

Tesis de Posgrado

Regulación de la expresión del gen de la fibronectina en células de la granulosa bovina

Bernath, Viviana A.

1991

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bernath, Viviana A.. (1991). Regulación de la expresión del gen de la fibronectina en células de la granulosa bovina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2445_Bernath.pdf

Cita tipo Chicago:

Bernath, Viviana A.. "Regulación de la expresión del gen de la fibronectina en células de la granulosa bovina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2445_Bernath.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA FIBRONECTINA EN
CELULAS DE LA GRANULOSA BOVINA**

Autor : Viviana A. Bernath

Director : Dr. Alberto Kornblihtt

Lugar de trabajo :

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR - INGEBI

*Tesis.
2415*

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

1991

*a Ariel
a Sebastián
a mi padre
a la memoria de mi madre*

Quiero agradecer:

Al Dr. Alberto Kornblihtt porque como jefe me enseñó a trabajar, a pensar, me apoyó y estimuló en el trabajo cotidiano, me transmitió su gran pasión por la ciencia, y porque como persona estuvo cerca, como un verdadero amigo, tanto en los buenos como en los malos momentos de todos estos años.

Al Dr. Lino Barañao porque es una gran persona y un gran científico. Fue muy enriquecedor, tanto desde lo humano como desde lo científico trabajar junto a él.

A Anabella Srebrow, por todos los resultados, las contaminaciones y el gran cariño compartido.

A Andrés Muro, porque no solamente fue un gran compañero de trabajo desde el primer día, sino también porque en muchos momentos supo ser un buen amigo.

A Gustavo por el poco pero tan lindo tiempo que compartimos desde que se incorporó al grupo FN.

Al Dr. Héctor N. Torres porque un día se le ocurrió que en la Argentina también se podía hacer Biología Molecular y fundó el INGEBI.

A los Dres. Mirtha M. Flawiá, María Teresa Tellez de Iñón, Alejandro Mentaberry, Mariano Levin, Alejandro Paladini y Luis Jimenez de Asúa, porque todos ellos en algún momento y de diferentes maneras, colaboraron con este trabajo.

Al Dr. Gerardo Glikin porque fue muy lindo compartir el Laboratorio con él.

A todos los becarios del INGEBI; especialmente a: Pablo Rabinowicz, Alejandro Schijman, Patricia Levy Yeyati, Gabriela Levitus, Rita Ulloa, Nora Paños, Fernando Bravo, Laura Moratinos, Sonia Lafon, Horacio Martinetto, María Laura Gomez, Omar Coso, Silvia Cabral, y Claudia Ochatt, y también a los más nuevos: Ximena Ares, Dan Kaplan, Martín Vazquez, Nelson Duseti, Alfredo Panebra, Florencia Rodriguez, Sandra Oguetta, Marisa Farber, Alberto Díaz, Diego Fraldenraich y Pablo Zaltz porque son lo más importante de este INSTITUTO.

A Betina Orman, Roxana Celnik, y Jorge Muschietti por todos los "cafés" de mesa y de pasillos compartidos.

A Mercedes Goin y Alvaro Estevez por las "largas charlas" y consejos en la campana de cultivo.

A los que durante los primeros años me ayudaron TANTAS veces: Daniel Altschuler, Javier Cáceres, Guillermo Taccioli, Ricardo Attar, Eric Grotewold y hoy están TAN lejos.

A la Sra María Julia Alvarez, la Sra. Leonor Acevedo, Tito Contreras, Gabriel Paissan, Irma Gelmi, Luis Acosta, Lidia Parodi, Mariano Rodriguez, Norbero Malarini, Marta Garibaldi, porque sin ellos este instituto no funcionaría.

A Adriana Urman porque es mucho más que una secretaria.

A la gente del IByME: Patricia Saragüeta, Miky Bley, Silvia Lugo, Alejandro Colman Lerner y Liliana Dain.

Al Dr. Jorge Tezon porque tantas veces me permitió usar sus drogas y equipos.

A Quique, Vale, Martín, Claudia, Facundo, Rodrigo, Ruthy, Jorge, Dany, Gaby, Myry, Hernán, Betty, David, Mauricio, Esmeralda y Alejandro porque son MI FAMILIA.

A Silvia Tützer, Claudia Oszlak, Carlos Fradkin y Daniel Cholakian por ser tan amigos.

A Mariana Herrera por lo cerca que estuvo en todo momento durante estos años.

A mi padre y a mi madre, que me estimularon y ayudaron incondicionalmente para poder llegar a este momento.

A Sebastián, mi hijo, porque día a día me llena de alegría.

A mi esposo Ariel que me acompañó con un gran amor durante todos estos años y que además me ayudó con toda su paciencia en la escritura de la tesis.

1.1.REGULACION DE LA EXPRESION GENICA.	1
1.1.1.REGULACION TRANSCRIPCIONAL EN ORGANISMOS EUCARIOTAS.	2
1.1.1.a.La iniciación de la transcripción. Factores.	3
1.1.1.b.Otros factores reguladores de la transcripción.	5
1.1.1.c.Los dominios de unión al DNA de los factores de transcripción.	6
1.1.1.c.I.Dominio de tipo "Dedo de Zinc".	6
1.1.1.c.II.Hom eo · Dom inio. Hélice · Vuelta · Hélice.	7
1.1.1.c.III. Dom inio de tipo "Cr em aller a de Leucinas"	8
1.1.1.c.IV. Otr as proteínas r egulador as.	10
1.1.1.d.La Familia Multigénica del Factor CREB, los Factores Activadores de la Transcripción conocidos como ATF,y otros Factores relacionados.	10
1.1.1.e.Regulación de la actividad transcripcional de los Factores por modificaciones postraduccionales de los mismos.	11
1.1.1.f.El cAMP y la expresión génica.	12
1.1.1.g.El CREB. Características.	13
1.1.1.h.El Factor AP-2.	14
1.1.1.i.La represión de la transcripción en los organismos eucariotas.	14
1.2.MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES POR PROTEINAS RECEPTORAS DE LA SUPERFICIE CELULAR.	16
1.2.1.LA VIA DEL cAMP.	18
1.2.2.LA VIA DEL Ca ⁺⁺ .	18
1.3.LA FIBRONECTINA.	20
1.3.1.LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA FIBRONECTINA.	20
1.3.2.LA ESTRUCTURA DEL GEN.	22
1.3.3.DOMINIOS FUNCIONALES.	24
1.3.3.a.Dominio de unión a células.	24
1.3.3.b.Dominio de unión al colágeno.	25
1.3.4.FUNCIONES.	25
1.3.5.EL PROMOTOR DEL GEN DE LA FIBRONECTINA.	28
1.4.LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.	29
1.4.1.LA DIFERENCIACION Y LA LUTEINIZACION DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA	30

1.4.2.LA PRODUCCION DE ESTROGENOS DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.	32
1.4.3.EFECTO DE LOS DIVERSOS FACTORES PEPTIDICOS SOBRE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.	33
1.4.4. SINOPSIS DEL ROL DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SOBRE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.	34
1.4.4.a.Los estrógenos.	34
1.4.4.b.Los andrógenos.	35
1.4.4.c.La progesterona.	35
1.4.4.d.Los glucocorticoides	35
1.4.5.LAS GRANULOSAS, EL CITOESQUELETO Y LA TRANSDUCCION DE SEÑALES.	35
1.4.6.LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.	36
1.5.LA FIBRONECTINA EN LA REPRODUCCION.	37
1.6.LA REGULACION DE LA SINTESIS DE LA FIBRONECTINA EN LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.	38
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	40-57
2.1.AISLAMIENTO Y CULTIVOS CELULARES.	40
2.1.a.Preparación y cultivo de células de la granulosa de rata.	40
2.1.b.Preparación y cultivo de las células de la granulosa bovinas.	40
2.1.c.Cultivo de células NIH - 3T3.	41
2.2.CARIOTIPO DE LA LINEA CELULAR BOVINA BGC - 1.	41
2.3.MEDICION DE LA PRODUCCION DE ESTEROIDES.	41
2.4 ENSAYOS DE ADHESION CELULAR A DIFERENTES SUSTRATOS.	41
2.5.TRATAMIENTOS CELULARES.	42
2.5.a.Tratamientos con Bt ₂ cAMP, forskolina y FSH.	42
2.5.b.Tratamiento con Bt ₂ cAMP de la línea celular NIH - 3T3.	42
2.5.c.Tratamientos con TPA de las células de la granulosa bovina y de la línea celular NIH - 3T3.	42
2.6.INMUNOFUORESCENCIAS.	42
2.7.MARCACION RADIOACTIVA DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA Y DE LA LINEA CELULAR NIH - 3T3.	
DETECCION DE LA FIBRONECTINA.	43
2.8.EXTRACCION DE RNA. DOT BLOT. NORTHERN BLOT.	44
2.8.a.Extracción de RNA.	44
2.8.b.Dot Blot.	45
2.8.c.Northern Blot.	46

2.9.TRANSFECCIONES.Y ENSAYO DE CAT.	47
2.9.a.Transfecciones.	47
2.9.b.Preparación de los extractos celulares.	49
2.9.c.Cuantificación de las proteínas presentes en los extractos celulares.	50
2.9.d.Test de la enzima CAT.	50
2.10.PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES.ENSAYO DE LA DNASA I.	51
2.10.a.Aislamiento de núcleos de hígados de rata.	51
2.10.b.Aislamiento de núcleos de células de la granulosa.	52
2.10.c.Preparación de los extractos de las proteínas nucleares.	52
2.10.d.La diálisis.	53
2.10.e Ensayo de protección a la digestión por DNasa I.	54
2.10 f Soluciones usadas en 2.10.	55

3.RESULTADOS **58-95**

3.1.INTRODUCCION.	58
3.2.OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UNA NUEVA LINEA CELULAR DE CELULAS DE LA GRANULOSA.	58
3.2.a.Obtención de la línea celular.	59
3.2.b.Caracterización de la línea BGC-1.	60
D)Tiempo de duplicación de la línea BGC-1.	60
II) Cariotipo de la línea BGC-1.	61
III)Producción de estradiol de la línea BGC-1.	67
IV) Características de adhesión a diferentes sustratos de la línea BGC-1.	68
V)Producción de FN de tipo celular de la línea celular BGC-1.	70
3.3. AUSENCIA DE REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA FIBRONECTINA POR ESTERES DE FORBOL.	72
3.3.a.Análisis de la síntesis de FN en la línea BGC-1 bajo tratamientos con ésteres de forbol.	72
3.3.b.Análisis de la expresión del gen de la FN en la línea BGC-1 luego de tratamientos con TPA.	74
3.4.REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA FN POR cAMP.	75
3.4.a.Regulación de la expresión del gen de la FN por FSH en un cultivo primario de células de la granulosa de rata.	75
3.4.b.Disminución de la síntesis de FN en la línea celular BGC-1.	77
3.4.c.Inmunofluorescencias de células BGC-1 tratadas y no tratadas con Btg α AMP.	80

3.4.d. Disminución de los niveles de mRNA de FN en células tratadas con Bt ₂ cAMP. _____	81
3.4.e. El efecto inhibitorio del Bt ₂ cAMP sobre la expresión del gen de la FN requiere la síntesis de alguna proteína. _____	84
3.4.f. El Bt ₂ cAMP no altera la estabilidad del mRNA de FN en células BGC-1. _____	87
3.4.g. Transfecciones con construcciones CAT. _____	89
3.4.h. Unión de proteínas nucleares al promotor de la Fibronectina. _____	92
4. <u>DISCUSION</u> _____	96-109
5. <u>CONCLUSIONES</u> _____	110
6. <u>BIBLIOGRAFIA.</u> _____	112

ABREVIATURAS

8-Br-cAMP	8-Bromo cAMP
aa	aminoácido
Ampr	resistencia a la ampicilina
ATF	factor activador de la transcripción
BGC	células de la granulosa bovina
BL	"buffer" de lisis
BPB	azul de bromofenol
BSA	albúmina sérica bovina
Bt ₂ cAMP	dibutiril cAMP
C/EBP	proteína de unión a "enhancer" y a CCAAT
cAMP	adenosina 3'5' monofosfato cíclico
CAT	cloranfenicol acetil transferasa
cDNA	DNA copia
CRE	elemento que responde a cAMP
CREB	factor de unión al elemento CRE
CREM	factor modulador del CREB
DB	"buffer" de diálisis
DES	dexametasona
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DTT	ditiotreitól
EBP	proteína de unión al "enhancer"
ED	dominio extra
EDTA	ácido etilén diamino tetracético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilenglicol diamino tetracético
FCS	siero fetal bovino
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FN	fibronectina
G3PD	gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas
HNB	"buffer de homogeneización de núcleos"
HSE	elemento que responde al "shock" térmico
IGF	factor de crecimiento similar a insulina
IIIS	segmento que conecta dos homologías de tipo III
InsP3	inositol 1,4,5 - trifosfato
IP3	inositol 1,4,5 - trifosfato
kb.	kilobases
kd	kilodalton

LH	hormona luteinizante
NCS	suero de ternero neonato
NEB	"buffer" de elución de núcleos
NF	número fundamental
NP40	Nonidet P 40
OCT	proteína de unión octomérica
ori	origen de replicación
pb	pares de bases
PBS	solución salina de fosfatos
PIP ₂	fosfatidil inositol 4,5 - bifosfato
Pit.	factor específico de la pituitaria
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PM	peso molecular
pol	polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SHB	"buffer" de homogeneización de Schibler
snRNP	partículas ribonucleoproteicas de RNAs nucleares pequeños
SRF	factor de respuesta al suero
SSC	solución salina de sodio y citrato
TBE	"buffer" Tris / Borato / EDTA
TE	"buffer" Tris / EDTA
TF	factor de transcripción
TGF β	factor de crecimiento transformante β
TLC	cromatografía en capa delgada
TPA	forbol 12 -o- tetradecanil - 13 acetato
tPA	activador tisular del plasminógeno

RESUMEN

El principal rol de las células de la granulosa es nutrir al ovocito y producir estradiol y progesteronas.

La hormona estimulante de la folículoogénesis (FSH) promueve la esteroidogénesis y la maduración de las células de la granulosa a través de la acción del cAMP. Existen factores como PRL, insulina, testosterona y estrógenos que modulan la acción de FSH. Así mientras algunas sustancias favorecen la acción de FSH sobre las células de la granulosa, la hormona GnRH actúa inhibiéndola. GnRH promueve que estas células se diferencien a un estado distinto al generado por la hormona FSH. La activación del receptor de GnRH activa la vía del fosfatidil inositol difosfato que termina con la activación de la PKC por el diacilglicerol.

El cAMP estimula la transcripción de genes que contienen la secuencia consenso conocida como "elemento que responde a cAMP" (CRE 5' TGACGTCA 3') y los ésteres de forbol (que mimetizan la acción del diacilglicerol activando la PKC) regulan la transcripción de genes que contienen la secuencia AP-2. El gen de la FN contiene en su promotor una secuencia CRE en la posición -170 y dos secuencias AP-2 en las posiciones -110 (en la cadena no codificante) y -68.

Con el fin de estudiar los mecanismos involucrados en las regulaciones por TPA y cAMP del gen de la FN en las células de la granulosa se desarrolló una línea celular de granulosa bovina (BGC-1) que posee un cariotipo diploide estable de $2n=43$ derivado del cariotipo normal bovino, que posee un alto grado de transformación estructural y que sintetiza estradiol en respuesta a FSH.

Las gonadotrofinas y el cAMP inhiben la expresión del gen de la FN en las células de la granulosa de rata y bovinas. En cambio, si bien el TPA incrementa la síntesis de la FN en cultivos primarios de granulosa de rata, no tiene efecto sobre las línea celular BGC-1.

El cAMP disminuye específicamente tanto la secreción de la FN como los niveles de su mRNA en las células BGC-1. Este efecto inhibitorio ocurre a nivel transcripcional: no se debe a una alteración de la estabilidad del mRNA de la FN, requiere secuencias del promotor diferentes al CRE, localizadas entre las posiciones -510 y -223 que pueden unir proteínas nucleares de las granulosa bovinas. La inhibición depende de la síntesis de un intermediario proteico inducido o fosforilado por el cAMP y suprime la activación transcripcional dependiente de la secuencia CRE observada para el gen de la FN en otras líneas celulares.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

Bernath, V.A., Muro, A.F., Vitullo, A.D., Bley, M.A., Barañao, L.J., y Kornblihtt, A.R. (1990) J.Biol.Chem. 265,18219-18226.

INTRODUCCION

1.1.REGULACION DE LA EXPRESION GENICA.

Las secuencias de DNA presentes en un organismo, codifican para todas las moléculas de RNA y de proteínas que son capaces de sintetizar sus células.

Sin embargo no es posible describir un organismo a través de la secuencia de su genoma, para esto se requiere un estudio completo de la biología celular que permita saber, cómo miles de moléculas grandes y pequeñas, con una y otra forma, se comportan luego de ser sintetizadas.

Los diferentes tipos celulares difieren enormemente tanto en su morfología como en su función, tanto que a veces se hace difícil imaginar, que posean el mismo genoma.

La mayoría de los tipos celulares de un organismo multicelular, son capaces de acumular, diferentes moléculas de RNA y de proteínas, sin modificar absolutamente nada de su genoma.

Existen mecanismos que controlan la expresión de los genes en cada tipo celular, y estos mecanismos operan a diferentes niveles, desde el DNA, hasta la proteína, pasando por el RNA, por lo tanto, existen diferentes puntos donde puede ejercerse algún tipo de regulación. Ver Figura 1.

1.Control transcripcional: regula cuándo y con qué frecuencia un determinado gen debe transcribirse.

2.Control del procesamiento: regula cómo el transcrito primario de RNA es procesado.

3.Control en el transporte del RNA mensajero: selecciona cuáles mRNAs deben ser transportados del núcleo al citoplasma.

4.Control de traducción: controla cuáles mRNAs del citoplasma deben ser traducidos a proteínas.

5.Control de la degradación del mRNA: actúa desestabilizando selectivamente ciertas moléculas de mRNA en el citoplasma.

6.Control en la actividad proteica: actúa activando o desactivando moléculas proteicas específicas luego de haber sido fabricadas.

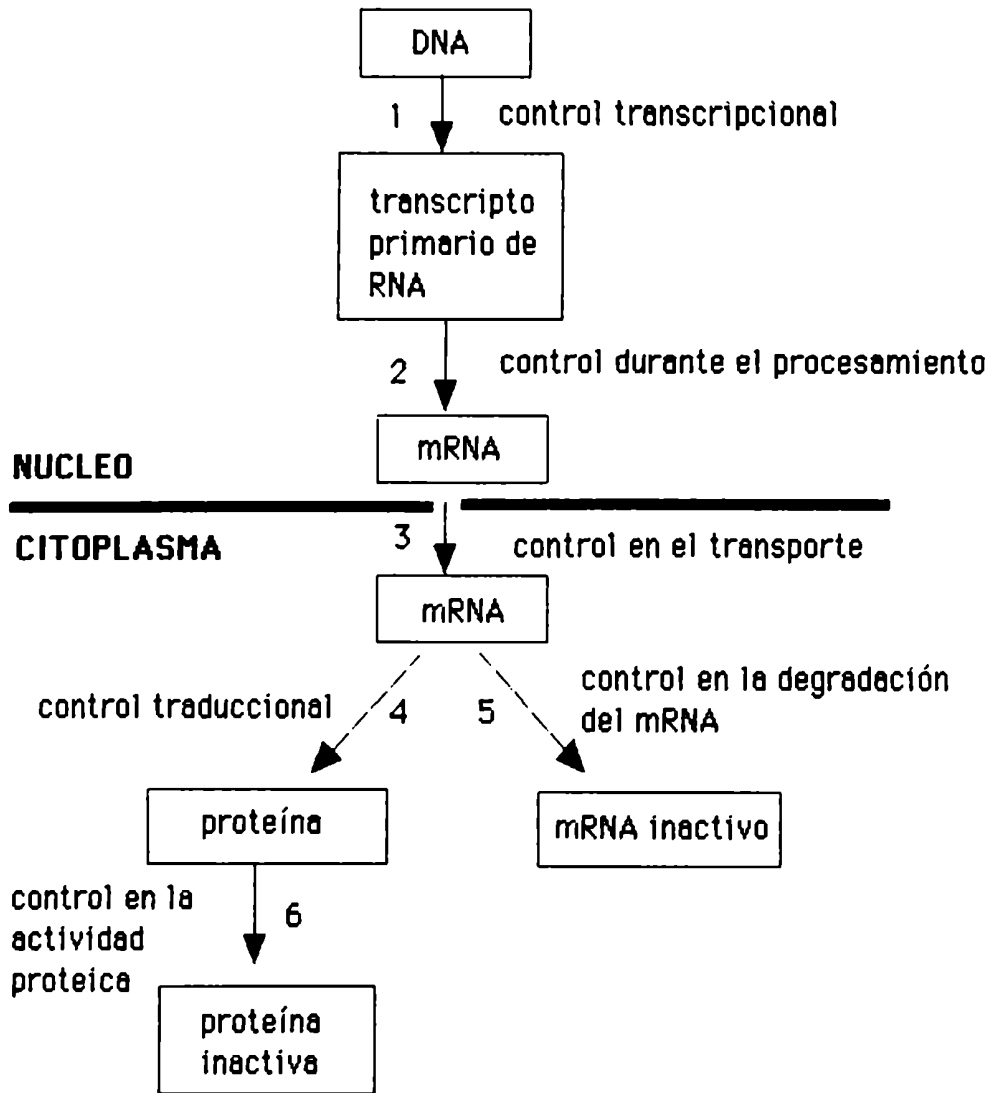


Figura 1: Se indican los seis pasos en los cuales puede controlarse la expresión génica en los organismos eucariotas.

1.1.1. REGULACION TRANSCRIPCIONAL EN ORGANISMOS EUCARIOTAS.

Si bien los mecanismos de transcripción de DNA a RNA son semejantes en los organismos procariontes y eucariotas, en los últimos son más complejos.

Las RNA polimerasas son las enzimas responsables de la transcripción del mRNA a partir de una molécula de DNA molde; pero, mientras que la RNA polimerasa bacteriana se une directamente al promotor del gen, las polimerasas de eucariotes para unirse al promotor del gen necesitan de la presencia de factores proteicos adicionales unidos al DNA: factores de transcripción.

En eucariotas existen tres tipos de RNA polimerasas, cada una responsable de la transcripción de diferentes "sets" de genes.

La RNA polimerasa I es la responsable de la transcripción de los RNA ribosomales mayores.

La RNA polimerasa II es la responsable de la transcripción de los RNAs pequeños que constituyen los snRNPs y de la transcripción de todos los genes cuyos RNAs serán traducidos a proteínas.

La RNA polimerasa III es la responsable de la transcripción de una variedad de RNAs muy pequeños y estables como el RNA ribosomal 5S y los RNA de transferencia.

1.1.1.a. La iniciación de la transcripción. Factores.

La iniciación de la síntesis del RNA mensajero, es el punto de control primario en la regulación de la expresión génica y depende de factores que interactúan con elementos específicos del promotor de los genes.

Se define como promotor de un gen a una secuencia específica de DNA a la cual la RNA polimerasa se une y que contiene tanto al sitio de iniciación para la transcripción, como también señales específicas para la síntesis. Se lo define también como una región de control o regulación ubicada en la vecindad inmediata al sitio de iniciación de la transcripción.

Las secuencias o regiones que regulan al promotor activándolo desde una distancia mayor tanto río arriba ("upstream"), como río abajo ("downstream"), y en forma independiente a su orientación, se llaman "enhancers".

Alrededor de la posición -25 se encuentra el elemento consenso conocido como TATA box. La velocidad de iniciación de la transcripción está determinada por factores que reconocen secuencias en elementos "enhancers" ubicados tanto río arriba de la TATA box, como por factores que reconocen a la misma TATA box (1).

La RNA polimerasa sola, no es capaz de iniciar correctamente la transcripción "in vitro", sin embargo sí se vio transcripción en forma correcta en extractos totales de células o en extractos nucleares (2-4). Los factores de transcripción responsables de esta actividad fueron parcialmente purificados y llamados: TFIIA, B, D y E (factores de transcripción A, B, D y E) (4-7).

Se determinaron complejos formados por los factores proteicos parcialmente purificados y la secuencia de DNA a la cual ellos se unen que permitieron dilucidar aproximadamente la función de cada uno de estos factores (1). Ver Figura 2.

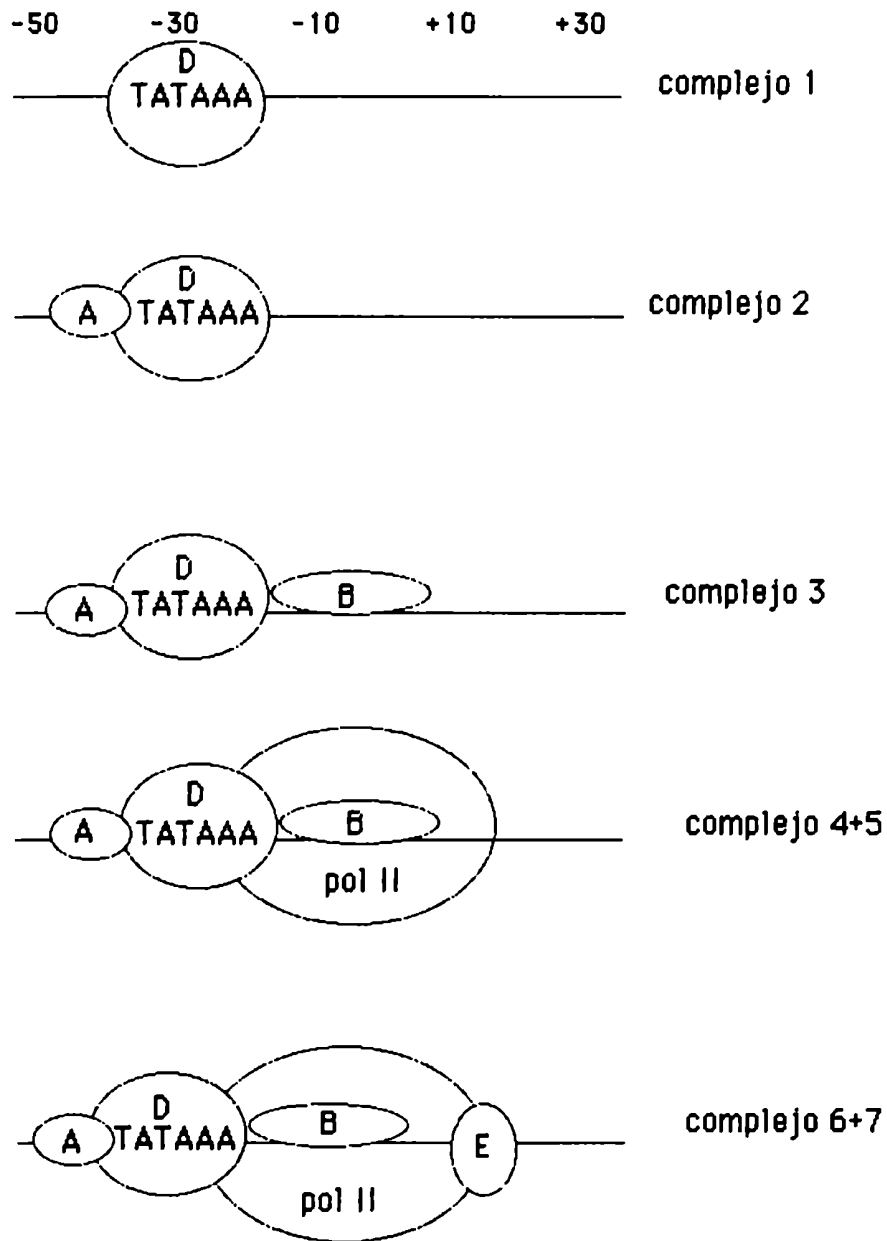


Figura 2: Modelo esquemático de la Estructura Molecular de los diferentes Complejos.

El primer paso en la iniciación, está dado a través del reconocimiento del factor TFIIID al elemento TATA, esto forma el complejo 1 y es requerido para la formación de los otros complejos

El complejo 2 contiene a TFIIID + TFIIA. La adición de TFIIA, aumenta la unión del factor TFIIID al elemento TATA.

El complejo 3, contiene a TFIIID + TFIIA + TFIIB. TFIIB es imprescindible para la unión de la RNA polimerasa II, actúa como puente entre la polimerasa y el complejo 2, y estaría involucrado en la determinación de la distancia del elemento TATA al sitio de iniciación de la transcripción.

La unión de la RNA polimerasa II al complejo 3, forma los complejos 4 y 5, que representan, o diferentes formas de la polimerasa unidas al mismo complejo, o la adición de alguna proteína que podría ser TFIIS o RAP38, responsables de la estimulación de la elongación de la transcripción.

Los complejos 6 y 7, se forman por el agregado del factor TFIIE a los complejos 4 y 5, y son necesarios para la correcta iniciación de la transcripción. La fracción que contiene a TFIIE, posee actividad de ATPasa dependiente del DNA.

1.1.1.b. Otros factores reguladores de la transcripción.

Además de la región TATA, involucrada en la iniciación de la transcripción de un gen, existen una variedad de elementos reguladores, dispuestos en cis, tanto río arriba como río abajo del sitio de iniciación, a los cuales se unen factores específicos. Ver Figura 3.

En una célula animal, cada gen posee una combinación particular de estos elementos reguladores, positivos y negativos, dada por el ordenamiento espacial, el número, y el tipo de estos elementos. Estos son sitios de unión de factores de transcripción, que se unen activando o reprimiendo la expresión del gen.

La importancia o el rol de un elemento en cis puede variar enormemente en los diferentes tipos celulares y en respuesta a señales fisiológicas, esto se debe probablemente a que los factores que reconocen y se unen a los elementos del DNA, varían en cuanto a su abundancia y a su función en los diferentes tejidos y bajo diferentes circunstancias (8).

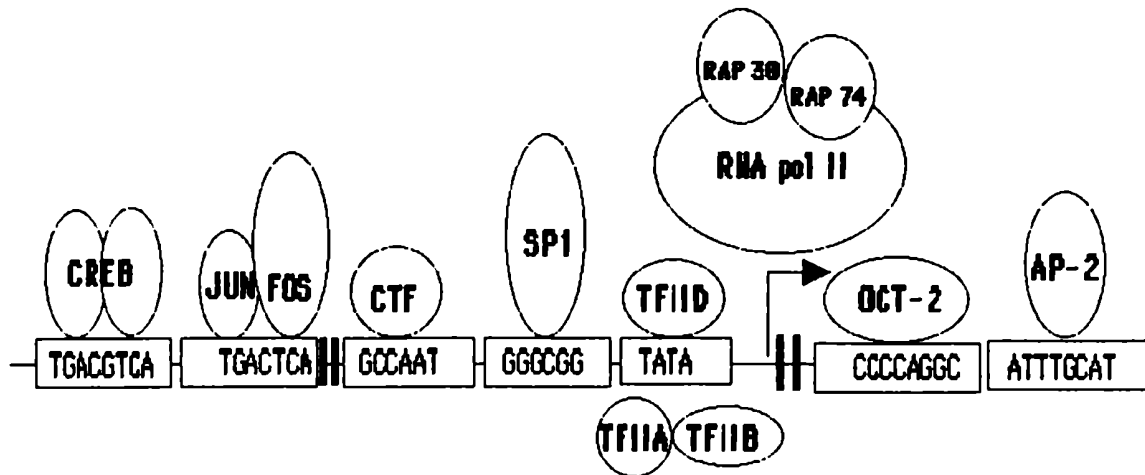


Figura 3: Ordenamiento hipotético de los elementos en cis que constituyen el promotor y los elementos "enhancers" de un gen transcrito por la RNA polimerasa II.

1.1.1.c.Los dominios de unión al DNA de los factores de transcripción.

Los factores de transcripción que se unen al DNA, son proteínas que presentan una variedad de dominios estructurales característicos. La actividad de unión al DNA de la mayoría de los factores se encuentra en pequeñas subregiones que pueden tener entre 60 y 100 aminoácidos.

1.1.1.c.I.Dominio de tipo "Dedo de Zinc".

Los motivos de tipo "dedo de zinc", se encontraron por primera vez, dentro de los factores que se unen al DNA, específicamente en el factor TFIII A que se une a la región de control interna del gen del RNA 5S, transcrito por la RNA polimerasa III (9).

Este dominio, está formado por 30 aminoácidos que constituyen, una unidad estructural alrededor de un átomo de Zn^{++} , estabilizada por dos residuos de cisteína y dos residuos de histidina. Ver Figura 4.

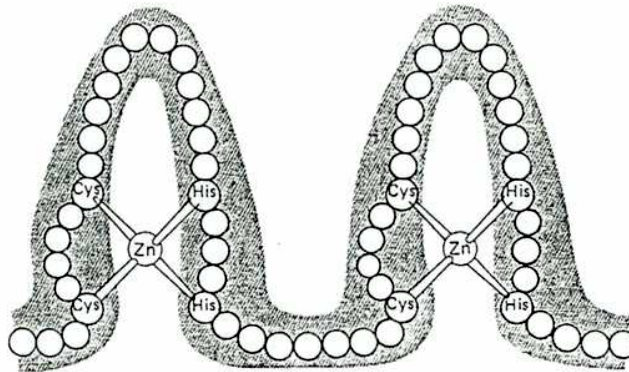


Figura 4: Representación esquemática del dominio de tipo "dedo de Zinc".

Este dominio se encuentra también, en el factor Sp1, el cual es responsable de la activación transcripcional de genes que llevan la secuencia 5' GGGCGGG 3' (GC box) en su promotor.

Sp1, contiene una secuencia de tres "dedo de zinc" "en tandem" en su extremo COOH terminal (10).

1.1.1.c.II.Homeo - Dominio. Hélice - Vuelta - Hélice.

Este dominio de unión al DNA se identificó, como un segmento proteico de 60 aa que se encuentra conservado en varias proteínas reguladoras de la embriogénesis de *Drosophila*, luego de lo cual se lo encontró también en vertebrados (11,12).

Esta estructura está altamente relacionada con otra estructura de unión al DNA llamada hélice-vuelta-hélice. Estas estructuras están formadas por homodímeros simétricos. Cada monómero tiene una estructura de dos alfa hélices separadas por un giro beta agudo. Ver Figura 5.

En cada caso la alfa hélice más COOH terminal de una subunidad del dímero, se juxtapone de una única manera con la hélice análoga de la otra subunidad. Estas hélices se llaman hélices de reconocimiento y son las involucradas en el contacto con el DNA, siendo entonces importantes para la unión a sitios específicos sobre el mismo (13).

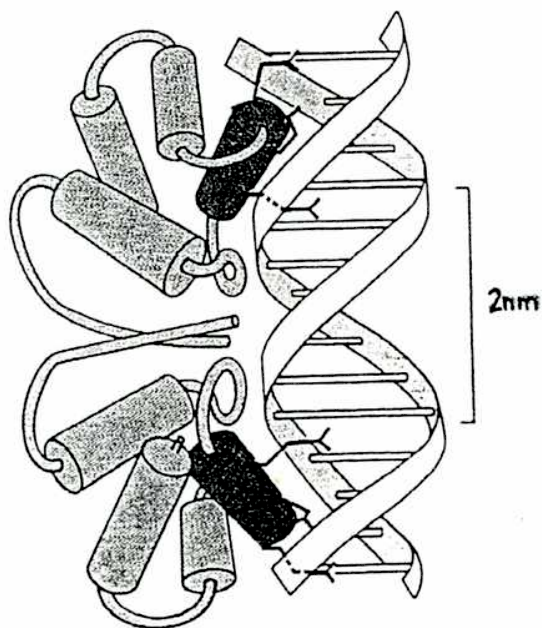


Figura 5: Representación esquemática del dominio Hélice-Vuelta-Hélice.

Una molécula efectora alostérica que se une a esta proteína, puede aumentar o disminuir enormemente la afinidad al DNA de esta proteína reguladora cambiando la distancia entre las dos hélices de reconocimiento (13).

Se encontró que en *Drosophila* las proteínas reguladoras con estructura de homeodominio se unen a secuencias ricas en AT (14).

En mamíferos se encontraron los factores OCT-1 ("octamer binding protein"), OCT-2, y Pit-1 (factor específico de la pituitaria), con estructura de homeodominio (15-17).

Las proteínas OCT, se unen a un elemento formado por la secuencia de ocho bases 5' ATGCAAAT 3'.

Esta secuencia fue encontrada en el promotor de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y en el promotor de la cadena liviana kappa, así como también en genes no asociados a células linfoides. Se las dividió entonces en dos grupos, OCT-1 y OCT-2. Las primeras pueden encontrarse en diferentes tipos celulares y las últimas solamente en células linfoides (18-20).

1.1.1.c.III. Dominio de tipo "Cremallera de Leucinas" ("Leucine Zipper").

En 1988 se descubrió una nueva familia de proteínas reguladoras que presentan una estructura característica llamada "cremallera de leucinas" (21,22) (Figura 6).

Esta estructura consiste en una extensión de 35 aa que contienen 4 o 5 residuos de leucina, separados uno de otro por 6 aminoácidos.

Las leucinas se ubican sobre una cara de una estructura alfa hélice anfipática, y las leucinas de dos hélices semejantes interactúan permitiendo la dimerización. En posición NH₂ terminal respecto de la "cremallera de leucinas" se encuentra una región rica en aminoácidos cargados positivamente, conocida como región básica de la proteína.

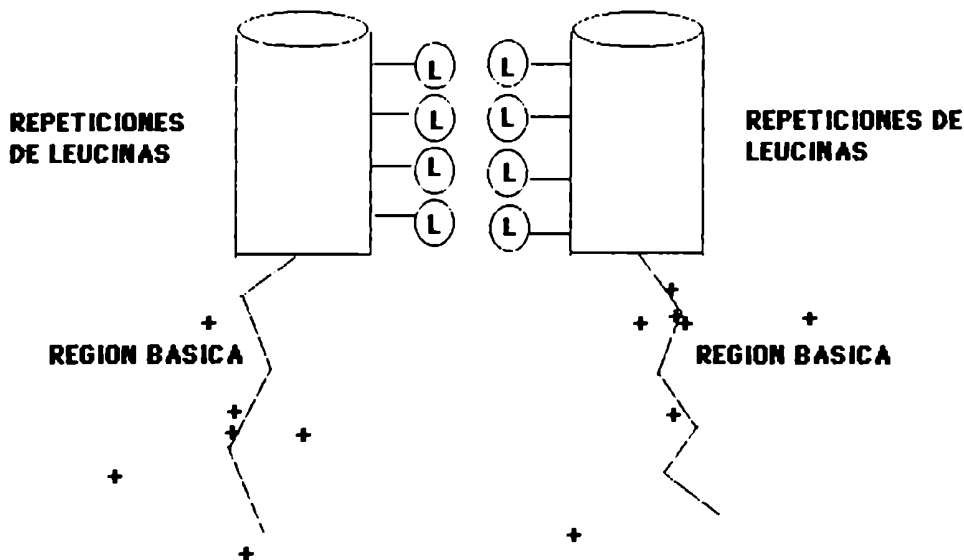


Figura 6: Representación esquemática del dominio de tipo "cremallera de leucinas".

El segmento de tipo "cremallera de leucinas" es requerido tanto para la dimerización de la proteína, como para su unión al DNA, mientras que, la región básica se requiere solamente para la unión al DNA (23-25).

Se identificó un dominio de tipo "cremallera de leucinas" en la proteína C/EBP I (CCAAT "enhancer binding protein") (21,23). Posteriormente se encontraron repeticiones semejantes en las secuencias de aminoácidos de las proteínas nucleares Jun, Fos, y Myc codificadas por protooncogenes y en el factor de levadura GCN4 (21,23,24,26).

Las proteínas con esta estructura no forman dímeros al azar, de esta manera mientras que GCN4, y C/EBP forman homodímeros, Jun y Fos pueden formar tanto homo como heterodímeros.

En casos como en el de la proteína Myc, existe el motivo de leucinas pero no se conserva la región básica.

La proteína OCT-2 tiene además del homeodominio, otro dominio de tipo "cremallera de leucinas"

Las proteínas nucleares Fos y Jun juegan un rol en la regulación transcripcional a través de dos eventos, por un lado la proteína Jun, está relacionada con un grupo de proteínas que se unen a una secuencia específica del DNA conocida como AP-1 cuya secuencia específica es 5' TGACTCA 3'; por el otro lado Jun y Fos forman heterodímeros estables "in vivo" que se unen a secuencias similares a AP-1 (13).

Además las proteínas reguladoras conocidas como CREB, y los factores ATF, tienen dos dominios funcionales, uno amino terminal y el otro carboxilo terminal, éste último contiene a su vez un subdominio con estructura de tipo "cremallera de leucinas". Sobre estos factores se profundiza en el punto 1.1.1.d.

1.1.1.c.IV. Otras proteínas reguladoras.

Existen proteínas reguladoras que se unen al DNA pero que no pertenecen a ninguno de los tres grupos antes mencionados.

Por ejemplo, el factor de transcripción y replicación llamado CTF-NF1 (27); los factores de tipo AP-2 (28); o los SRF ("serum response factor") (29).

1.1.1.d.La Familia Multigénica del Factor CREB, los Factores Activadores de la Transcripción conocidos como ATF, y otros Factores relacionados.

El CRE ("cyclic AMP responsive element" o elemento que responde a cAMP) es la secuencia de DNA que confiere a los genes que la poseen en su promotor, respuesta a cAMP (adenosina 3' 5' monofosfato cíclico). Este elemento difiere solamente en una base del sitio de unión conocido como AP-1.

La secuencia del CRE es 5' TGACGTCA 3'.

El CRE es reconocido por una familia de proteínas entre las cuales se destaca el CREB ("CRE binding protein" o proteína de unión a la secuencia CRE). Como ya se mencionó el CREB tiene una "cremallera de leucinas".

A partir del clonado del cDNA se ha identificado un conjunto de factores capaces de responder a cAMP (30).

CREB-327	Placenta humana.
CREB-341.	Cerebro de rata.
CRE-BP1.	Cerebro humano.
HB16	Células B humanas.
mXBP	Células B de ratón.
ATF-1.	Células HeLa.
ATF-2.	Células HeLa.
ATF-2.	Células HeLa.
ATF-3	Células HeLa.
ATF-4.	Células HeLa.
ATF-5	Células HeLa.
ATF-6,7,8.	Células HeLa.
CREB-120 kd	Tiroides.
TREB	Linfocitos.
HBP-1	Semillas de trigo.
TGA-1a,1b	Tabaco.

Todas estas proteínas poseen dos dominios funcionales, uno amino terminal responsable de la activación transcripcional, y uno carboxilo terminal responsable de la unión al DNA.

Este último dominio contiene a su vez dos subdominios: el más carboxilo terminal posee estructura de tipo "cremallera de leucinas" y es el responsable de la dimerización la cual es un prerequisite de la unión al DNA. El otro subdominio que por lo tanto es el más amino terminal, tiene una estructura de tipo ~~hélice-vuelta-hélice~~ y el 50% de sus aminoácidos se encuentran cargados positivamente, constituyendo una región básica. La función de este subdominio es la de reconocimiento específico de la secuencia del DNA (30).

Miembros de la familia CREB/ATF pueden dimerizarse con miembros de la familia Jun a través de la "cremallera de leucinas". Se ha descrito que la especificidad de los sitios de reconocimiento puede variar entre los diferentes complejos. Mientras el dímero Jun A - Fos reconoce mejor a AP-1 que a CRE, el heterodímero de Jun A con un miembro de la superfamilia ATF/CREB, reconoce mejor a la secuencia CRE que a la secuencia AP-1 (31).

1.1.1.e.Regulación de la actividad transcripcional de los Factores por modificaciones postraduccionales de los mismos.

Muchos factores de transcripción son proteínas capaces de ser fosforiladas y esta fosforilación jugaría un rol fundamental en la regulación de la actividad transcripcional de los mismos.

El CREB es un ejemplo de un factor cuya fosforilación se ha estudiado ampliamente y que se describirá más adelante.

Los promotores de los genes que codifican para proteínas de "heat-shock" poseen un elemento en su DNA conocido como HSE ("heat shock element"), que es reconocido por factores de transcripción específicos. El aumento de la transcripción de los genes de "heat shock" se correlaciona con el aumento de la fosforilación del factor de "heat shock" (8).

La glicosilación es también una modificación que frecuentemente ocurre en los factores de transcripción. Así por ejemplo se observa que el factor Sp1 está altamente glicosilado. La glicosilación ocurre sobre residuos serina y treonina. Estos mismos sitios pueden sufrir fosforilación. Sin embargo se ha visto que estos dos tipos de modificaciones no son mutuamente excluyentes (8).

1.1.1.f.El cAMP y la expresión génica.

En respuesta a estímulos que alteran la concentración de cAMP se producen cambios en el estado de fosforilación de las proteínas. La relación entre el cAMP y la fosforilación proteica se ha establecido muy temprano en la evolución de los organismos eucariotas, y se ha distribuido ampliamente en el reino animal.

Muchos genes regulados por cAMP fueron aislados y caracterizados y se vio que comparten ciertas características. Generalmente se expresan en tejidos capaces de responder a hormonas o a factores reguladores y su velocidad de transcripción es alterada por cAMP (32).

Los factores de transcripción una vez fosforilados se unen a los elementos del promotor o a secuencias "enhancers" del gen. Como ya vimos en secciones anteriores el elemento que responde a estímulos por cAMP se llama CRE y su secuencia es 5' TGACGTCA 3'.

Experimentos de transfección mostraron que el CRE de un gen que se expresa en hígado de rata puede sustituir al CRE de un gen que se expresa en placenta

humana. Esto demuestra el alto grado de conservación durante la evolución del elemento CRE (30).

Existe un grupo de genes capaces de alterar rápidamente su transcripción por tratamientos con cAMP, en ellos el elemento CRE se encuentra dentro de las primeras 150 pares de bases de la región 5' flanqueante de los genes y no sólo actúa como una secuencia "enhancer" inducible, si no que también funciona como un "enhancer" basal (32).

Sin embargo no es el CRE el único elemento capaz de responder a cAMP, el elemento AP-2 cuya secuencia consenso es 5' CCCAGGC 3', es capaz de hacerlo también. Se lo encontró como un "enhancer" basal en el genoma de SV40, y en el promotor de la metalotioneína humana II A (39).

La identificación de este nuevo elemento permitió entender la regulación por cAMP de genes que no poseían la secuencia CRE.

El elemento AP-2 generalmente se encuentra en más de una copia dentro de la región 5' flanqueante de muchos genes, y media también la respuesta a ésteres de forbol (32).

1.1.1.g.El CREB. Características.

En 1987 se aisló una proteína de 43.000 PM que se fosforilaba y era responsable de la regulación por cAMP del gen de la somatostatina. Esta proteína era el CREB (34).

El CREB existe en equilibrio entre dímeros activos transcripcionalmente y monómeros relativamente inactivos. Los dímeros son fosforilados por la proteína quinasa C (PKC) y por la proteína quinasa A (PKA). La PKC fosforila al CREB estimulando la formación de los dímeros y la PKA fosforila al factor proteico estimulando su actividad transcripcional, pero sin influenciar sobre la dimerización (35). Los sitios de fosforilación de las dos quinasas se encuentran muy cercanos en la estructura proteica por lo que existirían interacciones positivas y negativas de ellos regulando la actividad del CREB (36).

La PKA fosforila una serina ubicada en la posición 133, esta fosforilación produciría un cambio alostérico conformacional del CREB tal que algún sitio distal a esta serina 133 interactuaría con el aparato transcripcional (37).

Para que el CREB actúe activando la transcripción se requiere la fosforilación por PKA, la formación de los homodímeros y la unión al CRE. En consecuencia son

necesarias tanto la región básica como la de los residuos de leucina de la proteína (38).

Más adelante se encontró que el gen que codifica para el CREB puede dar por procesamiento alternativo de su transcrito primario una proteína idéntica al CREB pero con una deleción de 14 aminoácidos entre los aminoácidos 88 y 101, llamada delta CREB. A la región de 14 aminoácidos se la llamó región alfa. El delta CREB es menos activo y más abundante que el CREB y es capaz de formar heterodímeros con el CREB. Así el delta CREB regularía negativamente la respuesta del CREB por cAMP. La región alfa contiene una estructura crítica para la actividad del CREB. Por lo tanto la transactivación del CREB depende tanto de la fosforilación por PKA como de la presencia de la región alfa (39).

Recientemente se purificó de extractos nucleares de células HeLa una proteína de 120 kd capaz de unirse a la misma secuencia CRE que el CREB, y que es solamente fosforilado por PKC (40).

1.1.1.h.El Factor AP-2.

El factor de transcripción AP-2 se encuentra en mamíferos y se une a secuencias reguladoras que responden a cAMP y a ésteres de forbol (41). Se lo reconoció por primera vez estudiando la regulación del gen de la metalotioneína humana II A, y luego se lo encontró en el "enhancer" de SV40, y en los genes de la hormona de crecimiento humana, y de histocompatibilidad.

AP-2 contiene una región carboxilo terminal formada por dos alfa hélices separadas por un segmento de aminoácidos, que es la responsable de la dimerización y de la unión al DNA de la proteína. Contiene también una región amino terminal que funciona en la unión de la proteína al DNA. La región que contiene a las dos alfa hélices no puede unirse al DNA sin la región básica, pero sí formar dímeros (42).

AP-2 es capaz de formar dímeros con Jun y unirse así al sitio AP-1.

1.1.1.i.La represión de la transcripción en los organismos eucariotas.

La activación transcripcional puede ser modulada de diferentes maneras (Figura 7):

- 1- inhibiendo la unión al DNA de los factores reguladores.
- 2- bloqueando la activación de los factores.
- 3- a través de los elementos "silenciadores".

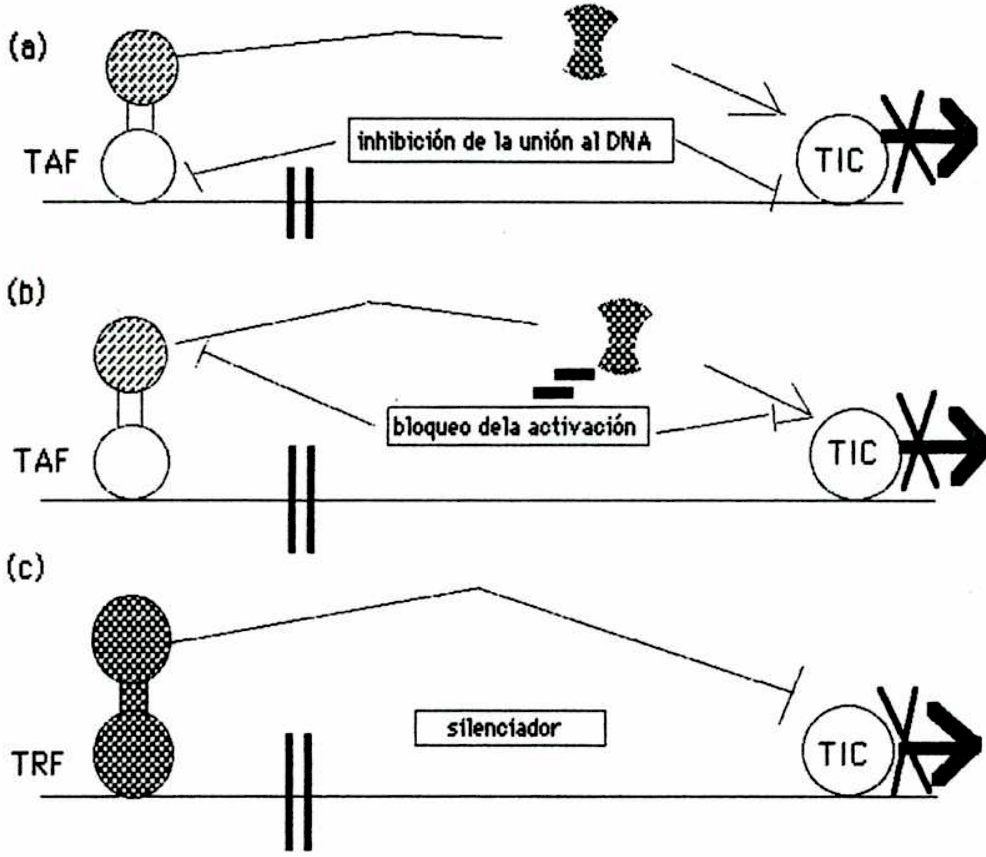


Figura 7: Se observan los tres tipos de represión de la transcripción.
 a) la trans-activación es inhibida por un represor que compite por los sitios de unión al DNA del factor TAF (factor trans-activador), o del complejo TIC (complejo de iniciación de la transcripción). b) un represor interacciona con el factor TAF, con un factor intermediario, o con el complejo TIC. c) un factor trans-represor (TRF) se une al DNA inactivando al complejo TIC.

1- En este caso algún factor negativo compite con el factor transactivador inhibiendo su unión al DNA.

Un ejemplo de esto es la inhibición del efecto activador del heterodímero formado por Jun - Fos por la expresión simultánea de otro protooncogen de tipo Jun. El heterodímero activo es Jun - Fos, mientras que el dímero Jun - Jun es inactivo; si coexisten Jun y JunB, se forman más heterodímeros de tipo Jun - Jun, que de tipo Jun - Fos, desplazándose el equilibrio hacia la formación de heterodímeros inactivos.

2- La unión al DNA de un factor transactivador transmite una señal que hace que el complejo de iniciación de la transcripción sea blanco de un represor capaz de inactivar al transactivador de diferentes maneras, por ejemplo, uniéndose al dominio activador del factor transcripcional o secuestrando a alguna proteína que el factor necesite para funcionar.

3- Los elementos "silenciadores" son secuencias que se encuentran en el DNA y que regulan negativamente la expresión del gen. Tienen las propiedades de los "enhancers", pero median un evento de represión (43).

Recientemente se ha encontrado un factor que se une al elemento CRE pero que no regula positivamente la transcripción génica, si no que lo hace negativamente. Este factor fue llamado CREM. Cuando el CREM se expresa en las líneas celulares JEG-3 y F9 bloquea al factor de transcripción CREB que se une a una secuencia CRE de un gen de timidina-quinasa CAT. El CREM suprimiría la actividad del CREB o bien formando dímeros inactivos transcripcionalmente con el CREB o bien ocupando secuencias CRE que no permitirían la unión del CREB para activar la transcripción (44).

1.2.MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES POR PROTEINAS RECEPTORAS DE LA SUPERFICIE CELULAR.

En los organismos multicelulares, las células se comunican unas con otras para regular su desarrollo y organización en los tejidos, para controlar su crecimiento y para coordinar sus funciones.

Las células animales pueden comunicarse de tres maneras diferentes:

1- secretando moléculas químicas capaces de actuar como señales desde distancias cercanas o lejanas de tal manera que las células responden a estas señales extracelulares a través de receptores que se unen a la molécula señal específica iniciando la respuesta.

2- secretando moléculas que se unen a la membrana plasmática influenciando en dicha célula por contacto directo. En este caso no son necesarias proteínas intermediarias como receptores.

3- formando uniones que directamente unan los citoplasmas de diferentes células permitiendo el intercambio de pequeñas moléculas.

Los receptores celulares no regulan directamente la expresión génica. Ellos transmiten la señal externa a través de la membrana plasmática produciendo nuevas señales intracelulares que actúan sobre el citoplasma o el núcleo.

Entre los receptores se encuentran los que actúan a través de las proteínas G, las cuales a su vez activan o inactivan tanto enzimas unidas a membrana como canales iónicos.

Las proteínas G activan una cadena de eventos que alteran la concentración intracelular de algunas moléculas que funcionan como señales intracelular, y que son conocidas como segundos mensajeros. Los segundos mensajeros más importantes son el cAMP y el Ca^{++} . Estos mediadores a su vez actúan activando quinasas de proteínas específicas. Ver Figura 8.

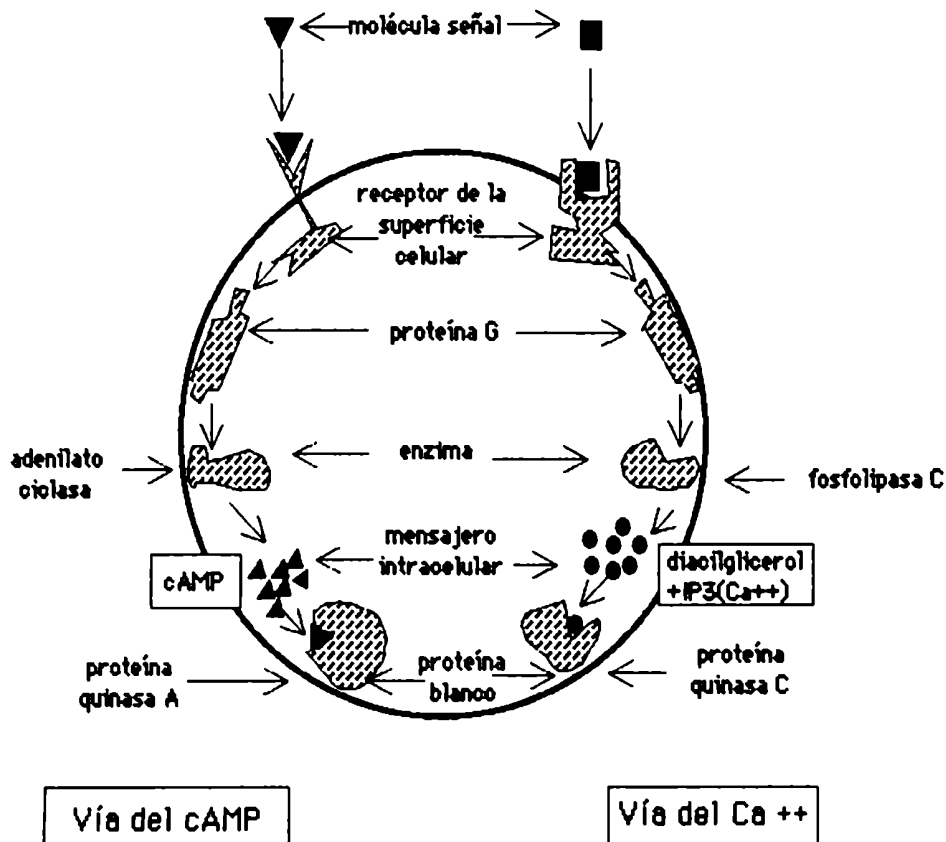


Figura 8: Se observan las dos principales vías por las cuales la proteína G se une a receptores de la superficie celular generando mensajeros intracelulares.

1.2.1.LA VIA DEL cAMP.

Muchas hormonas o mediadores químicos actúan de tal manera que sus receptores a través de la proteína Gs activan a la adenilato ciclasa, que es la enzima responsable de la transformación del ATP en cAMP.

Este cAMP generado en las células activa a la proteína quinasa dependiente de cAMP, conocida como PKA.

La subunidad catalítica de la PKA activada cataliza ahora la transferencia de un grupo fosfato terminal del ATP a residuos específicos de serina o treonina de las proteínas blanco, provocando cambios de actividad en las mismas.

1.2.2.LA VIA DEL Ca⁺⁺.

En el interior de muchas células la concentración de Ca⁺⁺ es extremadamente baja, 10⁻⁷ M, mientras que en el fluido extracelular es mucho mayor, 10⁻³ M. Existe entonces un gradiente que tiende a llevar Ca⁺⁺ dentro del citoplasma a través de la membrana plasmática.

Una señal extracelular llega a un receptor que actúa a través de la proteína Gp la cual a su vez transmite la señal a una fosfolipasa C que genera diacilglicerol e inositol trifosfato a partir del fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PI 4,5 bifosfato). Ver Figura 9.

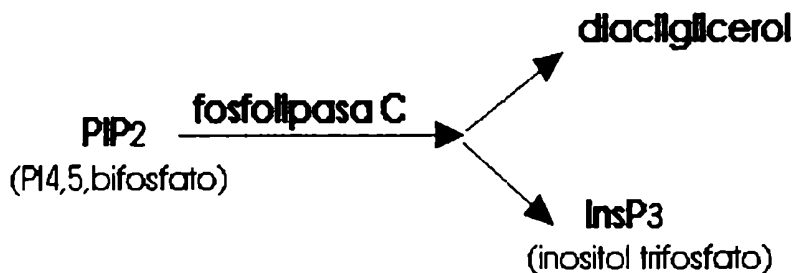


Figura 9.

El diacilglicerol activa directamente a la proteína quinasa C, la cual es dependiente de Ca⁺⁺. Ver Figura 10.

Por otra parte el inositol trifosfato intracelular se une a una proteína que actúa abriendo los canales de Ca^{++} de las membranas del retículo endoplasmático incrementando el Ca^{++} citoplasmático. Este Ca^{++} , actúa como mediador de la señal externa activando enzimas dependientes de Ca^{++} como la proteína quinasa C.

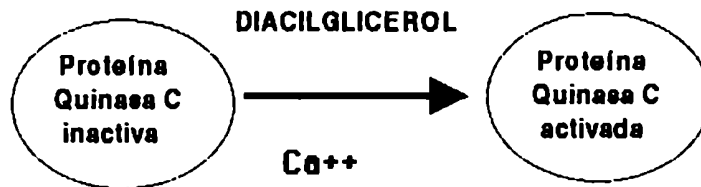


Figura 10.

La PKC activada transfiere un grupo fosfato terminal del ATP a residuos serina y treonina específicos de las proteínas blanco. Ver Figura 11.

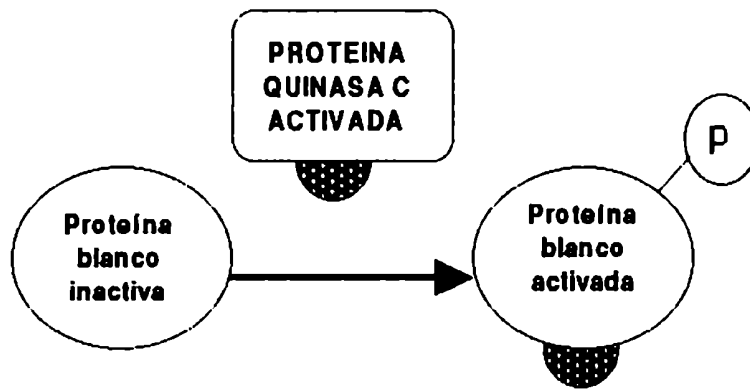


Figura 11.

El efecto del inositol trifosfato puede ser reproducido por el ionóforo de Ca^{++} (A23187) que permite la entrada de Ca^{++} al citoplasma, y el efecto del diacilglicerol por los ésteres de forbol.

1.3.LA FIBRONECTINA.

Dentro de la compleja arquitectura de los organismos multicelulares, la mayoría de las células normales guardan un lugar determinado y exclusivo para ellas mismas. Las células se adhieren a las membranas basales y así el intersticio va adquiriendo tanto proteínas como otras sustancias que las células le proveen.

¿Cómo hacen las células para mantener un grado de organización tan alto tanto cuando migran como cuando se mantienen fijas? La respuesta a esta pregunta se encuentra en parte en la gran variedad de glicoproteínas que unen a la células a la matriz extracelular.

Una de las proteínas más importantes de este grupo es la Fibronectina (FN, del latín, *fibra* = fibra, y *nectere* = conectar). Como su nombre lo indica, las fibronectinas actúan como cables, como conectores. Varias moléculas de fibronectina pueden reunirse formando fibrillas, como también unirse a las células uniendo unas con otras. La FN está también relacionada con la organización interna de las células.

1.3.1.LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA FIBRONECTINA.

Las diversas funciones de la FN dependen de su capacidad de unirse a un gran número de diferentes estructuras biológicas como a superficies celulares, al colágeno, la heparina y a la fibrina. Para poder comprender estas afinidades es necesario analizar primero la estructura primaria de la proteína. Ver Figura 12.

La FN es un dímero compuesto por dos cadenas polipeptídicas de PM aproximadamente 250.000 cada una. Ambas subunidades se encuentran unidas cerca del extremo carboxilo terminal por puentes disulfuro (45).

La FN se encuentra en el plasma a una concentración aproximada de 300 µg/ml y en la matriz extracelular de diversos tipos celulares.

Las subunidades de la FN plasmática tienen un peso molecular menor que las de la celular, se habla entonces de FN plasmática y FN celular. Se sabe hoy que esta heterogeneidad es el resultado de variaciones en la secuencia de los aminoácidos de los diferentes polipéptidos debido a modificaciones postranscripcionales.

Se determinó que existe solamente un gen para la FN por genoma haploide, el cual mapea en el cromosoma 3, más exactamente en el sitio 2q 333 - qter (46).

El análisis de clones de cDNA y de clones genómicos, permitió dilucidar la secuencia de las FNs humana, bovina, de rata y de pollo (47-57).

La mayor parte de la secuencia de la FN, está organizada en tres tipos de módulos, que se van repitiendo a lo largo de la proteína y que se llaman homologías internas, de tipo I, II, y III, de aproximadamente 45, 60, y 90 aminoácidos respectivamente. Tanto las homologías de tipo I, como las de tipo II se encuentran estabilizadas por dos puentes disulfuro intracatenarios cada una. Los tres tipos de homologías constituyen el 90% de la proteína total. Existen 12 homologías de tipo I, 2 de tipo II, y 17 de tipo III, y pocas regiones que no se corresponden con ninguna de estas homologías.

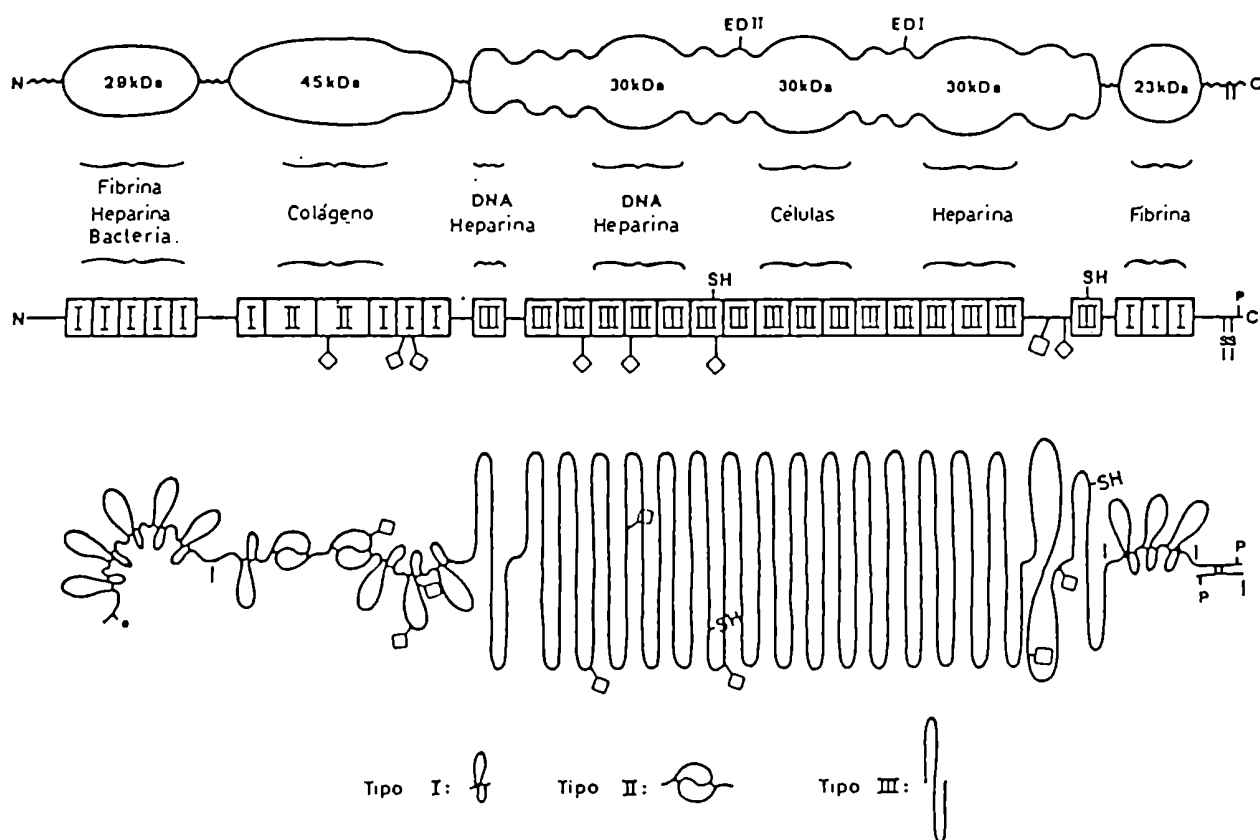


Figura 12: Estructura de los dominios de la FN. Cada una de las tres tipos de homologías se encuentra indicado con números romanos (I, II, y III) o por símbolos (los símbolos se observan en la línea inferior). En la variante más larga de la FN existen 12 homologías de tipo I, 2 de tipo II y 17 de tipo III. Los fragmentos que pueden obtenerse por proteólisis enzimática se encuentran indicados por sus tamaños y capacidades de unión respectivas. EDI y EDII son los dominios "extras" de tipo III que están presentes en algunas FNs celulares. SH, grupos sulfidrilos libres; *, sitio de transglutaminasa; \diamond oligosacáridos con grupos glucosaminos en las bases; \square oligosacáridos con grupos galactosaminos en las bases; P, grupos fosfatos.

La FN es sintetizada como un preprolipéptido. La secuencia prepro tiene 31 aa en humanos y 33 aa en rata. No se determinó exactamente el sitio de hidrólisis de la secuencia pre. La secuencia pro termina con dos residuos básicos y es liberada por una enzima proteolítica (55,59,59).

1.3.3.LA ESTRUCTURA DEL GEN.

Si bien existen varias isoformas de la FN todas ellas están codificadas por el único gen y son originadas a través del "splicing alternativo" del transcrito primario del mismo (47,60).

El gen de la FN de rata tiene aproximadamente 70 kb y 47 exones (61).

No se conoce la estructura completa del gen humano.

Como vimos anteriormente, la FN está formada por la repetición de tres tipos de homologías, lo que sugiere que el gen proviene de la endoduplicación de varios minidominios originales, o módulos tal que cada uno se corresponde con un tipo de homología (62).

Según estudios hechos con el gen de rata, ocho de las doce homologías de tipo I, están codificadas por un único exón cada una igual que las dos homologías de tipo II. La última homología de tipo I es una excepción y está codificada por dos exones (59,63).

La mayoría de las homologías de tipo III están codificadas por dos exones, salvo las homologías III8 , III13 (EDII y EDI) y III10 que tanto en humanos como en rata están codificadas por un único exón cada una.

Los exones EDI, y EDII, pueden sufrir un procesamiento alternativo a través de un mecanismo conocido como "exon skipping", y así originar las diferentes variantes.

Figura 13.

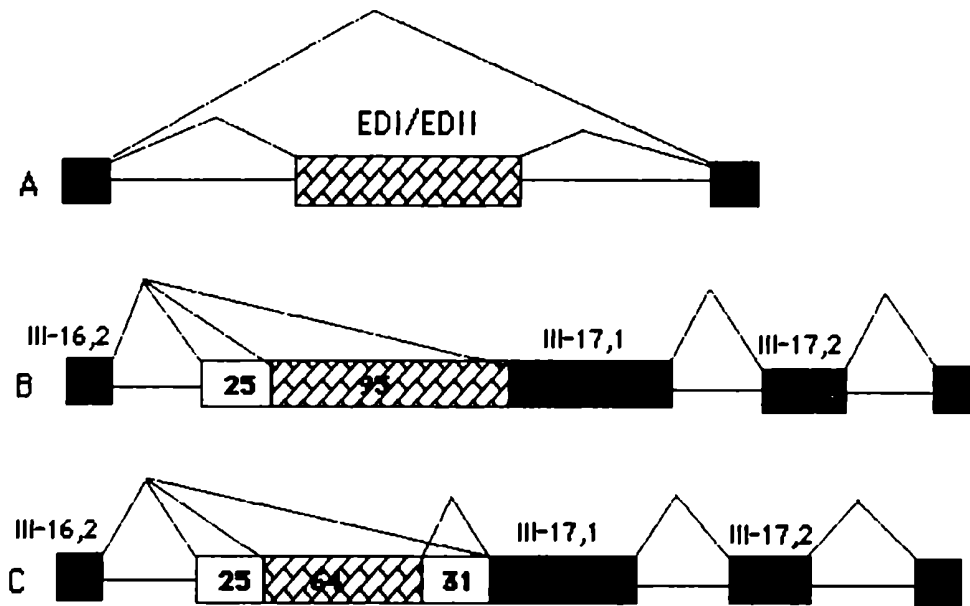


Figura 13: Diferentes tipos de procesamiento alternativo del transcripto primario del gen de la FN. A) (humano y rata) Las dos homologías de tipo III, EDI, y EDII se encuentran codificadas en un único exón que puede ser omitido por un mecanismo de "exón skipping" durante el procesamiento. B) (rata). La última homología de tipo III (III17) está codificada por dos exones (II17,1 y II17,2). III17,1 se conecta directamente con la secuencia codificante de IIICS que contiene sitios de procesamiento alternativos. La subdivisión del exón durante el procesamiento puede dar tres mRNAs diferentes. C) (humanos) El gen contiene un sitio de procesamiento extra respecto del de rata, y es capaz de originar cinco mRNAs diferentes.

¿Qué ocurre con la tercera región de procesamiento alternativo conocida como IIICS?

En rata el segmento que codifica para este fragmento está dentro de la primera mitad del primer exón que codifica para la unidad III17. El extremo 5' de este exón tiene tres puntos diferentes capaces de ser reconocidos por el intrón precedente para dar las diferentes longitudes del IIICS de 95, 120, o ningún aa (61,64).

En la FN humana la situación es diferente: dentro del exón que codifica para IIICS, un cambio en una base, genera un sitio capaz de ser reconocido como extremo 5' de un intrón. De esta manera, las variables de IIICS en humano son más que en rata. Se pueden generar segmentos IIICS de 0, 64, 89, 95, o 120 aminoácidos (47,52,56).

1.3.3.DOMINIOS FUNCIONALES.

Las principales macromoléculas con las que interacciona la FN son:

- Colágeno y Gelatina.
- Fibrina y Fibrinógeno.
- Heparina.
- Receptor de la membrana plasmática.
- Factor XIII (transglutaminasa plasmática).
- Bacterias.
- Actina.
- DNA.
- Poliaminas.
- Gangliósidos.
- Acido hialourónico.

1.3.3.a.Dominio de unión a células.

Dentro de una de las homologías de tipo III (III10), presente en todas las variantes de FN, se encuentra el tetrapéptido RGDS, (Arg - Gly - Asp - Ser), el cual media la adhesión de la FN a la superficie celular (65).

La secuencia RGD es común a muchas proteínas relacionadas con la adhesión, existe en la vitronectina, la trombospodina, el colágeno, y es reconocida por un grupo de receptores conocidos como integrinas.

Aproximadamente a 300 aa de distancia de esta secuencia RGDS, hacia el extremo amino terminal, se localiza otro sitio de alta afinidad por las células. Sin embargo este sitio requiere la presencia del anterior para ser funcionalmente activo.

Otros dos sitios con función de unión a células mapean dentro del segmento IIICS, uno está ubicado en su extremo carboxilo terminal y está formado por el tetrapéptido REDV (Arg - Glu - Asp - Val), y el otro está ubicado en su extremo amino terminal y se denomina CS1 (66). Estos dos últimos sitios, están presentes o ausentes de la proteína según el tipo de procesamiento alternativo del segmento IIICS.

La presencia de múltiples sitios de unión a células a lo largo de la FN, está relacionada con el rol de esta proteína en la regulación del comportamiento celular y especialmente durante el desarrollo embrionario (67). Figura 14.

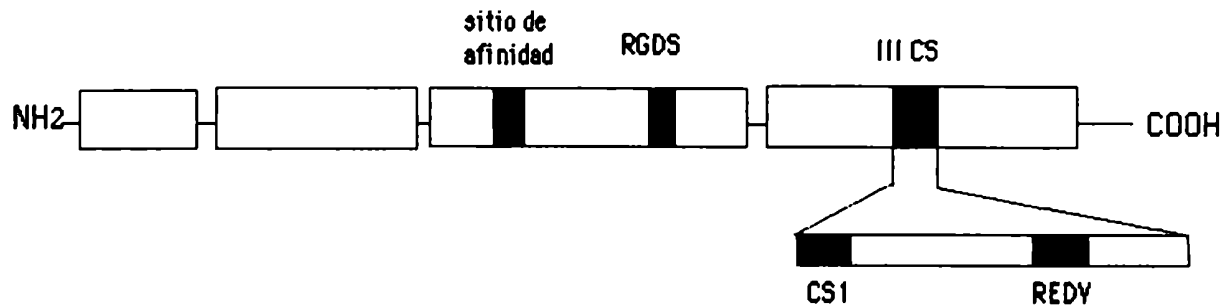


Figura 14: Diferentes sitios de unión a células identificados sobre la fibronectina.

1.3.3.b. Dominio de unión al colágeno.

La FN puede unirse rápidamente a los colágenos de tipo I, II, III, IV, y V. Este dominio se encuentra cercano al extremo amino terminal de la molécula. La región de unión al colágeno de la FN intacta, se une con gran afinidad a la gelatina, y esta unión puede inhibir la unión de macromoléculas a regiones adyacentes como por ejemplo la actina o el fibrinógeno (68).

La región de unión al colágeno es la menos inmunogénica de la proteína. Este dominio es importante en la organización espacial de la FN y del colágeno en la matriz extracelular (69).

1.3.4. FUNCIONES.

La FN es uno de los principales componentes de la matriz extracelular, las células interactúan con esta matriz durante el desarrollo embrionario, la regulación del crecimiento, la modulación de la forma celular, la transformación oncogénica, la migración celular y la metástasis. Transitivamente la FN en mayor o menor grado, está involucrada en todos estos procesos.

La FN de la matriz extracelular estaría relacionada con el citoesqueleto a través de una asociación transmembrana representada por un complejo supramolecular regulador del comportamiento social de las células (70-71).

De esta manera en las células transformadas, donde el citoesqueleto se encuentra desorganizado, disminuye la habilidad de unir FN y las células tienen baja capacidad de adhesión y de "spreading".

La embriogénesis es un proceso morfogénico que involucra interacciones de las células entre sí y con su medio ambiente inmediato: la matriz extracelular. La FN es una de las proteínas que constituyen esta matriz. Se observó una clara correlación entre la presencia de FN y la migración celular en el embrión (67).

Una de las principales características de la transformación de células fibroblásticas en cultivo, es la pérdida de la matriz extracelular. Estas células transformadas son capaces de adquirir su fenotipo normal por el agregado de FN (72,73).

Las células epiteliales sintetizan FN que depositan en su matriz extracelular, esta estructura es esencial en el mantenimiento de su fenotipo normal.

La pérdida de la matriz está asociada con la transformación maligna de estas células, y aunque no es un requisito imprescindible para la transformación, cuando ocurre la transformación celular esta pérdida es prominente (74).

Se ha intentado correlacionar la pérdida de la FN de la matriz en células transformadas "in vitro", con su tumorigenicidad y capacidad metastásica "in vivo". Sin embargo esto no fue posible. Se vio por ejemplo que en el estroma del tejido conectivo de carcinomas avanzados existe FN, y que en cánceres de mama tempranos no se encuentra presente (75-76).

Otra posibilidad es que durante el proceso de crecimiento tumoral, se produzca la fragmentación proteolítica de la FN junto con la hidrólisis enzimática de los componentes del tejido conectivo, evento que normalmente sucede durante el crecimiento tumoral.

La reparación de un tejido dañado es una respuesta adaptativa de los organismos que requiere la interacción de muchos tipos celulares e involucra una gran variedad de moléculas. La FN es una de estas moléculas que afecta a varios de los tipos celulares intervinientes en este proceso.

En la siguiente tabla se resumen los roles de la FN durante la cicatrización de heridas:

CELULAS	FUNCION
FIBROBLASTOS	Factor de anclaje durante la migración celular. Quimiotaxis/haptotaxis. Unión a la matriz durante la contracción celular. Sustrato para la unión de colágeno.
EPITELIO	Factor de anclaje durante la migración celular.
ENDOTELIO	Factor de anclaje durante la migración celular. Quimiotaxis/haptotaxis.
MACROFAGOS	Factor de anclaje durante la migración celular. Quimiotaxis. Opsonización. Agregación celular. Estímulo para la producción de factor de crecimiento.
NEUTROFILOS	Opsonización bacteriana.
CELULAS DE SCHWAN/ NEURONAS	Haptotaxis.

En ratas adultas, se encontró que el gen de la FN presenta altos niveles de expresión luego de una herida, tanto en las células que se encuentran en la base de la herida, como en el músculo subyacente y en la dermis lateral de la herida. Sin embargo, en las diferentes áreas difiere el patrón de "splicing" del mRNA de FN. En la dermis adyacente y el músculo, el patrón de "splicing" es idéntico al que presenta la piel de la rata adulta, los segmentos EDI y EDII no se encuentran en el mRNA de la FN. En contraste con esto, EDI y EDII sí están presentes en el mRNA de la FN de las células que se encuentran en la base de la herida. Este último patrón de "splicing" es igual al que presenta la FN durante la embriogénesis temprana. Por lo tanto, esto indicaría que este patrón de "splicing" es el más apropiado para la migración celular y la proliferación celular asociada con la reparación de los tejidos (77).

1.3.5. EL PROMOTOR DEL GEN DE LA FIBRONECTINA.

(Figura 15)

```

-500                -480                -460
CTGCAAGGGTCGTGGATATTTTATGGG|TTTTCTTCCTCACAAATACTCCTATAGCAG

-440                -420                -400
AGATTCCCCCCTCCACCCCGAAGAG|AGGTGACGCAATGTCCTCAACACTACCCACC

-380                -360                -340
CCCAAT|AAAAAGAAAAGGGGAGGGGG|GAGCGTCTTGCAACCCCTTGCTTACACAGTC
CAAT

-320                -300                -280
CAGCCACTCCCTTTCTCCAGCCGC|TCCCATCCCTCCCCATCCCTAAAAAGTTTG

-260                -240                -220
ATGACC|GCAAGGAARCCGAAAAAAAG|TTGTCTTGCCCCAGTCCTGGCGGCCATCAGCA

-200                -180                -160
TCTCTTTTGTTCGCTGCGAACCCACA|GTCCCCCGTGACGTCACCCCGAGCCCGGGCCCAAT
CRE                                CAAT

-140                -120                -100
CGGGCG|CGGTGGGTGCGGCGGCCGG|CGGGCGGGCGGGTGGGGTGGGGCGGGCGGGGAC
RP-2*                            SP-1

-80                -60                -40
AGCCCC|GCGGGTCTCTCTCCCCCGG|GCCCCGGGCCTCCAGAGGGGCGGGAGGGCCGTCC
RP-2

-20                +1                +20
CATATA|AGCCCGGCTCCCGCGCTCCG|ACGCCCGCGCCGGCTGTGCTGCACAGGGGGAGGA
TATA

```

GAGGGAA|CCCCAGGCGCGAGCGG

* Esta secuencia consenso está presente en la cadena no codificante.

La secuenciación de la región 5' flanqueante del gen de la FN humana permitió definir las secuencias consenso para la unión de los factores de transcripción (58) descritos en la Figura (Figura 15).

En los resultados y en la discusión se analizará la función de dichos consensos.

1.4.LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.

Ya en el año 1672, se había descrito por primera vez la diferenciación de los folículos ováricos en el cuerpo lúteo.

Los folículos ováricos son la unidad funcional básica del ovario. Están formados por una capa externa formada por las células de la teca, que rodean a una capa interna de células, llamadas de la granulosa. Estas últimas rodean a su vez al complejo celular más interno que contiene al ovocito. El ovocito se encuentra protegido por una capa de mucopolisacáridos conocida como la zona pelúcida. La primer capa de células de la granulosa ubicada sobre la zona pelúcida se denomina corona radiata. El espacio formado entre el complejo que contiene al ovocito y las células de la granulosa se llama antro, y está lleno de un fluido conocido como fluido folicular cuya composición es semejante a la del plasma sanguíneo (78,79). Ver Figura 16.

La maduración de un folículo ovárico y su transformación en cuerpo lúteo con aumento de la síntesis de esteroides, está regulada por la secreción de las gonadotrofinas pituitarias, FSH, LH y PRL.

En respuesta a estas hormonas, varios compartimentos del folículo interactúan integradamente para secretar los esteroides sexuales: estrógenos y progesteronas, y para producir un óvulo fertilizable.

Pero no todos los folículos en un ovario dado responden durante el mismo ciclo, es más, solamente un número limitado de folículos ovulan durante la vida de una mujer.

Luego de la ovulación, las células de la granulosa sufren cambios profundos en cuanto a su respuesta hormonal y a su capacidad de producir esteroides, se luteinizan, constituyendo el principal componente del cuerpo lúteo, pasando a ser la principal fuente de progesterona del ovario (78,79).

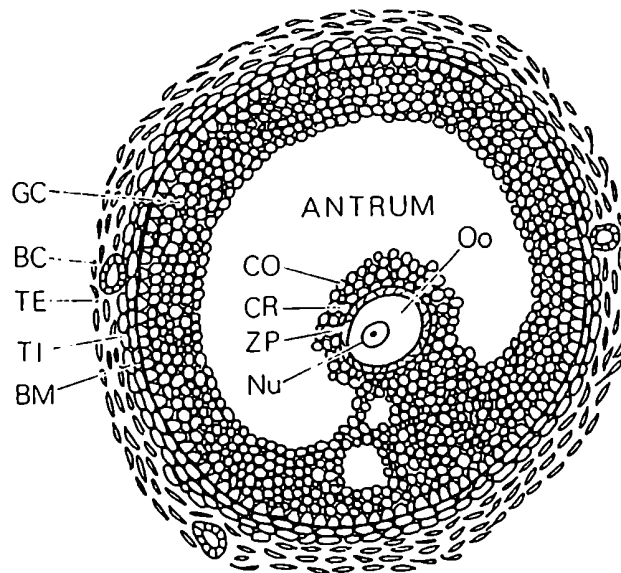


Figura 16: Componentes básicos de un folículo preovulatorio. Oo, ovocito; ZP, zona pelúcida; CO, células del cúmulo del óvulo; GC, células de la granulosa; BM, membrana basal; TI, células tecales internas; TE, células tecales externas; BC, capilares sanguíneos; CR, corona radiata; Nu, núcleo.

1.4.1. LA DIFERENCIACION Y LA LUTEINIZACION DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA

Durante el proceso de maduración del folículo ovárico las células de la granulosa experimentan un marcado cambio en su estado de diferenciación, de células especializadas en la síntesis y secreción de proteínas constitutivas del fluido folicular a un tipo celular con una alta capacidad esteroideogénica y una reducida secreción de proteínas. Este proceso se desarrolla bajo la influencia de múltiples señales hormonales de tipo endócrino paracrino, neuromodulador y autócrino.

Al inicio del proceso de diferenciación, las células de la granulosa están dotadas solamente de receptores para la hormona FSH. Posteriormente esta hormona ejerce un efecto inductor sobre la producción de sus propios receptores así como

también de receptores para LH, EGF, prolactina y β adrenérgicos (78,79). Figura 17.

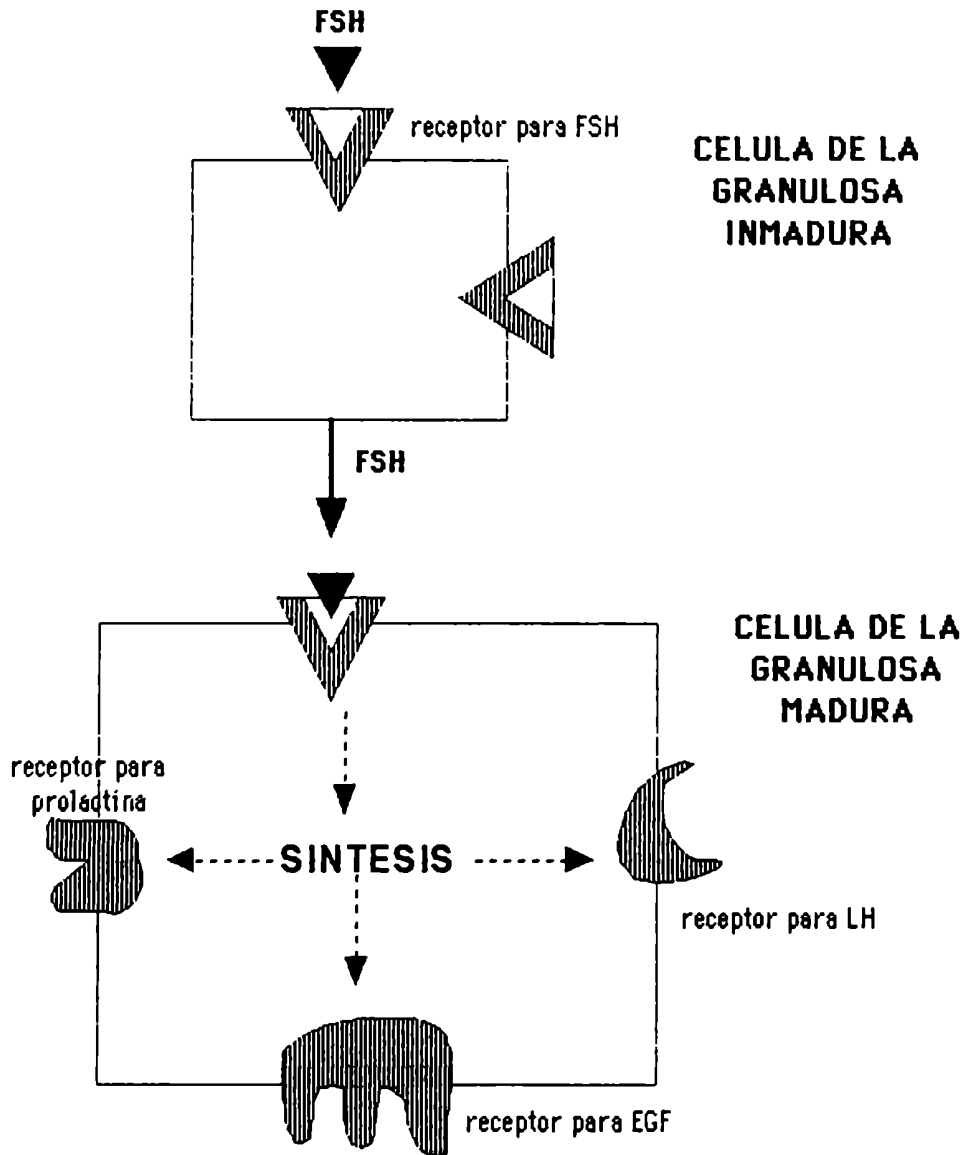


Figura 17: Diferenciación de las células de la granulosa durante la maduración del folículo ovárico.

1.4.2. LA PRODUCCIÓN DE ESTROGENOS DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.

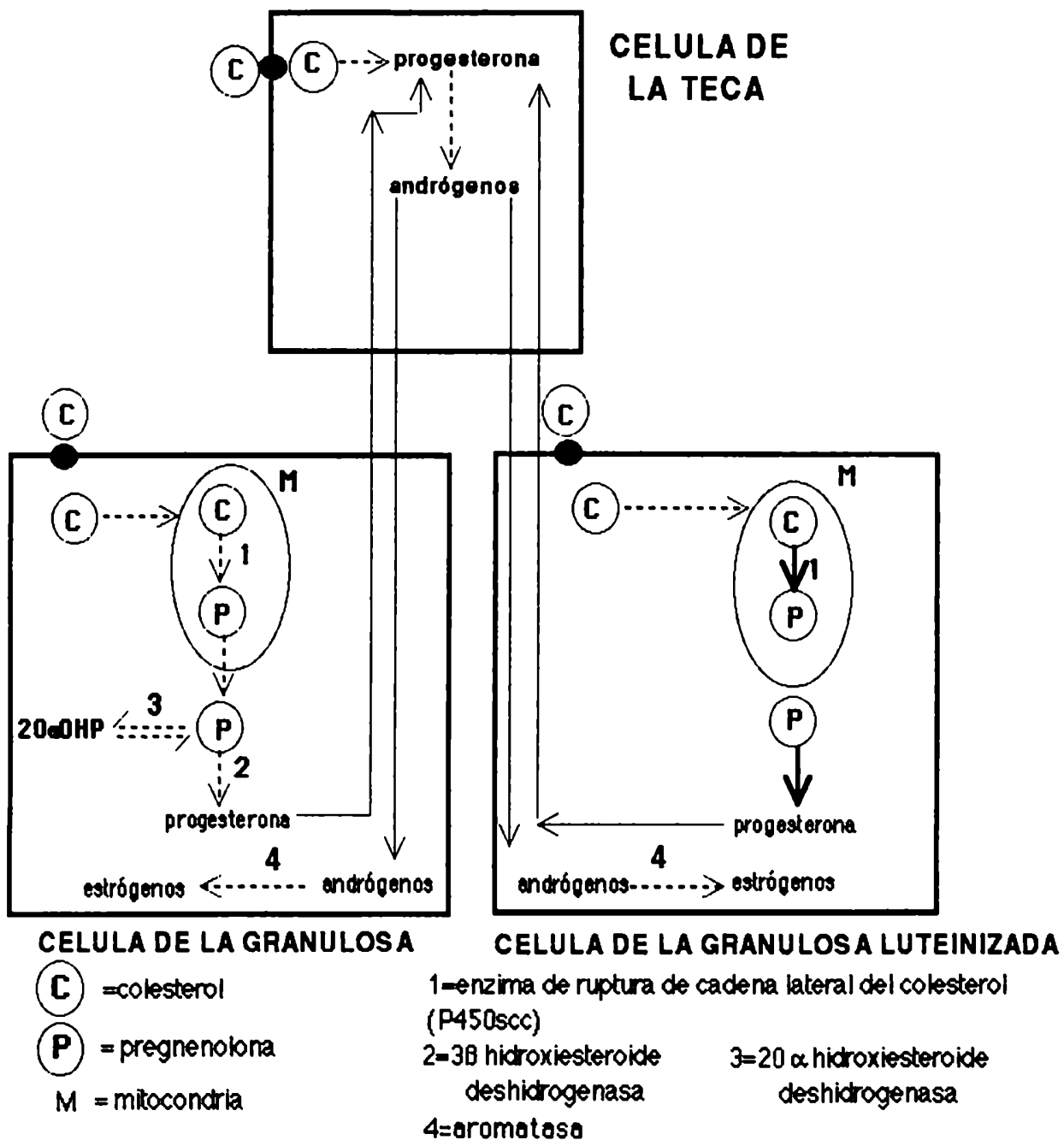


Figura 18: Producción de estrógenos de las células de la granulosa.

ESTIMULACION DE FUNCIONES GENERALES DE LA CELULA(78)

FSH	LH	PRL	EGF	IGF	FGF	TGFB	GnRH	inhibina	
+	-		+	+	+	+/-			síntesis de DNA
+	+		+					+	síntesis de proteínas
+									captación de gluc. y formación de lactato
+									redondeo y agregación celular
+									formación de "gap junctions"
+									formación de microvilli
	+								glicólisis
	+								alteración de la forma celular
	+								reducc.del tamaño de los "gap junctions"

PROCESOS RELACIONADOS CON LA MEMBRANA PLASMÁTICA.(78)

FSH	LH	PRL	EGF	IGF	FGF	TGFB	GnRH	inhibina	
+	+								activación de la adenilato ciclasa y formación de cAMP
+							+		activación de fosfodiesterasas
+									formación de "cAMP binding protein"
+									aumento de la microviscosidad de la membrana plasmática
+	+								estimulación de la PKA
	+						+	+	estimulación del recambio de fosfolípidos
			+				+		inducción de la maduración del oocito
								+	inhibición de la liberación de FSH de la pituitaria

*EFECTO EN PRESENCIA DE FSH

1.4.4. SINOPSIS DEL ROL DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS SOBRE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.

1.4.4.a.Los estrógenos.(78)

*Proliferación de las células de la granulosa.

*Actividad antiatrésica.

*Aumento del acople de las células de la granulosa, a través de la formación de "gap junctions".

*Formación del antro.#.

*Aumento de la síntesis del receptor celular para estrógenos.

*Aumento de la síntesis de receptores para LH y FSH.#.

*Aumento de cAMP.#.

*Aumento de la síntesis de la proteína CBP.#.

*Producción de aromatasas.#.

*Producción de progesterona.#.

= efecto en presencia de FSH.

1.4.4.b.Los andrógenos.(78)

*Estimulación de la atresia folicular.

*Aumento de la esteroidogénesis estimulada por gonadotrofinas.

*Estímulo en la producción de progesterona.

1.4.4.c.La progesterona.(78)

*Regulación del crecimiento del folículo.

*Autorregulación de la síntesis de progesterona.

*Inhibición de la aromataasa.

1.4.4.d.Los glucocorticoides.(78)

*Inhibición de la liberación de gonadotrofinas a nivel hipotalámico.

*Inhibición de la aromataasa.#.

= efecto en presencia de FSH.

1.4.5.LAS GRANULOSAS. EL CITOESQUELETO Y LA TRANSDUCCION DE SEÑALES..

Durante la diferenciación de las células de la granulosa varía la síntesis y la expresión de algunas proteínas del citoesqueleto. Así, la síntesis de vinculina,

actina y tropomiosina, se encuentra dramáticamente reducida, mientras que la síntesis de proteínas microtubulares como la α 1, y la β tubulina, y la vimentina permanece invariable (80-83). La disminución de la síntesis de las proteínas del citoesqueleto es consecuencia de la reducción de los niveles de los mRNAs de las proteínas respectivas. Estos cambios permiten generar el fenotipo celular óptimo para la esteroidogénesis.

Poco se sabe acerca de los mecanismos por los cuales las señales generadas en la membrana plasmática por los diferentes factores hormonales o no hormonales son transducidos al citoesqueleto para regular la esteroidogénesis.

Se demostró que la vinculina se fosforila en respuesta a estimulaciones por Ca^{++} y por TPA, lo cual sugiere que la PKC está involucrada en la modulación de al menos un componente del citoesqueleto de actina, el cual a su vez está involucrado en la determinación de los contactos celulares y la organización de los microfilamentos (84).

El sistema de microfilamentos interviene en la transducción de señales del medio ambiente al interior de las células. Más aún, existen conexiones directas entre componentes de la matriz extracelular como la fibronectina y el heparan sulfato y el sistema de microfilamentos a través de receptores específicos de las membranas celulares (85,86).

1.4.6.LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.

Las células de la granulosa pueden ser cultivadas por períodos prolongados, observándose que mantienen su capacidad de secretar progesterona y estradiol y de sufrir luteinización como normalmente ocurre "in vivo". Además, tratamientos hormonales sobre estos cultivos producen un aumento de la biosíntesis de esteroides y de los receptores hormonales (87-89).

El sistema de cultivo más estudiado es el de cultivos primarios de granulosa de rata originados a partir de ratas hipofisectomizadas inmaduras tratadas con estrógenos (78).

En este modelo experimental ocurre que:

- 1) El tratamiento con estrógenos "in vivo" produce la formación de múltiples folículos prenatales lo cual permite tener un gran número de células relativamente homogéneas, en el mismo estado de desarrollo.

- 2) Las células no están expuestas a gonadotrofinas endógenas y mantienen un estado relativamente poco diferenciado.

3) Durante el aislamiento celular no se usan ni enzimas proteolíticas ni colagenasas, eliminándose así posibles cambios en la respuesta hormonal.

4) Si se usa medio de cultivo sin suero, es posible analizar los efectos de las hormonas o de los factores del suero sobre estas células al adicionarlos selectivamente.

5) Los cultivos primarios de las granulosa, a diferencia de otras líneas celulares de ovario, mantienen la respuesta hormonal y las funciones fisiológicas de las células "in vivo".

Características de este cultivo celular:

1) No se tienen en cuenta cambios en la vasculatura folicular o en la microcirculación que son importantes para la liberación de las hormonas a los folículos "in vivo".

2) No se tienen en cuenta las interacciones entre las células tecales y de la granulosa ni las interacciones entre las granulosa y el ovocito. Normalmente las células tecales proveen de precursores de la esteroidogénesis a las granulosa, así como también, secretan factores que promueven el crecimiento y la diferenciación de las granulosa.

3) No se tienen en cuenta las subpoblaciones de granulosa que existen en un folículo y la diferencia que entre ellas existe en cuanto a funcionalidad y estructura.

1.5.LA FIBRONECTINA EN LA REPRODUCCION.

Las células secretan proteínas y glicoconjugados como colágenos, elastina, proteoglicanos, fibronectina, laminina, etc, para llenar los espacios intercelulares de la matriz extracelular que poseen. Muchos de estos componentes interactúan con las células participando así en el control del comportamiento celular. El anclaje, la migración, y la diferenciación celular parecen originarse en respuesta a estas interacciones.

Los ovocitos de los mamíferos se encuentran detenidos en el estado de diplotene de la primera división meiótica antes que la gonadotropina LH inicie la reanudación de la meiosis.

Durante el proceso de crecimiento folicular ocurren una secuencia compleja de cambios que incluyen, la diferenciación de las células de la granulosa y la interacción de los componentes de la matriz extracelular con las células de la

granulosa. Todo esto afecta la diferenciación y la maduración citoplasmática y nuclear del ovocito.

Durante la maduración y el crecimiento del folículo ovárico la hormona FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa y la formación del antro. La FSH provoca un aumento de las comunicaciones intracelulares entre células vecinas mediante uniones conectoras ("gap junctions"). Se demostró que existen "gap junctions" entre las células del cúmulo del ovocito y el mismo ovocito así como también que la hormona LH provoca la ruptura de estas comunicaciones. Se propone entonces que la eliminación de las "gap junctions" entre el cúmulo y el ovocito es un paso crucial que conduce a la reanudación de la meiosis (90).

Durante la primera etapa del desarrollo, la hormona predominante es la FSH, y en este período se observa un aumento de la producción de glicosaminoglicanos y una disminución de la síntesis de fibronectina. Luego, en la etapa en donde la hormona predominante es la LH se observa lo contrario, una disminución de la producción de glicosaminoglicanos, y un aumento de la producción de fibronectina (91,92).

Por otro lado se demostró que la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), que induce la terminación de la meiosis en el ovocito promueve la secreción de fibronectina en células de la granulosa de rata. Estos resultados permitieron deducir entonces que la fibronectina participa de alguna manera en la reanudación de la meiosis (93,94).

Para estudiar el rol de la fibronectina en la maduración del ovocito se usó el péptido sintético GRGDS, usando como control su análogo inactivo GRGESP. Únicamente el primero de estos dos es capaz de inhibir la maduración espontánea del ovocito en forma reversible (95).

Resumiendo, la fibronectina provee el medio ambiente extracelular a las células del cúmulo durante el proceso de maduración del ovocito, y lo afectaría indirectamente ya que mediaría la terminación de las comunicaciones entre el cúmulo y el ovocito lo cual es crucial en la maduración del mismo.

1.6.LA REGULACION DE LA SINTESIS DE LA FIBRONECTINA EN LAS CELULAS DE LA GRANULOSA.

Ya en 1980 se identificó a la fibronectina como una de las proteínas secretadas al medio por un cultivo primario de células de la granulosa bovinas (96).

En 1984 se demostró que las células de la granulosa sintetizaban y secretaban fibronectina y que la hormona GnRH estimulaba la producción de esta proteína

simultáneamente con la inhibición de la esteroidogénesis que esta hormona normalmente induce (98).

En 1985 se vio que las hormonas responsables de la citodiferenciación de la granulosa influenciaban también sobre la secreción de los componentes de la matriz extracelular, especialmente sobre la fibronectina. Luego de 24 o 48 horas de cultivo de células de la granulosa de rata , se encontró a la FN como la principal proteína secretada. Tratamientos con FSH sobre estas células llevaban a la citodiferenciación del cultivo y a la inhibición de la síntesis de FN. Se consideró entonces a la FN como un posible marcador del estado de diferenciación de las granulosas (97).

Sin embargo poco se sabía a cerca de los mecanismos que relacionaban la actividad hormonal y la síntesis de fibronectina.

**MATERIALES
Y
METODOS**

2.1. AISLAMIENTO Y CULTIVOS CELULARES.

2.1.a. Preparación y cultivo de células de la granulosa de rata.

Se obtuvieron ovarios de ratas hembras de 24 o 25 días (Sprague - Dawley), luego de tratamiento con DES (implantes de s.c.silastic que contienen 5 mg de dexametasona), por un período de 48 horas. Las células de la granulosa fueron preparadas siguiendo el método de Campbell, con algunas modificaciones (98).

Los ovarios fueron disgregados suavemente con una aguja de calibre 30 e incubados en medio DMEM (4,5 g glucosa/litro)/F12 (1:1) + EGTA (6 mM) + HEPES (10mM) por 15 minutos a 37°. Luego fueron lavados dos veces e incubados en DMEM:F12 + HEPES (10 mM) + sacarosa (0,5 M) por 5 minutos a 37°. Luego de esta incubación se diluyó el medio con dos volúmenes de DMEM:F12 + HEPES (10 mM), y se dejó que los ovarios sedimentaran solos. Las células de la granulosa fueron obtenidas luego de presionar los ovarios dentro de dos piezas de nylon mesh (Nytex 50) y se resuspendieron en DMEM:F12 (1:1) + HEPES (10 mM). Se determinó el número total de células obtenido, así como también su viabilidad, luego de 5 minutos de incubación con azul de tripan. Las células vivas no son permeables al colorante, mientras que las muertas sí lo son. Se obtuvieron entre 3 y 4 millones de células por ovario.

Las células fueron sembradas sobre placas de plástico con medio DMEM:F12 (1:1) suplementado con 10% v/v de NCS, más los antibióticos penicilina (10 unidades por litro), estreptomycin (100 mg por litro), el antimicótico anfotericina (25 mg por litro) y 2,2 g por litro de bicarbonato de sodio y se mantuvieron en una estufa humidificada (37°C, 5% CO₂). Luego de dos horas de cultivo se cambió el medio por el mismo medio fresco.

2.1.b. Preparación y cultivo de las células de la granulosa bovina.

Se obtuvieron ovarios de vaca de un matadero local. De ellos se aspiraron folículos de entre 3 a 5 mm de diámetro con una aguja de calibre 19. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 200 g durante 10 minutos luego de lo cual fueron lavadas dos veces con medio DMEM:F12 (1:1) + HEPES (10 mM). El "pellet" celular fue resuspendido en el medio de cultivo DMEM (4,5 g glucosa / litro):F12 (1:1), conteniendo 2,2 g de bicarbonato de sodio por litro y suplementado con 10% v/v de NCS más los mismos antibióticos y antimicóticos que fueron usados para las células

de la granulosa de rata. Los cultivos fueron mantenidos en una estufa a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ (99).

2.1.c.Cultivo de células NIH - 3T3.

Esta línea celular de fibroblastos de ratón fue cultivada en medio DMEM (4,5g glucosa/litro), conteniendo 3,7 g de bicarbonato de sodio por litro y suplementado con 10% v/v de FCS más los antibióticos y antimicóticos en iguales concentraciones que en los casos anteriores.

2.2.CARIOTIPO DE LA LINEA CELULAR BOVINA BGC - 1.

El cariotipo de esta línea fue realizado por métodos estándares. Los cromosomas fueron teñidos con el reactivo de Giemsa para su caracterización, y también fueron sometidos a bandeado G con tripsina (100). Se analizaron un total de 37 células de 5 pasajes diferentes.

2.3.MEDICION DE LA PRODUCCION DE ESTEROIDES.

Los niveles de estradiol en el medio de cultivo fueron medidos por radioinmunoensayo usando un anticuerpo específico (101).

2.4.ENSAYOS DE ADHESION CELULAR A DIFERENTES SUSTRATOS.

Para los ensayos de adhesión de las células a diferentes sustratos, se colocaron gotas de diferentes proteínas adhesivas sobre placas de cultivo a una concentración de 20 µg/ml. Se dejaron durante 2 horas a temperatura ambiente, luego de lo cual fueron retiradas y las placas lavadas tres veces con PBS. Posteriormente, las placas fueron dejadas durante 1 hora con BSA 1% en PBS p/v a temperatura ambiente.

Por otro lado las células fueron cosechadas, centrifugadas y resuspendidas en medio sin suero. Esto se repitió tres veces. Finalmente las células fueron sembradas a una densidad de 1,5 10⁶ células por caja de 6 cm de diámetro e incubadas a 37°C hasta detectar la adhesión celular.

Las células fueron fijadas en 4% v/v de formaldehído durante 1 hora y observadas al microscopio.

2.5. TRATAMIENTOS CELULARES.

2.5.a. Tratamientos con Bt₂cAMP, forskolina y FSH.

Se cubrieron las placas de cultivo con 2 ml de NCS por caja de 10 cm de diámetro, durante 1 hora a 37°C. Al cabo de este tiempo el suero fue removido y las células fueron plaqueadas con medio DMEM:F12 suplementado con 1% v/v de NCS y los antibióticos respectivos, a una densidad aproximada de 7×10^4 cél/cm². A las 4 horas de plaqueadas, el medio fue cambiado por el mismo medio fresco. En este momento fueron agregadas las drogas requeridas para los diversos tratamientos. El Bt₂cAMP a una concentración final de 0,5 mM, la forskolina a una concentración final de 10 mM y la FSH a 200 ng/ml. En todos los tratamientos fue usado el análogo del cAMP, conocido como Bt₂cAMP debido a que es más permeable y menos susceptible a hidrólisis que el propio cAMP.

2.5.b. Tratamiento con Bt₂cAMP de la línea celular NIH - 3T3.

Se siguió la misma metodología que para las células de la granulosa, con la excepción de que en todo momento tanto durante la pegada celular como durante los tratamientos se usó el medio DMEM suplementado con 10% v/v de FCS.

2.5.c. Tratamientos con TPA de las células de la granulosa bovina y de la línea celular NIH - 3T3.

Las células fueron sembradas a una densidad aproximada de 5×10^4 cél/cm² en medio DMEM:F12 (1:1), suplementado con 10% v/v de NCS para las células de la granulosa y con medio DMEM suplementado con 10% v/v de FCS para la línea celular NIH-3T3. Luego de cuatro horas se cambió el medio por el medio correspondiente fresco. En este momento se agregó el TPA y la droga se dejó durante el tiempo requerido para el ensayo.

2.6. INMUNOFLUORESCENCIAS.

Se cultivaron las células sobre cajas de plástico hasta que alcanzaron la densidad deseada o durante el tiempo requerido por el ensayo. Las células fueron lavadas 2 o

3 veces con PBS. Fueron fijadas con formaldehído 4% en PBS durante 1 hora, y luego lavadas 2 o 3 veces con PBS.

Para observar estructuras intracelulares se trataron las células durante 4 minutos con una solución de tritón 0,4% v/v en PBS, y luego se lavaron 2 o 3 veces con PBS.

Se seleccionaron pequeñas regiones sobre las placas de cultivo y se marcaron sus bordes con un lápiz de pasta para ser usadas en las inmunofluorescencias. Las células ya fijadas de estas zonas fueron cubiertas durante 1 hora con 100 ml de la dilución adecuada del 1º anticuerpo y luego lavadas 2 o 3 veces con PBS. Las regiones seleccionadas fueron cubiertas con el 2º anticuerpo. Se usó una anti IgG de conejo hecho en cabra, acoplado a rodamina, diluído 1/50 en PBS y se incubó durante 1 hora. Luego se lavaron las células 2 o 3 veces con PBS. Las zonas con la inmunofluorescencia fueron montadas en moviol y observadas en un microscopio de epifluorescencia.

2.7. MARCACION RADIOACTIVA DE LAS CELULAS DE LA GRANULOSA Y DE LA LINEA CELULAR NIH - 3T3. DETECCION DE LA FIBRONECTINA.

Las células fueron crecidas hasta el momento de la marcación en cajas de 24 pocillos de 1 cm de diámetro cada uno. Previamente a la marcación, las células fueron ayunadas de metionina durante 1 hora con medio DMEM carente de metionina suplementado con 0,5 % v/v del suero correspondiente al tipo celular. Se marcaron las células durante 4 horas o durante toda la noche con medio DMEM carente de metionina suplementado con ³⁵S metionina (20 µCi/pocillo), más 0,5% v/v del suero correspondiente al tipo celular si la marcación se realizaba sólo durante 4 horas y con 10 % v/v del suero correspondiente cuando la marcación se realizaba durante toda la noche. Transcurrido este período de tiempo, se colectaron los medios de cultivo en tubos "eppendorf", e inmediatamente cada una de las marcaciones fue dividida en dos fracciones, a una de ellas se le agregó "buffer" de siembra y se la hirvió durante 5 minutos, a la otra fracción se la sometió a inmunoprecipitación. Los extractos celulares correspondientes a las células marcadas fueron obtenidos luego de incubar durante 10 minutos en hielo a las células con una solución de Tritón X 100 2 % v/v en PBS, y de raspar la capa celular con una espátula de goma. Cada uno de los extractos celulares fue dividido en dos fracciones, a una de ellas se le agregó "buffer" de siembra y se la hirvió durante 5 minutos, y a la otra fracción se la sometió a inmunoprecipitación. Para las inmunoprecipitaciones, se incubó el medio o el extracto con un antisuero de conejo

contra Fibronectina a una dilución de 1/100, o con anticuerpo anti EDI hecho en cabra a una dilución de 1/150 durante una hora. Posteriormente se incubaron las muestras con proteína A sepharosa durante 1/2 hora. Luego de varios lavados, a los "pellets" de proteína A sepharosa se les agregó "buffer" de siembra y se los hirvió durante 5 minutos. Todas las muestras, tanto las que contenían proteínas totales como las inmunoprecipitadas fueron sometidas a una electroforesis de geles de poliacrilamida 6% conteniendo dodecilsulfato de sodio. Finalmente los geles fueron expuestos y revelados de acuerdo a las metodologías normales.

2.8. EXTRACCIÓN DE RNA. DOT BLOT. NORTHERN BLOT.

2.8.a. Extracción de RNA.

Para la extracción de RNA fue utilizado el método de Favaloro y colaboradores con algunas modificaciones (102).

Las monocapas celulares fueron lavadas con PBS y levantadas con una espátula de goma. Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 5000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante, y el "pellet" celular fue resuspendido en 250 µl de "buffer" BLI, por caja de células de 10 cm confluyente agitando enérgicamente (vortex) durante 5 minutos. Se volcó cuidadosamente esta suspensión sobre un colchón de igual volumen del "buffer" BLII. Los tubos fueron centrifugados 20 minutos a 9000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase turbida superior y a esta fase se le agregó un volumen de "buffer" para la proteinasa K, más la proteinasa K a 200 mg/ml, y se la incubó durante 30 minutos a 37°C. Se agregó un volumen de fenol/cloroformo, se agitó en vortex y se centrifugó 2 minutos a 6000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó acetato de sodio a una concentración final de 0,3 M y se la precipitó con 2,5 volúmenes de etanol. El "pellet" fue resuspendido y reprecipitado de la misma manera con etanol y acetato de sodio.

Se controló la calidad de los diferentes RNAs a través de la corrida de una alícuota de cada muestra en una electroforesis en un gel de agarosa 1% p/v en "buffer" TBE con Bromuro de Etidio, a 200 volts.

Los RNAs fueron cuantificados, por comparación de las tinciones de las diferentes preparaciones con bromuro de etidio en el gel de agarosa, y por medición de la absorbancia de luz ultravioleta a 260 nm.

BLI = "Buffer" de lists I.

0,14 M NaCl

1,5 mM MgCl₂

10 mM Tris HCl pH 8,6

0,5 % v/v NP40

10 mM ribonucleósidos de vanadilo

BLII = "Buffer" de lists II.

0,14 M NaCl

1,5 mM MgCl₂

10 mM Tris HCl pH 8,6

1% v/v NP40

24 % sacarosa p/v

"Buffer" 2 X para la proteínasa K.

0,2 M Tris HCl pH 7,5

25 mM EDTA

0,3 M NaCl

2% p/v SDS.

"Buffer" 10 X TBE.

Tris Base 0,5 M

ácido bórico 0,5 M

EDTA Na₂2H₂O 10 mM

2.8.b.Dot Blot.

Aproximadamente 10 mg de RNA total fueron llevados a un volumen final de 50 ml con el agregado de 30 µl de 20 X SSC y de 30 µl de 37% (p/p) de formaldehído y la cantidad necesaria de agua. Se desnaturalizó el RNA durante 15 minutos a 60°C. Se sembraron 100 µl de muestra en un aparato de Dot Blot conteniendo una membrana de nitrocelulosa. Se aplicó vacío durante 30 segundos. El RNA fue fijado a la membrana por horneado a 80°C durante 2 horas. Se prehibridó en 50% v/v formamida, 5 X SSC, 5 X solución de Denhardt's, 0,1% p/v SDS, y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmon, a 42°C durante 1 hora. Para la hibridación se usó la

misma solución que para la prehibridación conteniendo como sonda al plásmido pFH154 marcado por "nick translation".

El plásmido pFH154 contiene un fragmento del cDNA del gen de la FN de 2300 pb que abarca 500 pb río arriba del sitio EDI, y 1800 pb río abajo del mismo pero que no contiene a este exón. Se hibridó durante toda la noche a 42°C. Se lavó dos veces la membrana a temperatura ambiente con una solución 0,1% p/v SDS, 2 X SSC y una vez a 65°C a 0,1% p/v SDS, 2 X SSC. Se expuso la membrana y la placa autorradiográfica fue revelada siguiendo, en ambos casos, los métodos convencionales.

20 X SSC

NaCl 3 M

Na₃ citrato 2H₂O 0,3 M

llevar a pH 7

100 X su Denhardt's.

10 g polivinilpirrolidona

10 g albúmina sérica bovina

10 g Ficoll 400

H₂O hasta 500ml.

2.8.c.Northern Blot.

Aproximadamente 50 µg de RNA total se corrieron en cada pocillo de una electroforesis en un gel de agarosa 1,5% p/v con formaldehído a 200 volts. El gel fue tratado sucesivamente con agua durante 30 minutos, con NaOH 50 mM durante 30 minutos, con 100 mM Tris-HCl pH 7,5 durante 30 minutos y con "buffer" fosfato pH 6,5 25 mM durante 20 minutos. Para la transferencia se usó una membrana de nylon marca Gene Screen previamente tratada durante 20' en el mismo "buffer" fosfato que el gel. La transferencia se llevó a cabo por 48 horas, durante este tiempo se cambiaban periódicamente los papeles absorbentes. El RNA fue fijado a la membrana durante 2 horas a 80°C. La prehibridación se hizo en 50% v/v formamida, 1 X SDS, 5 X SSC, 2 X de solución de Denhardt's, y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón, a 42°C durante por lo menos 1 hora.

Para la hibridación se usó la misma solución, conteniendo como sonda a un clon de cDNA de Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa o a un fragmento del gen de FN

marcados en ambos casos por "nick translation" o una sonda específica para el reconocimiento de la FN de tipo celular conteniendo específicamente la región EDI. La sonda de FN total que se usó es un fragmento de 5768 pares de bases que contiene una región del cDNA del mRNA de la fibronectina humana obtenido del plásmido pFH100 (103). La membrana fue lavada dos veces a temperatura ambiente durante 10 minutos en 2X SSC / 0,1% p/v SDS; 1 vez a 65°C durante 20 minutos en 2 X SSC/0,1% p/v SDS, una vez durante 20 minutos a 65°C en 1X SSC/0.1% p/v SDS; una vez durante 20 minutos a 65°C en 0,5 X SSC/0.1% p/v SDS y una vez durante 20 minutos a 65°C en 0,5 X SSC/ 0.1% p/v SDS. En lo que respecta a otros detalles técnicos se siguió el manual de Maniatis y colaboradores (104).

2.9. TRANSFECCIONES Y ENSAYO DE CAT.

2.9.a. Transfecciones.

Se sembraron cajas de 6 cm de diámetro con células, a una densidad tal que al otro día se encontrasen subconfluentes

La mezcla conteniendo el DNA plasmídico para transfectar fue preparada de la siguiente manera:

Se puso en el fondo de un tubo tipo Falcon de 15 ml la cantidad de agua suficiente para completar 500 µl en la mezcla total. Se agregaron suavemente 15 µg del DNA plasmídico. No se mezcló. Se agregaron 25 µl de CaCl₂ 2,5 M. No se mezcló. Se agregaron 250 µl del "buffer" 2 X HEPES con una pipeta de plástico de 1 ml sumergida hasta el fondo del tubo y con esta misma pipeta se mezcló toda la solución dejando burbujear varias veces el contenido del tubo. Esta mezcla fue incubada 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formen los precipitados de fosfato de calcio.

Se retiró el medio de cultivo de las cajas con las células a transfectar. Los 500 µl de la solución de DNA plasmídico con fosfato de calcio fueron volcados suavemente sobre las cajas de cultivo, e incubados durante 30 minutos a 37°C en la estufa gaseada con CO₂, moviendo las placas periódicamente. Se agregaron 2,5 ml de medio de cultivo. Se dejaron las células durante 5 horas con la mezcla conteniendo el precipitado de fosfato de calcio y los 2,5 ml de medio. Se retiró el medio de las cajas. Se agregó 1 ml de glicerol 15% v/v en "buffer" HEPES, precalentado a 37°C y se incubó por 1 minuto. Luego las células fueron lavadas dos veces con PBS. Se

agregó el medio de cultivo y se incubaron las células transfectadas durante el tiempo deseado.

Los plásmidos usados en las transfecciones son p-223/+45 FN-CAT y p-510/+69 FN-CAT.

El plásmido p-223/+45 FN-CAT se construyó introduciendo un fragmento de 269 pares de bases que contiene la secuencia -223/+45 del gen de la FN humana entre los sitios *AccI* y *HindIII* del plásmido pSV₂ CAT. Para ello la región del plásmido comprendida entre estos dos sitios fue eliminada y los sitios *AccI* y *HindIII* fueron transformados en sitios romos con el uso de la enzima Klenow. El fragmento de FN -223/+45 fue obtenido cortando con la enzima *Bst*NI el clon pIHF PstI-PvuII 0.6. Los extremos *Bst*NI también se hicieron romos con el uso de la Klenow. El clon pIHF PstI-PvuII 0.6 es un subclon del plásmido pgHR37 (56).

El plásmido p-510/+69 FN-CAT fue obtenido introduciendo un fragmento de 579 pares de bases entre los mismos sitios del vector pSV₂ CAT que en el caso anterior. El fragmento de 579 pb contiene la región -510/+69 del gen de la FN y fue también clonado del plásmido pIHF PstI-PvuII 0.6 cortándolo con las enzimas *Pst*I y *Eco*RI. Nuevamente para introducir este fragmento dentro pSV₂ CAT los extremos del fragmento fueron hechos romos con el uso de la Klenow (Figura 19).

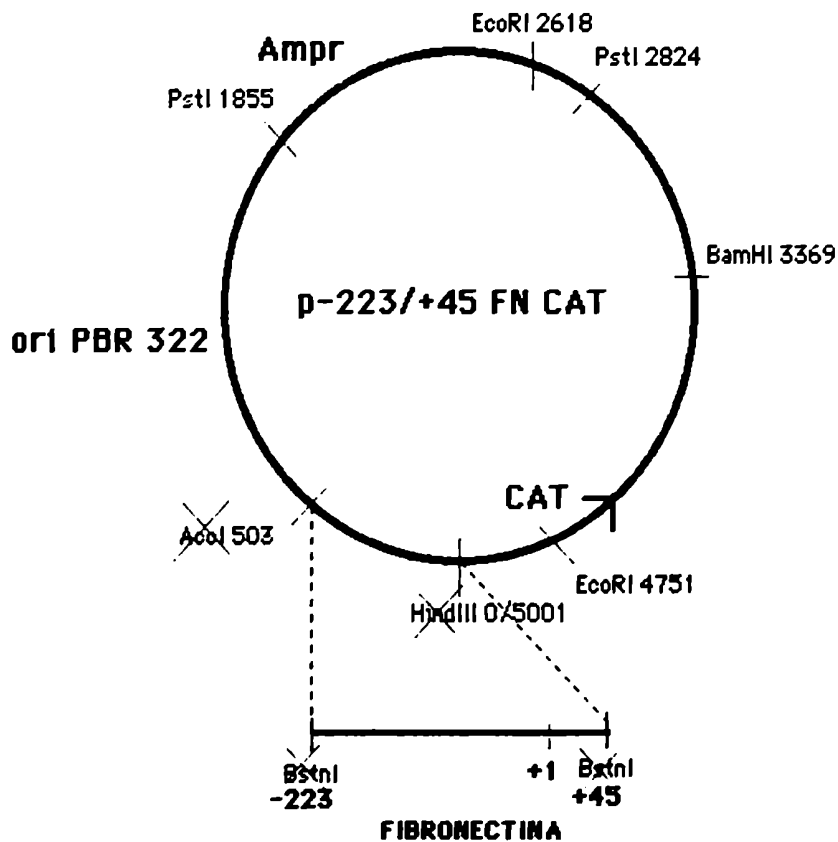


Figura 19 A

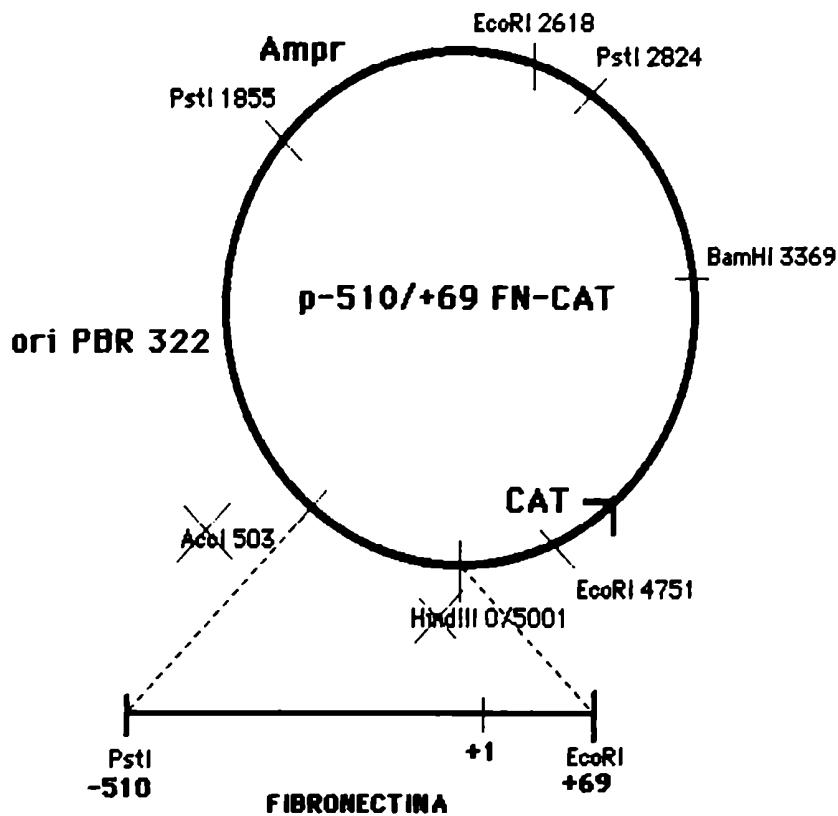


Figura 19 B.

Figura 19: A. Representación del plásmido p-223/+45 FN-CAT. B. Representación del plásmido p-510/+69 FN-CAT.

En todas las construcciones se observa la presencia del gen de la cloranfenicol acetil transferasa precedido por diferentes promotores o regiones promotoras. Dado que las células de mamíferos no poseen la enzima CAT, solo se observará actividad de CAT en los extractos celulares de las células transfectadas.

2.9.b.Preparación de los extractos celulares.

Las células fueron cosechadas raspando la monocapa con una espátula de goma en el propio medio de cultivo para evitar perder células transfectadas que pudieran haberse despegado. Las células fueron centrifugadas 5 minutos a 5000 rpm. El "pellet" celular fue resuspendido en 100 µl de una solución 250 mM Tris HCl pH 8/5mM EDTA. La solución con las células fue transvasada a tubos "eppendorf". Luego se repitieron tres ciclos en donde los tubos "eppendorf" se dejaban, 1 minuto en

nitrógeno líquido, y 5 minutos en un baño a 37°C. Luego se centrifugó 15 minutos a 10.000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperaron los sobrenadantes. Las muestras fueron calentadas 10 minutos a 60°C. Los extractos fueron utilizados inmediatamente o bien conservados a -70°C.

2.9.c. Cuantificación de las proteínas presentes en los extractos celulares.

Las proteínas de los extractos celulares fueron cuantificadas por el método de Bradford sobre una alícuota de cada muestra usando albúmina sérica bovina como estándar (105).

2.9.d. Test de la enzima CAT.

Se tomaron cantidades de extractos celulares conteniendo la misma cantidad de proteínas totales. A cada tubo se le agregaron 20 µl de 4 mM Acetil Coenzima A, 10 µl de ¹⁴C cloranfenicol (0,25 µCi/10µl), y "buffer" Tris-HCl pH 8 250 mM / EDTA 5mM hasta completar los 150 µl. Se incubó por 45 minutos a 37°C. Se agregaron 4 µl de Acetil CoA 20 mM a cada muestra y se continuó la incubación a 37°C por otros 45 minutos. Esto último se repitió dos veces más. Se extrajeron las formas acetiladas y no acetiladas del cloranfenicol agregándole a cada uno de los tubos 500 µl de acetato de etilo, agitando en vortex durante 30 minutos, centrifugando las muestras durante 2 minutos a 12000 x g y recuperando la fase superior. El acetato de etilo fue eliminado por evaporación en un aparato "speed vac". Las muestras fueron resuspendidas cada una en 20 µl de acetato de etilo, y sembradas en una placa de cromatografía en capa delgada, corriéndose una cromatografía ascendente en cloroformo / metanol, 95:5 v/v, hasta que el frente llegó al borde superior de la placa. Una vez seca, se realizó la autorradiografía.

Para cuantificar más precisamente la actividad de la enzima cloranfenicol acetil transferasa de los diferentes extractos celulares, se superpusieron las autorradiografías ya reveladas con las placas de TLC, y se marcaron sobre éstas las zonas que de acuerdo a la autorradiografía se correspondían con las diferentes formas del ¹⁴C cloranfenicol acetilado. Estas zonas fueron recortadas y analizadas en un contador de centelleo. Se determinó entonces para cada extracto celular, la cantidad de ¹⁴C cloranfenicol acetilado en función del ¹⁴C cloranfenicol total.

2.10. PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES. ENSAYO DE LA DNASA I.

2.10.a. Aislamiento de núcleos de hígados de rata.

El método que se usó está basado esencialmente en el método descrito por Gorski y colaboradores (106).

Se sacrificó una rata macho Sprague-Dawley, de 180-200 gramos e inmediatamente se perfundió el hígado con PBS frío. Todas las operaciones siguientes fueron realizadas a 4°C. El hígado fue disecado y desprovisto de todos los restos de tejido conectivo y adiposo y lavado con PBS. Se cortó el hígado con tijera o bisturí en pedacitos de aproximadamente 0,5 X 0,5 cm. Se transfirió el tejido a un homogeneizador Teflon/vidrio de 30 ml y se le agregaron 20 ml de solución SHB. Se homogeneizó con 10 o 20 pasadas del pistón utilizando el motor a 3/4 de la velocidad máxima. El homogenato fue filtrado a través de 4 capas de gasa sobre una probeta de 100 ml, trabajando siempre en hielo. El homogeneizador fue lavado con SHB (2 ó 3 pasadas del pistón), y esta solución de lavado fue filtrada de la misma manera que en el paso anterior. Se lavaron las gasas con SHB hasta que se completó un volumen de 85 ml. El contenido de la probeta fue mezclado por inversión y se lo depositó sobre 10 ml de una solución colchón en tubos flexibles para rotor Beckman SW-28. Todo el hígado fue colocado en tres tubos de este tipo. minutos a 25.000 rpm a 4°C. Luego de la centrifugación, se eliminó con una pipeta Pasteur la capa de grasa que normalmente aparece en los tubos. El resto del sobrenadante fue aspirado con otra pipeta Pasteur limpia hasta alcanzar el colchón, y finalmente por inversión del tubo. Se dejó secar el "pellet" colocando el tubo invertido sobre una servilleta. Las paredes del tubo se secaron con un papel cuidando de no tocar el "pellet".

A cada "pellet" se le agregó 1 ml de SHB:H₂O (9 vol : 1 vol) y se lo resuspendió con pipeta automática usando una punta plástica de 1 ml cortado en su extremo.

Se transfirió todo lo obtenido hasta el momento a un homogeneizador de 15 ml de Teflón / vidrio. Los tubos fueron lavados 2 o 3 veces con 1 ml de SHB:H₂O y los lavados se colocaron en el homogeneizador. Se juntaron los "pellets" de todos los tubos y se homogeneizó todo con 2 o 3 "strokes" a 3/4 de la velocidad máxima. Los núcleos fueron transferidos entonces a una probeta de 100 ml, el homogeneizador fue lavado y los lavados transferidos a la misma probeta. Se agregó la mezcla SHB:H₂O hasta completar 54 ml. Se homogeneizaron los núcleos y se los sembró en dos tubos de rotor Beckman SW-28 conteniendo 10 ml de solución de colchón cada

uno. Se colocaron 27 ml en cada tubo. Los tubos fueron centrifugados 45 minutos a 25.000 rpm a 4°C. EL sobrenadante fue descartado por inversión. Se dejaron secar los tubos sobre una servilleta, y también se secaron cuidadosamente las paredes de los tubos. Los núcleos pasaban a tener coloración blanca. Los colores rosa o amarillo de los núcleos son indicadores de una mala perfusión. En este punto los núcleos fueron congelados en nitrógeno líquido y guardados a - 70°C.

2.10.b. Aislamiento de núcleos de células de la granulosa.

A un "pellet" celular se le agregaron 40 ml de PBS conteniendo el "cocktail" de inhibidores de proteasas. Se centrifugó 10 minutos a 25.000 rpm. A un "pellet" celular de 1,5 a 2 ml se le agregaron 7 ml de buffer HNB y las células fueron resuspendidas con una suave agitación de los tubos. Al tubo anterior se le agregaron 5 ml de HNB + 1% NP40 v/v y se mezcló todo por inversión. Inmediatamente se le agregaron 2 ml de HNB con el fin de diluir el NP40 hasta aproximadamente una concentración final de 0,2% de NP40 v/v. Se mezcló todo por inversión. Se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante. Los núcleos se usaron inmediatamente para la preparación de los extractos nucleares.

2.10.c. Preparación de los extractos de las proteínas nucleares.

Los extractos de las proteínas totales fueron preparados siguiendo el método de Dignam y colaboradores (107). Los núcleos fueron resuspendidos en 250 µl de NEB 0,14 M NaCl usando una punta de pipeta de 1 ml cortado en un extremo. Se midió el volumen del "pellet" nuclear y se transfirió cada "pellet" a un tubo de rotor Beckman SW-56 (vol del "pellet" = vol total - vol NEB 0,14 M). Se calculó el volumen de NEB 0,42 M NaCl necesario para llegar a una concentración final de 0,37 NaCl. Este volumen se obtuvo agregando 1/2 volumen de NEB 0,14 M y 1/2 volumen de NEB 0,7 M.

$$\text{Vol NEB 0,42M} = \frac{\{(\text{vol "pellet"} \times 0,37) + (\text{vol NEB 0,14} \times 0,23)\}}{0,05}$$

El tubo del rotor Beckman SW-56 fue cubierto con un "parafilm" y se lo homogeneizó por inversión. Luego, se le agregó 1/2 volumen de NEB 0,42 M y se lo homogeneizó nuevamente por inversión. Se dejó al tubo agitando suavemente durante 30 minutos

en el cuarto frío. Se centrifugó el tubo a 25.000 rpm durante 30 minutos a 4°C en un rotor SW-56. EL sobrenadante con las proteínas nucleares fue cuidadosamente colectado teniendo cuidado de no tocar el "pellet" de cromatina. Se midió el volumen del "pellet" del sobrenadante y se lo transfirió a otro tubo SW-56.

Se precipitaron las proteínas por el agregado de sulfato de amonio, manteniendo siempre la agitación suave del tubo en el cuarto frío, aproximadamente durante 60 minutos. Luego de agregar todo el sulfato de amonio, se dejó durante 30 minutos más agitando. Las proteínas pueden quedar en este paso durante toda la noche. Se centrifugaron las proteínas centrifugadas durante 20 minutos en un rotor SW-56 a 25.000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue eliminado por inversión de los tubos y los "pellets" secados sobre una servilleta. También se secaron las paredes de los tubos cuidadosamente. Se agregaron a cada tubo aproximadamente 75 µl de "buffer" de diálisis conteniendo los inhibidores de las proteasas. Se resuspendió el "pellet" con un "tip" de 200 µl. Es necesario trabajar suavemente sin generar burbujas.

2.10.d.La diálisis.

El precipitado de sulfato de amonio resuspendido fue transferido a un tubo "eppendorf" sin tapa. El tubo del rotor Beckman SW-56 fue lavado con 40 µl de "buffer" de diálisis y estos 40 µl fueron agregados al tubo anterior. Se homogeneizó todo con un "tip" de 200 µl. El "eppendorf" fue cubierto con una membrana de diálisis la cual fue sujeta con una banda de goma. Los tubos fueron colocados boca abajo dentro de tubos Corex de 15 ml y se centrifugaron a 500 rpm durante 1 minuto o 2 minutos. Los tubos "eppendorf" fueron retirados invertidos de la centrifuga y se dializaron contra 200-300 ml de "buffer" de diálisis, colocando los tubos invertidos en un flotador. Se dejaron así por 4 horas cambiando periódicamente el "buffer". Al concluir la diálisis se recogió el contenido líquido de los tubos en su fondo con un golpe de centrifuga y se retiró la membrana de diálisis. Luego se tapó los tubos y se centrifugó durante 8 minutos a 12000 x g. EL sobrenadante con las proteínas solubles fue alicuotado en fracciones de 20-25 µl y fue congelado en nitrógeno líquido o a -70°C. La concentración de proteínas del extracto fue medida por el método de Bradford.

2.10.e Ensayo de protección a la digestión por DNasa I.

Los extractos nucleares fueron preincubados durante 10 minutos o 15 minutos en hielo junto con un "carrier" de DNA (poli dI - dC sintético, 150 a 500 ng), para evitar la unión de proteínas no específicas a la sonda radioactiva usada.

Mg/Espermidina (20 mM)	2µl
poli dI - dC (250 ng/µl)	2µl
agua	1µl
"buffer" de diálisis (DB)	5µl
proteínas nucleares	(15 - 30 µg)

Se agregó la sonda de DNA marcada radioactivamente en un extremo y se incubó todo durante 10 minutos en hielo.

sonda radioactiva	2 µl
(aprox. 1 ng)	

Las reacciones fueron transferidas a un baño a 20°C durante 1 minuto. Se agregó luego 1 µl de DNasa. La enzima fue diluída 1:50 de un "stock" de 2 mg/ml justo antes de ser usada en un "buffer" HNB conteniendo 5 mM MgCl₂ y 2,5 mM CaCl₂. Se incubó durante 1 minuto en el baño a 20°C. La reacción se detuvo agregándole 30 µl de una solución "stop" de la DNasa I.

50 mM EDTA
0,1% SDS v/v
150 µg/ml tRNA
200 µg/ml Proteinasa K

Esto se incubó durante 45 minutos a 42°C. A la mezcla de reacción se le agregó "buffer" TE hasta completar 100 µl y se extrajo la fase acuosa con fenol. Se precipitó el DNA con etanol y posteriormente se secaron los "pellets". Las muestras fueron resuspendidas con 3 µl de "loading buffer".

95% formamida deionizada
10 mM EDTA

0,25% p/v BPB-0,25% p/v Xilencianol

y fueron sometidas electroforesis en geles de polacrilamida 8% p/v desnaturalizantes (urea 8 M).

2.10.f Soluciones usadas en 2.10.

PBS = (Solución salina de fosfato)

NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,15 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

"Buffer" SHB ("buffer" de homogeneización de Schibler)

Hepes pH 7,6 - 7,9	10 mM
KCl	15 mM
EDTA	2 mM
Sacarosa	2,4 M

Este "buffer" debe guardarse a -20°C y antes de ser usado hay que suplementarlo con:

DTT	0,5 mM
espermina	0,15 mM
espermidina	0,5 mM

Y con el "Cocktail "de inhibidores de proteasas:

PMSF	0,5 mM
benzamidina	2 mM
aprotinina	5 µg/ml
pepstatina	5 µg/ml
leupeptina	5 µg/ml

Solución para el colchón.

sacarosa	2 M
glicerol	10% v/v

Esta solución debe guardarse a -20°C y antes de ser usada suplementada con las mismas drogas que SHB.

"Buffer" NEB 0.14M ("Buffer" de elución de los núcleos).

Hepes pH 7,9	20 mM
glicerol	25% v/v
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	0,25 mM
NaCl	0,14 M

antes de ser usada esta solución debe suplementarse con

DTT 0,5 mM
"Cocktail" de inhibidores de proteasas

"Buffer" NEB 0,7 M ("Buffer" de elución de núcleos 0,7 M).

Este "buffer" tiene la misma composición que el anterior con la salvedad que tiene una concentración de NaCl 0,7 M.

"Buffer" de diálisis.

Hepes pH 7,9	20 mM
KCl	60 mM
glicerol	20% v/v
EDTA	0,25 mM
EGTA	0,125 mM

Este "buffer" antes de ser usado debe complementarse con:

DTT 1 mM
"Cocktail" de inhibidores de proteasas.

"Buffer" HNB.

Sacarosa	0,5 M
Tris HCl pH 7,5	15 mM
KCl	60 mM
EDTA pH 8	0,25 mM
EGTA pH 8	0,125 mM

Este "buffer "antes de ser usado debe ser suplementado con

espermidina	0,5 mM
espermina	0,15 mM
DTT	1 mM

"Cocktail" de inhibidores de proteasas.

RESULTADOS

3.1.INTRODUCCION.

Cuando se comenzó con este trabajo, había sido recientemente publicada la secuencia de una región del promotor del gen de la FN humana de aproximadamente 0,6 kb, inmediata al sitio de iniciación de la transcripción (58).

El análisis detallado de esta región, mostró la presencia de secuencias consenso para la unión de factores de transcripción. Entre otros sitios en la posición -173 se encuentra una secuencia necesaria para la inducción por cAMP, tanto para el gen de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (108), como para el gen de la somatostatina (119), conocida como CRE, y en las posiciones -110 y -68 se encuentran dos secuencias consenso capaces de responder tanto a cAMP como a ésteres de forbol, llamadas AP-2 (32,42).

Quisimos entonces analizar la función de estas secuencias en el promotor del gen de la FN.

Sabíamos además que cultivos primarios de células de la granulosa de rata eran capaces de secretar grandes cantidades de FN (93,96,97), cuya síntesis era inhibida por tratamientos con FSH (107) y estimulada por GnRH (93). Sabíamos además que la hormona FSH actúa vía PKA y la hormona GnRH vía PKC.

Por otro lado las células de la granulosa eran un sistema usado para estudiar la regulación de la expresión génica por ser un tipo celular con alta capacidad de respuesta hormonal.

Consecuentemente comenzamos a estudiar la regulación de la expresión del gen de la FN en las células de la granulosa. Queríamos saber si aquellas diferencias en la biosíntesis de FN que producían los tratamientos con las hormonas FSH y GnRH se observaban a nivel del mRNA así como también averiguar qué mecanismos estaban involucrados en estos tipos de regulaciones.

3.2.OBTENCION Y CARACTERIZACION DE UNA NUEVA LINEA CELULAR DE CELULAS DE LA GRANULOSA.

Cuando comenzamos a desarrollar las hipótesis de trabajo surgió como dificultad la obtención de grandes cantidades de células de la granulosa que nos permitieran hacer los diversos experimentos.

Hasta el momento trabajábamos con cultivos primarios de células de la granulosa de rata, no existían líneas celulares de granulosa capaces de responder hormonalmente de la misma manera que las células de un cultivo primario.

solamente existían líneas celulares de granulosa originadas por transformación oncogénica con SV 40 y Ha-Ras (110).

Comenzamos a trabajar con células de la granulosa bovinas. Los animales más grandes tienen órganos de mayor tamaño que los animales más pequeños, por lo que el número de células de la granulosa que podían obtenerse de un ovario de vaca era mucho mayor que el que podía obtenerse de un ovario de rata. Además cuanto mayor es el tamaño de los órganos mayor es el número de veces que una célula de ese tejido tiene que replicarse para completarlo, y esto se refleja en el número de veces que un cultivo primario originado de un tipo celular dado puede replicarse.

3.2.a. Obtención de la línea celular.

Para la obtención de los folículos ováricos bovinos y la preparación de las células de la granulosa seguimos la metodología ya relatada en Materiales y Métodos. Aproximadamente 10^6 células fueron sembradas en una placa de 10 cm de diámetro. Luego de tres días de cultivo y habiendo alcanzado la confluencia, las células fueron tripsinizadas y divididas en 2 cajas de 10 cm.

Durante tres meses las células fueron mantenidas siempre de esta manera: dejándolas hasta formar monocapas confluentes y luego pasándolas 1: 2. Se observó una reducción en el tiempo necesario para que las células alcanzasen una monocapa confluyente y se comenzó a pasarlas 1:6 o 1:10.

Ante la sospecha de que el cultivo primario había dado origen a una línea celular, fueron llevados a cabo una serie de ensayos experimentales.

La supuesta línea celular fue llamada BGC-1 (línea celular de células de la granulosa bovina).

Las células BGC-1 presentan una morfología altamente homogénea similar a la de un cultivo primario de células de la granulosa (Figura 20).

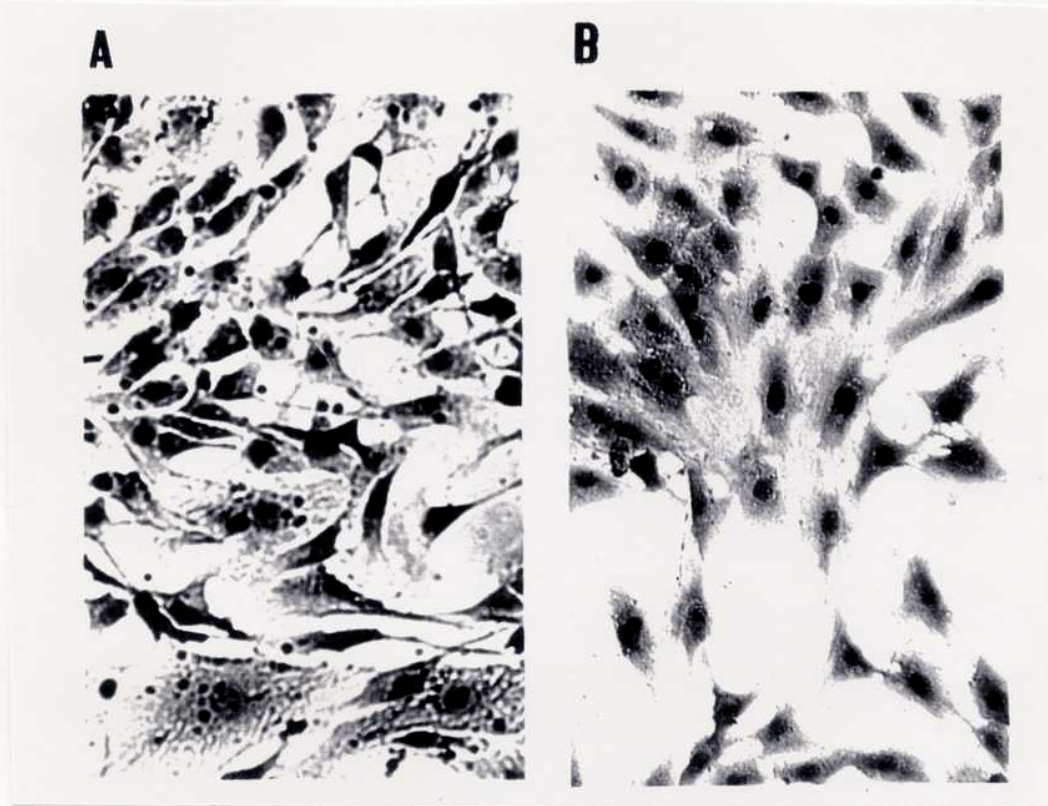


Figura 20: Tinción de Giemsa de células de la granulosa bovina. A.cultivo primario. B. línea celular (pasaje 60).

3.2.b.Caracterización de la línea BGC-1.

DTiempo de duplicación de la línea BGC-1.

Con el objetivo de determinar el tiempo de duplicación de las células BGC-1 sembramos 10^5 células de la línea BGC-1 en 10 cajas de 3,5 cm de diámetro conteniendo medio DMEM:F12 suplementado con 1% v/v de NCS. A las 3, 20, 40, 60, 80 y 100 horas de la siembra, las células de dos cajas fueron tripsinizadas y contadas en una cámara de Neubauer.

Los datos obtenidos fueron graficados (Figura 21) y se determinó que el tiempo de duplicación celular de la línea BGC-1 es de 23,5 horas.



Figura 23: Metafase de las células BGC-1 en donde se observan los marcadores M, SM1 y SM2 pertenecientes al grupo A.

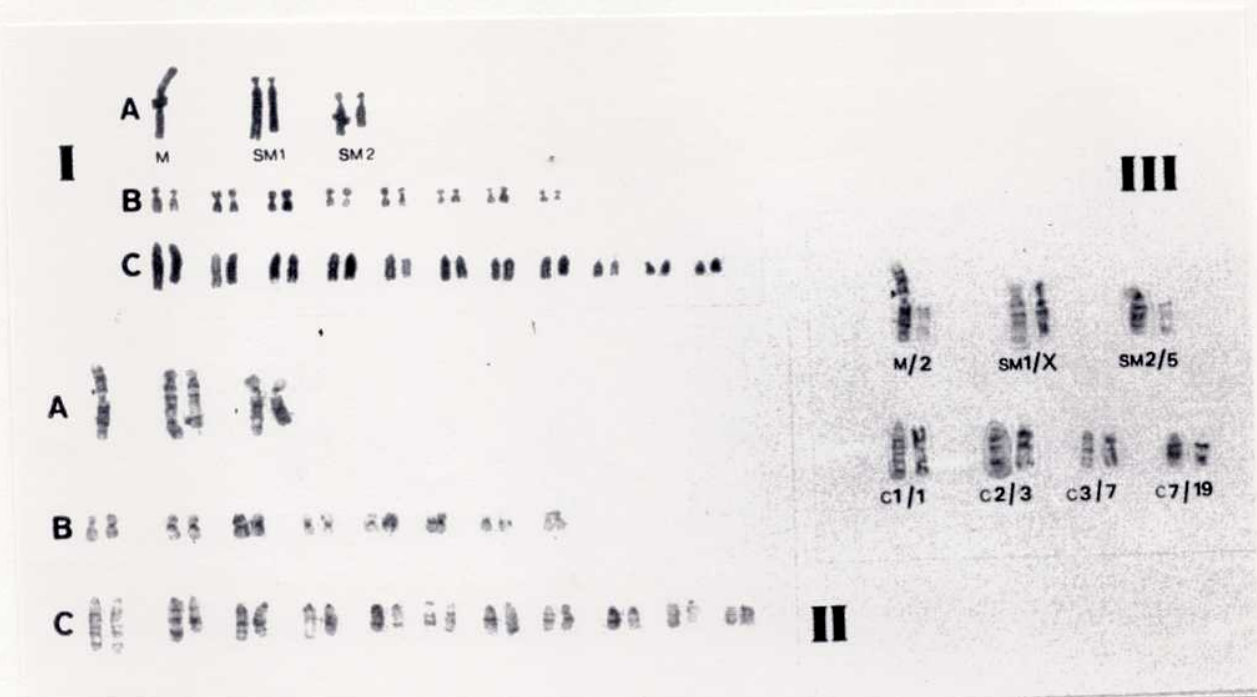


Figura 23: Características citológicas de la línea celular BGC-1.

Panel I= cariotipo de las células BGC-1. A. cromosomas marcadores. B. cromosomas meta-submetacéntricos. C. cromosomas telocéntricos.

Panel II= bandeo G (digestión con tripsina) de las células BGC-1 que permite la identificación de los pares homólogos, exepcto para el cromosoma M el cual probablemente es un isocromosoma.

Panel III= identificación de tres elementos marcadores y cuatro elementos del grupo C como elementos bovinos por comparación de los patrones de bandeos G con cromosomas bovinos estándares de células del epitelio sublingual.

Los resultados obtenidos fueron:

Número modal $2n=43$ cromosomas.
 Número fundamental NF=64 (NF: número de brazos cromosómicos).

Frecuencia

Nº cromosomas	39	40	41	42	43	44	4n*
Nº células	1	3	4	6	47	7	5

4n*: células tetraploides.

Total de células analizado: 73.

Características cariológicas de la población celular.

Se distingue un cariomorfo predominante de $2n=43$ (NF=64) característico en el 64,4% de las células analizadas. En menor proporción, 9,6%, se observa un cariomorfo de $2n=44$ (NF=64) que resulta de la fisión del marcador M del cual más adelante se hablará. Se ve también un 6,8% de células tetraploides.

La frecuencia de células $2n=42$ (8,2%), si bien es semejante a la de $2n=44$, no representa un cariomorfo particular dado que el elemento faltante en los casos estudiados es indistinto.

Fórmula cromosómica.

$$\begin{array}{ll} 2n = 43 \text{ (NF = 64)} & 22 \text{ A} + 21 \text{ M} \\ 2n = 44 \text{ (NF = 64)} & 24 \text{ A} + 20 \text{ M} \end{array}$$

A: elementos monobranquiales (cromosomas telocéntricos o subtelocéntricos).

M: elementos bibranchiales (cromosomas metacéntricos o submetacéntricos).

Anomalías estructurales.

No se observaron estos tipos de anomalías que incluyen cromosomas de tipo dicéntricos, fragmentos acéntricos, anillos.etc.

Cariotipo.

Se pueden distinguir tres grupos cromosómicos según caracteres morfológicos (Figura 23.D):

Grupo A: está formado por elementos metacéntricos y submetacéntricos grandes, son los cromosomas mayores del cariotipo. En $2n=43$ existen 5 elementos de este tipo y en $2n=44$ 4 elementos.

Grupo B: está formado por elementos metacéntricos y submetacéntricos pequeños. Se observan 8 pares tanto en $2n=43$ como en $2n=44$.

Grupo C: está formado por elementos telocéntricos y subtelocéntricos en serie decreciente de tamaño. Se ven 11 pares en $2n=43$ y 12 pares en $2n=44$.

Bandeo G.

Permite la identificación de pares cromosómicos, no se observan elementos únicos, excepto el marcador M. Esto implica el mantenimiento de una condición diploide (Figura 23 II).

Elementos marcadores.

Grupo A:

M: es un elemento metacéntrico (centrómero medial) presente como elemento único en el cariomorfo $2n=43$. No se observa en el cariomorfo $2n=44$, en donde es reemplazado por dos elementos telocéntricos equivalentes en longitud a los brazos M.

SM-1: es un par submetacéntrico grande normalmente heteromórfico a consecuencia de una deleción del cuarto terminal del brazo largo en uno de los elementos del par.

SM-2: es un par submetacéntrico grande.

Otros elementos marcadores.

- a. Constricción secundaria terminal en un elemento telocéntrico del grupo C.
- b. Constricción secundaria en los brazos cortos de un elemento del par B7.
- c. Deleción terminal en un elemento del par C2.

Comparación del bandeo G con el estándar bovino:

Esta comparación permite la identificación de las siguientes similitudes entre ambos cariotipos (Figura 23 III):

Granulosa bovino	Bovino normal.
M	2
SM1	X
SM2q	5
C1	1
C2	3
C3	7
C7	19

Derivación del cariotipo encontrado a partir del cariotipo de Bos taurus/ B. indicus.

B.taurus/indicus:. fórmula cromosómica: 58 A+XX (2n=60, NF=62).

Línea BGC-1: fórmula cromosómica: 22 A+21M (2n=43, NF=64).

El número de fusiones (f) requerido para obtener la transformación de 58 A a 22 A es de 9.

$$f = \frac{58 - 22}{4} = 9 \text{ fusiones}$$

Derivación:

58 A	+ XX	2n=60	NF=62
<u>9 fusiones</u>			
22 A + 18 M	+ XX	2n=43	NF=62

En la línea celular BGC-1 se observan:

$$22 A + 18 M + XX + M \quad 2n=43 \quad NF=64$$

Los 22 elementos de tipo A constituyen el grupo C.

Los 18 elementos de tipo M están formados por los elementos del grupo B más el par SM3.

El par XX se corresponde con el par SM2.

El marcador M diferencia al cariotipo derivado del cariotipo observado en BGC-1.

Identidad cromosómica de la línea celular BGC-1.

La factibilidad de derivación del cariotipo de la línea celular a partir del cariotipo bovino, mediante transformaciones estructurales simples (fusiones robertsonianas) y la identificación de elementos con patrones de bandeo G semejantes en ambos cariotipos permite acreditar el origen bovino de la línea celular.

No obstante la línea BGC-1 presenta ciertas peculiaridades llamativas como:

1. Alto grado de transformación estructural.
2. Caracter diploide estable.
3. Constancia de número modal.

III) Producción de estradiol de la línea BGC-1.

Con el fin de determinar si la línea BGC-1 era capaz de responder hormonalmente de la misma manera que un cultivo primario de células de la granulosa se midió la producción de estradiol en la línea BGC-1 luego de tratamientos con FSH y forskolina (Figura 24).

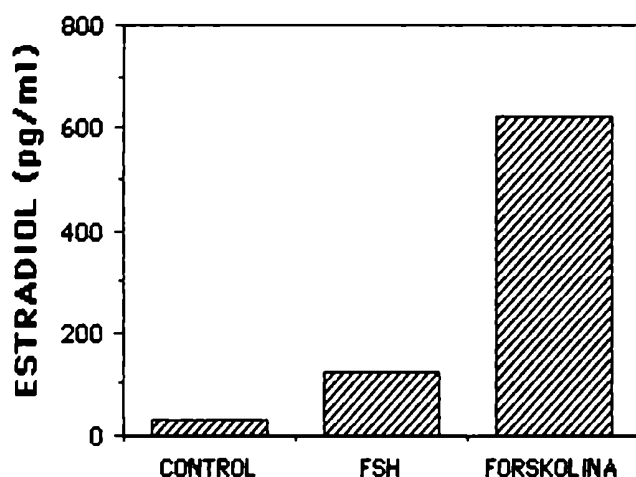


Figura 24: Efecto de los tratamientos de las células BGC-1 con 200 ng/ml de FSH y 10 mM de forskolina sobre la síntesis de estradiol. Las células fueron tratadas con los compuestos indicados durante 72 horas. La concentración de estradiol fue determinada como se describe en Materiales y Métodos.

Observamos que los niveles de producción de estradiol aumentan en las células tratadas con FSH o con forskolina en relación a la producción de estradiol de las mismas células no sometidas a estos tratamientos.

Sin embargo en las células tratadas con forskolina (10 μ M), este incremento es mucho mayor que en las células tratadas con FSH (200 ng/ml). Probablemente esto se deba a la pérdida de receptores para FSH sobre la membrana celular de las células de la línea BGC-1. Como la forskolina es capaz de imitar la acción de FSH pasando por alto a los receptores hormonales, el incremento en la producción de estradiol con el uso de esta droga resulta mucho mayor que con FSH.

IV) Características de adhesión a diferentes sustratos de la línea BGC-1.

Se ensayó la adhesión de las células BGC-1 a la laminina, el colágeno y la fibronectina, en todos los casos a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ p/v.

Se observaron las células sembradas en las cajas en presencia o ausencia de los diferentes sustratos y en cada caso se analizó la adhesividad. Ver Figura 25.

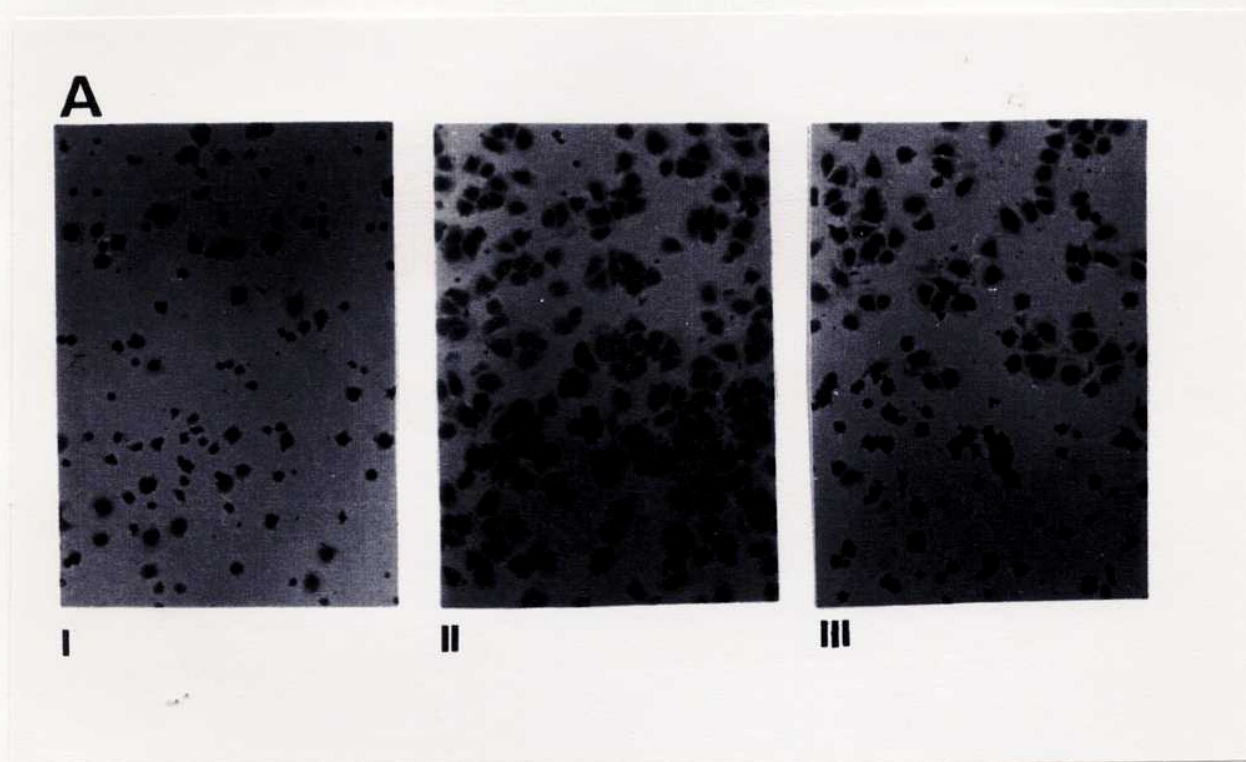


Figura 25: A. Adherencia de las células BGC-1 a superficies cubiertas con colágeno (20 mg/ml). Tinción con cristal violeta de las células BGC-1, fijadas a los 30 minutos de la siembra. I. Control, células sembradas sobre plástico. II. Células sembradas sobre plástico recubierto con colágeno. III. Se observa el límite entre las células sembradas en ausencia y presencia de colágeno.

B**I****II****III****IV**

Figura 25: B. Adherencia de las células BGC-1 a superficies cubiertas con colágeno y laminina (20 mg/ml). Tinción con cristal violeta de las células BGC-1, fijadas a los 120 minutos de la siembra. I. Control, células sembradas sobre plástico. II. Células sembradas sobre plástico recubierto con colágeno. III. Se observa el límite entre las células sembradas en ausencia y presencia de colágeno. IV. Células sembradas sobre plástico recubierto con laminina.

A los 30 minutos de la siembra las células ubicadas dentro del área cubierta con colágeno aparecen fuertemente adheridas a la placa, mientras que en el resto de la superficie recién comienzan a fijarse, en ambos casos la morfología celular aún aparece redondeada. A las 2 horas de la siembra las células ubicadas sobre la gota del colágeno aparecen no solamente fuertemente adheridas si no que además se observa que ya han hecho "spreading". En las regiones adyacentes al colágeno si bien las células aparecen pegadas a la placa, su morfología aún permanece redondeada.

Cuando las células se siembran sobre laminina o fibronectina no aparecen diferencias en la adhesión a la placa entre las zonas cubiertas por los sustratos y las zonas libre de ellos. No se muestran los resultados obtenidos sobre placas cubiertas con fibronectina.

Esto permite concluir que las células BGC-1 se adhieren muy bien al colágeno y no muestran características especiales frente a la laminina o a la fibronectina.

VI Producción de FN de tipo celular de la línea celular BGC-1.

Con el fin de determinar si las células BGC-1 producían FN de tipo celular se realizó un ensayo de Northern Blot usando mRNA total de las células BGC-1. La membrana fue hibridada con una sonda específica de la región EDI de la FN que es característica de la FN de tipo celular y que se encuentra ausente en la FN de tipo plasmática. Simultáneamente otra membrana conteniendo iguales cantidades de RNA total de las mismas células fue hibridada con una sonda de FN que reconoce una región de la proteína que está presente tanto en la FN de tipo plasmática como en la de tipo celular (Figura 26).

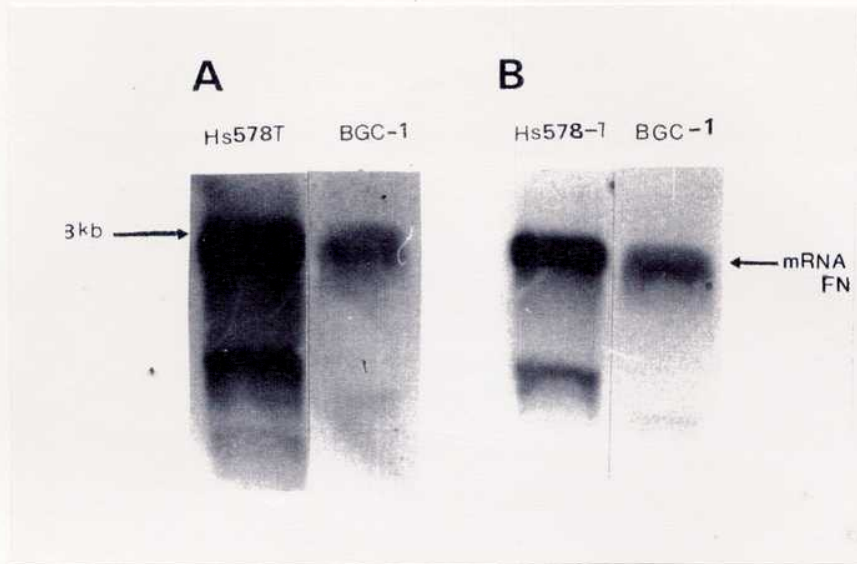


Figura 26: Detección de mRNA para FN plasmática y celular en las células BGC-1 por la técnica de "Northern". A. La membrana fue hibridada con una sonda de cDNA de FN total. B. La membrana fue hibridada con una sonda específica para la región EDI. Se usó como control mRNA de la línea celular Hs578T (carcinosarcoma mamario humano).

También se inmunoprecipitó la FN secretada al medio por las células BGC-1 con un antisuero de conejo contra FN, y con un anticuerpo de cabra contra la región EDI de la FN. En ambos casos la inmunoprecipitación fue realizada luego de un pulso de cuatro horas con ^{35}S metionina (Figura 27).

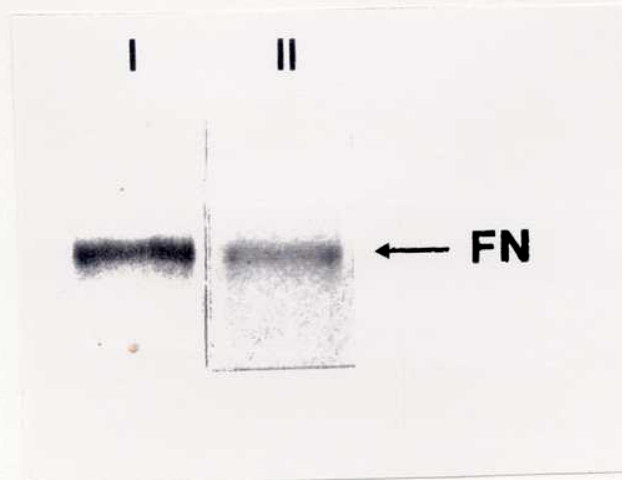


Figura 27: Detección de FN plasmática y FN celular en las células BGC-1 por inmunoprecipitación y electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. I. Inmunoprecipitación con Ac anti FN total. II. Inmunoprecipitación con Ac anti EDI.

Tanto el ensayo de Northern como la inmunoprecipitación muestran que la línea celular BGC-1 secreta FN de tipo plasmática y de tipo celular.

3.3. AUSENCIA DE REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA FIBRONECTINA POR ESTERES DE FORBOL.

3.3.a. Análisis de la síntesis de FN en la línea BGC-1 bajo tratamientos con ésteres de forbol.

Con el fin de analizar si los ésteres de forbol modificaban la síntesis de FN se realizaron marcaciones celulares con ^{35}S metionina de células BGC-1 y de células NIH-3T3 tratadas y no tratadas con TPA, siguiendo las técnicas de marcación e inmunoprecipitación descritas en Materiales y Métodos .

El objetivo de este experimento fue el de confirmar o descartar en nuestra línea celular el efecto activador de la síntesis de FN por GnRH observado por Durrington y Skinner en cultivos primarios de granulosa de rata (93). Se realizaron tratamientos durante tiempos cortos (4 horas) o durante tiempos más largos (24 y 48 horas) con TPA. Ver Figura 28.

No se observaron diferencias entre la síntesis de FN de las células BGC-1 tratadas con TPA y las células no tratadas ni durante tratamientos breves ni durante tratamientos más largos. Se obtuvo el mismo resultado tanto con la FN secretada al medio de cultivo como con la FN depositada en la matriz.

Tampoco existen diferencias en la síntesis de FN entre células NIH-3T3 tratadas con TPA y sin tratar. Esto se investigó solamente en las proteínas secretadas al medio de cultivo de las células NIH-3T3.

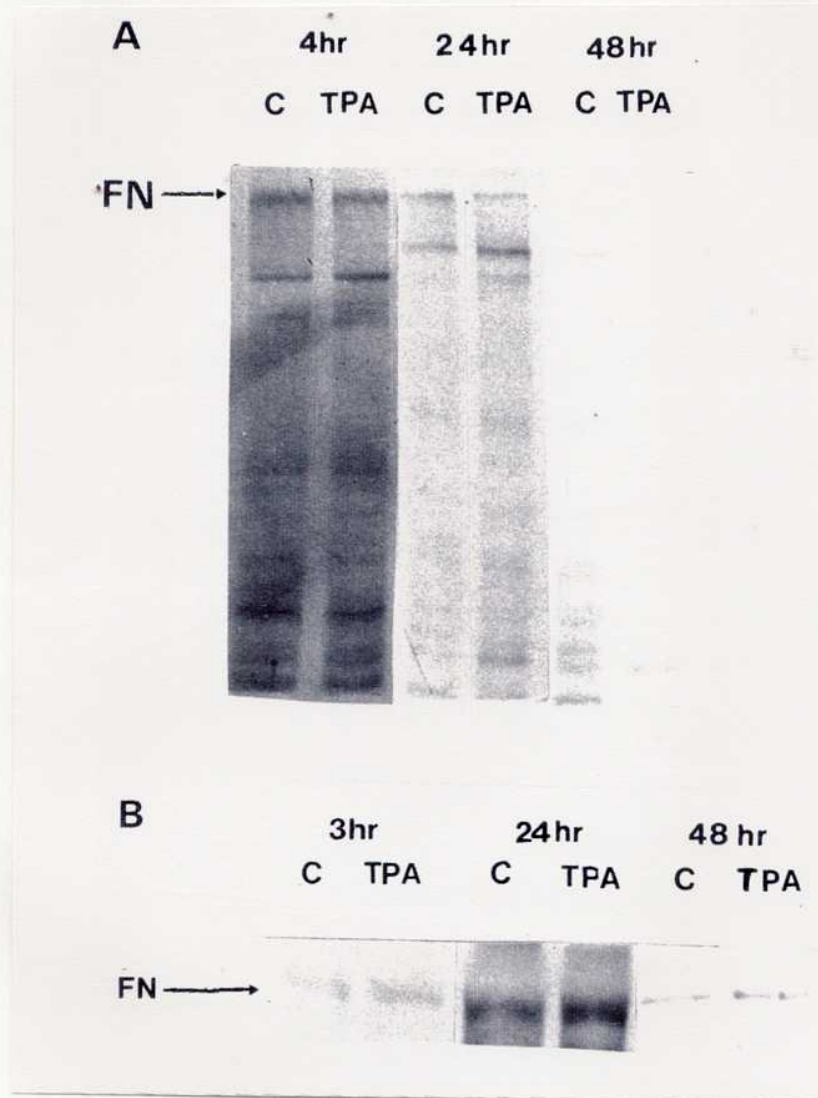


Figura 28: Efecto del TPA ($10^{-6}M$) sobre la biosíntesis de FN en las células BGC-1 y en la línea celular NIH-3T3. Se marcaron monocapas celulares con pulsos de 4 horas de ^{35}S metionina. A. Electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas totales secretadas al medio por las células BGC-1 con y sin tratamientos de TPA a los tiempos indicados. B. Electroforesis en geles de poliacrilamida del inmunoprecipitado de la FN secretada al medio por las células NIH-3T3 con y sin tratamientos de TPA a los tiempos indicados.

3.3.b. Análisis de la expresión del gen de la FN en la línea BGC-1 luego de tratamientos con TPA.

El resultado que habíamos obtenido marcando radioactivamente células bovinas tratadas y no tratadas con TPA, difería de los indicados en la literatura en donde tratamientos con la hormona GnRH aumentaba la síntesis de FN luego de 48 horas. Recordemos que la hormona GnRH actúa vía PKC y la PKC es una enzima activable por los ésteres de forbol.

Como ya se mencionó anteriormente en la región secuenciada del promotor del gen de la FN existen dos sitios consenso para el factor de transcripción AP-2, factor responsable de la regulación de la expresión génica por cAMP y por ésteres de forbol (58). Se estudió el efecto del TPA sobre el mRNA de FN en las células BGC-1 y en la línea celular NIH 3T3 luego de tratamientos con TPA durante 48 horas mediante ensayos de Northern Blot (Figura 29).



Figura 29: Efecto del TPA ($10^{-6}M$) sobre los niveles del mRNA de FN en las células BGC-1 y NIH-3T3. Las células fueron incubadas por 48 horas en presencia o ausencia de TPA, luego fueron cosechadas y se preparó el RNA total. En cada calle se sembraron iguales cantidades de RNA total (15 mg). La membrana se hibridó también con una sonda de gliceraldehído 3P deshidrogenasa (G3PD) con el fin de estandarizar las cantidades de RNA total usadas en cada calle.

No se observan diferencias entre los niveles de mRNA de FN producidos por las células tratadas con TPA y por las células no sometidas a este tratamiento, tanto en la línea celular BGC-1 como en las células NIH-3T3. Con el objetivo de cuantificar el RNA total sembrado en cada calle, el Northern Blot fue hibridado con una sonda de cDNA de gliceraldehído 3P deshidrogenasa. Como este gen no es regulable por ésteres de forbol, los niveles de su mensajero son un indicador de la cantidad de RNA total sembrada en cada calle. Las cantidades de RNA total sembradas de células no tratadas con TPA y de células tratadas son las mismas tanto para la línea celular BGC-1 como para NIH-3T3.

3.4. REGULACION DE LA EXPRESION DEL GEN DE LA FN POR cAMP.

3.4.a. Regulación de la expresión del gen de la FN por FSH en un cultivo primario de células de la granulosa de rata.

Cuando se comenzó a estudiar la regulación del gen de la FN por cAMP se tomó como antecedente el trabajo ya comentado en donde Dorrington y Skinner mostraban que tratamientos con FSH en un cultivo primario de células de la granulosa de rata, provocaban una disminución en la síntesis de FN (98). Con el propósito de confirmar este resultado, preparamos un cultivo primario de células de la granulosa de rata, y sembramos 30 cajas de cultivo de 3,5 cm de diámetro con $2,5 \times 10^6$ células cada una. Luego de tres horas de sembradas las células el medio de cultivo fue removido, y cambiado por medio fresco. Quince cajas fueron tratadas con 200 ng /ml de FSH y 15 cajas fueron dejadas como control. A partir de este momento, tiempo cero, se preparó RNA total de grupos de tres cajas a las 24, 48, 72 y 96 horas y se cuantificó el mRNA de FN mediante la técnica de improntas puntiformes de Dot Blot (Figura 30). Observamos que a partir de las 24 horas de cultivo, las células tratadas con FSH muestran menor cantidad de mRNA de FN que las células no tratadas. A las 48 horas esta diferencia se incrementa notablemente, a las 72 horas ya disminuye y a las 140 horas desaparece.

Con este experimento se confirmó la inhibición de la síntesis de FN por FSH reportada en la literatura y se determinó que esta inhibición es consecuencia de una disminución de los niveles de mRNA de FN.

A.

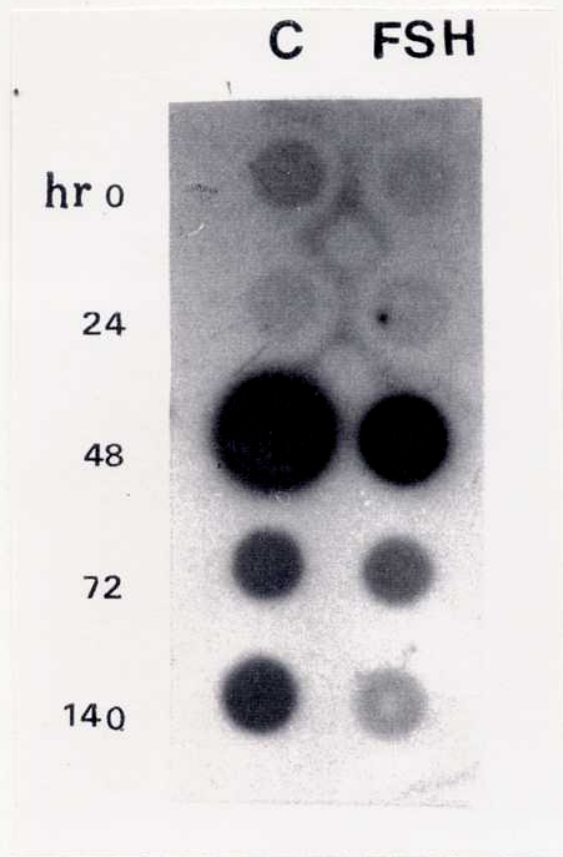


Figura 30: A. Dot Blot. Efecto de FSH (200 ng/ml) sobre los niveles del mRNA de FN en un cultivo primario de células de la granulosa de rata. Las células fueron incubadas por 0, 24, 48, 72, y 140 horas en presencia o ausencia de la droga indicada. Se preparó el RNA total de las células a cada uno de los tiempos indicados. Se sembraron iguales cantidades de RNA total en cada punto. La membrana fue hibridizada con una sonda de FN total. Autorradiografía de los resultados obtenidos.

B.

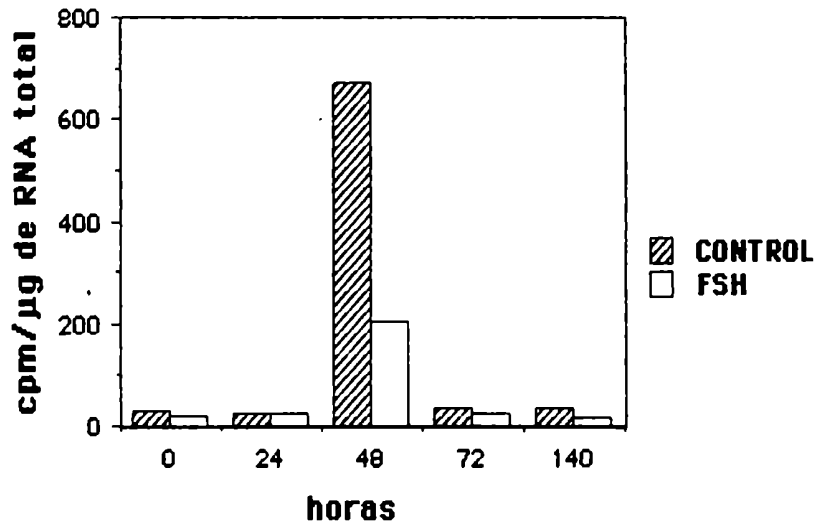


Figura 30: B Dot Blot. Efecto de FSH (200 ng/ml) sobre los niveles del mRNA de FN en un cultivo primario de células de la granulosa de rata. Las células fueron incubadas por 0, 24, 48, 72, y 140 horas en presencia o ausencia de la droga indicada. Se preparó el RNA total de las células a cada uno de los tiempos indicados. Se sembraron iguales cantidades de RNA total en cada punto. La membrana fue hibridizada con una sonda de FN total. B. Las improntas detectadas por hibridización se identificaron por la autorradiografía, se cortaron de la membrana de nitrocelulosa y se contaron en 3 ml de líquido de centelleo en un contador de centelleo Beckman. Los resultados obtenidos se observan en el gráfico.

3.4.b. Disminución de la síntesis de FN en la línea celular BGC-1.

Con el fin de comprobar si la disminución en la expresión del gen de la FN producida por FSH en el cultivo primario de células de la granulosa de rata ocurría también en nuestra línea celular BGC-1, estas células fueron tratadas con FSH (200 ng/ml), Bt₂cAMP (0,5 mM) o forskolina (10 µM) de acuerdo a los protocolos descritos en Materiales y Métodos. Las células fueron incubadas por diferentes tiempos con las sustancias mencionadas y marcadas con ³⁵S metionina. Todas las incubaciones se realizaron en medio suplementado con 1% v/v de NCS. Las proteínas secretadas al medio fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Para medir las cpm de las bandas de FN y de otras bandas, la autorradiografía revelada, fue colocada sobre el gel de poliacrilamida luego de

haber sido secado y expuesto, se cortaron las regiones de las bandas deseadas y se contaron las cpm de estas regiones colocándolas en 2 ml de líquido de centelleo en un contador de Centelleo Beckman. Los resultados se encuentran en la figura 31.

A.



Figura 31: A. Efecto del FSH (200 ng/ml), la forskolina (10 mM) y el Bt_2cAMP (0,5 mM) sobre la velocidad de biosíntesis de FN en células BGC-1. Se marcaron monocapas celulares en los tiempos indicados con un pulso de 4 horas de ^{35}S metionina. Electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas totales secretadas al medio a las 48 horas de tratamiento con las drogas indicadas. Se sembraron iguales cantidades de proteína radioactiva en cada pocillo y solamente se muestra la FN radioactiva.

B.

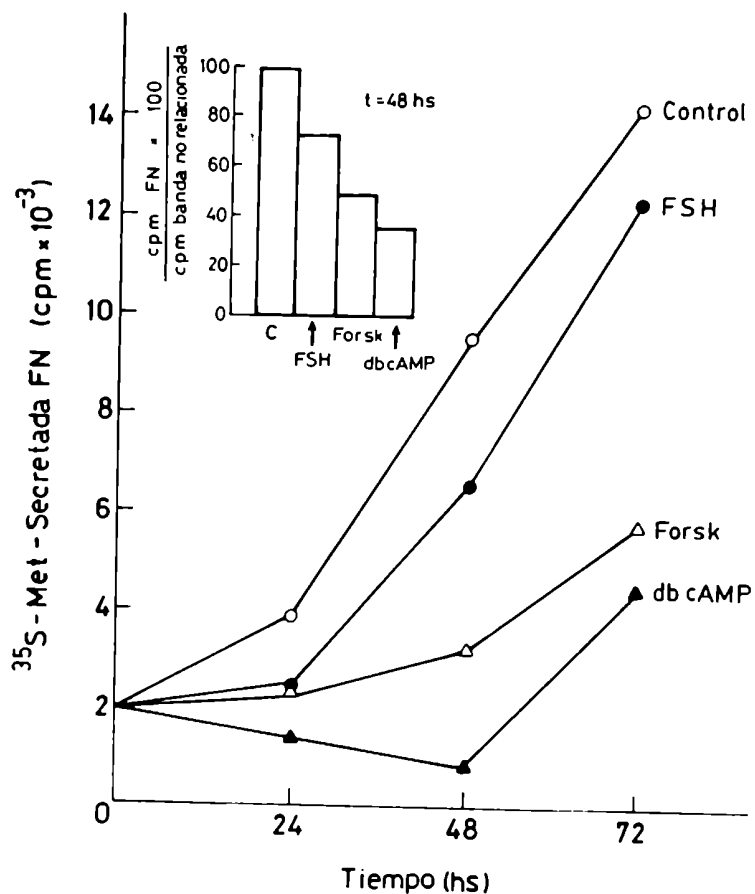


Figura 31: B Efecto del FSH (200 ng/ml), la forskolina (10 mM) y el Bt_2cAMP (0,5 mM) sobre la velocidad de biosíntesis de FN en células BGC-1. Se marcaron monocapas celulares en los tiempos indicados con un pulso de 4 horas de ^{35}S metionina. La FN fue inmunoprecipitada y sometida a electroforesis en geles con SDS como se describe en Materiales y métodos. Las bandas fueron ubicadas por la autoradiografía, cortadas del gel seco y contadas en 2 ml de líquido de centelleo en un contador de centelleo Beckman. El "inset" muestra las relaciones entre la radioactividad encontrada en la banda de FN y la radioactividad de una banda no relacionada cuya intensidad no varía significativamente con los diferentes tratamientos.

En las células control la velocidad de síntesis de FN aumenta con el tiempo hasta alcanzar sus niveles máximos a las 72 horas. En las células tratadas con FSH, forskolina y Bt_2cAMP observamos una disminución en la síntesis de FN respecto de las células control para cada uno de los tiempos. La máxima diferencia se observa a las 48 horas del tratamiento. Además la hormona FSH muestra un efecto inhibitorio menor que las drogas forskolina y Bt_2cAMP . Esto puede correlacionarse con la menor producción de estradiol de la línea celular BGC-1 tratada con FSH en comparación a la estimulación de la síntesis de estradiol producida por los tratamientos con forskolina en estas mismas células. Evidentemente el bajo efecto de la hormona FSH sobre la síntesis de FN mostraría una vez más la pérdida de receptores para FSH en la línea BGC-1.

A las 48 horas de tratamiento medimos también la radioactividad de una banda no regulada por cAMP ni por forskolina o por FSH durante las 72 horas del ensayo. En cada caso determinamos la relación:

$$\frac{\text{cpm FN}}{\text{cpm banda no regulada}} \times 100$$

Observamos que esta relación es máxima para las células control y que disminuye progresivamente en células tratadas con FSH, forskolina y cAMP.

3.4.c. Inmunofluorescencias de células BGC-1 tratadas y no tratadas con Bt_2cAMP .

Con el fin de observar si el efecto inhibitorio del cAMP sobre la síntesis de FN se veía reflejado en una disminución en la deposición de fibrillas de FN en la matriz extracelular se crecieron células tratadas y no tratadas con cAMP y luego de 48 horas de tratamiento fueron fijadas y sometidas a inmunofluorescencia con antisuero de conejo anti FN bovina (Figura 32). Se observa una marcada disminución en la matriz fibrilar de FN en las células tratadas con cAMP respecto de las no tratadas.

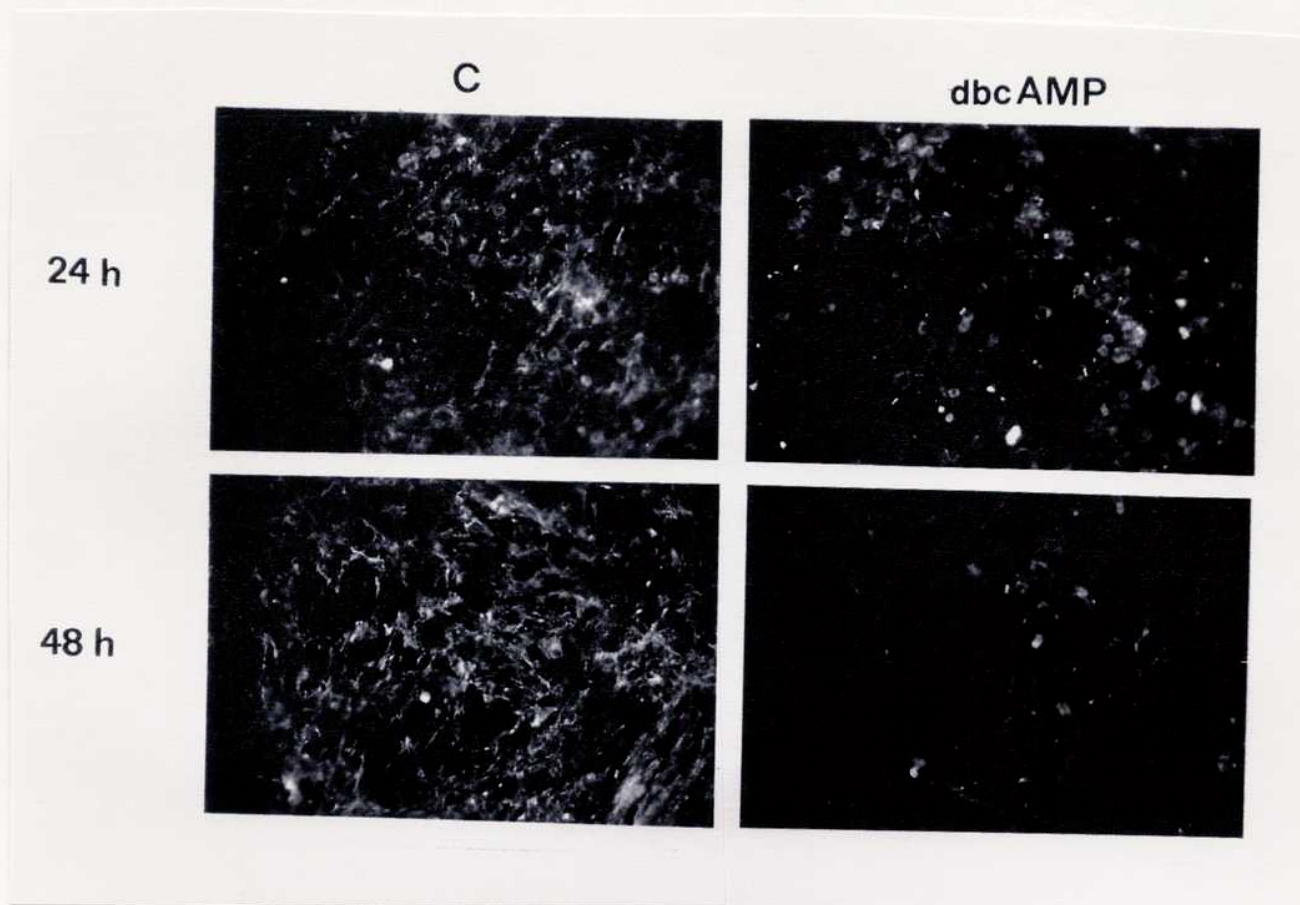


Figura 32: Detección de la presencia de FN total (matriz extracelular + citoplasmática) por inmunofluorescencia indirecta en las células BGC-1 tratadas y no tratadas con Bt₂cAMP durante 24 y 48 horas.

3.4.d. Disminución de los niveles de mRNA de FN en células tratadas con Bt₂cAMP.

La inhibición observada en los niveles de FN podría deberse a diferentes causas: a la disminución de los niveles de mRNA de FN, al aumento de la degradación de FN o a la inhibición de la traducción del mRNA de FN. Quisimos entonces analizar estas posibilidades, para ello crecimos células BGC-1 tratadas con Bt₂cAMP (0,5 mM), con forskolina (1,5 10⁻⁵M) y células control, durante 24 y 48 horas. Preparamos el RNA total de todas estas células y corrimos un gel de agarosa 1,5% p/v para hacer un Northern Blot que fue hibridado con una sonda de FN y una sonda de cDNA de gliceraldehído 3P deshidrogenasa. Para más detalles experimentales remitirse a Materiales y Métodos (Figura 33).



Figura 33: Efecto del Bt_2cAMP y la forskolina sobre los niveles del mRNA de FN en las células BGC-1. Las células fueron incubadas por 24 o 48 horas en presencia o ausencia de las drogas indicadas, cosechadas y luego fue preparado el RNA total de ellas. En cada calle fueron sembradas iguales cantidades de RNA total (15 mg). La membrana fue hibridizada con la sonda de FN y con la sonda de gliceraldeído 3P deshidrogenasa (G3PD) para estandarizar las cantidades de RNA total usadas en cada caso.

Luego de 24 horas de tratamientos con Bt_2cAMP se observa una disminución del 50% de los niveles de mRNA de FN de las células tratadas respecto de las control mientras no se observan alteraciones en las cantidades del mRNA correspondiente a la gliceraldeído 3P deshidrogenasa.

Luego de 48 horas de tratamiento con Bt_2cAMP o forskolina, el mRNA de FN es prácticamente indetectable mientras que los niveles del mRNA del gen control no se modifican apreciablemente por el tratamiento con Bt_2cAMP y disminuyen un poco en el caso de la forskolina.

En varias líneas celulares como HT 1080, JEG 3, WI 38 y NIH-3T3, los tratamientos con forskolina aumentan la expresión del gen de la FN (112,113). En consecuencia, con el fin de comprobar la especificidad celular del efecto inhibitorio se realizó el siguiente experimento control: células NIH 3T3 fueron sometidas a los tratamientos

con Bt₂cAMP durante 48 horas de acuerdo a los protocolos conocidos. Se preparó el RNA total y se realizó el mismo ensayo de Northern Blot que con las células de la granulosa (Figura 34).

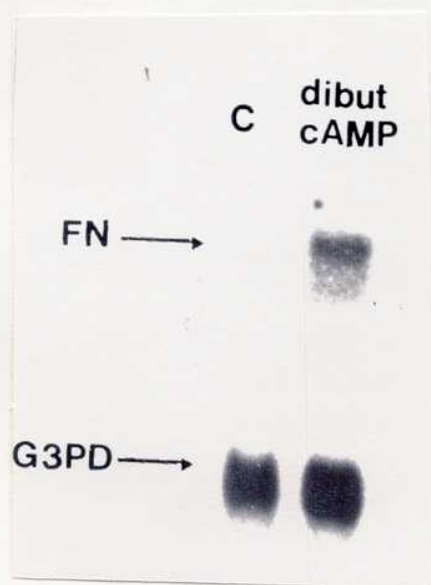


Figura 34: Efecto del Bt₂cAMP sobre los niveles del mRNA de FN en las células NIH-3T3. Las células fueron incubadas por 48 horas en presencia o ausencia de la droga indicada, cosechadas y luego preparado el RNA total de ellas. En cada calle fueron sembradas cantidades iguales de RNA total. La membrana fue hibridada con la sonda de FN y con la sonda de gliceraldehído 3P deshidrogenasa (G3PD) con el fin de estandarizar las cantidades de RNA total sembradas en cada caso.

Observamos que evidentemente el tratamiento de células NIH 3T3 con Bt₂cAMP provoca un aumento de los niveles del mRNA de FN como fue descripto previamente.

3.4.e. El efecto inhibitorio del Bt₂cAMP sobre la expresión del gen de la FN requiere la síntesis de alguna proteína.

Debido a que el efecto inhibitorio se observa a tiempos largos de tratamiento con Bt₂cAMP (24-48 horas), quisimos determinar si el mismo dependía de la síntesis de proteínas. Con este objetivo se analizó el efecto de la cicloheximida, (inhibidor de la síntesis proteica), sobre la reducción de los niveles del mRNA de FN causada por el Bt₂cAMP.

Previamente a la realización de este experimento, se determinó cuál es la mínima concentración de cicloheximida capaz de causar la máxima inhibición de la síntesis proteica y que además permitiera una buena viabilidad celular.

Se trataron células BGC-1 con 0, 2,5, 5, 10, y 15 µg/ml de cicloheximida, durante 24 horas. Al cabo de este período, el medio fue cambiado por otro carente de metionina fría, suplementado con ³⁵S metionina, y se prosigió a la incubación durante 4 horas. Al cabo de este tiempo se midió la incorporación de ³⁵S a proteínas por precipitación con tricloroacético y filtración a través de nitrocelulosa (Figura 35).

Se consideró como el 100% de síntesis proteica, al porcentaje de incorporación en células no tratadas con cicloheximida. Por lo tanto el porcentaje de inhibición es:

$$100 - \frac{\% \text{ de incorporación de } ^{35}\text{S metionina con } \{x\} \text{ de cicloheximida}}{\% \text{ de incorporación de } ^{35}\text{S metionina sin cicloheximida}}$$

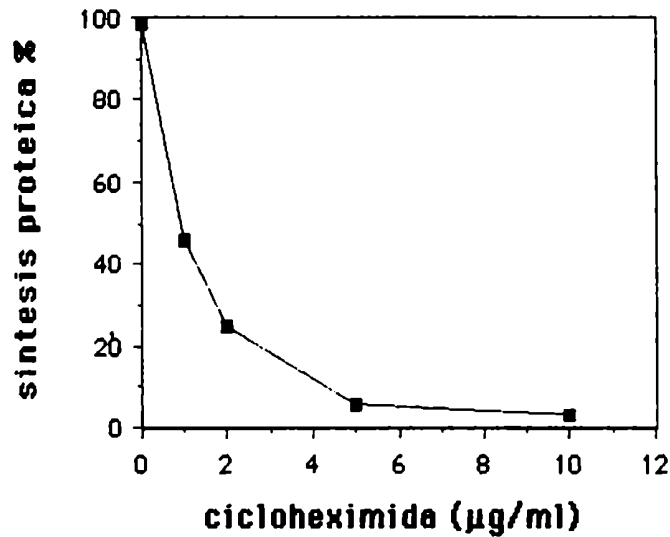


Figura 35: Detección de la mínima concentración de cicloheximida necesaria para producir una máxima inhibición de la síntesis proteica en las células BGC-1. Las células fueron tratadas durante 24 horas con las concentraciones de cicloheximida indicadas. Se detectó para cada concentración de cicloheximida el porcentaje de síntesis proteica a partir de la precipitación con tricloroacético de las proteínas marcadas durante un pulso de 4 horas con ^{35}S metionina.

Se decidió usar entonces la concentración de cicloheximida de 5 µg/ml que produce una inhibición de la síntesis proteica del 98% y que no afecta la viabilidad de las células BGC-1.

Con estos datos procedimos a realizar el ensayo deseado.

Crecimos las células BGC-1 en las cajas siguiendo siempre el mismo protocolo descrito en Materiales y Métodos. Luego de las 4 horas de la siembra de las células, el medio fue removido y se trataron 4 cajas con Bt_2cAMP , 4 cajas con cicloheximida, 4 cajas con Bt_2cAMP + cicloheximida, y 4 cajas se dejaron como control. Al cabo de 48 horas se preparó el RNA total de todas las células, y con este RNA corrimos un Northern Blot que se hibridó con las sondas de FN y de gliceraldehído 3P deshidrogenasa (Figura 36).

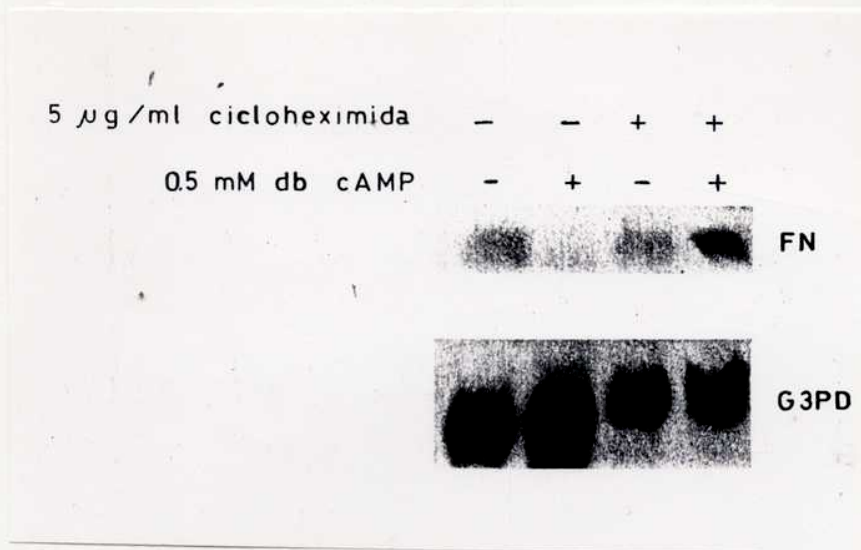


Figura 36: Efecto de la cicloheximida (5 μ g/ml) sobre la inhibición de los niveles de mRNA de FN por Bt₂cAMP en las células BGC-1. Las células fueron incubadas durante 48 horas en presencia o en ausencia de las drogas indicadas. Los mRNA de FN y gliceraldehído 3P deshidrogenasa fueron detectados por análisis de Northern Blot.

El tratamiento con cicloheximida no solamente anula la inhibición de los niveles del mRNA de FN provocada por Bt₂cAMP si no que además revierte el efecto del Bt₂cAMP, observándose un aumento de los niveles de mRNA de FN respecto del control. En efecto, en las células tratadas con Bt₂cAMP y cicloheximida se observa una cantidad de mRNA de FN cuatro veces mayor en relación a las células control o a las células tratadas con cicloheximida solamente. Estos resultados muestran que el efecto inhibitorio requiere de la síntesis de alguna proteína intermediaria que no puede fabricarse en presencia de cicloheximida, la cual, o bien es inducida por Bt₂cAMP o bien es una proteína que se expresa constitutivamente y que tiene una vida media muy corta. La ausencia de síntesis de esta proteína en presencia de cicloheximida hace que el Bt₂cAMP provoque un aumento de los niveles de mRNA de FN. Estos resultados son coincidentes con lo que se observa en la regulación hormonal del activador tisular del plasminógeno (tPA) en cultivos primarios de granulosa de rata. En este caso cuando las células se tratan con FSH o GnRH

aumentan los niveles del mRNA del tPA, 20 y 12 veces respectivamente. En presencia de cicloheximida, la estimulación por FSH se incrementa a 30 veces mientras que la inducción por GnRH se inhibe. Este experimento indica que mientras la inducción por FSH es independiente de la síntesis proteica, la inducción por GnRH requiere la síntesis de alguna proteína intermediaria. La superinducción observada con FSH más cicloheximida puede justificarse por un aumento de la estabilidad del mRNA o por un aumento de la velocidad de transcripción del gen tPA (114).

3.4.f.El Bt_2cAMP no altera la estabilidad del mRNA de FN en células BGC-1.

El mecanismo que conduce a la reducción de los niveles de mRNA de FN por cAMP podía involucrar o bien una disminución de la transcripción del gen o bien una desestabilización del mRNA de FN.

Con el objetivo de determinar cuál de estas dos posibilidades era la correcta hicimos nuevamente Northern Blots usando RNAs extraídos de células tratadas o no tratadas durante diferentes tiempos con 1 $\mu g/ml$ de Actinomicina D (inhibidor de la transcripción). El diseño del experimento fue similar al utilizado por Dong y colaboradores (115).

Las células fueron sembradas en 32 cajas a la densidad acostumbrada para los ensayos, la mitad de las cajas fueron tratadas con Bt_2cAMP y la otra mitad fueron dejadas sin tratamiento, luego de 24 horas las 32 cajas fueron tratadas con Actinomicina D. Seguidamente se preparó el RNA total de las células de las cajas a las 0, 2,5, 4,5, y 6,5 horas posteriores al agregado de Actinomicina D (Figura 37).

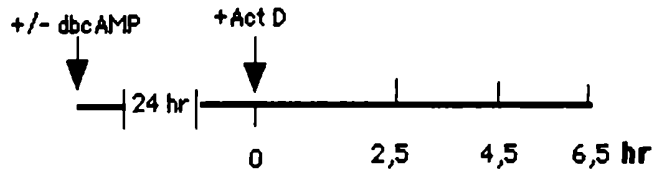
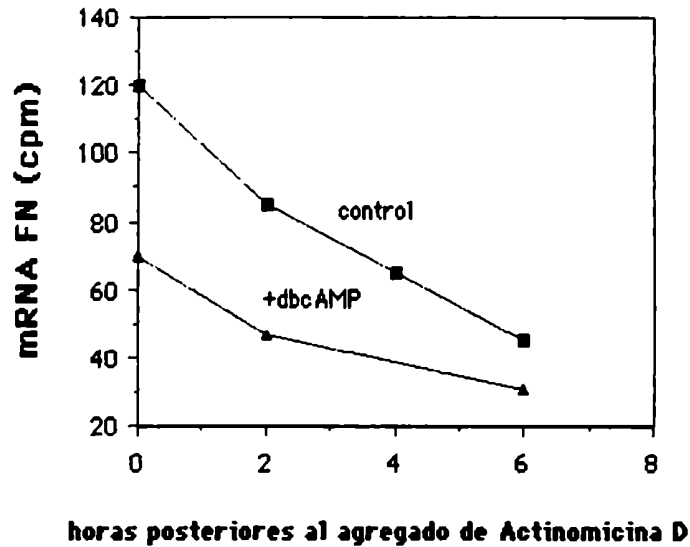


Figura 37: Efecto del bloqueo de la transcripción por Actinomicina D sobre los niveles de mRNA de FN en células BGC-1 tratadas o no tratadas con 0,5 mM $Bt_{2c}AMP$. El diseño del experimento se encuentra esquematizado debajo del gráfico. Las flechas indican los tiempos a los que fueron detectados los niveles de mRNA de FN por análisis cuantitativos de Northern Blot. Las bandas de mRNA de FN fueron detectadas por hibridación, ubicadas por la autoradiografía, cortadas de la membrana de Gene Screen y contadas en 2ml de líquido de centelleo en un contador de centelleo Beckman.

Luego de 24 horas de cultivo celular, el bloqueo de la transcripción por Actinomicina D causa una disminución continua de los niveles del mRNA de FN. Puede estimarse una vida media aparente de 6 horas para el mRNA de FN. En las mismas condiciones el tratamiento con $Bt_{2c}AMP$ no aumenta la velocidad de degradación del mRNA de FN. Además la Actinomicina D causa una reducción del efecto inhibitorio del $Bt_{2c}AMP$ sobre los niveles del mRNA de FN a las 6,5 horas. Todo esto indica que el $Bt_{2c}AMP$ no afecta negativamente la estabilidad del mRNA de FN. Cuando la transcripción es parcialmente bloqueada se atenúa el efecto

inhibitorio del cAMP sobre el mRNA de la FN, probablemente esto se deba a la necesidad de síntesis continua de alguna proteína, lo cual ya se había demostrado en el experimento con cicloheximida.

3.4.g. Transfecciones con construcciones CAT.

Para confirmar la naturaleza transcripcional de la regulación de la síntesis de FN por cAMP y a la vez determinar qué porción del promotor del gen de la FN era la responsable de la inhibición transcripcional causada por Bt_2cAMP , se transfectaron células BGC-1 con 10 μg de 2 plásmidos diferentes: uno de ellos conteniendo la región -510/+69 del promotor de la FN humana seguida del gen CAT llamado p-510/+69 FN-CAT, y el otro conteniendo la región -223/+45 del promotor de la FN humana, seguida del gen CAT, llamado p-223/+45 FN CAT. En ambos casos la expresión de CAT refleja el rol de las regiones del promotor de la FN introducidas en las construcciones sobre la expresión de esta proteína. Como control fue usado el plásmido pSV₂CAT, que contiene al promotor temprano de SV40 (simian virus 40) seguido del gen CAT. Las construcciones con las regiones del promotor de la FN mostraron ser tan activas en la transfección de células BGC-1 como la construcción que contiene el promotor de SV40. En todos los casos al cabo de 5 horas de contacto entre los cultivos celulares y el DNA, las células fueron tratadas o no con Bt_2cAMP (Figura 38).

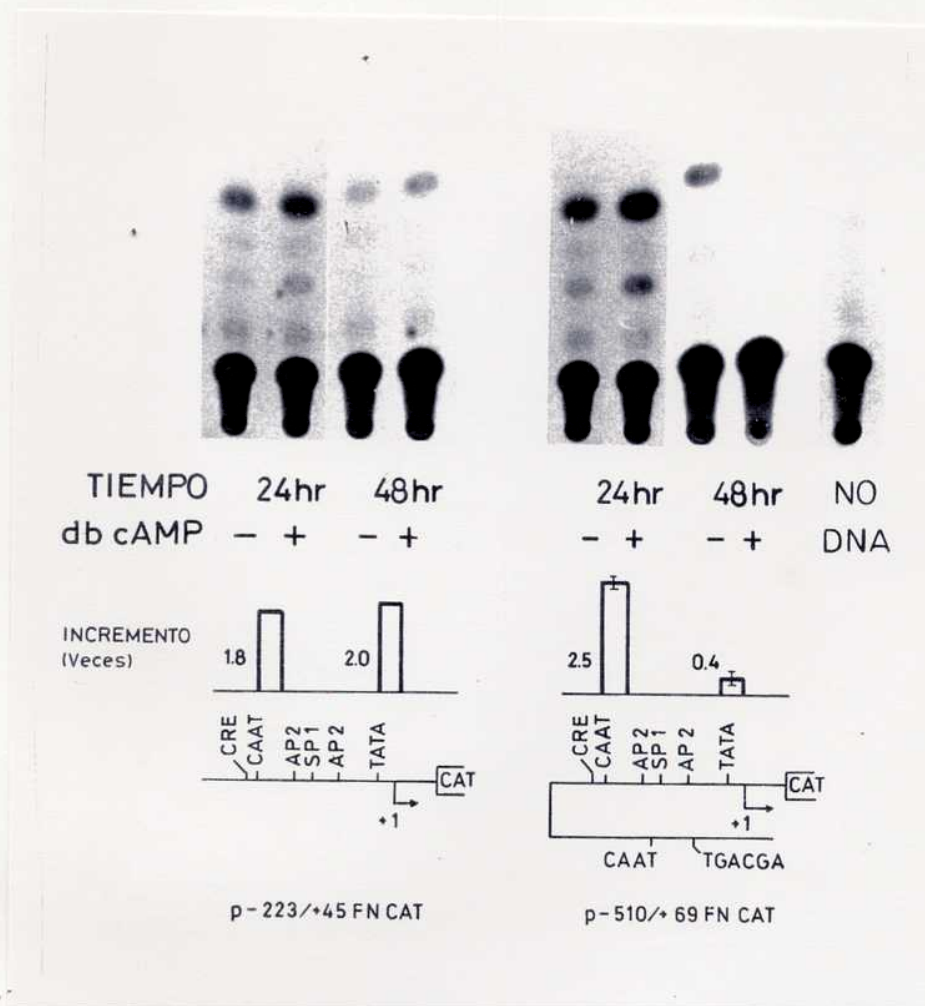


Figura 38: Expresión transitoria de las construcciones FN-CAT transfectadas en las células BGC-1 durante diferentes tiempos en presencia o ausencia de 0,5 mM $Bt_{\alpha}cAMP$. Las células fueron transfectadas con el plásmido p-220/+45 FN-CAT (izquierda) y con el plásmido p-510/+69 FN-CAT, por el método del fosfato de calcio. Las bandas representan el incremento o la disminución en la actividad CAT (medida como porcentaje de conversión) en las células tratadas con $Bt_{\alpha}cAMP$ respecto de las células no tratadas para cada plásmido.

La actividad de CAT de células BGC-1 transfectadas con el plásmido p-223/+45 FN-CAT es estimulada por Bt_2cAMP tanto a las 24 como a las 48 horas del tratamiento. En ambos casos el aumento de la expresión del gen CAT en las células tratadas es de aproximadamente 2 veces. Esta inducción es semejante a la obtenida con cantidades similares del plásmido en las líneas celulares HT 1080 y en JEG-3 (113).

La actividad de CAT de células transfectadas con la construcción p-510/+69FN-CAT aumenta 2,5 veces por el tratamiento con Bt_2cAMP respecto de las células no tratadas, pero esto se observa solamente a las 24 horas del tratamiento. Por el contrario a las 48 horas del tratamiento las células tratadas con Bt_2cAMP muestran una disminución del 60% en su actividad CAT respecto de las células no tratadas.

Dado que los experimentos de Northern Blot con células NIH-3T3 mostraron que el tratamiento con Bt_2cAMP incrementa la cantidad de mRNA de FN resultaba importante determinar si esta activación se correlacionaba con un aumento en la actividad de CAT en células NIH-3T3 transfectadas con la construcción p-510/+69 FN-CAT (Figura 39). Las células NIH-3T3 también fueron transfectadas con una construcción que contenía 1,6 kb del promotor de la FN seguidas del gen CAT .

Con todas las construcciones vemos que la expresión del gen CAT aumenta con el tratamiento con Bt_2cAMP aún a las 48 horas.

La región del promotor del gen de FN comprendida entre -220 y +1 presenta la secuencia consenso del elemento CRE entre las posiciones -173/-166 (5' TGACGTCA 3'), la secuencia consenso CCAAT entre -152/-148, la secuencia para AP-2 entre las posiciones -110/-119 en la cadena no codificante (5' CCGCCCGCC 3'), las secuencias para SP1 entre -102/-92 y entre -97/-89 (5' GGGGCGGGG 3'), una segunda secuencia para AP-2 entre -68/-60 (5' TCCCCGCG 3') y la TATA box (5' ATATAA 3') entre -25/-20.

Como se menciona en la introducción en la mayoría de los genes estudiados, tanto la secuencia CRE como las secuencias AP-2 median el efecto inductor de la transcripción por cAMP. Por lo tanto la presencia de un sitio CRE y de dos sitios AP-2 entre las posiciones -223/+45 explicarían el incremento en la actividad del promotor en presencia de Bt_2cAMP del plásmido p-223/+45FN-CAT tanto en la línea celular BGC-1 como en la línea celular NIH 3T3. Dean y colaboradores (113) ya habían demostrado esto para otras líneas celulares.

Por lo tanto, en el caso de nuestras transfecciones, las secuencias entre -510/-223 serían las responsables de una respuesta dual al cAMP en las células de la granulosa BGC-1 transfectadas con el plásmido p-510/+69 FN-CAT. Este efecto

estaría caracterizado por una estimulación transitoria seguida de una inhibición de la transcripción. Esta inhibición de la actividad CAT a las 48 horas de tratamiento estaría correlacionada con la disminución de los niveles del mRNA de FN que se observa en los Northern Blot de RNA de células de la granulosa tratadas con cAMP.

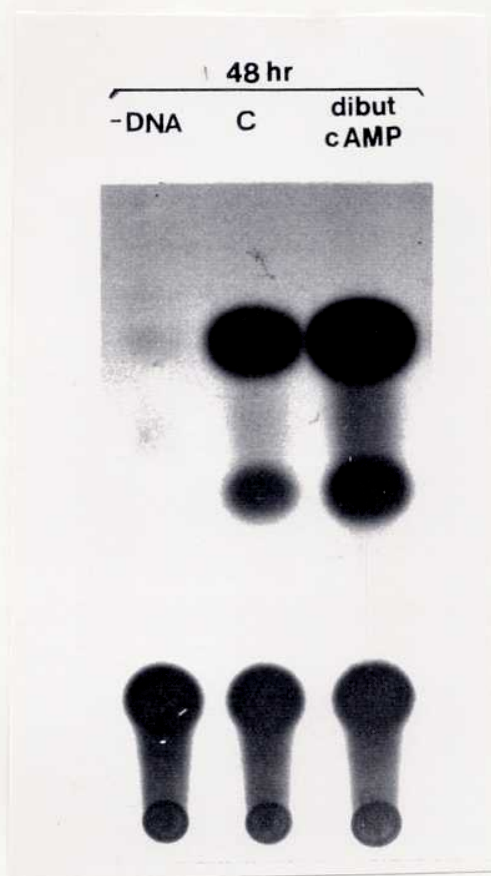


Figura 39: Expresión transiente de la construcción p-510/+69 FN CAT transfectada en las células NIH-3T3 en presencia o ausencia de Bt₂cAMP durante 48 horas.

3.4.h. Unión de proteínas nucleares al promotor de la Fibronectina.

Con el fin de determinar si las células BGC-1 tenían proteínas nucleares que interactuaban con elementos consenso, especialmente con los elementos CRE y AP-2 y con la región -510/-223, que resultó ser la responsable del efecto inhibitorio, se hicieron ensayos de "footprinting" con DNaseI sobre el promotor de la FN (Figura 40).

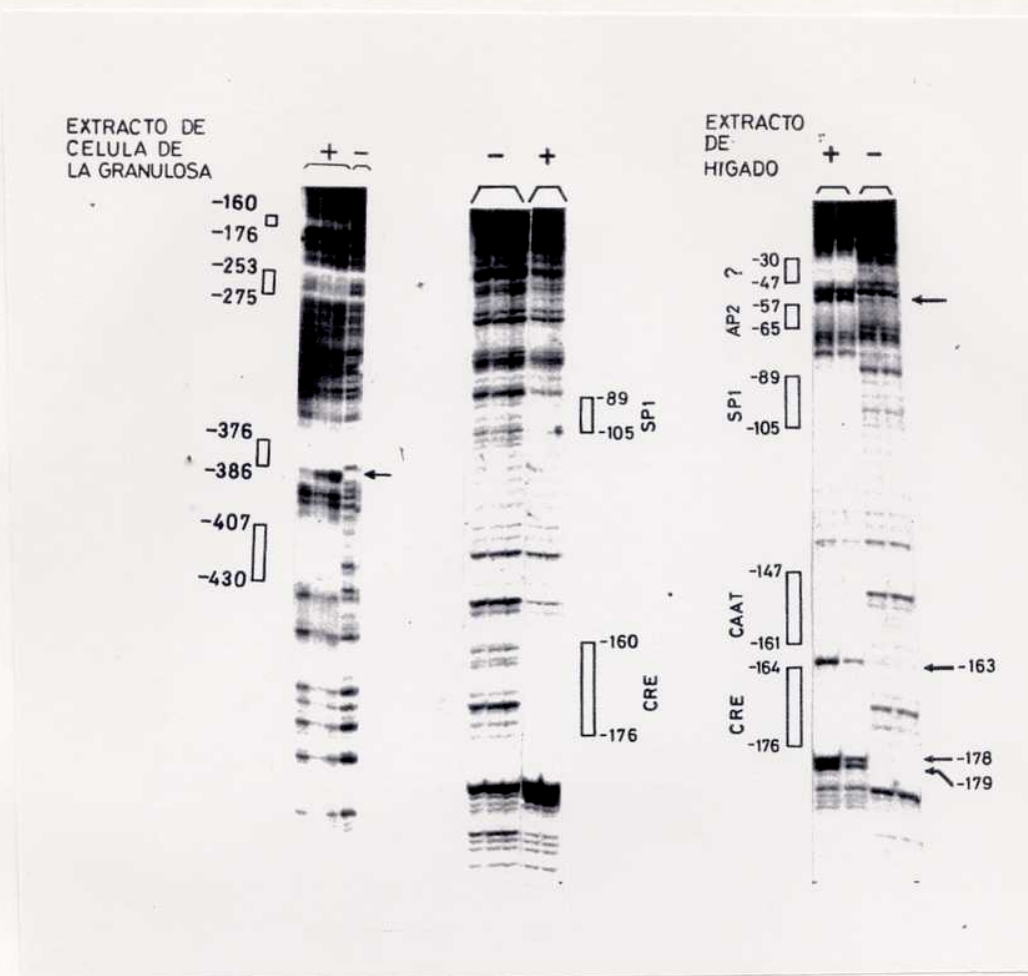


Figura 40: Ensayo de "footprinting" con DNasaI del promotor de FN. Se obtuvieron dos fragmentos de DNA que cubren la región 5' flanqueante del gen de la FN humana, uno entre las posiciones -500 y -200 (izquierda) y el otro entre las posiciones -200 y +45 (centro y derecha). Los dos fragmentos fueron marcados con ^{32}P en un extremo e incubados en ausencia (-) o presencia(+) de extractos nucleares de células BGC-1 o de hígado de rata. Posteriormente fueron tratados con DNasaI y se corrió una electroforesis en geles de poliacrilamida 8% desnaturizante como se describe en Materiales y Métodos.

Observamos 5 regiones protegidas por proteínas de extractos nucleares de BGC-1 en el promotor de la FN:

- 1) -430/-407
- 2) -386/-376
- 3) -275/-253
- 4) -176/-160 = CRE
- 5) -105/-89 = SP1

Vemos que las células de la granulosa contienen grandes cantidades de CREB unido a la secuencia -176/-160. Al usar extractos de células de la granulosa tratadas con Bt_2cAMP no se observan cambios en la protección de los sitios CRE en los ensayos de DNasaI.

Ninguna de las dos secuencias AP-2 detectadas en el promotor del gen de la FN interactúan con proteínas nucleares de la granulosa ni siquiera a altas concentraciones de extracto.

Dentro de la región -510/-223 se observan tres regiones protegidas:

- 1) -430/-407
- 2) -386/-376
- 3) -275/-253

La secuencia -430/-407 incluye la secuencia 5' TGACGCA 3' que es una secuencia consenso CRE que no tiene en el 6º lugar una base T (314). Esta región incluye también al sitio consenso 5' GNNACaaNNTGTYCT 3' que es característico del sitio de unión del receptor de glucocorticoides (116).

Para los ensayos con DNasaI fueron usados como control extractos nucleares de hígado de rata. Estos extractos muestran un patrón de protección diferente al observado para las células BGC-1.

Aparecen 8 regiones protegidas:

- 1) -430/-407
- 2) -386/-376
- 3) -275/ -253
- 4) -176/-164 CRE
- 5) -161/-147 CAAT
- 6) -105/-89 SP1
- 7) -65/-57 AP-2 en la cadena codificante
- 8) -47/-30 secuencia semejante a SP1

Los extractos de hígado muestran también bandas hipersensibles en las posiciones -179, -178 y -163 o sea alrededor del sitio CRE. Estas bandas nunca aparecen en los "footprinting" hechos con células de la granulosa.

A continuación se muestran los diferentes patrones de protección existentes al usar extractos celulares de BGC-1 o al usar extractos de hígado de rata. (Figura 41).

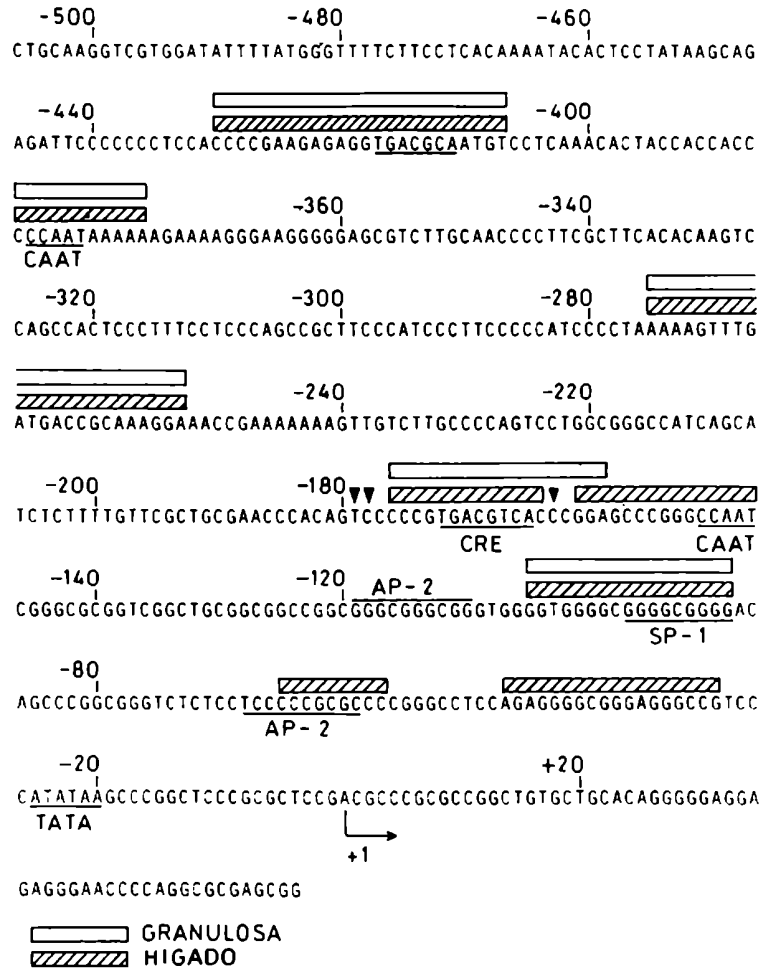


Figura 41: Regiones del promotor de FN que interactúan con las proteínas nucleares de células BGC-1 y de hígado de rata. Se observa la secuencia nucleotídica de la región 5' flanqueante del gen de la FN entre las posiciones -500 y +20. El sitio de iniciación de la transcripción está indicado con una flecha en la posición +1. Las "boxes" se encuentran dibujadas sobre las secuencias que son protegidas en el ensayo de DNasaI. Fueron subrayadas las secuencias semejantes a los elementos reguladores conocidos.

DISCUSSION

A.Introducción.

El objetivo de esta tesis fue estudiar la regulación de la expresión del gen de la Fibronectina por FSH y GnRH y dilucidar los mecanismos moleculares involucrados. En las primeras 0,6 kb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción del promotor del gen de la FN humana existen dos secuencias consenso para AP-2 y una para el CRE. AP-2 es un elemento que responde tanto a ésteres de forbol como a cAMP y el CRE es un elemento que responde a cAMP. Se buscó entonces un sistema "in vitro" que respondiera a estas drogas.

B.Objetivos generales.

Los cultivos primarios de células de la granulosa de rata han sido ampliamente usados para el estudio de la regulación hormonal de la expresión genética. Por ejemplo este sistema celular se usó para el estudio de la regulación del gen de la proopiomelanocortina por LH y por androstendiona (117); para la regulación de la expresión de la biosíntesis de la apolipoproteína E por cAMP y ésteres de forbol (118). Así también, cultivos primarios de granulosa humana fueron usados para estudiar el aumento de la síntesis del mRNA de la enzima citocromo P450 de ruptura de la cadena lateral del colesterol y la secreción de progesterona (119). Recientemente Pei y colaboradores (120) estudiaron también la regulación transcripcional del gen de la α inhibina por cAMP en cultivos primarios de granulosa de rata. Vieron que la expresión del gen de la α inhibina aumenta por tratamientos con FSH o forskolina en forma dependiente de la dosis de la droga. La secuencia del promotor de la α inhibina presenta varias secuencias CREs potenciales y sitios de unión a AP-2 capaces de mediar la regulación por cAMP. En este trabajo los autores concluyeron que un factor tipo CREB es el responsable de la regulación por cAMP del gen de la α inhibina en las células de la granulosa del ovario.

Por otro lado Dorrington y Skinner (98) demostraron en cultivos primarios de células de la granulosa de rata, la regulación de la síntesis de FN por GnRH y FSH. Determinaron que la hormona GnRH aumenta la producción de FN entre 2,5 y 5 veces en relación a células no tratadas, y que la hormona FSH suprime la producción de FN a niveles no detectables. El Bt_2cAMP tiene los mismos efectos que la hormona FSH.

C. Obtención de la línea celular BGC-1 de células de la granulosa del ovario bovinas.

Los cultivos primarios de rata no son una fuente abundante de células y entonces se comenzó a trabajar con células de la granulosa bovina que se fueron manteniendo en cultivo. Luego de varios repiques el cultivo primario dio origen a una línea celular de granulosa bovina. A partir de ese momento fue posible trabajar sin limitaciones en la cantidad de material así como también repetir los experimento con un alto grado de reproducibilidad. La línea de células de la granulosa bovina fue llamada BGC-1. La elección de la especie animal de células de la granulosa se basó en que el número de células que se pueden obtener a partir de una preparación de granulosa bovinas y el número de repiques que se pueden hacer de un cultivo primario de estas células es mucho mayor que si partieramos de células de la granulosa de rata, con lo cual se incrementa la probabilidad de que alguna de las células se desdiferencie perdiendo alguno de sus controles internos originando así una línea estable.

D. Características de la línea BGC-1.

Luego de más de 160 generaciones las células BGC-1 conservaban sus principales características de células de la granulosa del ovario tales como: respuesta a FSH, forskolina y Bt_2cAMP en la inducción de la esteroidogénesis, inhibición de la síntesis de FN descripta previamente por la literatura y similitud morfológica con cultivos primarios de granulosa bovinas y de rata.

Las células de la línea celular obtenida se dividen rápidamente. El tiempo de duplicación es de 23,5 horas y presentan un cariotipo altamente modificado el cual muestra varias fusiones cromosomales y deleciones que conducen a un estado diploide que es raro de encontrar en una línea celular.

El hecho de que la línea BGC-1 haya sido obtenida sin transformación viral y que mantenga un cariotipo diploide podría ser el motivo por el cual las células BGC-1 responden a FSH y a agentes que aumentan los niveles de cAMP intracelulares aumentando la producción de FN.

Normalmente los cultivos primarios de células de la granulosa bovina pueden mantenerse durante 11 o 12 generaciones y los de rata 1 o 2 generaciones.

En 1978 Gospodarowicz y colaboradores demostraron que la adición del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) al medio de un cultivo primario de células de la granulosa bovina aumentan hasta 60 el

número de generaciones sin observarse cambios significativos en el cariotipo normal de las células (126). La línea celular BGC-1 se mantiene sin el agregado de ninguno de estos factores y el medio de cultivo puede suplementarse con cantidades muy bajas de NCS (1%), concentración a la cual los factores de crecimiento se encuentran en muy pequeñas proporciones. Estas células muestran modificaciones en su cariotipo. Se puede concluir que durante el proceso de establecimiento de la línea celular se seleccionó una población estable con un genotipo alterado capaz de expresar un fenotipo independiente de los factores de crecimiento.

Si bien existen otras líneas celulares de granulosa en todas ellas la inmortalización celular fue llevada a cabo por transformación viral de cultivos primarios y las líneas resultantes perdieron la habilidad de responder a FSH. Así, cultivos primarios de células de la granulosa de rata se transfectaron con DNA de SV40 o con DNA de SV40 más el oncogen humano Ha-ras activado. Las células así obtenidas perdieron la capacidad de responder a gonadotrofinas, pero luego de tratamientos con forskolina, toxina del cólera, o 8-Br-cAMP producían progesterona a niveles semejantes que los cultivos primarios. Las células transfectadas con SV40 solamente no producían progesterona. Esto sugirió que en este caso la expresión del oncogen ras activado en las células de la granulosa juega un rol fundamental en la persistencia de la inducción de la esteroidogénesis (110). Otra línea celular de granulosa fue obtenida por Zilberstein y colaboradores a partir de cultivos primarios de granulosa de rata transformados con SV40. Esta línea celular conserva todas las características morfológicas originales pero ha perdido todos los receptores para gonadotrofinas así como también la actividad esteroidogénica (121).

Las células BGC-1 no solamente no fueron inmortalizadas por transformación viral si no que además retienen la respuesta hormonal y pueden producir estradiol en ausencia del agregado exógeno de precursores como los andrógenos. Esto último indicaría la presencia de la enzima que cliva la cadena lateral del C21 que es típica de cultivos primarios de granulosa bovinas (122). Las células de la granulosa de rata producen estrógenos a partir de andrógenos originados en las células tecales. Las células de la granulosa bovinas tienen la enzima C21 (17 hidroxilasa y 17-20 liasa) y por lo tanto pueden producir sus propios andrógenos a partir los esteroides presentes en las células y así finalmente originar estrógenos.

E.Regulación hormonal de la síntesis de FN por GnRH en la línea celular BGC-1.

Las evidencias de que la hormona GnRH estimula la síntesis de FN en cultivos primarios de granulosa de rata y la presencia de dos sitios AP-2 en las primeras 0.6 kb del promotor del gen de la FN llevaron al estudio de la regulación de este gen por ésteres de forbol. Si bien el mecanismo molecular de acción intracelular de la hormona GnRH no ha sido completamente dilucidado, se sabe que la activación del receptor de GnRH activa la vía del fosfatidil inositol difosfato (123) que termina con la activación de la PKC por diacilglicerol. El TPA es un éster de forbol que imita la acción del diacilglicerol.

Como no se conocían evidencias que mostrasen que la hormona GnRH tuviera acción en las células de la granulosa bovinas (124) no se estudió la regulación de la expresión por la hormona si no que directamente se investigó el efecto del TPA.

No se encontraron diferencias en la síntesis y la expresión del gen de la FN entre células de la granulosa bovina tratadas y no tratadas con TPA. Esto puede deberse a diferentes razones. Por un lado, se demostró que en especies diferentes la regulación de la expresión de un gen puede variar, así la hormona GnRH inhibe la esteroidogénesis de las células de la granulosa en primates por un mecanismo diferente al de la inhibición en ratas (125). En nuestro caso GnRH si bien aumenta los niveles de síntesis de FN en cultivos primarios de granulosa de rata, no lo hace en la línea celular BGC-1, de origen bovino.

Otra posibilidad es que la línea celular BGC-1 haya perdido la capacidad de regular al gen de la FN por TPA por haberse mutado o delecionado algún gen involucrado en esta regulación, como consecuencia de las múltiples fusiones cromosomales sufridas. La PKC no solamente es estimulada por el TPA que imita al diacilglicerol, si no también por Ca^{++} . Los niveles de Ca^{++} intracelular pueden ser aumentados por el ionóforo de calcio. Experimentos que no se muestran en donde se hicieron tratamientos con ionóforo de calcio en la línea BGC-1 no mostraron diferencias en la síntesis de FN entre las células tratadas y las control.

F.Regulación hormonal de la síntesis de FN por FSH en las células de la granulosa del ovario de rata.

Dorrington y Skinner habían demostrado la inhibición de la síntesis de FN por FSH en cultivos primarios de granulosa de rata (93). En nuestro trabajo, usando cultivos primarios de granulosa de la misma especie se probó que esta inhibición de la

síntesis de FN observada a nivel de la secreción de proteínas es consecuencia de una disminución en los niveles del mRNA. Tratamientos con FSH por distintos tiempos muestran que a las 48 horas los niveles del mRNA de FN de las células tratadas es mucho menor (5 veces) que el de las células control. A las 96 horas este efecto ya no existe. El hecho de que esta inhibición ocurra a tiempos largos permitiría suponer la presencia de alguna proteína mediadora de este efecto. La desaparición de la inhibición a las 96 horas del tratamiento probablemente se deba a una inactivación de la hormona luego de tiempos tan largos de cultivo.

G.Regulación hormonal de la síntesis de FN por FSH, Bt₂cAMP y forskolina en la línea celular BGC-1.

Los resultados de inhibición de la síntesis proteica se repitieron en la línea celular BGC-1, observándose no solamente una disminución de FN por FSH si no también por otras drogas que aumentan los niveles intracelulares de cAMP como el Bt₂cAMP y la forskolina. Los niveles de inhibición de la síntesis de FN son mucho mayores con los tratamientos con Bt₂cAMP, un poco menores con forskolina y notablemente menores con FSH.

En los cultivos primarios de granulosa de rata la inhibición de la síntesis de FN por FSH, a las 48 horas del tratamiento es de un 80%, mientras que en BGC-1, al mismo tiempo, es simplemente de un 20%. Cuando se observa la producción de estradiol de la línea BGC-1 luego de tratamientos con FSH, esta producción es cinco veces menor que la obtenida con tratamientos con forskolina.

La baja inhibición de la síntesis de FN por FSH, en relación a los efectos de la forskolina y el cAMP y los bajos niveles de producción de estradiol luego de tratamientos con FSH de la línea BGC-1 permiten suponer que la línea celular BGC-1 haya perdido una cantidad considerable de receptores de membrana para FSH durante el proceso de su establecimiento. De todas maneras la escasa respuesta a la FSH de la línea BGC-1 es comparable a la observada por otros autores en cultivos primarios de células bovinas (126)

Los experimentos de Northern Blot muestran que la disminución de la síntesis de FN por Bt₂cAMP y forskolina ocurre también a nivel del RNA en la línea celular BGC-1.

El efecto del cAMP no es un efecto generalizado sobre la expresión de todos los genes de las células. En efecto, en los experimentos de Northern se puede observar que no existe regulación de la expresión del gen de la enzima gliceraldehído 3 P deshidrogenasa. Es

por esto que este gen es usado para cuantificar la cantidad de RNA total que está presente en cada calle de los experimentos de Northern que se muestran a lo largo de esta tesis.

Efectos similares del cAMP sobre los niveles del mRNA de FN se observaron en citotrofoblastos humanos (127). Ya en 1981 Fagan y colaboradores (128) vieron que al transformar fibroblastos embrionarios de pollo con el virus de sarcoma de ave, el mRNA de la FN de tipo celular disminuye a un 10% del mRNA que producen los fibroblastos normales. Cuando transformaron los mismos fibroblastos con un mutante del virus de sarcoma de ave, sensible a la temperatura para la transformación, vieron que al infectar el cultivo a la temperatura permisible para el virus y luego transferirlo a la temperatura no permisible, el mRNA de la FN de tipo celular aumenta pasado un período de 15 horas. El tiempo en que transcurren las variaciones es idéntico al que se observa para los cambios en los mRNAs de los procolágenos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ pero más lento que el de los cambios en la morfología, los niveles de cAMP y el transporte de glucosa que ocurren cuando los fibroblastos se transforman con los mismos mutantes. El lento aumento en los niveles del mRNA de la FN de tipo celular y de los procolágenos, luego de un cambio de temperatura, en los fibroblastos infectados con los mutantes sensibles a la temperatura, es consistente con una acción indirecta del producto de los genes del virus del sarcoma sobre la regulación de los genes celulares.

En estos casos se desconoce los mecanismos involucrados en la disminución de los niveles del mRNA de FN.

H. Presencia de una proteína intermediaria en el efecto inhibitorio del Bt_2cAMP sobre la expresión del gen de la FN en las células de la granulosa.

El experimento de Dot Blot realizado con células de la granulosa de rata muestra que recién a las 48 horas del tratamiento existe un efecto notorio del cAMP sobre el mRNA de la FN. También en la línea BGC-1 el cAMP tiene un efecto máximo a las 48 horas del tratamiento.

Esto indicaba que en el efecto inhibitorio del cAMP sobre los niveles de mRNA de la FN en las células de la granulosa podría estar involucrada alguna proteína intermediaria.

Finalmente los experimentos con cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica) mostraron que evidentemente existe una proteína mediadora del efecto. Esto se dedujo luego de observarse que el tratamiento con cicloheximida anula el efecto

inhibitorio del cAMP sobre el mRNA de la FN.

Sobre esta proteína podían postularse dos hipótesis, o que se requiera su síntesis "de novo", o bien que su expresión fuera constitutiva pero que tuviera una vida media muy corta.

En las líneas celulares JEG-3 (células de coriocarcinoma), HT 1080 (línea celular de fibrosarcoma) y NIH-3T3 (fibroblastos murinos) Dean y colaboradores (113) observaron que la forskolina aumenta la biosíntesis de la FN. Vieron que en todos los casos el efecto ocurre a nivel de la transcripción del gen.

En la línea JEG-3 la inducción es rápida y desaparece a las 24 horas del tratamiento por lo que en este caso parece ser un efecto enteramente transcripcional que no requiere la síntesis de ninguna proteína.

Por el contrario en la línea HT 1080 la inducción requiere más de 24 horas y la síntesis de alguna proteína mediadora del efecto.

En esta tesis se usó como control de los experimentos de Northern la línea celular NIH-3T3 y se observó un incremento del mRNA de FN a las 48 horas de tratamiento con Bt_2cAMP .

1.El efecto inhibitorio del Bt_2cAMP sobre la síntesis de la FN ocurre a nivel transcripcional.

En la inhibición del gen de la FN por cAMP de la línea BGC-1 existen dos evidencias que sugieren que el efecto del cAMP ocurre a nivel transcripcional. La primera evidencia reside en que los Northern cuantitativos de células tratadas y no tratadas con Actinomicina D muestran que el cAMP no afecta el "turnover" del mRNA de FN. La vida media del mRNA de FN de células tratadas con Bt_2cAMP y de células no tratadas es la misma: aproximadamente 6 horas. Si el Bt_2cAMP actuase induciendo la degradación del mRNA de FN deberíamos haber observado una pendiente más pronunciada de la recta que representa la desaparición del mRNA de FN en función del tiempo en los cultivos tratados con Bt_2cAMP en relación a las células control (Figura 37).

La segunda evidencia que muestra que el efecto del cAMP sobre la expresión del gen de la FN ocurre a nivel transcripcional, proviene de los experimentos de transfección. En estos ensayos se ve que a las 48 horas del tratamiento con Bt_2cAMP se inhibe la expresión de la construcción FN-CAT donde el gen CAT está bajo el control de la región -510/+69 del promotor del gen de la FN. Esta inhibición no se detecta ni a las 24 horas del tratamiento con esta misma construcción, ni a ninguno

de los dos tiempos ensayados, 24 y 48 horas, con la construcción -223/+45 FN/CAT. Dean y colaboradores (113) ya habían demostrado a través de experimentos de transcripción "in vitro" con extractos nucleares de células HeLa que efectivamente la expresión de CAT de genes de fusión FN-CAT reflejan la actividad del promotor de FN. Ellos usaron un plásmido conteniendo la región -510 seguida del gen CAT en ensayos de transcripción de tipo "run off" y observaron una banda específica que indica que la transcripción "in vitro" del promotor de la FN se inicia en el sitio CAP que existe "in vivo", esta banda desaparece cuando el ensayo se lleva a cabo en presencia de α -amanitina (inhibidor de la polimerasa II).

Demostraron también que luego de 36 horas de tratamiento, la forskolina incrementa la expresión del gen CAT cuando se transfectan células NIH-3T3 con una construcción que contiene la región -510 del promotor de la FN seguida del gen CAT.

En esta tesis nuevamente se usó como control de los experimentos de transfección la misma línea celular NIH-3T3 previamente mencionada. En nuestro caso aún a las 48 horas del tratamiento con Bt_2cAMP las transfecciones con la construcción -510/+69 FN CAT muestran un incremento de la actividad del CAT en relación a las células transfectadas con la misma construcción pero sin tratamiento.

Esto permite afirmar que en la línea celular NIH-3T3 la región -510/0 del promotor del gen de la FN está involucrada en la inducción de la expresión del mRNA de FN por cAMP.

J.El CRE y el efecto inhibitorio de la expresión del gen de la FN.

El promotor del gen de la FN contiene una secuencia CRE entre las posiciones -173 y -166. Esta secuencia es una de las responsables de la activación transcripcional dependiente de cAMP del gen de la FN tanto en las células HT 1080 como en las células JEG 3 y posiblemente esto ocurre a través de la interacción de esta región con un factor transcripcional perteneciente a la familia CREB/ATF.

Entre las posiciones -56 y -122 existe una segunda secuencia que en JEG 3 contribuye a la inducción por cAMP pero que no participa en el mismo tipo de regulación en las células HT 1080.

Este último sitio mencionado parece funcionar independientemente del CRE. Dentro de esta región se encuentra una secuencia similar a un sitio AP-2 que está presente en el gen de la metalotioneína (129), en donde se demostró que media la inducción por cAMP. Los experimentos de protección con DNasaI con extractos de

JEG 3 muestran protección en esta región mientras que no se observa la región protegida al hacer el ensayo con los extractos de las células HT 1080 (113).

Con extractos de ambos tipos celulares los autores observaron múltiples complejos CRE-proteínas. Varios de los complejos formados con los diferentes extractos tienen movilidades electroforéticas diferentes. No se conoce el significado biológico de estas diferencias. Cuando incubaron las células con forskolina antes de las preparaciones de los extractos no se alteraron los complejos formados en ninguno de los tipos celulares. Esto indicaría que las fosforilaciones dependientes de cAMP no alteran la afinidad del CREB con el CRE. Se sugirió entonces que la interacción del CREB con otro factor de transcripción sería importante y que la forskolina actuaría mediando esa interacción (113).

En los ensayos con DNasa I de esta tesis se observa que las células BGC-1 contienen cantidades significativas de CREB, y este factor nuclear protege la secuencia entre las bases -176 y -169 del promotor del gen de la FN. Sin embargo los resultados sugieren que el efecto inhibitorio de la transcripción del gen de la FN estaría determinado por secuencias distintas del CRE. Esto se deduce a partir de los ensayos de transfección sobre los cuales se discutió previamente.

La pregunta sería cual es la razón por la cual la inhibición de la transcripción de la FN endógena ya se observa a las 24 horas del tratamiento con Bt₂cAMP mientras en las transfecciones con la construcción -510/+69 FN CAT se observa activación a las 24 horas e inhibición recién a las 48 horas.

Si bien la razón de este efecto dual no está clara, una explicación posible sería que es necesario un cierto tiempo para que el DNA transfectado adquiriera el estado de cromatinización o el grado de metilación propio del promotor endógeno, y recién entonces este DNA exógeno podría comportarse de la misma manera que el endógeno.

De cualquier manera la secuencia entre las posiciones -510 y -223 sería la responsable de mediar la inhibición de la transcripción por cAMP.

Kurten y Richards (130) estudiaron la expresión de los mRNAs de la enzima citocromo P450 que cliva la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}) y de la subunidad de tipo II de la proteína quinasa dependiente de cAMP (RIIb), en cultivos primarios de granulosa de rata. Observaron que la forskolina estimula la producción de cAMP y que consecuentemente se acumula el mRNA del gen RIIb y se induce el mRNA del gen P450_{scc}. Cuando ensayan tratamientos con Actinomicina D y con α amanitina se inhibe la expresión de los mRNAs de ambos genes.

Uno de los posibles caminos que intervienen en esta regulación involucraría la

actividad del CRE. Para analizar esta posibilidad transfectaron células de la granulosa de rata con un DNA que contenía 169 pares de bases del promotor del gen α G (subunidad α de las hormonas glicoproteicas humanas), que incluía los elementos CRE y TATA seguidas del gen CAT, y observaron que la forskolina inducía la expresión de este gen. Cuando transfectaron con un plásmido carente del CRE no vieron expresión de CAT, y además experimentos con cicloheximida no bloqueaban la actividad de la forskolina. Los autores propusieron que uno de los mecanismos por el cual la forskolina estimula la expresión del p-169 a CAT en las células de la granulosa involucraría la fosforilación del factor nuclear CREB.

Este trabajo permitió concluir que las células de la granulosa poseen toda la maquinaria transcripcional necesaria para la estimulación de la expresión genética mediada por el elemento CRE, y en estas células el CRE actuaría como un "enhancer" inducible por forskolina. Los resultados expuestos en esta tesis muestran que en el caso de la FN, este rol estaría enmascarado por otras secuencias presentes en su promotor.

Por otro lado Kanei-Issii e Ishii investigaron el rol del CRE en la transcripción de genes eucarióticos (131). Hicieron esto en varias líneas celulares transfectadas con construcciones que contenían el gen CAT pegado a tres promotores diferentes, simian virus (SV) 40, c-Ha-ras-1 humano y β actina de pollo, todos ellos con o sin la secuencia CRE. Vieron que el CRE tiene actividad de "enhancer" inducible solamente cuando se encuentra unido al promotor de SV 40 y en unas pocas líneas celulares como PC 12.

Acoplado al promotor del c-Ha-ras-1 humano, el CRE funciona como un "enhancer" constitutivo en todas las líneas celulares examinadas. En cambio acoplado al promotor de la β actina de pollo el CRE solamente muestra actividad de "enhancer" constitutivo en las células KB, HeLa y A431. Finalmente los autores postularon que existen diferentes tipos de actividad "enhancer" del CRE que dependen de otras secuencias del promotor en el cual se encuentran y de las líneas celulares. Estas diferencias podrían deberse a que el CRE puede interactuar con diferentes factores en trans provocando en cada caso un efecto particular sobre la transcripción génica. Postularon también que el CRE podría conferirle a los promotores un efecto dual o bien de "enhancer" constitutivo o bien de "enhancer" inducible por cAMP, pero ellos nunca observaron un efecto inhibitorio como el observado aquí en las células de la granulosa.

En esta tesis puede observarse también la naturaleza dual del cAMP sobre el promotor de la FN en las células de la granulosa. En los experimentos de Northern

luego de tratamientos con cicloheximida (Fig 36) se observa que cuando esta droga bloquea la síntesis de la FN se elimina la inhibición dependiente de la secuencia -510/-223 y se pone en evidencia la estimulación de la transcripción dependiente de la secuencia CRE.

Los ensayos de protección con DNaseI con extractos nucleares de BGC-1 o de hígado de rata permiten observar tres secuencias diferentes dentro de la región -510/-223 que unen proteínas nucleares. Las secuencias protegidas son: -430/-407 la cual incluye al heptámero 5' TGACGCA 3' que es una secuencia que difiere del CRE solamente por la ausencia de una T en el sexto lugar; -386/-376 que incluye una CCAAT box; y la secuencia -275/-258 de homología no conocida.

Aún no se determinó el rol de estas secuencias como mediadoras de la inhibición de la transcripción del gen de la FN mediada por cAMP.

Recientemente Bowlus y colaboradores (132) postularon la existencia de tres secuencias CRE funcionales en la región 5' flanqueante del gen de la FN humana ubicadas en las posiciones -170, -260 y -415. Vieron que si bien los tres CRE son capaces de responder a cAMP solamente el CRE de -170 es capaz de estimular la expresión basal del gen, además este CRE es el de mayor afinidad. Los autores trabajaron transfectando células HT 1080 con construcciones que contenían el promotor de la timidina quinasa y río arriba de este promotor fueron colocando los diferentes CRE, con cada uno de ellos hicieron dos construcciones, una en donde el CRE estaba inmediato al promotor y la otra en donde el CRE estaba alejado del mismo. Vieron que cuando el CRE de -170 es alejado del sitio de iniciación de la transcripción se elimina la actividad basal del mismo pero se conserva su inducibilidad por forskolina. Dedujeron entonces que la expresión basal del gen requiere la proximidad de la secuencia CRE como también que la capacidad para estimular la expresión basal y la inducibilidad por forskolina son dos propiedades diferentes del CRE.

En el caso de los CRE de -260 y -415 cuando son alejados del sitio de iniciación de la transcripción disminuye la capacidad de inducibilidad por forskolina y en ninguna ubicación son capaces de tener actividad basal.

El CRE de -170 contiene un palíndromo perfecto de 10 pares de bases 5' CTGACGTCAG 3', mientras que los CRE de -260 y -415 muestran solamente la secuencia 5'TGAC 3' que se corresponde con la mitad del sitio de unión del CRE consenso.

El CRE de -260 se corresponde con un sitio de unión llamado PEA-2 que está presente en el "enhancer" del virus poliooma donde se sugiere que tiene dos

funciones posibles, una la de represor y la otra la de inhibidor de la función del "enhancer" en donde está incluido por mutaciones en su secuencia (133-138). Sin embargo en este trabajo los autores no observaron que el CRE de -260 tuviera un efecto negativo sobre el gen de la FN.

¿Qué ocurre con los CRE de -260 y -415 en la regulación de la expresión del gen de la FN en las células de la granulosa?

Cuando se hicieron los ensayos de protección con DNase I con los extractos nucleares de BGC-1 se observaron tres regiones protegidas entre las posiciones -510/-223. Dos de estas tres regiones incluyen al CRE de -260 y al CRE de -415 respectivamente. La primera es la secuencia -275/-253 y la otra la secuencia -430/-407. Como se discutió previamente la secuencia CRE puede tener una función dual en relación al cAMP, o bien como "enhancer" basal o bien como "enhancer" inducible. En función de esto podemos decir que los CRE de -260 y -415 también podrían cumplir una función dual en relación al cAMP según sea el tipo celular en que se exprese el gen de la FN. Así en en las células de la granulosa tendrían uno de ellos o ambos CRE un rol inhibitorio de la expresión del gen de la FN y en las células HT 1080 función estimuladora.

Más aún, si consideramos que el CRE de -260 ya fue correlacionado con la secuencia PEA 2 del "enhancer" del virus de polio y que este sitio podría cumplir funciones de represor, resultaría interesante investigar si el CRE de -260 es el responsable del efecto inhibitorio de la transcripción del gen de la FN en las células BGC-1 a través de una actividad represora.

Foulkes y colaboradores encontraron (44) que a la secuencia CRE puede unirse a un factor nuclear conocido como CREM (modulador del CREB) capaz de bloquear la inducción transcripcional del CREB. El CREM tiene un PM de 29 kD y suprimiría la actividad del CREB o bien por dimerización con el CREB a través de la formación de complejos inactivos transcripcionalmente, o bien ocupando secuencias CRE y así evitando la formación del complejo activador CRE-CREB.

En nuestro caso, un modelo posible podría incluir un factor semejante al CREM, el cual actuaría sobre los CRE de -260 o -415, pero no sobre el CRE de -170. Si un "CREM" se uniera al CRE de -170, la inhibición por cAMP en las células BGC-1 no ocurriría solamente al transfectar con la construcción completa -510/+45 FN CAT si no también al transfectar con la construcción menor -223/+69 FN CAT.

En las células de la granulosa podría existir un factor semejante al CREM que no estuviera presente en otras líneas celulares como NIH-3T3, HT 1080 o JEG 3.

Si el CRE de -260 es semejante al sitio PEA 2 del "enhancer" del virus polio ya

postulado como represor, su rol inhibitorio podría estar mediado por la unión de un factor de tipo CREM, capaz de bloquear la transcripción del gen de la FN en las células de la granulosa.

K. Significado biológico del efecto inhibitorio del cAMP sobre la expresión del gen de la FN en las células de la granulosa.

Hung y colaboradores observaron que durante el desarrollo del folículo ovárico y el estado de maduración del ovocito varían los niveles de FN presentes en el fluido folicular humano. Ellos sugirieron que la FN no está involucrada solamente en la regulación autocrina del crecimiento y la diferenciación de las células de la granulosa si no que también participa en el control del arresto meiótico que estas células ejercen sobre el ovocito. Demostraron también que el péptido GRGDS que está presente en el sitio de adhesión celular a la FN bloquea el efecto estimulatorio que ejerce la hormona GnRH sobre la meiosis. Concluyeron que la FN junto con las gonadotropinas y otros factores del ovario controlan la meiosis del ovocito (139-141).

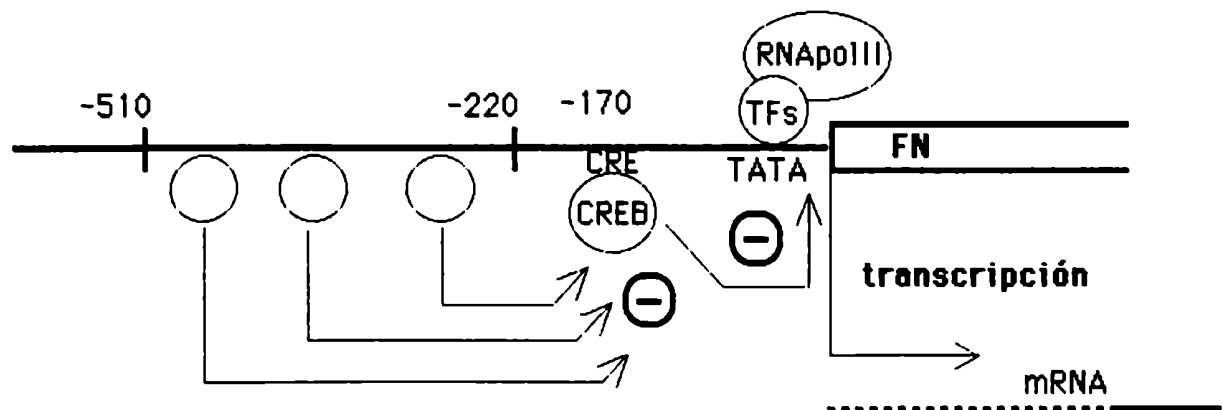
Los folículos, durante las primeras etapas de maduración, cuando aún no son muy activos en la síntesis de progesterona, producen más cantidad de FN que cuando son muy esteroideogénicos. La producción de esta proteína es una característica de los folículos tempranos (142).

No está claramente definido el rol de la FN que producen las granulosas durante el desarrollo de los folículos tempranos.

La FN con sus dominios de unión al colágeno, la heparina, el heparán sulfato y la superficie celular, es un componente importante de las membranas basales de diferentes tejidos. Así, la FN está presente en la membrana basal que separa las células de la granulosa de las tecales dentro de los folículos ováricos. Cuando estos folículos se preparan para la ovulación aumentan considerablemente su diámetro y por lo tanto necesitan sintetizar varios componentes de la matriz extracelular (FN entre otros) con el fin de mantener esta membrana basal, la cual no solamente apoya la capa de células de la granulosa si no que además actúa como barrera semipermeable entre las granulosas y las tecales. Esta sería la razón de la mayor producción de FN de los folículos tempranos en relación a los tardíos, así como también la justificación de la estimulación de la síntesis de FN por la hormona GnRH en cultivos primarios de células de la granulosa de rata. Durante ese momento del desarrollo celular sería necesario incrementar la producción de FN necesaria para el crecimiento del folículo y entonces la hormona GnRH participaría

en la estimulación de esta proteína. En la línea celular BGC-1 no se induce la síntesis de FN por GnRH. Esto podría deberse a las razones ya mencionadas en el punto E. Podemos suponer también, que si el pasaje de cultivo primario a línea celular se produjo en un momento de la diferenciación celular en que las granulosa ya no se identificaban con aquellas de los folículos tempranos, si no de los tardíos, las células originadas, BGC-1, conservaron las características de este estadio en el cual ya no existe una alta producción de FN asociada a la hormona GnRH como en las granulosa de los folículos tempranos. Lo expuesto anteriormente justifica la actividad de la hormona GnRH en relación a la FN en las células de la granulosa, pero cuál es el significado biológico del efecto inhibitorio de la hormona FSH sobre esta proteína observado tanto en los cultivos primarios de la granulosa como en las células BGC-1. Dijimos que cuando las células de la granulosa tienen alta actividad esteroidogénica son componentes de folículos maduros que ya han alcanzado su tamaño definitivo y por lo tanto no necesitarían producir FN para fabricar más membrana basal. Durante este periodo es cuando la hormona FSH tiene mayor actividad sobre estas células y cuando toda la maquinaria celular está trabajando en la producción de los estrógenos. Así las células de la granulosa controlarían su actividad celular regulando negativamente la síntesis de algunas proteínas de secreción mayoritarias, como por ejemplo la FN.

L. Esquema del mecanismo postulado para la inhibición de la síntesis de FN por cAMP en las células de la granulosa.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1-A partir de un cultivo primario de células de la granulosa bovinas se obtuvo una línea celular que fue llamada BGC-1, y que es la primer línea de células de la granulosa obtenida sin transformación viral.

2-Las características de la línea celular BGC-1 son las siguientes:

1. Mantiene las características morfológicas de las células de la granulosa normales.
2. Tiene un tiempo de duplicación celular de 23,5 horas.
3. Tiene un cariotipo diploide estable de $2n=43$, derivado del cariotipo bovino normal.
4. Mantiene la capacidad de responder a tratamientos con la hormona FSH produciendo estradiol sin el agregado precursores exógenos como andrógenos.
5. Tienen adherencia preferencial al colágeno

3-Mientras en los cultivos primarios de granulosa de rata tratamientos con la hormona GnRH incrementan la producción de FN, en la línea BGC-1 no se observan alteraciones en la síntesis y/o expresión de este gen por TPA o Ca^{++} .

4-La hormona FSH disminuye la síntesis del mRNA de FN en cultivos primarios de granulosa de rata a partir de las 24 horas del tratamiento.

5-La hormona FSH, el Bt_2cAMP y la forskolina inhiben la secreción de la FN y los niveles de su mRNA en la línea celular BGC-1, observándose el efecto máximo a las 48 horas del tratamiento.

6-El efecto del Bt_2cAMP sobre la expresión del gen de la FN ocurre a nivel transcripcional y no es consecuencia de la alteración de la estabilidad del mRNA de la proteína.

7-El efecto inhibitorio del Bt_2cAMP depende de la síntesis de un intermediario proteico que puede ser inducido o fosforilado por el cAMP.

8-La región del promotor del gen de la FN ubicada entre las posiciones -510 y -223 es la responsable de la inhibición transcripcional del gen por Bt_2cAMP en la línea BGC-1.

9-La proteína intermediaria inducida por el Bt_2cAMP suprime la activación transcripcional, del gen de la FN, dependiente de la secuencia CRE (posición -170), que se observa en otras líneas celulares estudiadas.

10-La regulación por Bt_2cAMP del gen de la FN en las células de la granulosa, es uno de los pocos ejemplos en donde el cAMP actúa inhibiendo y no estimulando la transcripción génica.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Buratowski, S., Hahn, S., Gnaren, L., y Sharp, P.A. (1989) Cell 56,549-561.
- 2) Weil, P.A., Luse, D.S., Segall, J. y Roeder, R.G. (1979) Cell 18,469-484.
- 3) Manley, J., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A. y Geyer, M. (1980) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77,3855-3859.
- 4) Dignam, J.D., Martin, P.L., Shastri, B.S. y Roeder, R.G. (1983) Meth.Enzymol. 104,582-298.
- 5) Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A., y Roeder, R.G. (1980) J.Biol.Chem. 255,11992-11996.
- 6) Samuels, M., Fire, A. y Sharp, P.A. (1982) J.Biol.Chem. 257,14419-14427.
- 7) Sawadogo, M. y Roeder, R.G. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 82,4394-4398.
- 8) Mitchell, P.J., y Tjian, R. (1989) Science 245,371-378.
- 9) Miller, J., McLachlan, A.D., y Klug, A. (1985) Embo.J. 4,1609.
- 10) Pugh, F.B., y Tjian, R. (1990) Cell 61,1187-1197.
- 11) Wright, C.V.E., Cho, K.W.Y., Oliver, G., y DeRobertis, E.M. (1989) Trends Genet. 14,52.
- 12) Hoey, T., y Levine, M. (1988) Cell 55,537.
- 13) Johnson, P.F., y McKnight, S.L. (1989) Annu.Rev.Biochem. 58,799-839.
- 14) Odenwald, W.F. et al. (1989) Genes Dev. 3,158.
- 15) Sturm, R., Das, G., y Herr, W. (1988) Genes Dev. 2,1582.
- 16) Ko, H.S., Fast, P., McBride, W., y Staudt, L.M. (1988) Cell 55,135.
- 17) Ingraham, H.A. et al. (1988) Cell 55,519.
- 18) Sturm, R., Baumrucker, T., Franza, B.R., y Herr, W. (1987) Genes Dev. 1,1147-1160.

- 20) Fletcher, C., Heintz, N., y Roeder, R.G. (1987) Cell 51,773-781.
- 21) Landschulz, W.H., Johnson, P.F., y McKnight, S.L. (1988) Science 240,1759-1764.
- 22) Abel, T., y Maniatis, T. (1989) Nature 341,24-25.
- 23) Landschulz, W.H., Johnson, P.F., y McKnight, S.L. (1988) Genes Dev. 2,786.
- 24) Kouzandes, T. y Ziff, E. (1988) Nature 336,346.
- 25) Turner, R., y Tjian, R. (1989) Science 243,1689-1694.6
- 26) O'Shea, E.K., Rutkowski, R., y Kim, P.S. (1989) Science 243,538-542.
- 27) Mermel, N. et al Cell in press.
- 28) Williams, T., Admon, A., Luscher, B., y Tjian, R. (1988) Genes Dev. 2,1557.
- 29) Norman, C., Runswick, M., Pollock, R., y Treisman, R. (1988) Cell 55,989.
- 29) Scheidereit, C., Heguy, A., y Roeder, R.G. (1987) Cell 51,783-793.
- 30) Habener, J.F. (1990) Mol.Endocrinol. 4,1087-92.
- 31) Jones, N. (1990) Cell 61,9-11.
- 32) Roesler, W.J., Vandenbark, G.R., y Hanson, R.W. (1988) J.Biol.Chem. 263,9063-66.
- 33) Prywes, R., y Roeder, R.G. (1987) Mol.Cell.Biol. 7,3482-89.
- 34) Montminy, M.R., y Bilezikjian, L.M. (1987) Nature 328,175-78.
- 35) Yamamoto, K.K., Gonzalez, G.A., Biggs, H.W., y Montminy, M.R. (1988) Nature 334,494-498..
- 36) Gonzalez, G.A., Yamamoto, K.K., Wolfgang, H., Fischer, D.K., Menzel, P., Biggs, W., Vale, W.W., y Montminy, M.R. Nature 337,749-752.

- 37)Gonzalez, G.A., y Montminy, M.R. (1989) Cell 59,675-680.
- 38)Dwarkan, V.J., Montminy, M., y Verma, I.M. (1990) Embo.J.9,225-232.
- 39)Yamamoto, K.K., Gonzalez, G.A., Menzel, P., Rivier, J., y Montminy, M.R. (1990) Cell 60,611-617.
- 40)Andrisani, O., y Dixon, E. (1990) J.Biol.Chem.265,3212-3218.
- 41)Imagawa, M., Chiu, R. y Karin, M. (1987) Cell 51,251-260.
- 42)Trevor, W., y Tjian, R. (1990) Science 251,1067-71.
- 43)Renkawitz, R. (1990) TIG.6,192-196.
- 44)Faulkes, N.S., Borelli, E. y Sassone-Corsi, P. (1991) Cell 64,739-749.
- 45)Petersen, T.E., Skorstengaard, K. y Vibe-Pedersen, K. (1989) En Mosher, D. (ed), Fibronectin. Academic Press, San Diego, p.p.1-24.
- 46)Henry, I. et al. (1988) Human gene Mapping 8. Helsinki.
- 47)Kornblihtt, A.R., Vibe-Pederson, K., y Baralle, F.E. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 80,3218-3222.
- 48)Kornblihtt, A.R., Vibe-Pederson, K., y Baralle, F.E. (1984) Embo.J. 3,221-226.
- 49)Kornblihtt, A.R., Vibe-Pederson, K., y Baralle, F.E. (1984) Nucleic Acids Res. 12,5853-5868.
- 50)Kornblihtt, A.R., Umezawa, K., Vibe-Pederson, K., y Baralle, F.E. (1985) Embo.J.4,1755-59.
- 51)Oldberg, A., Linney, E., y Roushalti, E. (1983) J.Biol.Chem.258,10193-10196.
- 52)Umezawa, K., Kornblihtt, A.R., y Baralle, F.E. (1985) FEBS letts.186,31-34.

- 53) Bernard, M.P., Kolbe, M., Weil, D., y Chu, M.L. (1985) Biochemistry 24,2698-2704.5
- 54) Sekiguchi, K., Klos, A.M., Kurachi, K., Yoshitake, S. y Hakomori, S. (1986) Biochemistry 25,4936-41.5
- 56) García-Pardo, A., Pearlstein, E., y Frangione, B. (1985) J.Biol.Chem. 260,10320-10325.
- 57) García-Pardo, A., Rostagno, A., y Frangione, B. (1987) Biochem.J. 241,923-928.
- 58) Dean, D.C., Bowlus, C.L., y Bourgeois, S. (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 84,1876-1880.
- 59) Patel, R.S., Odermatt, E., Schwarzbauer, J.E., y Hynes, R.O. (1987) Embo.J. 6,2565-2572.
- 60) Tamkun, J.W., y Hynes, R.O. (1983) J.Biol.Chem. 258,4641-4647.
- 61) Tamkun, J.W., Schwarzbauer, J.E., y Hynes, R.O. (1984) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 81,5140-5144.
- 62) Petersen, T.E., Skorstengaard, K., Vibe-Pederson, K., Sahl, P., Sottrup-Jensen, L., y Magnusson, S. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 80,137-141.
- 63) Skorstengaard, K., Jensen, M., Peterse, T.E., y Magnusson, S. (1986) Eur.J.Biochem. 154,15-29.
- 64) Schwarzbauer, J.E., Tamkun, J.W., Lemischka, I.R., y Hynes, R.O. (1983) Cell 35,421-431.
- 65) Gutman, A., Yamada, K.M., y Kornblihtt, A.R. (1986) FEBS letts. 207,145-148.
- 65) Ruoslahti, E., y Pierschbacher, M.D. (1986) Cell 44,517-518.
- 66) Humphries, M.J. et al (1986) J.Cell Biol. 103,2637,2647.

- 67) Dufour, S., Duband, J., Kornblihtt, A.R., y Thiery, J.P. (1988) TIG 4,198-201.
- 68) Keski-Oja, J., y Yamada, K.M. (1981) Biochem.J. 193,615-620.
- 69) Sato, T.N. et al. (1986) Biochem. 99,653-771.
- 70) Hynes, R.O. (1983) En "Cell Biology of Extracellular Matrix" (E.D.Nay, ed) Plenum Press, New York pp.295-326.
- 71) Singer, I.I. (1979) Cell 16,675-685.
- 72) Hynes, R.O. (1973) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 70,3170-3174.
- 73) Yamada, K.M., Ohanian, S.H., y Pastan, I. (1976) Cell 9,241-245.
- 76) Labat-Robert, J., Birembaut, P., Adnet, J.J., Mercantini, F., y Robert, L. (1980) Biol.Int.Rep. 4,609-616.
- 77) French-Constant, Ch., Van De Water, L., Dvorak, H.F., y Hynes, R.O. (1989) J.Cell Biol. 109,903-914.
- 78) Hsueh, A.J., Adashi, E.J., Jones, P.B., y Welsh, T.M. (1984) Endocrine Reviews. 5,76-127
- 79) Amsterdam, A., Rotmench, S., y Ben-Ze'ev, A. (1989) TIBS 14,377-382.
- 80) Ben-Ze'ev, A., y Amsterdam, A. (1987) J.Biol.Chem. 62,5366-5376.
- 81) Ben-Ze'ev, A., y Amsterdam, A. (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 83,2894-2898.
- 82) Ben-Ze'ev, A., Kohen, F., y Amsterdam, A. (1987) Differentiation 34,222-235.
- 83) Ben-Ze'ev, A., y Amsterdam, A. (1989) Endocrinology 124,1033-1041.
- 84) Hayman, E.G., Engvall, E., y Ruosalhti, E. (1981) J.Cell Biol. 88,352-357.
- 84) Nishizuka, Y. (1988) Nature 334,661-665.

- 85) Horwitz, A., Duggan, K., Buck, C., Beckerle, M.C., y Burrige, K. (1986) Nature 320,1-3.
- 85) Stenman, S., y Vaheri, A. (1981) Int.J.Cancer 27,427-435.
- 86) Rapraegera, A., Jalkanen, M., y Berfield, M. (1986) J.Cell.Biol. 103,2683-2696.
- 87) Dorrington, J.H., y Armstrong, D.T. (1979) Recent.Prog.Horm.Res. 35,301.
- 88) Hsueh, A.J.W., Jones, P.B.C., Adashi, E.J., Wan, C., Zhuang, L., y Welsh, T.H. (1983) J.Reprod.Fertil. 69,325.
- 89) Dorrington, J.H., Moon, J.S., y Armstrong, D.T. (1975) Endocrinology 102,1328.
- 90) Hung, T.T., Tsuiki, A., y Yemini, M. (1989) Steroides 54,575-582.
- 91) Gebauer, H., Lindner, H.R., y Amsterdam, A. (1978) Biol.Reprod. 18,350-358.
- 92) Vanderboom, R.J., Wise, T.W., Maurek, R.R., y Ax, R.L. (1988) Serono Symposio.USA.Plenum Press.New York. 315-320.
- 93) Dorrington, J.H., y Skinner, M.K. (1986) Endocrinology 118,2065-2071.
- 94) Skinner, M.K., y Dorrington, J.M. (1984) Endocrinology 115,2029-22031.
- 95) Yemini, M., Tomur, R., y Hung, T.T. (1989) Resumen n° 296.Presentado en el VI Congreso Mundial de Fertilización in vitro. Jerusalem Israel.
- 96) Savior, N., y Gopodarowicz, D. (1980) Endocrinology 108,1798-1806.
- 97) Skinner, M.K., McKeracher, H.L., y Dorrington, J.H. (1985)
- 9
- 8) Campbell, K.L. (1979) Biol.Reprod. 21,773-786.
- 99) Barañao, J.L., y Hammond, J.H. (1985) Endocrinology 116,51-58.

- 100) Seabright, M. (1971) Lancet **2**,971-072.
- 101) Chiauzzi, V.A., Cigorraga, S., Escobar, M.E., Rivarola, M.A., y Charreau, E.H. (1982) Endocrinol.Metab. **54**,1221-1228.
- 102) Favaloro, J., Treisman, R., y Kamer, R. (1908) Methods Enzimol. **65**,718-749.
- 103) Dufour, S., Gutman, A., Bois, F., Lamb, N., Thiery, J.P., y Kornblihtt, A. (1991) Exp.Cell Res. **193**,331-338.
- 104) Maniatis, T., Fritsch, E.F., y Sambrook, J. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York.
- 105) Bradford, M.M. (1976) Anal.Biochem. **72**,248-254.
- 106) Gorski et al. (1986) Cell **47**,767-776.
- 107) Dignam et al. (1983) Nucleic Acids Res **11**,1475-1489.
- 108) Short, J.M., Wynshaw-Boris, A., Short, H.P., y Hanson, R.W. (1986) J.Biol.Chem. **261**,9721-9726.
- 109) Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagner, J.A., Mandel, G., y Goodman, R.H. (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **83**,6682-6686.
- 110) Amsterdam, A., Zauberman, A., Meir, G., Pinhasi-Kimhi, O., Suh, B., y Oren, M. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **85**,7582-7586.
- 111) Ford, C.E., Pollock, D.L., y Gustavsson, I. (Eds) (1980) Hereditas **92**,145-162.
- 112) Dean, D.C., Newby, R.F., y Bourgeats, S. (1988) J.Cell Biol. **106**,2159-2170.
- 113) Dean, D.C., Blakely, M.S., Newby, R.F., Ghazal, P., Hennighausen, L., y Bourgeats, S. (1989) Mol.Cell Biol. **9**,1498-1506.
- 114) Ohlsson, M., Huesh, A.J.W., y Ny, T. (1989) Mol.Endocrinol. **3**,854-861.

- 115) Dong, Y., Aronsson, M., Gustafsson, J.A., y Okret, S. (1989) J.Biol.Chem. **264**,13679-13683.
- 116) Moore, D.D., Marks, A.R., Buckley, D.I., Kopler, G., Payvar, F., y Goodman, H. (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **82**,699-702.
- 117) Melner, M.H., Young, S.L., Czerwiec, F.S., Lym, D., Puett, D., Roberts, J.L., y Koos, R.D. (1986) Endocrinology **119**,2082-2088.
- 118) Wyne, K.L., Schreiber, J.R., Larsen, A.L., y Getz, G.S. (1989) J.Biol.Chem. **264**,981-989.
- 119) Moore, Ch., Brentano, S., y Miller, W. (1990) Mol.Cel.Biol. **10**,6013-6023.
- 120) Pei, L., Dodson, R., Schoderbek, W.E., Maurer, R.A., y Mayo, K.E. (1991) Mol.Endocrinol. **5**,521-534.
- 121) Zilberstein, M., Chou, J.Y., Rowe, W.L.Jr., Shen-Orr, Z., Roberts, C.T., Le Roith, D., y Catt, K.J. (1989) Mol.Endocrinol. **3**,1488-1497.
- 122) Gore-Langton, R.E., y Armstrong, D.T. (1988) en "The Physiology of Reproduction" (Knobil,E. y Neill,J. ,eds) pp.331-385, Raven Press Ltd., New York.
- 123) Waibel, S., Bremen, T., Schiffli, R., Scharla, S., Wüster, C., Ziegler, R., Minne, H.W., y Leyendecker, G. (1988) Gynecol.Endocrinol. **2**,106.
- 124) Toneta, S.A., y di Zerega, G. (1989) Endocrine Reviews **10**,205-229.
- 125) Wickings, E.J., Eidne, K.A., Diwson, A.F., y Hillier, S.G. (1990) Biol.Reprod. **43**,305-311.
- 126) Gospodarowicz, D., y Bialecki, H. (1978) Endocrinology **103**,854-865.
- 127) Ulloa-Aguirre, A., August, A.M., Golos, T.G., Kao, L., Sakuragi, N., Kliman, H.J., y Strauss, J.F. (1987) J.Clin.Endocrinol.Metab. **64**,1002-1009.
- 128) Fagan ,J.B., Sobel, M.E., Yamada, K.M., de Crombrughe, B., y Pastan, I. (1981) J.Biol.Chem. **256**,520-525.

- 129)Imagawa, M., Chiu, R., y Karin, M. (1987) Cell 51,250-260.
- 130)Kurtenm, R.C., y Richards, J. (1989) Endocrinology 125,1345-1357.
- 131)Kanei-Ishi, C., y Ishi, S. (1989) Nucleic Acids Res.17 ,1521-1536.
- 132)Bowhus, C.L., Mcquillan, J.J., y Dean, D.C. (1991) J.Biol.Chem. 266,1122-1127.
- 133)Veldman, G.M., Lupton,J., y Kamen,R. (1985) Mol.Cell.Biol. 5,649-658.
- 134)Piette, J., y Yaniv, M.(1987) EMBO J. 6,1331-1337.
- 135)Satake, M., Inaraki, T., Yamaguchi, Y., y Ito, Y. (1989) J.Virol. 63,3669-3667.
- 136)Satake, M., Inaraki, T., y Ito, Y. (1988) Oncogene 3,69-78.
- 137)Bokar, J.A., Roesler, W.J., Vandenbark, G.R., Kaetzel, D.M., Hanson, R.W., y Nilson, J.H. (1988) J.Biol.Chem. 263,19740-19747.
- 138)Wasylyk, B., Imler, J.L., Chatton, B., Schatz, C., y Wasylyk, C. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 85,7952-7956.
- 139)Hung, T.T., Tsuiki, A., y Y. Temini,M. (1989) Steroids 54,575-582.
- 140)Tsuiki, A., Preyer, J., y Hung, T.T. (1988) Hum.Reprod. 3,425-429.
- 141)Yemini, M. ,y Hung, T.T. (1989) "71st Annual Meeting of the Endocrine Society" #909 (resumen)
- 142)Carnegie, J.A. (1990) J.Reprod.Fert. 89,579-589.
- Endocrinology 117 ,886-892.

"FE DE ERRATAS"

página 6: Figura 3, CCCCAGGC; corresponde a la secuencia consenso para AP-2 y ATTTGCAT; corresponde a la secuencia consenso para OCT-2.

página 29: "estrógenos y progesteronas"; corresponde, "estrógenos y progesterona".

página 36: "folículos prenatales"; corresponde, "folículos preantrales".

página 40: no es correcto "5 mg de dexametasona"; corresponde, "5 mg de estrógeno sintético".

página 42: "forskolina.....10 mM"; corresponde, "forskolina....10 μ M".

página 64: "elementos monobranquiales"; corresponde, "elementos monobraquiales".

página 66: "grupo BSM3"; corresponde "grupo B....SM2" y "XX.....SM2"; corresponde, "XX....SM1".

página 67: Figura 24, "10 mM de forskolina"; corresponde, "10 μ M de forskolina"

página 68: Figura 25, "colágeno (20 mg/ml)"; corresponde, "colágeno (20 μ g/ml).

página 69: Figura 25, "laminina (20 mg/ml)"; corresponde, "laminina (20 μ g/ml)".

página 74: Figura 29, "RNA total (15 mg)"; corresponde, "RNA total (15 μ g)".

página 77: "forskolina (10 μ m)"; corresponde, "forskolina (10 μ M)".

página 78: "forskolina (10 mM)"; corresponde, "forskolina (10 μ M)".

página 79: "forskolina (10 mM)"; corresponde, "forskolina (10 μ M)".

página 82: "RNA total (15 mg)"; corresponde, "RNA total (15 μ g)".

página 97: "aumentando"; corresponde, "disminuyendo".

página 105: "p-169 a CAT"; corresponde, "p-169 α CAT" y "b actina"; corresponde " β actina".

página 116: no figuran las citas 74, y 75, que se encuentran bajo la numeración: cita 74 se corresponde con la primera de las dos citas que figuran como 84, y la cita 75 con la segunda de las dos citas que figuran como 85.