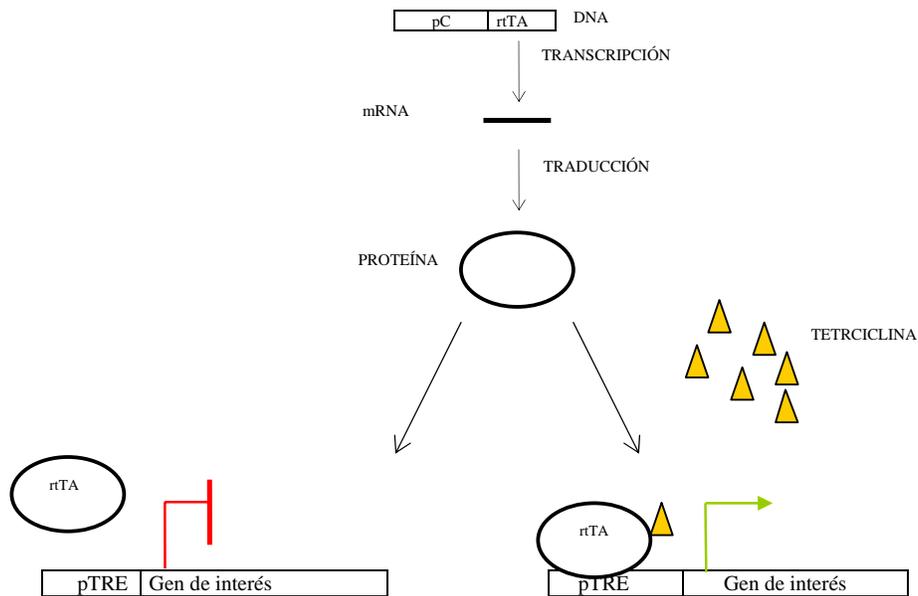


Figura 12. Sistema de regulación por tetraciclina (Tet-ON). Por medio de este sistema se puede regular la expresión de algún gen de interés que es inducida solo en presencia de tetraciclina.

En este modelo, el transactivador estará dirigido por el promotor constitutivo CMV·CBA, este nos va a permitir la expresión del transactivador en células ES (provenientes de la masa interna del blastocisto de ratón), con la finalidad de seleccionar las colonias que expresen la mutante dominante negativa de Nur77 (gen de interés). Así, la integración de las dos partes del sistema, estarán restringidas por la obtención de dos construcciones: La construcción 1, pC-rtTA-IRESLacZ (**Fig. 13**), producirá un mensajero bi-cistrónico ya que expresará tanto el transactivador regulado por tetraciclina (rtTA), como β -galactosidasa (LacZ) a partir de un solo promotor constitutivo (CMV·CBA); la traducción se logrará utilizando un elemento interno de entrada a ribosomas (IRES). Al transfectar esta construcción se detectará la presencia de β -galactosidasa, así se podrá conocer el patrón de expresión del transactivador en el ratón.

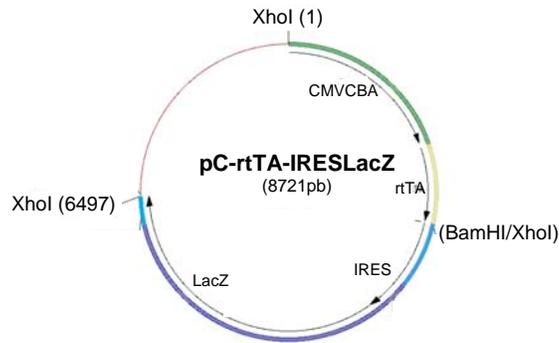


Figura 13. Construcción 1. Mapa gráfico del plásmido pC-rtTA-IRESLacZ, que contiene al transactivador responsive a tetraciclina. Se diseñó con el software Gene Construction Kit.

Para generar esta construcción se parte de tres plásmidos: pUHrT 62-1 (**Fig. 14a**) el cual contiene el gen sintético que representa al transactivador regulado por tetraciclina (rtTA). El plásmido pKS-CMVCBA (**Fig. 14b**) que es el vector comercial pBluscript II KS conteniendo el promotor constitutivo CMVCBA. Y el plásmido pW61 (**Fig. 14c**), el cual está constituido por el vector comercial pBluscript II KS y tiene insertada una secuencia IRES seguida por el gen LacZ.

La construcción 2, pTRE-152ΔNur77GFP (**Fig. 15**), estará conformada por la dominante negativa de Nur77 (152ΔNur77), la cual no cuenta con el dominio de transactivación, su expresión se regulará a partir del promotor responsive a tetraciclina (pTRE). Para detectar la expresión de la dominante negativa de Nur77, estará fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP).

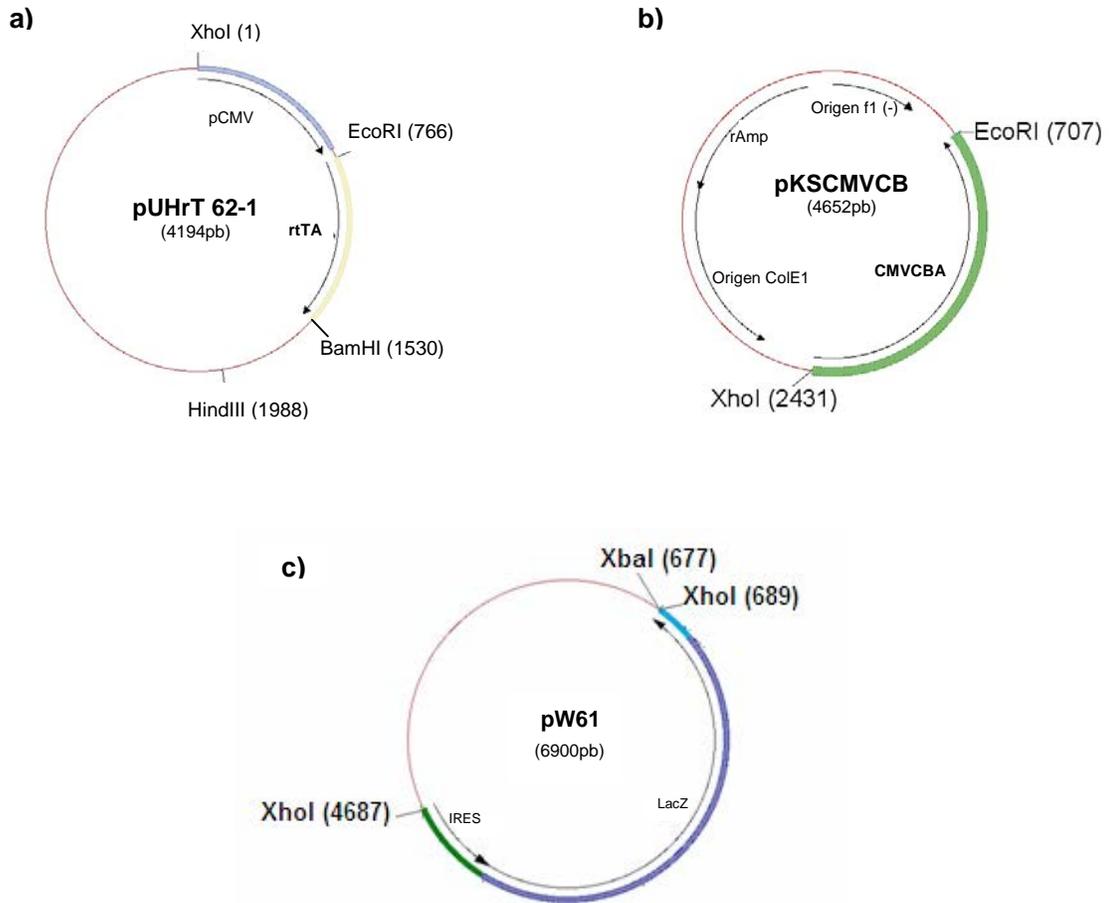


Figura 14. Mapa gráfico de los plásmidos pUhrT 62-1, pKS-CMVCBA y pW61. a) Plásmido pUhrT 62-1. Este contiene el gen del transactivador (rtTA) que se activa con tetraciclina. El cual se puede extraer del plásmido cortando con las enzimas EcoRI (5') y BamHI (3'). b) Plásmido pKS-CMVCBA. Contiene al promotor del citomegalovirus fusionado al enhancer Chicken β -actina, el cual puede ser cortado del plásmido con EcoRI (3') y XhoI (5'). Y c) Plásmido pW61. Contiene una secuencia IRES seguida por el gen reportero LacZ

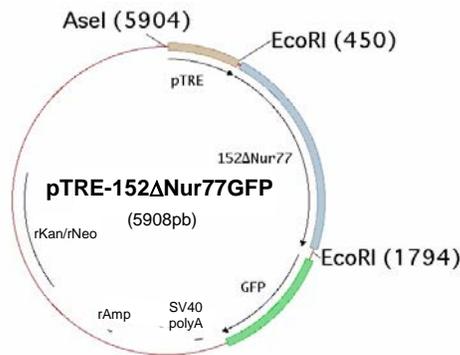


Figura 15. Construcción 2. Mapa gráfico del plásmido pTRE- 152 Δ Nur77GFP, el cual contiene a nuestro gen de interés (mutante dominante negativa de Nur77) bajo el promotor responsivo a tetraciclina. Se diseñó con el software Gene Construction Kit.

Para generar esta construcción partimos sólo de dos plásmidos: pUHD 10-3, el cual contiene el promotor responsivo a tetraciclina (pTRE), se muestra en la figura 16a, y el plásmido pGFP-N₂, en cuyo MCS, está insertada la secuencia de la mutante dominante negativa de Nur77, la cual carece de 152 aminoácidos de la parte amino terminal, este gen está fusionado a la GFP como se puede observar en la figura 16b.

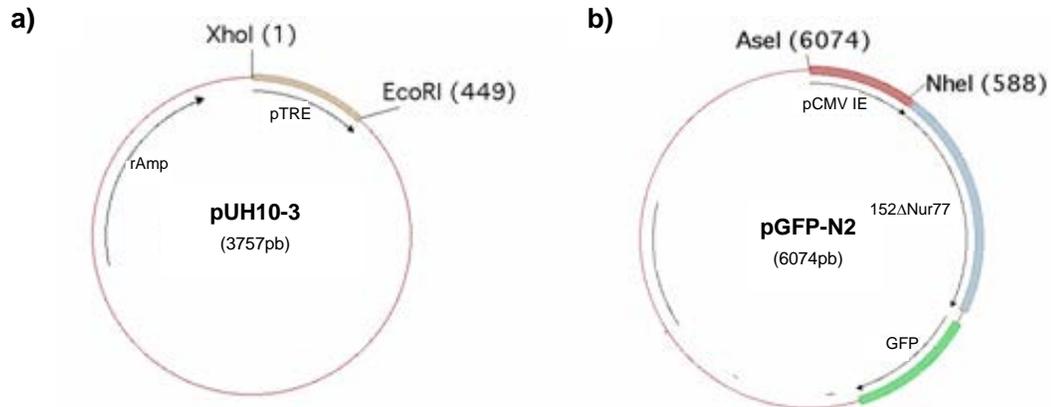


Figura 16. Mapa gráfico de los plásmidos pUHD 10-3 y pGFP-N2. a) Plásmido pUHD 10-3. Este plásmido contiene el promotor pTRE, que se activa con la presencia del transactivador y de tetraciclina. Este promotor se puede extraer del plásmido cortando con las enzimas XhoI (5') y EcoRI (3'). b) Plásmido pGFP-N2. Es el plásmido que contiene la mutante dominante negativa de Nur77 seguida por la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP)

Para la obtención de las dos subconstrucciones se utilizaron diversas técnicas como la preparación de células electrocompetentes, en las cuales se electroporaron los plásmidos correspondientes y se sembraron en medio LB sólido. Obtuvimos el contenido plásmidico de varias colonias a escala mínima (miniprep) para posteriormente verificar por digestiones si alguna colonia tenía el plásmido deseado, cuando corroboramos que cierta colonia tuvo el plásmido que deseamos, obtuvimos grandes cantidades del plásmido, para lo cual realizamos una purificación del plásmido a gran escala (maxiprep).

7. RESULTADOS

Para determinar la presencia del receptor nuclear Nur77 en las extremidades de los embriones de ratón, se realizaron análisis de western blot; los extractos se obtuvieron de las extremidades de embriones a los 13.5 días de gestación (**Fig. 17**). Como controles positivos se usaron extractos de cerebro y de glándula adrenal, el extracto del pulmón fue el control negativo; todos los controles se tomaron de ratón adulto (madre de los embriones).

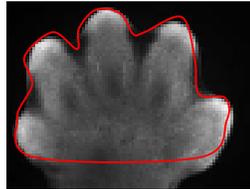


Figura 17. Extremidades de 13.5 días. En esta figura mostramos, delimitado con la línea roja, la parte que se tomó de las extremidades, de las cuales obtuvimos los extractos proteicos para realizar los ensayos de western blot.

Erk1 y Erk2 provienen de dos genes que generan proteínas de 44 y 42kDa respectivamente. Estas cinasas pertenecen a la familia de las serin-treonin cinasas. Son activadas a través de la fosforilación por una variedad de señales extracelulares como factores de crecimiento o neurotróficos, citocinas, hormonas y neurotransmisores. Se eligieron a Erk1/2 como controles de carga ya que son proteínas constitutivas y participan en el mecanismo de muerte celular inducido por SP, es decir, es un intermediario en la muerte donde participa Nur77. El anticuerpo utilizado detecta niveles totales de proteína Erk1/2 y en algunos tipos celulares este anticuerpo reconoce mas rápidamente a Erk2 que a Erk1, pero los niveles totales de una o de otra deberían ser similares en todos los tejidos.

En cuanto a la presencia de los receptores, los datos fueron más precisos al obtener la intensidad de las bandas medidas con el software Image-Pro Plus 5.0, el cual cuantifica la intensidad de cada píxel dentro de la banda. En los geles donde se detectó a Nur77, se sumó la intensidad de las 3 bandas. Estas bandas representan las diferentes isoformas modificadas postraduccionalmente de Nur77. Respecto al control de carga se cuantificó la intensidad de las dos bandas, tanto de Erk1 como de Erk2, y también se usó la suma de ambas como referencia de carga de proteína. De tal forma que los

números inferiores de cada gel muestran los valores que se tomaron como intensidad de las bandas o bien, la suma de la intensidad de las bandas para el caso de Nur77 y Erk1/2.

La intensidad de cada banda se puede observar en las tablas, de la 3 a la 6. El valor más alto lo representamos con la unidad. Para poder comparar cuantitativamente la intensidad de las diferentes bandas, es necesario contar con más repeticiones de los western blots. Por ello, las densitometrías únicamente nos proporcionaron información cualitativa.

Se graficó la relación de los receptores con respecto al control de carga (**Fig. 18-21**), de modo que en el eje X se representa cada tejido analizado, mientras que en el eje Y se representa la relación de la intensidad de las bandas de la proteína de interés (Nur77, Nurr1 o Nor-1) entre la sumatoria de la intensidad de las proteínas Erk1/2.

En la figura 20a se muestra el western blot que confirma la expresión de la proteína Nur77 en los extractos de los controles positivos (glándula adrenal y cerebro), así como en las extremidades del embrión de ratón en la etapa 13.5, a diferencia del control negativo (pulmón), donde apenas se detecta la proteína Nur77.

En la gráfica correspondiente a los datos de Nur77 y Erk 1/2 (**Fig. 18b**), se puede apreciar la presencia de Nur77 en las extremidades del embrión de ratón a los 13.5 días de gestación (E 13.5). La gráfica se obtuvo de la relación que existe entre los datos de Nur77 y Erk 1/2, mostrados en la tabla 3.

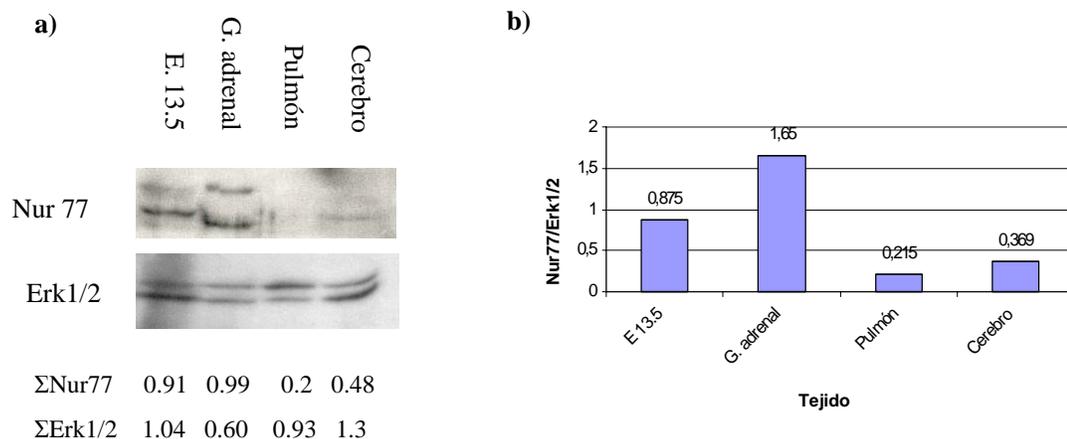


Figura 18. Detección de Nur77 en las extremidades de embrión de ratón. a) Western blot de extractos proteicos obtenidos de las extremidades de embrión de ratón de 13.5 días, glándula adrenal, pulmón y cerebro de ratón adulto. Erk1/2 han sido utilizados como controles de carga. Los números de abajo indican la sumatoria de la intensidad de cada banda tanto para Nur77 como para Erk1/2. b) Relación de los valores de intensidad de las bandas de Nur77 con respecto a las bandas de Erk 1/2.

Tabla 3. Intensidad de las bandas de Nur77

	Intensidad	E 13.5	G. adrenal	Pulmón	Cerebro
Nur77	Banda superior	0.2	0.25	0.06	0.16
	Banda media	0.56	0.14	0.1	0.18
	Banda inferior	0.15	0.6	0.04	0.14
	Erk 1	0.41	0.29	0.72	0.30
	Erk 2	0.63	0.31	0.21	1

Una vez determinada la presencia de Nur77 en las extremidades del embrión de 13.5 días, procedimos a analizar también por western blot, extractos de las extremidades del embrión de ratón en diferentes etapas de gestación (11.5, 12.5, 14.5 y 15.5). Esto se realizó con la finalidad de identificar alguna diferencia de la presencia de Nur77, a través de las etapas de gestación donde ocurre muerte interdigital y cuando ya están individualizados los dígitos (etapa 15.5). De modo que, en la figura 19a mostramos la presencia de Nur77 en las extremidades del embrión de ratón, desde los 11.5 hasta los 15.5 días de gestación (al igual que en los controles positivos, cerebro, glándula adrenal) cuya intensidad de bandas se representa en la tabla 4.

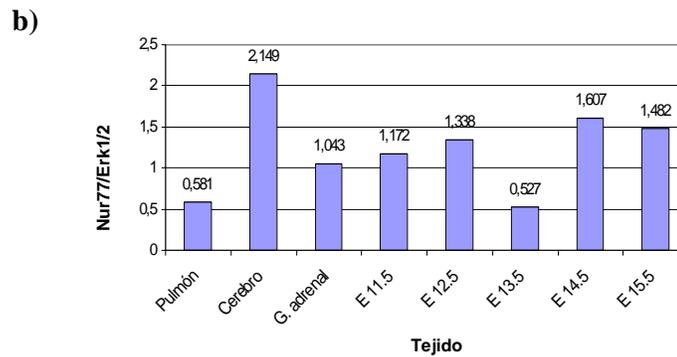
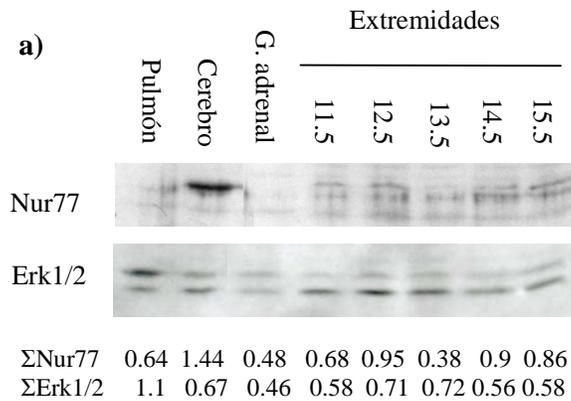


Figura 19. Nur77 en diferentes estadios de las extremidades del embrión de ratón. a) Por medio de western blot se detectó la presencia de Nur77 en extractos proteicos obtenidos de las extremidades de embrión de ratón de los 11.5 a los 15.5 días de gestación; órganos del adulto, como el pulmón se tomó de control negativo, mientras que el cerebro y glándula adrenal se tomaron como controles positivos. Erk1/2 se utilizaron como controles de carga. Los números inferiores indican la sumatoria de la intensidad de las bandas de cada carril tanto para Nur77 como para Erk1/2. b) Relación de los valores de intensidad de las bandas de Nur77 con respecto a las bandas de Erk 1/2.

Tabla 4. Intensidad de las bandas de Nur77 en extremidades de diferentes etapas embrionarias.

	Intensidad	Pulmón	Cerebro	Adrenal	E 11.5	E 12.5	E 13.5	E 14.5	E 15.5
Nur77	Banda superior	0.15	0.16	0.09	0.21	0.26	0.16	0.22	0.28
	Banda media	0.26	1	0.19	0.23	0.37	0.26	0.49	0.40
	Banda inferior	0.23	0.28	0.2	0.24	0.32	0.22	0.19	0.18
	Erk 1	0.8	0.3	0.2	0.16	0.2	0.22	0.16	0.18
	Erk 2	0.3	0.37	0.26	0.42	0.51	0.5	0.4	0.4

Posteriormente se evaluó la presencia de los otros dos miembros de la subfamilia NR4A. Detectamos, igualmente por western blot, que ambos miembros se presentan en las extremidades de los embriones analizados. Nurr1 (**Fig. 20**) parece presentarse en menor cantidad que los otros dos miembros, pero Nurr1 también se encuentra en todos los estadios estudiados del embrión de ratón (**Fig. 20a**). En la gráfica (**Fig. 20b**) podemos distinguir una tendencia a aumentar la expresión de Nurr1 en la etapa 15.5, sin embargo, el control de carga no es homogéneo con respecto a los otros tejidos, por lo que podría tratarse únicamente de una sobreestimación. La intensidad de las bandas de Erk1/2 y Nurr1 se encuentra en la tabla 5.

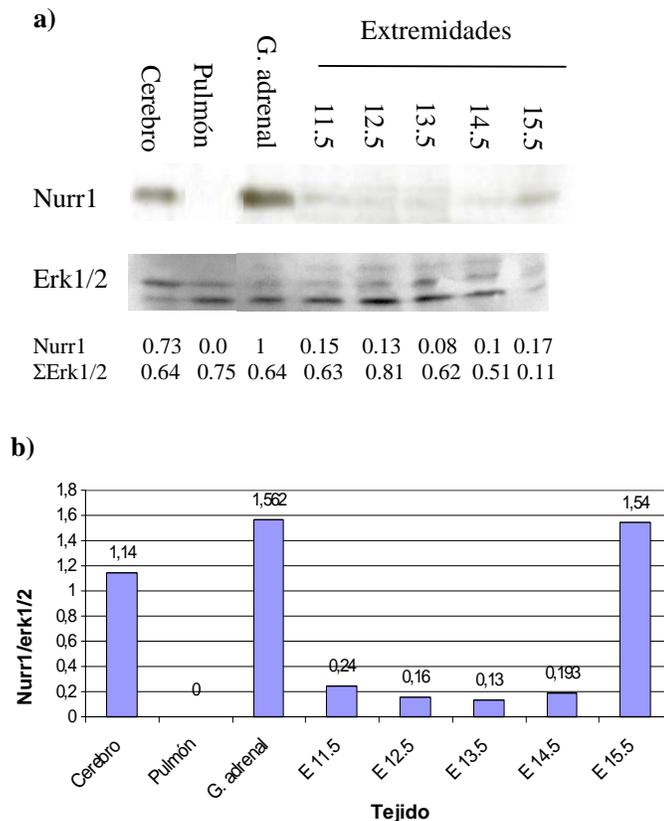


Figura 20. Niveles muy bajos de Nurr1 en diferentes estadios de las extremidades de embrión de ratón. a) Nurr1 es la proteína que presenta los niveles más bajos con respecto de Nur77 y Nor-1. Los tejidos control se tomaron del adulto. El pulmón se usó como control negativo, mientras que el cerebro y glándula adrenal se tomaron como controles positivos. Erk1/2 han sido utilizados como controles de carga. En el gel, los números inferiores denotan la intensidad de las bandas (para Erk1/2 se sumó la intensidad de ambas bandas). b) Relación de los valores de la intensidad de Nurr1 con respecto a Erk 1/2.

Tabla 5. Intensidad de la banda de Nurr1 en extremidades de diferentes etapas embrionarias.

Intensidad	Cerebro	Pulmón	Adrenal	E 11.5	E 12.5	E 13.5	E 14.5	E 15.5
Nurr1	0.73	0.002	1	0.15	0.13	0.08	0.1	0.17
Erk 1	0.38	0.33	0.25	0.16	0.19	0.17	0.13	0.05
Erk 2	0.26	0.44	0.39	0.47	0.62	0.45	0.38	0.06

Finalmente la proteína Nor-1, que es el tercer miembro de la subfamilia NR4A, como mencionamos anteriormente también se encuentra en las extremidades de las diferentes etapas del desarrollo analizadas (**Fig. 21**). Con los datos obtenidos no se distinguen diferencias significativas en los niveles de expresión de Nor-1 entre las diferentes etapas embrionarias, aunque parece haber una tendencia a aumentar la expresión de Nor-1 en la etapa 11.5 (**Fig. 21b**). En los controles (cerebro, pulmón y glándula adrenal) no se pudo detectar ninguna proteína probablemente por degradación de ésta.

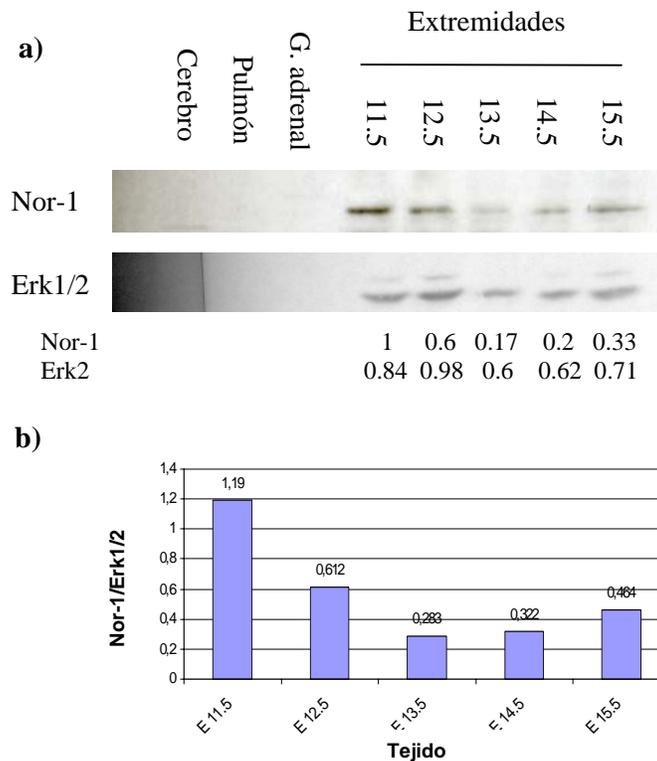


Figura 21. Expresión de Nor-1 en los diferentes estadios de las extremidades de embrión de ratón. Nor-1 al igual que los otros dos miembros de la subfamilia NR4A, se presenta en los extractos de las extremidades de embriones de ratón en las diferentes etapas analizadas. Erk1/2 se utilizaron como controles de carga. a) Los números inferiores muestran la intensidad de las bandas (se sumó la intensidad de las bandas de Erk1/2). b) Relación de los valores de la intensidad de Nor-1 con respecto a Erk 1/2.

Tabla 6. Intensidad de la banda de Nor-1 en las extremidades de diferentes etapas embrionarias.

Intensidad	E 11.5	E 12.5	E 13.5	E 14.5	E 15.5
Nor-1	1	0.6	0.17	0.2	0.33
Erk 1	0.14	0.16	0.08	0.078	0.11
Erk 2	0.7	0.82	0.52	0.55	0.6

Una vez que detectamos la presencia de los tres miembros de la subfamilia NR4A en las extremidades embrionarias; procedimos a determinar si el patrón de expresión de los miembros de la subfamilia coincide con las zonas interdigitales. Se realizaron pruebas de inmunofluorescencia en criocortes de extremidades de embriones de ratón a los 13.5 días, ya que es la etapa en la que hay mayor muerte interdigital. Primero, con el fin de estandarizar la técnica y para verificar que el anticuerpo contra Nur77 se pudiese utilizar con esta técnica, hicimos criocortes del cerebro de ratón adulto, pues en este tejido está confirmada la presencia de Nur77 (Zetterstrom et al., 1996). En estos criocortes utilizamos como control positivo, el anticuerpo (ya probado para esta técnica) contra NeuN, el cual es una proteína específica de neuronas que se detecta nuclearmente y se puede observar en la mayoría de las neuronas. Para contrateñir se usó Dapi en todos los criocortes analizados, éste tiñe núcleos y nos da una orientación de la ubicación del tejido. En la figura 22 podemos observar que al añadir el anticuerpo primario se detectó fluorescencia contra NeuN y cuando no colocamos el anticuerpo primario no se detectó ninguna fluorescencia. Lo cual nos indica que el anticuerpo primario está detectando a la proteína NeuN y que el anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario en forma específica.

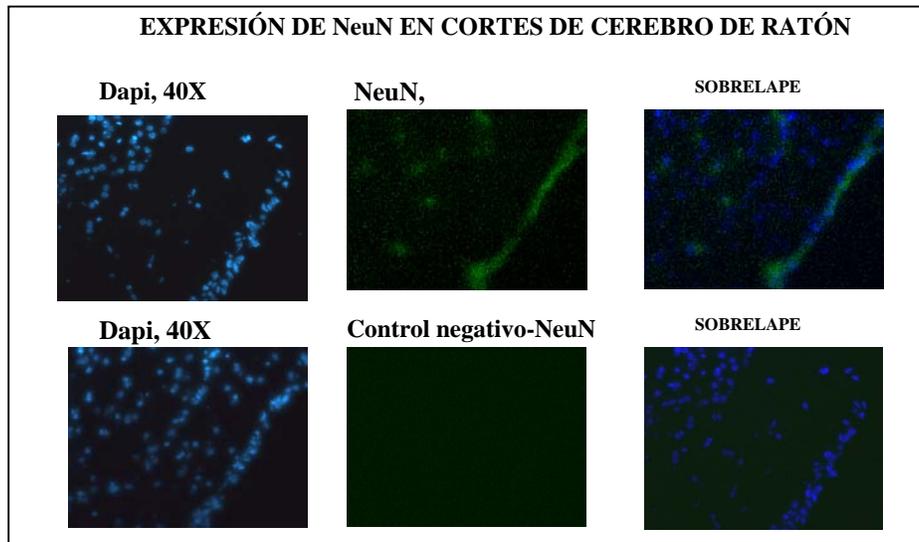


Figura 22. NeuN como control positivo en el cerebro del ratón adulto. Inmunofluorescencia contra NeuN, en cerebro del ratón adulto (arriba) y su respectivo control negativo (abajo). En azul se detectan los núcleos y la señal verde es NeuN.

Al mismo tiempo realizamos la detección de Nur77 en el cerebro adulto (**Fig. 23**), de lo cual se observó señal positiva solo cuando se incubó con anticuerpo primario contra Nur77.

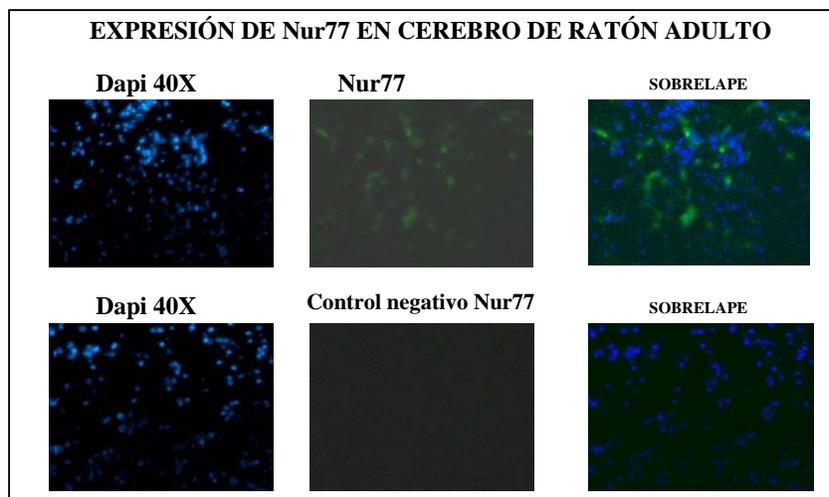


Figura 23. Nur77 se puede detectar en el cerebro de ratón adulto. De azul se tiñen los núcleos y Nur77 solo se detecta cuando se coloca anticuerpo primario (arriba) a diferencia del control negativo (abajo) que no tiene anticuerpo primario.

Después, con la finalidad de determinar si el mismo procedimiento de la inmunofluorescencia con que se detectaron NeuN y Nur77 en el cerebro iba a funcionar en los criocortes obtenidos de las extremidades del embrión de ratón, realizamos una inmunofluorescencia contra actina, una proteína constitutiva en las extremidades del

embrión de ratón. Ésta es una proteína que forma parte del citoesqueleto. Actina fue fácilmente detectada al adicionarle anticuerpo primario a los criocortes de las extremidades, mientras que en ausencia del anticuerpo contra actina no se pudo detectar señal alguna (**Fig. 24**).

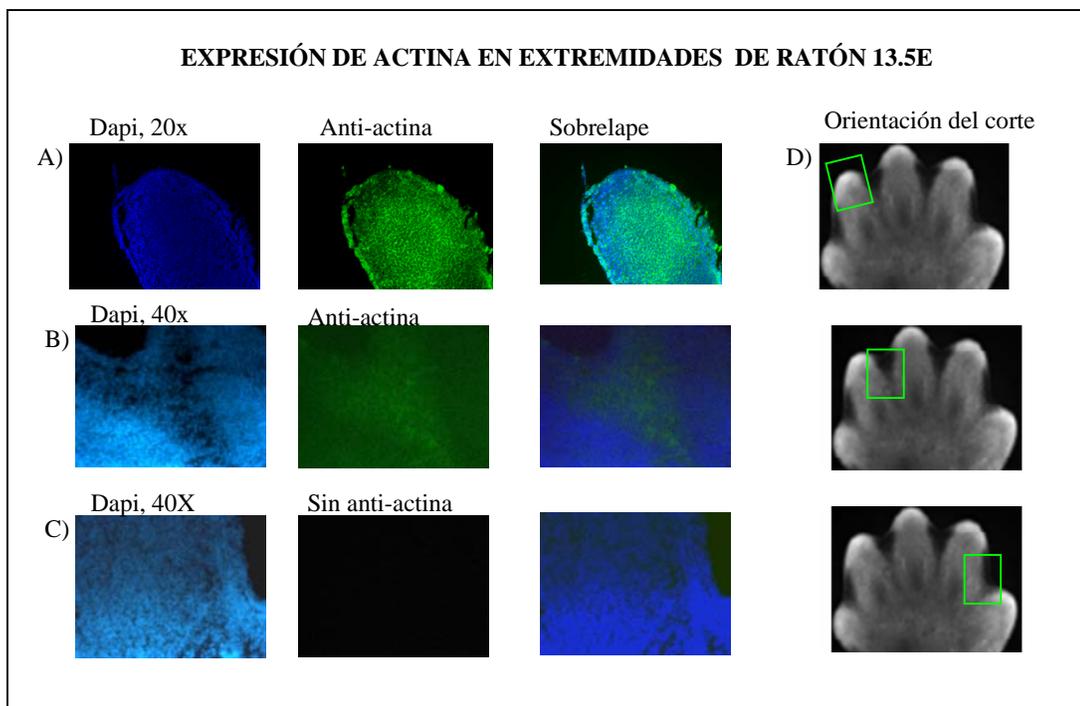


Figura 24. Señal de actina detectada en las extremidades del embrión de ratón de 13.5 días. Los núcleos están teñidos de azul y a diferencia del control negativo (que no tiene anticuerpo primario) se puede observar claramente la señal verde fluorescente marcando a la actina en los criocortes de las extremidades cuando se emplea el anticuerpo primario. En A se muestra una fotografía de la inmunofluorescencia contra actina, tomada con el objetivo microscópico 20x; mientras que en B y C se muestran las fotografías tanto de la inmunofluorescencia contra actina así como del control negativo, tomadas con el objetivo 40x. En D se delimita con el recuadro verde las áreas visualizadas en las inmunofluorescencias.

Por último realizamos las inmunofluorescencias contra Nur77, Nurr1 y Nor-1 en las extremidades de los embriones de ratón de 13.5 días de gestación. Las tres proteínas se detectaron en las extremidades del embrión de ratón (**Fig. 25**). Sin embargo, en los tres casos, la señal no se delimita a zonas interdigitales. De hecho, se detecta una mayor

fluorescencia de Nur77 en el dígito que en el interdígito. Mientras que Nor-1 parece detectarse homogéneamente tanto en el dígito como en el interdígito. En la fluorescencia contra Nurr1 si se aprecia un aumento de señal, sin mostrar diferencias significativas, en el interdígito con respecto al resto de la extremidad.

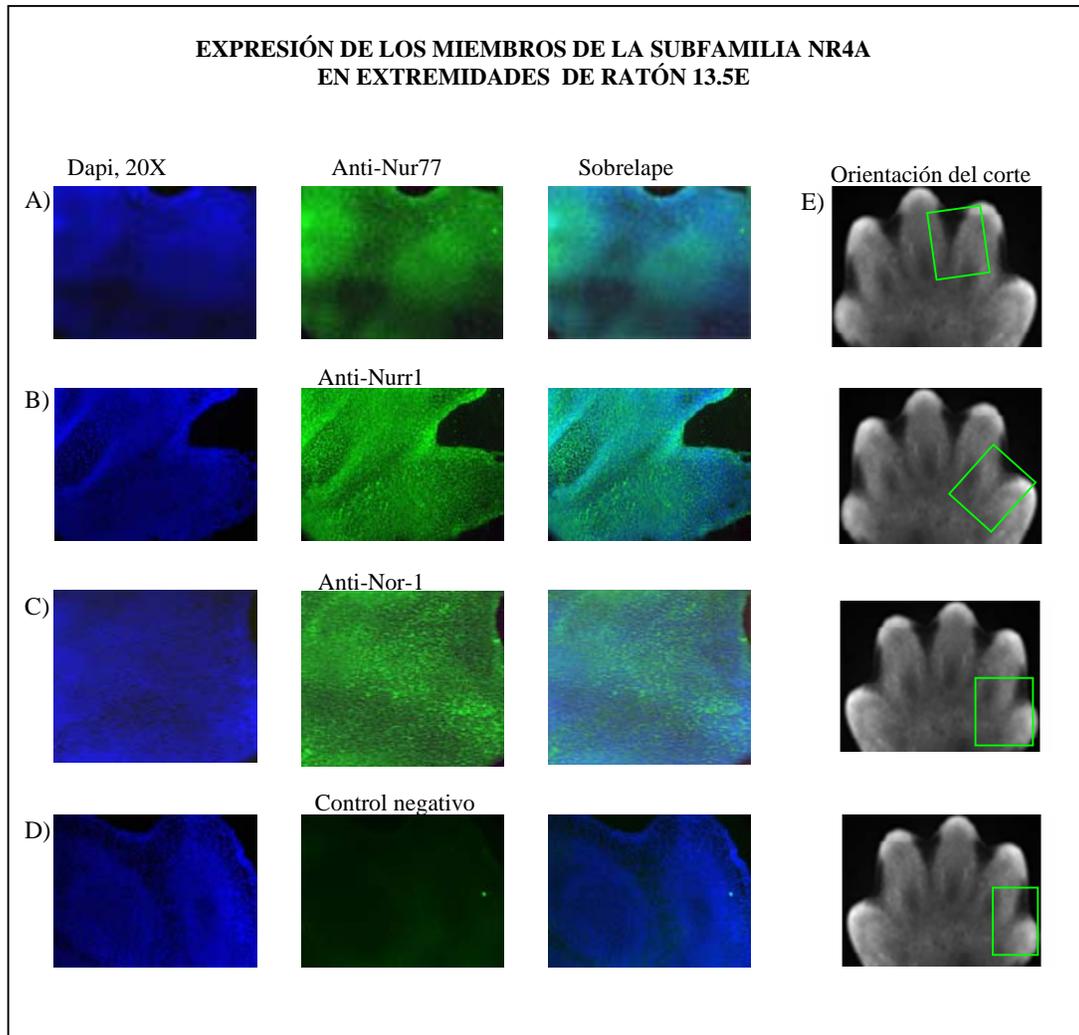


Figura 25. Detección de los miembros de la subfamilia NR4A en las extremidades del embrión de ratón a los 13.5 días de gestación. La señal verde fluorescente nos indica la señal de los miembros de la subfamilia NR4A. En A podemos observar la señal emitida para Nur77, la cual se distingue poco en el interdígito; en B mostramos la señal contra Nurr1, que como podemos ver es la que mejor se distingue a comparación de los otros miembros de la subfamilia NR4A; en C observamos la señal contra Nor-1. En el control negativo, que se muestra en D, se detectó una mínima señal a pesar de no tener anticuerpo primario. En E se muestra la parte de la extremidad (remarcada con los cuadros verdes) que se observa en las inmunofluorescencias de A-D.

Por otra parte, participé en el desarrollo de las construcciones que servirán para generar el ratón transgénico con la mutante dominante negativa de Nur77. Como mencionamos en la sección de métodos, se pretenden realizar dos construcciones finales, CMVCBA-rtTA-IRES-LacZ y pTRE- Δ 152Nur77-GFP. De la construcción CMVCBA-rtTA-IRES-LacZ se logró realizar el cambio de promotor en el plásmido pUHrT 62-1. Es decir, se sacó el promotor CMV del vector pUHrT 62-1 con las enzimas de restricción XhoI y EcoRI y en esos mismos sitios se dirigió la inserción del promotor constitutivo CMVCBA, que también se obtuvo a partir de la digestión con XhoI y EcoRI, del plásmido pKS-CMVCBA. Este cambio de promotor es requerido para poder expresar posteriormente la construcción CMVCBA-rtTA-IRES-LacZ en células ES. El plásmido resultante sólo se verificó por análisis de restricción. El patrón de bandas obtenidas coincidió con el patrón de bandas esperadas. Con las enzimas XhoI y EcoRI, se obtuvo una banda de 1725pb y otra de 3428pb, mientras que, con la enzima ApaI se obtuvo una banda de 1014pb y otra de 4139pb (**Fig. 26**).

Los patrones de digestión de la subclonación pUHrT 62-1-CMVCBA se muestran en la figura 27. Para realizar estas digestiones, primero se transformó la ligación pUHrT 62-1/CMVCBA en bacterias DH5 α , de las cuales posteriormente se extrajo el plásmido de diferentes colonias y en 8 de 10 colonias, se verificó que la ligación se llevó a cabo correctamente.

Habiendo obtenido el plásmido con la secuencia CMVCBA-rtTA, éste se amplificó a gran escala para contar con la cantidad suficiente y poder realizar las posteriores subclonaciones.

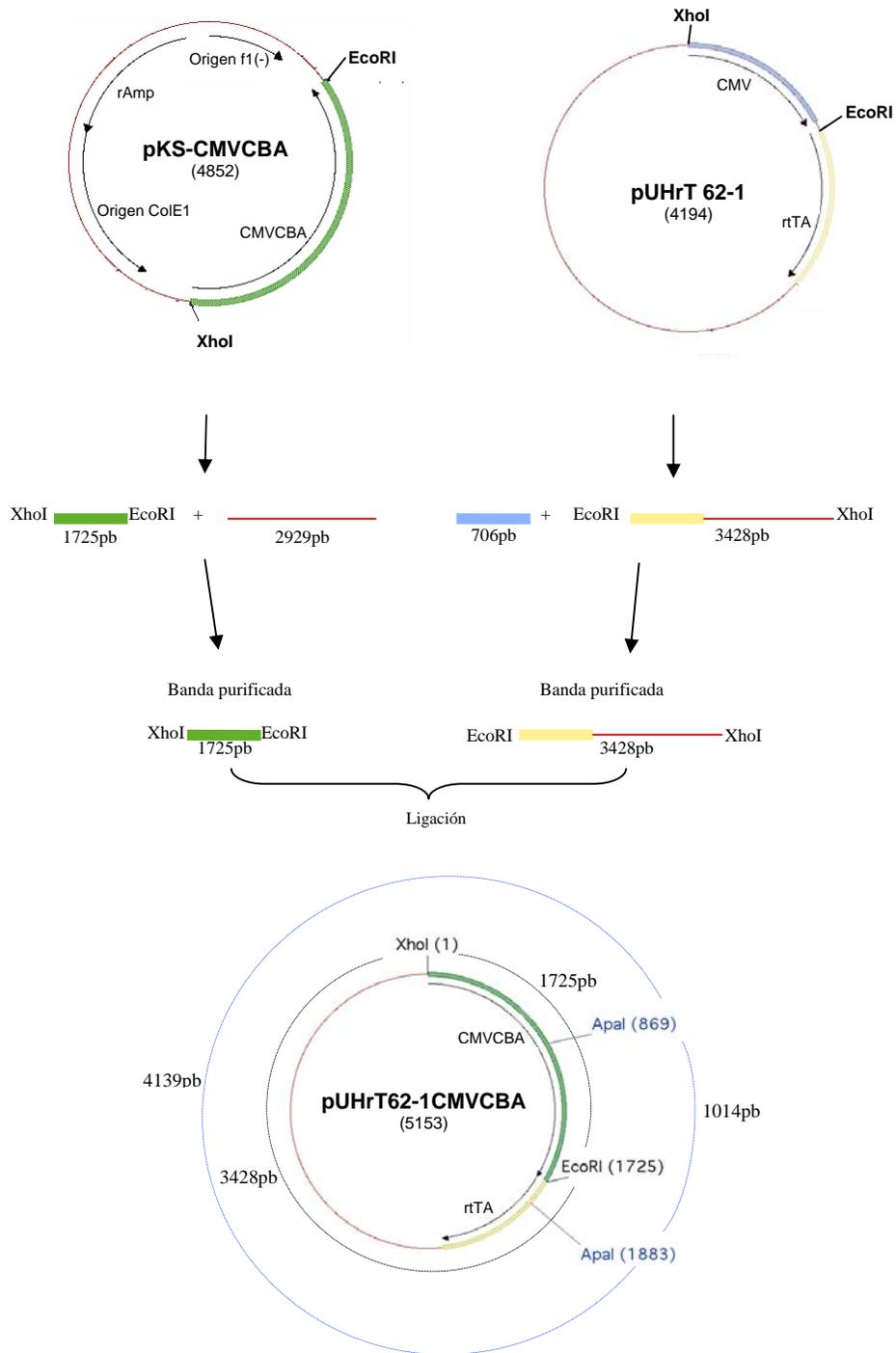


Figura 26. Construcción del plásmido pUHR62-1-CMVCBA. Por medio de digestiones y ligaciones se obtuvo el plásmido que contiene el promotor constitutivo CMVCBA seguido por la secuencia del transactivador.

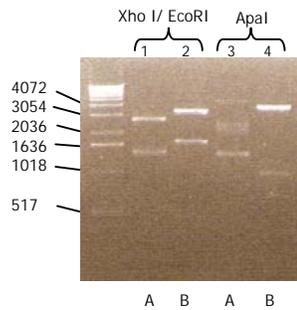


Figura 27. Gel representativo de las digestiones del plásmido pUhrT 62-1/CMVCBA. Las digestiones se realizaron en plásmidos obtenidos de diferentes colonias, los carriles 1 y 3 contienen plásmido de la misma colonia (A) y carriles 2 y 4 son plásmido de otra colonia (B). En los carriles 1 y 2 se observa el plásmido digerido con XhoI y EcoRI. En los carriles 3 y 4 se muestra la digestión con ApaI.

En cuanto a la construcción pTRE- Δ 152Nur77GFP, originalmente contamos con dos plásmidos, uno contiene la dominante negativa unida a la GFP (pGFP-N2) y el otro (pUHD 10-3) contiene al promotor responsivo a tetraciclina. Este promotor consta de un promotor mínimo CMV, además debería tener 7 copias del operador, que consta de 42pb cada copia en el elemento responsivo a tetraciclina, dando un tamaño total de 450pb. Sin embargo al extraer este promotor del plásmido pUHD10-3, se observó una banda aproximada de 260pb. Los patrones de restricción en el resto del plásmido si coincidieron con lo descrito en los mapas, razón por la cual se decidió secuenciar el promotor. Para poder secuenciarlo, lo subclonamos en el vector comercial pKS(+) (**Fig. 28**) ya que este cuenta con los sitios de reconocimiento para la polimerasa T7 y T3. La subclonación fue verificada por patrones de restricción como se muestra en la figura 30. De la secuencia obtenida probamos que el promotor pTRE obtenido del plásmido pUHD 10-3, solo tiene tres repeticiones del operador del promotor y no siete como se indica en el mapa. Lo cual explica el tamaño de aproximadamente 260pb obtenido en las digestiones.

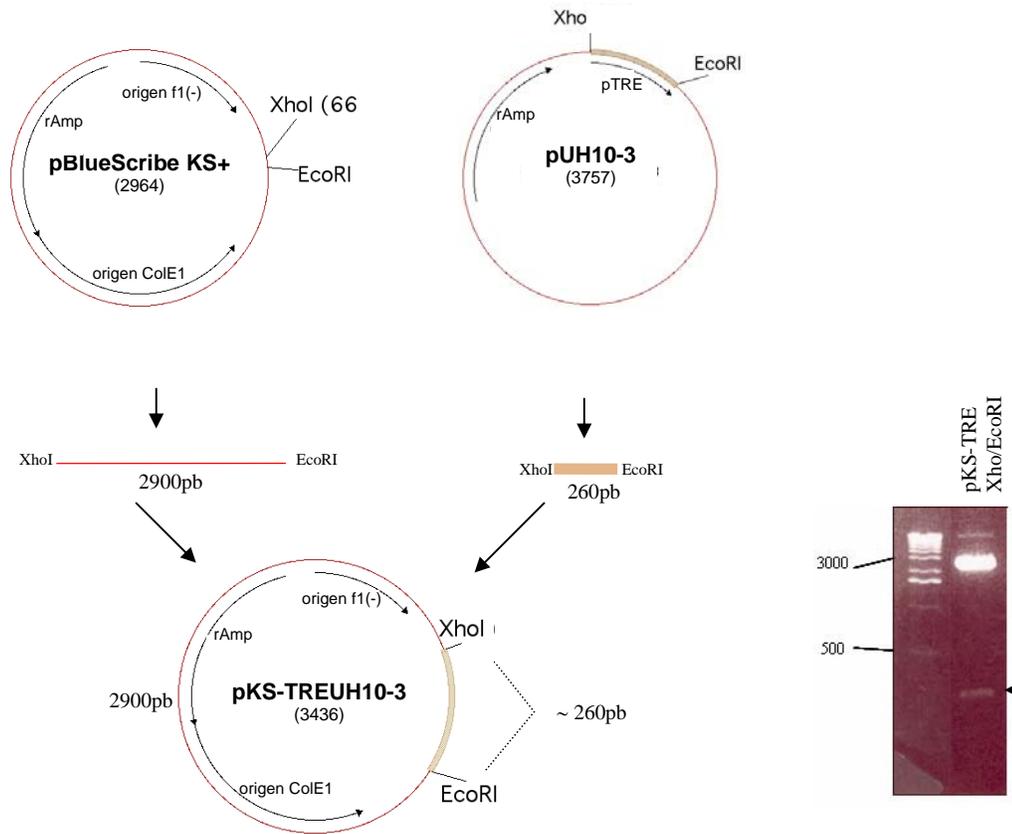


Figura 28. Subclonación del promotor pTRE en pKS. La subclonación del promotor se realizó a partir de las digestiones, tanto del vector como del inserto, con las enzimas XhoI y EcoRI. En el gel se muestra la verificación de la subclonación a partir de la digestión con las enzimas XhoI y EcoRI.

8. DISCUSIÓN

Con base en los antecedentes donde se ha relacionado a Nur77 con la muerte celular tanto apoptótica como vesicular; optamos por analizar la expresión de este receptor en las extremidades del embrión de ratón. Se tomaron estas estructuras embrionarias como modelo de estudio debido a que es un modelo donde se ha reportado que ocurre tanto muerte apoptótica como muerte con características no apoptóticas en la zona interdigital. Mediante análisis de western blot se analizaron las extremidades de diferentes etapas embrionarias (11.5-15.5 días de gestación), dentro de las cuales se encuentran las etapas donde se lleva a cabo el proceso de individualización de los dígitos. Pese a que detectamos la expresión proteica de Nur77 en todas las etapas embrionarias analizadas, necesitamos ajustar la técnica y obtener más replicas de cada resultado para hacer comparaciones cuantitativas y no solo cualitativas.

Nur77 forma parte de una subfamilia de receptores nucleares huérfanos que están relacionados principalmente por su alta homología en el dominio de unión a DNA. Se han reportado diversos ejemplos donde se propone una función redundante entre los tres miembros, Nur77, Nurr1 y Nor-1 de esta subfamilia NR4A. Por ejemplo la sobreexpresión de una dominante negativa de Nur77 que actúa sobre los tres miembros de la subfamilia, puede inhibir la apoptosis en timocitos y células T (Liu et al., 1994; Cheng et al., 1997). Los ratones deficientes en Nur77 aparentemente no exhiben cambios fenotípicos (Lee et al., 1995), lo cual sugiere la existencia de proteínas redundantes con una función similar a la de Nur77. Nor-1 también es regulado durante la apoptosis de las células T (Cheng et al., 1997). Debido a esto, consideramos la idea de que no necesariamente fuera Nur77 el que se exprese en el interdígito, sino, alguno de los otros dos miembros, o de hecho, los tres miembros pudiesen expresarse en las extremidades del embrión. Nosostros encontramos, a partir de western blots, que los tres miembros de la subfamilia NR4A se presentan en las extremidades del embrión de ratón desde los 11.5 hasta los 15.5 días de gestación, lo cual podría sugerirnos la colocalización y una posible función redundante de estos miembros de la familia NR4A. Como los tres receptores se detectan en etapas anteriores a la 13.5 (donde se da la mayor cantidad de muerte interdigital), nos permite especular que estos receptores podrían dirigir una señal temprana que desencadena la muerte celular en los interdígitos. O bien pueden participar en la morfogénesis durante las etapas tempranas del desarrollo

embrionario, lo que va de acuerdo con reportes previos de Young et al., (2003) y Ponnio et al., (2001). Para asegurar la participación temprana de estos receptores ya sea en la muerte interdigital o en la sobrevivencia de otras células de las extremidades embrionarias, sería de gran interés la manipulación molecular de estos receptores en las diferentes etapas del desarrollo donde sucede la muerte interdigital. Por ejemplo, podría inhibirse a estos receptores en etapas anteriores a los 13.5 días y observar el efecto que tenga esto sobre la muerte interdigital.

Por otra parte, la detección de los receptores en las últimas etapas embrionarias analizadas, nos permite contemplar la idea de que probablemente tienen una relación con la diferenciación celular en los dígitos, como ocurre en lo reportado por Hazle, donde Nur77 permite la diferenciación de células PC12 a células neuronales, en presencia de NGF (factor de crecimiento neuronal), (Hazle et al., 1991).

Con los análisis de western blot pudimos ver que los miembros de la subfamilia NR4A si se expresan en las extremidades del embrión de ratón. Sin embargo, estos experimentos no nos permiten determinar la localización de estos miembros en las extremidades. Por lo tanto, decidimos realizar pruebas de inmunofluorescencia en criocortes de las extremidades del embrión de ratón a los 13.5 días de gestación, con la finalidad de definir el patrón de expresión de cada miembro de la subfamilia NR4A en los interdígitos cuando está ocurriendo la mayor cantidad de muerte interdigital.

En cuanto a las inmunofluorescencias, en los cortes de cerebro de ratón adulto, tanto en la detección de NeuN como de Nur77 (**Fig. 20-21**) se esperaba nuclear, sin embargo, la señal fue principalmente extranuclear. Como Nur77 funciona como factor de transcripción, es probable que su localización extranuclear sea en respuesta a alguna señal de inhibición de Nur77 como factor de transcripción. Es decir, se ha probado que la actividad de Nur77 puede ser modulada por el tráfico intracelular, en el caso de las células PC12 el NGF dirige la translocación citoplásmica de Nur77 (Hazel et al., 1991) o cuando JNK fosforila a Nur77 también induce su translocación (Han et al., 2006).

A continuación, también con inmunofluorescencia, pudimos detectar a los tres miembros de la subfamilia NR4A a través de toda la extremidad del embrión de ratón a los 13.5 días. Como hemos mencionado, estos receptores son nucleares, pero pueden translocarse al citoplasma ya sea por una señal de diferenciación o de muerte celular (Hazle et al., 1991; Han et al., 2006). En nuestros resultados los tres miembros se detectaron extranuclearmente, lo cual se observó en todas las áreas de la extremidad, es decir, tanto en el interdígito como en el dígito.

Dado el patrón de expresión de estos receptores, cabe la posibilidad de que estén regulados a partir de su localización intracelular y podrían participando tanto la en diferenciación (en áreas digitales) como en la muerte (en áreas interdigitales) o bien podrían no ser funcionales.

9. CONCLUSIONES

- Logramos identificar la presencia de los miembros (Nur77, Nurr1 y Nor-1) de la subfamilia NR4A en las extremidades del embrión de ratón entre los 11.5 y 15.5 días de gestación.
- Los receptores nucleares de la subfamilia NR4A se localizan tanto en dígitos como en interdígitos.
- A nivel celular, los miembros de la subfamilia NR4A se localizan principalmente en el citoplasma.
- Conocemos el patrón de expresión de los miembros de la subfamilia NR4A en las extremidades del embrión de ratón, sin embargo, resta por conocer la actividad de cada uno.

10. PERSPECTIVAS

En cuanto a los análisis de inmunofluorescencia sugerimos detectar a los miembros de la subfamilia NR4A, en las diferentes etapas de muerte celular en los interdígitos, para determinar alguna correlación entre la muerte celular y estos receptores. Además, se pueden realizar ensayos, como TUNEL o tinciones con anaranjado de acridina, que nos permitan detectar las zonas de muerte en esos mismos interdígitos.

Con los resultados obtenidos no se puede aún descartar que algún miembro de la subfamilia NR4A participe en la muerte durante el desarrollo por lo cual podrían analizarse diferentes tejidos en desarrollo, que sufren un proceso de muerte celular tanto apoptótica como no apoptótica, como lo es el paladar.

Para facilitar las subclonaciones se podrían rediseñar nuevas estrategias, por ejemplo, en el caso de la secuencia IRES-LacZ no se pudo obtener por PCR, esto debido a la estructura tridimensional tan compleja de la secuencia IRES. Sin embargo, podría realizarse la subclonación por partes, es decir, podría obtenerse solo la secuencia IRES por digestión, subclonar este fragmento y la secuencia LacZ obtenerla por PCR para poder insertarla posteriormente. O bien, se podrían hacer subclonaciones en otros plásmidos con la finalidad de añadir los sitios compatibles entre el vector e inserto para posteriormente realizar la subclonación final donde se ligue fácilmente el inserto con el vector de interés.

12. APÉNDICE (Soluciones):

1. Western blot

Buffer de lisis

NaCl..... 100mM

Tris base pH 8.5..... 50mM

EDTA..... 1mM

NP-40..... 0.05%

Deoxicolato.....0.025%

Adicionar una pastilla de cocktail de inhibidores de proteasas por cada 10ml de solución.

Buffer de carga 5X

Para 9.5ml:

H₂O desionizada 3.55ml

Tris-HCl 0.5M, pH6.8 1.25ml

Glicerol 2.5ml

SDS 10% 2ml

Azul de bromofenol 0.5% . . 200µl

Almacenar a 4°C. Antes de usar añadir 50µl de 2-metamercaptoetanol (Bio-Rad #161-0710) a cada 950µl de buffer.

Buffer de corrida (Tris 25mM, pH8.3 + glicina 192mM + SDS 0.1%)

Para 1L:

Tris base 3.03g

Glicina 14.4g

SDS 1g

H₂O Hasta aforar a 1000ml

Buffer de transferencia (Tris 25mM, pH8.3 + glicina 192mM + SDS 0.1% + metanol 20%)

Para 1L:

Tris base 3.03g

Glicina 14.4g

SDS 1g

H₂O hasta aforar a 800ml
 Metanol 200ml de metanol

TBST (Tris-HCl 100mM, pH7.5 + NaCl 0.9% + Tween20 0.1%)

Para 1L:

Tris-HCl 1M, pH7.5 100ml

NaCl 9g

Tween20 1ml

H₂O hasta aforar a 1000ml

Preparación de 4 geles desnaturalizantes de poliacrilamida con gradiente del 10% al 15%:

	Gel separador del 10%	Gel separador del 15%	Gel concentrador (4%)	Solución tampón
Archilamida/Bis (30% T, 2.67% C)	8ml	12ml	1.04ml	-
Buffer*	6ml	6ml	2ml	5ml
SDS 10%	240µl	240µl	80µl	100µl
Sacarosa	-	3.5g	-	10g
Persulfato de amonio 10%	120µl	120µl	40µl	-
TEMED	12µl	12µl	4µl	-
Agua	cbp 24ml	Cbp 24ml	cbp 8ml	cbp 20ml
Volumen total	24ml	24ml	8ml	20ml

* Gel separador y solución tampón: Tris-HCl 1.5M, pH 8.8. Gel concentrador: Tris-HCl 0.5M, pH 6.8.

cbp: cuanto baste para.

- Colocar la solución tampón en una jeringa e insertarla en la válvula de tres direcciones que conecta a la cámara para hacer el gradiente con la cámara marca Höefer.
- Preparar las soluciones para los geles.
- Colocar la cámara para hacer gradiente en una placa magnética, agregar la solución de menor concentración junto con un agitador magnético

en el compartimiento derecho, y la solución de mayor concentración al compartimiento izquierdo.

- Abrir la válvula interna de la cámara para empezar a mezclar las soluciones, posteriormente se abre la válvula externa ligeramente para llenar la cámara Höefer.
- Cerrar la válvula antes de que se formen burbujas y llenar la parte inferior de la cámara con la solución tapón, en la parte superior se coloca un poco de isopropanol con el único objeto de emparejar los geles.
- Dejar reposar hasta que polimeriza la acrilamida.
- Quitar el isopropanol, agregar la solución del gel concentrador por la parte superior y colocar los peines. Dejar polimerizar, (los geles se pueden almacenar en una cámara húmeda a 4°C hasta por un mes).

2. Inmunofluorescencia

Paraformaldehido (PFA) al 4%

(Utilizar guantes, cubrebocas y trabajar en campana)

Para 100ml:

Paraformaldehido . . . 4g

H₂O bidestilada 50ml

- Para disolver, calentar a 60-70°C y añadir 100µl de NaOH 10N. Dejar enfriar.
- Adicionar 50ml de PBS 2X.
- Ajustar pH a 7.2 con HCl.
- Aforar con H₂O y filtrar con membrana de 0.22µm. Almacenar a -20°C.

PBS 1X (Buffer salino de fosfatos)

Para 1L:

NaCl 8g

KCl 0.2g

Na₂HPO₄ 1.44g

KH₂PO₄ 0.24g

H₂O hasta aforar a 1000ml

Esteriliza

Solución de montaje (Glicerol/ buffer de fosfatos)

Para 10ml:

Glicerol 5ml

NaHCO₃ 0.1M, pH9.0 5ml

3. Electrocompetentes

SOC

Para 100ml:

Bacto-triptona 2g

Extracto de levadura 0.5g

NaCl 50mg

KCl 250mM 1ml

H₂O hasta aforar a 100ml

Ajustar a pH7.0 con NaOH 5N ~ 20μl

Esterilizar en autoclave

Adicionar 2ml de glucosa 1M filtrada con membrana de 0.22μm

4. Purificación de plásmido

LB (Medio Luria-Bertani)

Para 1L:

Bacto-triptona 1g

Extracto de levadura . . . 0.5g

H₂O Hasta aforar a 100ml

Ajustar a pH7.0 con NaOH 5N ~ 0.2ml

Esterilizar en autoclave

Solución P1

Glucosa 50mM

Tris base 25mM pH8.0

EDTA 10mM pH8.0

Solución P2

Para 5ml:

NaOH 10N 0.1ml
SDS 10% 0.5ml
H₂O 4.4ml

Solución P3

Para 100ml:

Acetato de potasio 5M 60ml
Ácido acético glacial 11.5ml
H₂O 28.5ml

5. Gel para ver DNA

TAE 50X

Para 100ml:

Tris-base 24.2g
Acido acético glacial 5.7ml
EDTA 0.5M, pH8.0 10ml
H₂O hasta aforar a 100ml

PCR. Preparación de muestras para PCR:

40µl de agua
5 µl de buffer 10X para la enzima Pfu
1 µl de primer 5' (10µM)
1 µl de primer 3' (10 µM)
1 µl de dNTP (10mM)
1 µl de templado linearizado (1ng/µl)
1 µl de enzima Pfu polimerasa

Primers utilizados:

pTRE·AseI (5'>3'): GCC ATT AAT CCT CGA GTT TAC CAC TCC C

pTRE·NheI (5'>3'): TAT GCT AGC GGA GGC TGG ATC GGT CC

pTRE·EcoRI (5'>3'): CTC GAA TTC GGG GCC GCG GAG GCT G

IRES (5'>3'): CAT AGA TCT GGT CGA TCG ACG GTA TCG

LacZ (5'>3'): CAT AGA TCT CTC GAG TCA GTG GAG CG

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B., J. A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002). Molecular Biology of de cell, galand Science.

Baehrecke, E. H. (2005). "Autophagy: dual roles in life and death?" Nat Rev Mol Cell Biol 6(6): 505-10.

Boya, P. and E. J. de la Rosa (2005). "Cell death in early neural life." Birth Defects Res C Embryo Today 75(4): 281-93.

Bras, A., J. P. Albar, et al. (2000). "Ceramide-induced cell death is independent of the Fas/Fas ligand pathway and is prevented by Nur77 overexpression in A20 B cells." Cell Death Differ 7(3): 262-71.

Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, CH., Frohwein, U. and Schulte-Hermann, R. (2000) Programmed Cell Death, Apoptosis, Autophagic PCD, or others? Annals New York Of sciences: 1-12.

Castro-Obregon, S., G. Del Rio, et al. (2002). "A ligand-receptor pair that triggers a non-apoptotic form of programmed cell death." Cell Death Differ 9(8): 807-17.

Castro-Obregon, S., R. V. Rao, et al. (2004). "Alternative, nonapoptotic programmed cell death: mediation by arrestin 2, ERK2, and Nur77." J Biol Chem 279(17): 17543-53.

Cell Signaling Technology, I. (2003). Apoptosis_Mitochondrial.eps, www.cellsignal.com.

Chang, D. W., Z. Xing, et al. (2002). "c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis." Embo J 21(14): 3704-14.

Chautan, M., G. Chazal, et al. (1999). "Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway." Curr Biol 9(17): 967-70.

Cheng, L. E., F. K. Chan, et al. (1997). "Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis." Embo J 16(8): 1865-75.

Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." Anat Embryol (Berl) 181(3): 195-213.

Coelho, C. N., L. Sumoy, et al. (1991). "Expression of the chicken homeobox-containing gene GHox-8 during embryonic chick limb development." Mech Dev 34(2-3): 143-54.

Danial, N. N. and S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." Cell 116(2): 205-19.

DeYoung, R. A., J. C. Baker, et al. (2003). "The orphan steroid receptor Nur77 family member Nor-1 is essential for early mouse embryogenesis." J Biol Chem 278(47): 47104-9.

Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." Curr Opin Cell Biol 16(6): 663-9.

Francis, P. H., M. K. Richardson, et al. (1994). "Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb." Development 120(1): 209-18.

Fukuda, T., H. Wang, et al. (1999). "Novel non-apoptotic morphological changes in neurons of the mouse hippocampus following transient hypoxic-ischemia." Neurosci Res 33(1): 49-55.

Gozuacik, D. and A. Kimchi (2004). "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism." Oncogene 23(16): 2891-906.

Han, Y. H., X. Cao, et al. (2006). "Regulation of Nur77 nuclear export by c-Jun N-terminal kinase and Akt." Oncogene 25(21): 2974-86.

Hazel, T. G., R. Misra, et al. (1991). "Nur77 is differentially modified in PC12 cells upon membrane depolarization and growth factor treatment." Mol Cell Biol 11(6): 3239-46.

Hazel, T. G., D. Nathans, et al. (1988). "A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A 85(22): 8444-8.

Honkaniemi, J. and F. R. Sharp (1999). "Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures." Eur J Neurosci 11(1): 10-7.

Hsu, H. C., T. Zhou, et al. (2004). "Nur77 family of nuclear hormone receptors." Curr Drug Targets Inflamm Allergy 3(4): 413-23.

Huang, C. and B. F. Hales (2002). "Role of caspases in murine limb bud cell death induced by 4-hydroperoxycyclophosphamide, an activated analog of cyclophosphamide." Teratology 66(6): 288-99.

Ikegami, K. and T. Koike (2003). "Non-apoptotic neurite degeneration in apoptotic neuronal death: pivotal role of mitochondrial function in neurites." Neuroscience 122(3): 617-26.

Ilvesmaki, V., J. Liu, et al. (1998). "Expression of insulin-like growth factor binding protein 1-6 genes in adrenocortical tumors and pheochromocytomas." Horm Metab Res 30(10): 619-23.

Kaufmann, S. H. and M. O. Hengartner (2001). "Programmed cell death: alive and well in the new millennium." Trends Cell Biol 11(12): 526-34.

Ke, N., G. Claassen, et al. (2004). "Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis." Cancer Res 64(22): 8208-12.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer 26(4): 239-57.

Kiffin, R., C. Christian, et al. (2004). "Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress." Mol Biol Cell 15(11): 4829-40.

Kucharova, S. and R. Farkas (2002). "Hormone nuclear receptors and their ligands: role in programmed cell death (review)." Endocr Regul 36(1): 37-60.

Lawen, A. (2003). "Apoptosis-an introduction." Bioessays 25(9): 888-96.

Lee, S. L., R. L. Wesselschmidt, et al. (1995). "Unimpaired thymic and peripheral T cell death in mice lacking the nuclear receptor NGFI-B (Nur77)." Science 269(5223): 532-5.

Levine, B. and D. J. Klionsky (2004). "Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy." Dev Cell 6(4): 463-77.

Levine, B. and J. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" J Clin Invest 115(10): 2679-88.

Li, H., S. K. Kolluri, et al. (2000). "Cytochrome c release and apoptosis induced by mitochondrial targeting of nuclear orphan receptor TR3." Science 289(5482): 1159-64.

Li, Y., B. Lin, et al. (1998). "Molecular determinants of AHPN (CD437)-induced growth arrest and apoptosis in human lung cancer cell lines." Mol Cell Biol 18(8): 4719-31.

Lin, B., S. K. Kolluri, et al. (2004). "Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3." Cell 116(4): 527-40.

Liu, Z. G., S. W. Smith, et al. (1994). "Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77." Nature 367(6460): 281-4.

Maheux, J., I. Ethier, et al. (2005). "Induction patterns of transcription factors of the nur family (nurr1, nur77, and nor-1) by typical and atypical antipsychotics in the mouse brain: implication for their mechanism of action." J Pharmacol Exp Ther 313(1): 460-73.

Maira, M., C. Martens, et al. (2003). "Dimer-specific potentiation of NGFI-B (Nur77) transcriptional activity by the protein kinase A pathway and AF-1-dependent coactivator recruitment." Mol Cell Biol 23(3): 763-76.

Mendelsohn, C., E. Ruberte, et al. (1992). "Retinoid receptors in vertebrate limb development." Dev Biol 152(1): 50-61.

Mirkes, P. E., S. A. Little, et al. (2001). "Co-localization of active caspase-3 and DNA fragmentation (TUNEL) in normal and hyperthermia-induced abnormal mouse development." Teratology 63(3): 134-43.

Mizushima, N. (2005). "The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide." Cell Death Differ 12 Suppl 2: 1535-41.

Novac, N. and T. Heinzl (2004). "Nuclear receptors: overview and classification." Curr Drug Targets Inflamm Allergy 3(4): 335-46.

Oppenheim, R. W., R. A. Flavell, et al. (2001). "Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases." J Neurosci 21(13): 4752-60.

Ponno, T., Q. Burton, et al. (2002). "The nuclear receptor Nor-1 is essential for proliferation of the semicircular canals of the mouse inner ear." Mol Cell Biol 22(3): 935-45.

Proskuryakov, S. Y., A. G. Konoplyannikov, et al. (2003). "Necrosis: a specific form of

programmed cell death?" Exp Cell Res 283(1): 1-16.

Quartara, L. and C. A. Maggi (1997). "The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation." Neuropeptides 31(6): 537-63.

Raymond A., S. a. C.-O. S. (2003). Cell Death. Encyclopedia of Neurological Sciences: 542-545.

Reggiori, F. and D. J. Klionsky (2002). "Autophagy in the eukaryotic cell." Eukaryot Cell 1(1): 11-21.

Salas-Vidal, E., H. Lomeli, et al. (1998). "Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death." Exp Cell Res 238(1): 136-47.

Salas-Vidal, E., C. Valencia, et al. (2001). "Differential tissue growth and patterns of cell death in mouse limb autopod morphogenesis." Dev Dyn 220(4): 295-306.

Samali, A., B. Zhivotovsky, et al. (1999). "Apoptosis: cell death defined by caspase activation." Cell Death Differ 6(6): 495-6.

Saunders, J. W., Jr. (1966). "Death in embryonic systems." Science 154(749): 604-12.

Shimizu, S., T. Kanaseki, et al. (2004). "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes." Nat Cell Biol 6(12): 1221-8.

Slagsvold, H. H., A. C. Ostvold, et al. (2002). "Nuclear receptor and apoptosis initiator NGFI-B is a substrate for kinase ERK2." Biochem Biophys Res Commun 291(5): 1146-50.

Sperandio, S., I. de Belle, et al. (2000). "An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death." Proc Natl Acad Sci U S A 97(26): 14376-81.

Steller, H. (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide." Science 267(5203): 1445-9.

Suzuki, S., N. Suzuki, et al. (2003). "Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling." Proc Natl Acad Sci U S A 100(14): 8276-80.

Turmaine, M., A. Raza, et al. (2000). "Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease." Proc Natl Acad Sci U S A 97(14): 8093-7.

Uemura, H. and C. Chang (1998). "Antisense TR3 orphan receptor can increase prostate cancer cell viability with etoposide treatment." Endocrinology 139(5): 2329-34.

Walton, M., B. Connor, et al. (1999). "Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage." Brain Res Brain Res Rev 29(2-3): 137-68.

Wang, X. S., K. Diener, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase." J Biol Chem 271(49): 31607-11.

Wansa, K. D., J. M. Harris, et al. (2002). "The activation function-1 domain of Nur77/NR4A1 mediates trans-activation, cell specificity, and coactivator recruitment." J Biol Chem 277(36): 33001-11.

West, T., M. Atzeva, et al. (2006). "Caspase-3 deficiency during development increases

vulnerability to hypoxic-ischemic injury through caspase-3-independent pathways." Neurobiol Dis 22(3): 523-37.

Wingate, A. D., D. G. Campbell, et al. (2006). "Nur77 is phosphorylated in cells by RSK in response to mitogenic stimulation." Biochem J 393(Pt 3): 715-24.

Winoto, A. and D. R. Littman (2002). "Nuclear hormone receptors in T lymphocytes." Cell 109 Suppl: S57-66.

Yang, X., R. Khosravi-Far, et al. (1997). "Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis." Cell 89(7): 1067-76.

Yoshimori, T. (2004). "Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells." Biochem Biophys Res Commun 313(2): 453-8.

Zetterstrom, R. H., L. Solomin, et al. (1997). "Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice." Science 276(5310): 248-50.

Zetterstrom, R. H., L. Solomin, et al. (1996). "Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1." Mol Endocrinol 10(12): 1656-66.

Zuzarte-Luis, V., M. T. Berciano, et al. (2006). "Caspase redundancy and release of mitochondrial apoptotic factors characterize interdigital apoptosis." Apoptosis 11(5): 701-15.

Zuzarte-Luis, V. and J. M. Hurlle (2002). "Programmed cell death in the developing limb." Int J Dev Biol 46: 871-876.

Zuzarte-Luis, V. and J. M. Hurlle (2005). "Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb." Semin Cell Dev Biol 16(2): 261-9.

Zuzarte-Luis, V., J. A. Montero, et al. (2006). "Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death." Dev Biol.

Zuzarte-Luis, V., J. A. Montero, et al. (2004). "A new role for BMP5 during limb development acting through the synergic activation of Smad and MAPK pathways." Dev Biol 272(1): 39-52.