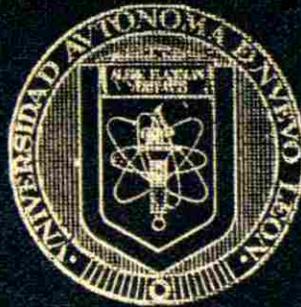


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES
ENDOGENOS hPLs y hGH-V EN CULTIVO PRIMARIO
DE PLACENTA

Por:

MARIO ALBERTO FLORES VALDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR
E INGENIERIA GENETICA

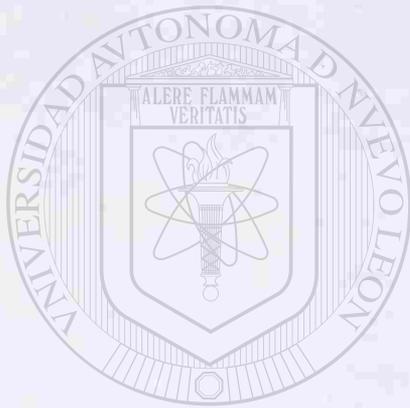
MARZO, 1999

Q. 15110 12
S. 65111 12
T. 65112 12
U.

MARIO ALBERTO FLORES VALDEZ



1080087126



UANL

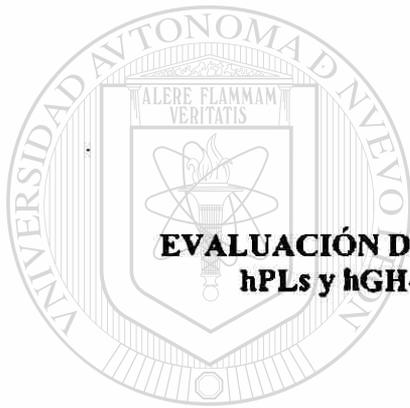
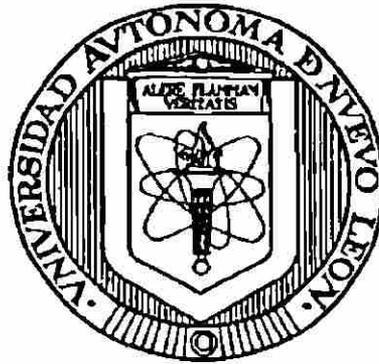
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ENDÓGENOS
hPLs y hGH-V EN CULTIVO PRIMARIO DE PLACENTA**

Por

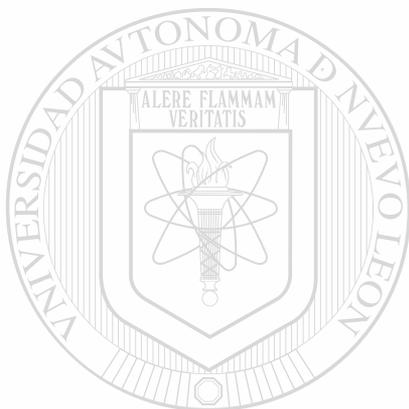
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

MARIO ALBERTO FLORES VALDEZ
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con especialidad
en **Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Marzo, 1999

TM
Q+445
r5



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

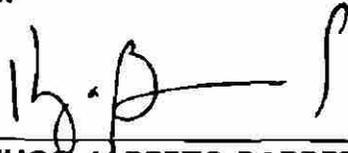
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

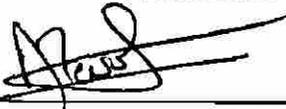


**EVALUACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES ENDOGENOS hPLs Y
hGH-V EN CULTIVO PRIMARIO DE PLACENTA**

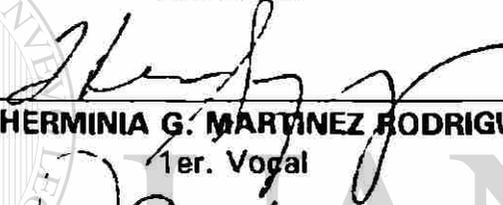
Aprobación de la Tesis:



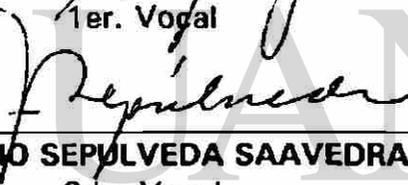
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Presidente



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Secretario



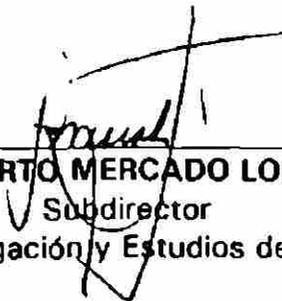
DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ.
1er. Vocal



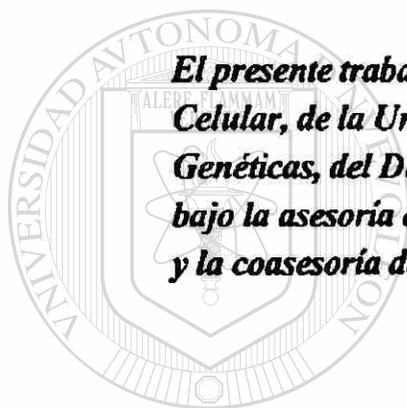
DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA
2do. Vocal



M.C. NORMA E. GUERRA RODRIGUEZ
3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Celular, de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, bajo la asesoría de la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez y la coasesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme los recursos económicos que me permitieron obtener estos estudios.

Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica, por colaborar para la terminación de mi trabajo experimental.

Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña, verdaderamente gracias por brindarme la oportunidad de dar los primeros pasos en el mundo de la Investigación.

A la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez, quien se encargó de hacerme ver que a veces es necesario hacer acopio de paciencia para lograr las cosas que uno se propone, gracias por sus consejos.

A la Dra. Agnès Revol de Mendoza, a quien le doy las gracias por sus sugerencias tan valiosas para mi formación como Investigador.

A la M.C. Norma Esther Guerra Rodríguez, le agradezco haberme ayudado a adquirir las primeras herramientas técnicas que tanto necesitaba.

Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra, al Dr. Salvador Saíd Fernández y a la Q.C.B. Raquel Ballesteros, por su colaboración para cubrir parte de mi trabajo experimental.

Al Dr. Antonio Luna, le agradezco haber realizado el trabajo fotográfico con que se ilustró esta tesis.

A las Enfermeras de la Unidad de Toco-Quirúrgica del Hospital Universitario, que tan amablemente me ayudaron a conseguir muestras para mi tesis.

A los que coincidimos en Biología Celular durante mi estancia en la ULIEG, Martín, Mario y Fermín, gracias por sus consejos.

A mis compañeros de generación, Flor, Maribel, Dolores, Víctor y Sandra; también a los miembros de los diferentes laboratorios; principalmente a Claudio, Ana, Irma, Pablo e Iván, con quienes compartí agradablemente.

A los trabajadores de la ULIEG, don Pacho, Raúl, Sandra, Eduviges, Patty y especialmente a Vicky y Raquel, por la amistad con que me distinguieron. A todos, gracias por haberme ayudado tan amablemente cuando fue necesario.

Dedicatorias

A esa Energía que recibe muchos nombres, entre ellos Dios, capaz de impulsarnos a seguir adelante cuando parece que nuestro esfuerzo no tendrá recompensa.

A mis Padres, Sres. Eledoro Flores García y Guadalupe Valdez de Flores; al igual que a mis hermanos, Mirna Guadalupe y José Alfredo, por el apoyo y confianza que siempre han mostrado hacia mí.

A toda mi Familia, con quienes compartí los primeros años de mi vida y con quienes vivo momentos tan gratos al vernos de nuevo.

A Julio Henoc y Perla, en verdad gracias por brindarme su amistad, motivo de un grato recuerdo de esta época.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Localización y Características de la Familia Multigénica hGH-hPL	1
1.2 Transcritos de los Genes de la Familia hGH-hPL	1
1.3 Factores Involucrados en la Expresión Diferencial	3
1.4 Proteínas que se Obtienen de la Traducción de los RNAs de los Genes hGHs y hPLs	5
1.4.1 HGH-N	5
1.4.2 HGH-V	6
1.4.3 HPL	6
1.5 Modelos Celulares de Expresión de los Genes hGH-hPL	7
1.5.1 Ensayos en células GC	8
1.5.2 Ensayos en Células COS-7	9
1.5.3 Ensayos en las Líneas celulares JAR y JEG-3	9
1.5.4 Ensayos en Células BeWo	9
1.6 Cultivo de Citotrofoblastos de Placenta	10
1.6.1 Obtención de los citotrofoblastos y evolución del cultivo	11
1.6.2 Aislamiento de las células	12
1.7 Estimuladores de la Expresión de hPL	12
1.7.1 Suero materno	12
1.7.2 AMPc	13
1.7.3 Interleucina 6 y Factores de crecimiento	13
1.7.4 Moléculas esteroideas	14
1.8 Justificación	15

2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo General	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Origen de los Reactivos	18
3.2 Secuencias de los Iniciadores Utilizados	19
3.3 Origen del Material Biológico	19
3.4 Equipo	20
3.5 Cultivo Celular	21
3.5.1 Obtención de los citotrofblastos y establecimiento de cultivos primarios	21
3.5.2 Adición de ácido retinoico al medio de cultivo	22
3.6 Extracción del RNA	24
3.7 Cuantificación de los Niveles de Expresión de hPLs y hGH-V	24
3.7.1 Síntesis de DNAc	25
3.7.2 Amplificación	25
3.7.3 Amplificación preferencial de los DNACs de hPL-1 y hGH-V	26
3.7.4 Transcrito de referencia en la PCR	28
3.7.5 Coamplificación de GAPDH con hGH-V	29
3.7.6 Análisis densitométrico	29
3.7.7 Análisis con endonucleasas de restricción	29
3.7.8 Verificación de la identidad de los productos amplificados para hGH-V con <i>Bgl II</i>	29
3.7.9 Verificación de la identidad de los productos amplificados para hPL-1 con <i>Rsa I</i>	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Aislamiento y Cultivo de los Citotrofblastos	31
4.2 Aislamiento del RNA total de los Cultivos Primarios	33

4.3	Verificación de la Integridad y Cantidad de los RNAs	33
4.4	Detección de los Transcritos Totales de hPLs por RT-PCR	35
4.5	Caracterización del Producto Amplificado de hPLs	35
4.6	RT-PCR para Detectar los Transcritos de hGH-V	36
4.7	Verificación de la Identidad del Producto Amplificado para hGH-V	37
4.8	RT-PCR Selectiva de los Transcritos de hPL-1	38
4.9	Verificación de la Identidad del Producto Amplificado para hPL-1	39
4.10	RT-PCR para los Transcritos de GAPDH	39
4.11	Coamplificación de los Transcritos de hPLs y GAPDH	41
4.12	Coamplificación GAPDH/hGH-V	42
4.13	Efecto del Ácido Retinoico sobre la Expresión de los Genes hPLs y hGH-V	42
4.14	Caracterización de los Transcritos hPLs de las Células Tratadas con AR	43
5.	DISCUSIÓN	45
6.	CONCLUSIONES	49
7.	PERSPECTIVAS	50
8.	REFERENCIAS	51
	APÉNDICE A	57

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Componentes de la Reacción de Transcripción Reversa	25
2. Preparación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para hPLs	26
3. Composición del Medio de Reacción para la Amplificación de los DNAs de hGH-V o hPL-I	27
4. Preparación de la Mezcla para Coamplificar GAPDH con hPLs	28

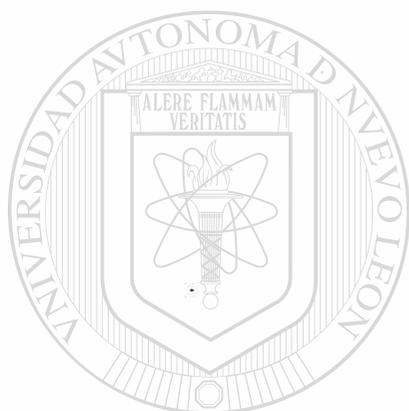
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Anatomía del Complejo Multigénico hGH-hPL	2
2. Estudios de Expresión en Cultivo Celular	8
3. Diagrama de Flujo para el Aislamiento de Citotrofoblastos a Partir de Placentas a Término	23
4. Cultivo Primario de Citotrofoblastos de Placenta a las 24 h	32
<hr/>	
5. Cultivo Primario después de 48 h	32
6. Curva de Calibración para Cuantificar los RNAs de Cultivo Primario	34
7. RNAs Totales de Cultivo Primario de Placenta	34
8. Producto Amplificado de los Genes hPL-2 y hPL-3	36
9. Producto Amplificado de hGH-V	37
10. Digestión de los Productos de PCR de hGH-V con <i>Bgl II</i>	38
11. (a) RT-PCR de los Transcritos de hPL-1 en Cultivo Primario	40
(b) Caracterización con <i>Rsa I</i> de los productos amplificados para hPL-1	40

12. Producto Amplificado del Transcrito de GAPDH	40
13. Productos Amplificados de los Transcritos GAPDH y hPLs	41
14. (a) Productos de la Coamplificación para GAPDH y hGH-V	43
(b) Tratamiento con <i>Bgl II</i> de los Productos de la Coamplificación GAPDH/hGH-V	43
15. Estimulación por Ácido Retinoico de la Expresión de hPLs	44
16. Productos amplificados de los transcritos de hPL-2 y hPL-3, digeridos con <i>Pvu II</i>	44



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

A	Adenina
AMPc	AdenilMonoFosfato Cíclico
AR	Ácido retinoico
°C	Grados Celsius
CAT	Cloramfenicol Acetil Transferasa
c.b.p.	Cuanto baste para
cols.	Colaboradores
CG	Hormona Gonadotropina Coriónica
CO₂	Dióxido de carbono
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNA mensajero
dNTPs	Desoxinucleósidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
Fig.	Figura
G	Guanina
g	Gramos
g	Aceleración de la gravedad (9.8 m/s²)
GAPDH	Gen de la enzima gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa
GHF-1/Pit-1	Factor Transcripcional Uno del gen de la hormona del crecimiento humana
HEPES	Ácido N-2-hidoxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico.
HGH	Hormona del Crecimiento Humana
hGH-N	Gen de la hormona del crecimiento humana
hGH-V	Variante del gen de la hormona del crecimiento humana
HPL	Hormona del Lactógeno Placentario Humano
hPL	Gen de la hormona del lactógeno placentario humano

h	Horas
IL-6	Interleucina 6
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
M	Concentración Molar
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Concentración micromolar
mg	Miligramos
MgCl₂	Cloruro de magnesio
mL	Mililitros
min.	Minutos
mm	Milímetros
MOPS	Ácido 3-N-morfolinopropanosulfónico
mPL	Gen del Lactógeno Placentario Murino
MTX	Metotrexato
N	Concentración Normal
ng	Nanogramos
nM	Concentración nanomolar
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno
q	Brazo largo del cromosoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
RNA_r	RNA ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción Reversa
RT/MML-V	Transcriptasa Reversa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney
S	Unidades Svedberg
s	Segundos
T3	Hormona 3,3',5-Triyodotironina
U	Unidades

1,25-(OH)₂D₃

1,25-dihidroxitamina D 3

V

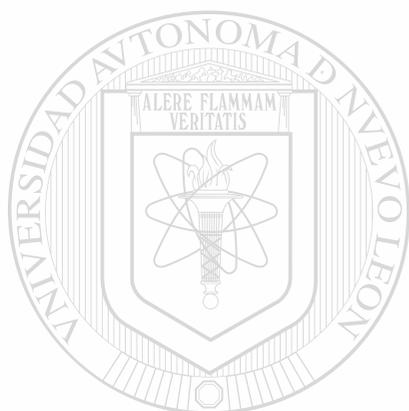
Volts

Vol.

Volumen

X

Número de veces la concentración



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Mario Alberto Flores Valdez

Fecha de Graduación : Marzo, 1999

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio : EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
ENDÓGENOS DE hPLs y hGH-V EN CULTIVO
PRIMARIO DE PLACENTA**

Número de páginas : 59

Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería
Genética

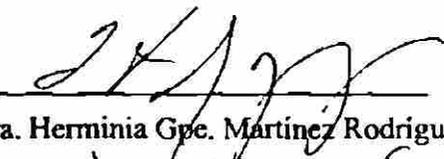
Área de estudio : Biología Molecular

Propósito y Método del Estudio : Los genes del lactógeno placentario y de la hormona del crecimiento humano pertenecen a una familia de cinco genes conocida como hGH-hPL. Estos genes comparten una similitud mayor al 90% en su secuencia nucleotídica, sin embargo, se expresan en forma tejido-específica y a diferentes niveles. Se han estudiado en cultivo de células algunos factores involucrados en la expresión diferencial de estos genes, como también se ha logrado establecer cultivos primarios de células normales de placenta que simulan la condición fisiológica real del tejido. En este sistema se ha detectado RNAm y proteína de lactógenos, sin determinarse la contribución individual de cada uno de los genes del complejo.

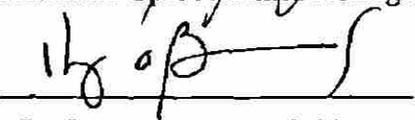
En este trabajo se adaptó una técnica para aislar células de placenta e iniciar cultivos primarios, y se evaluó por RT-PCR la expresión endógena en este sistema, de todos los genes del complejo hGH-hPL que se expresan en placenta. Se utilizaron diferentes sueros y ácido retinoico para verificar su efecto estimulante en la transcripción de estos genes, y si estos compuestos afectaban a uno o más de ellos.

Contribuciones y conclusiones : Se logró adaptar una técnica para aislar citotrofoblastos de placenta a término y mantenerlos en cultivo durante una semana, tiempo suficiente para que se diferenciaron hacia sincitiotrofoblastos y expresaran todos los genes hPLs y el gen de hGH-V. Se logró verificar tanto la calidad como la cantidad de RNA por electroforesis y densitometría de los geles. Por los análisis de RT-PCR y cortes con enzimas de restricción específicas, se estableció que todos los genes del complejo hGH-hPL que se expresan en placenta, lo hacen también en cultivo primario, con un patrón similar de procesamiento para todos los transcritos. También se verificó que el ácido retinoico estimula la transcripción de los genes hPL-2 y hPL-3, además de hGH-V. No se pudo concluir sobre el efecto del suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo.

FIRMA DEL ASESOR :


Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez

FIRMA DEL COASESOR :


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Localización y Características de la Familia Multigénica hGH-hPL

El complejo multigénico de la hormona del crecimiento y del lactógeno placentario (hGH-hPL) está constituido por cinco genes y se localiza en una región de aproximadamente 60 kb entre las bandas q22-24 del cromosoma 17. Sus genes muestran la siguiente distribución de 5' a 3' : hGH normal (hGH-N); hPL-1 (o hPL-L, por Like); hPL-2 (o hCS-A, hCS-1; llamado anteriormente hPL-4); hGH variante (hGH-V); hPL-3 (o hCS-B, hCS-2) (Harper y cols., 1982) (Fig.1). Entre otras características, puede citarse que comparten una similitud en secuencia nucleotídica mayor al 90% y que esta similitud se presenta incluso en las regiones 5' y 3' no traducibles, así como en los intrones.

1.2 Transcritos de los Genes de la Familia hGH-hPL.

A pesar de la alta similitud que existe entre los miembros de la familia multigénica hGH-hPL, se sabe que la expresión es específica de tejido: el gen hGH-N se expresa principalmente en hipófisis anterior y los demás genes del complejo lo hacen en placenta. El RNAm de hGH-N constituye cerca del 3% en la hipófisis, mientras que los

otros genes se expresan en placenta en niveles relativos que van desde 3% para hPL-2 y hPL-3 hasta 0.001% para hGH-V, pasando por 0.01% para hPL-1.

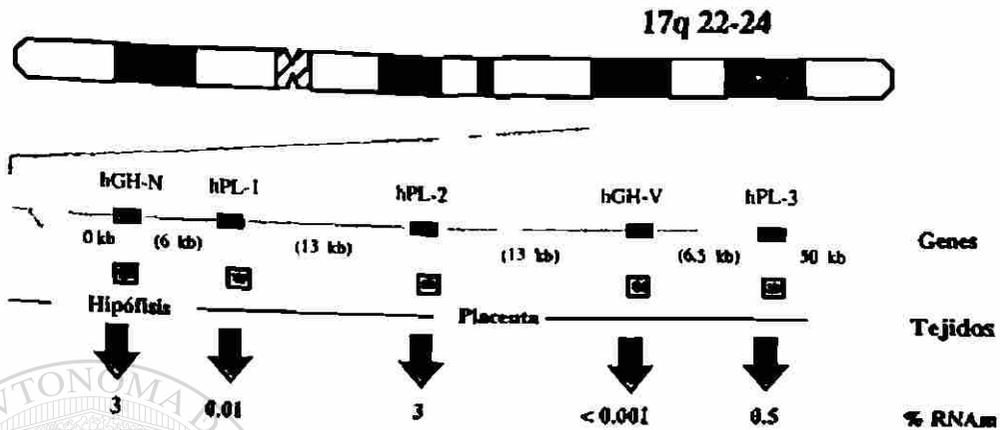


Fig.1. Anatomía del complejo multigénico hGH-hPL. Se muestra el arreglo de estos genes, así como la expresión diferencial y específica de tejido (Harper y cols., 1982; Chen y cols., 1989).

Respecto a los genes hPL-2 y hPL-3, si bien ambos codifican un rRNA precursor con diferencias mínimas entre ellos, de ambos genes se produce una proteína madura idéntica, notándose que hay varios informes en la literatura donde se menciona que la contribución de cada uno es variable. Por ejemplo, Barrera Saldaña y cols en 1982 encontraron una relación 3:2 entre los transcritos de hPL-2 y hPL-3; Chen y cols en 1989 encontraron una proporción 6:1 y MacLeod y cols en 1992 mencionan 5 : 1. Estos valores se obtuvieron en estudios realizados con una sola placenta. Por otro lado, en un estudio con un grupo de placentas se encontró una proporción variable entre ellos, que va desde 1:1 a 6: 1 (Martínez Rodríguez y cols., 1997).

En cuanto al gen hPL-1, la primera evidencia de su transcripción se tuvo con una biblioteca de DNAc obtenido de placenta, que se tamizó con sondas de oligonucleótidos específicas para este gen. Se detectaron transcritos en niveles cien veces menores que los de los otros genes hPLs (Chen y cols., 1989). Como característica principal de su expresión, se asume que el gen hPL-1 no es funcional, debido a que contiene una transición (G→A) en el sitio consenso 5' donador de procesamiento en el segundo intrón.

Además, se piensa que la transición en el sitio de procesamiento no es el único factor involucrado, porque cuando se construyeron plásmidos recombinantes donde se reemplazó este sitio con la secuencia normal de hPL-3, y se transfectaron en células COS-7, no se observó producción de proteína (Chen y cols., 1989; Reséndez Pérez y cols., 1990; MacLeod y cols., 1992). En contraparte a esto, otro estudio aportó evidencias distintas a la presunción de que hPL-1 es un pseudogen; en éste se lograron detectar cinco transcritos alternativos de este gen y se determinó por traducción *in vitro*, que al menos uno de ellos es capaz de producir una proteína de 22.6 kDa y que la secuencia señal de tal proteína se procesa correctamente (Misra-Press y cols., 1994).

Por lo que respecta al gen hGH-V, se han descrito cuatro formas de RNAm en placenta a término: 1) una de ellas es la forma típica de los otros genes del complejo, que origina una proteína de 22 kDa (191 aminoácidos); 2) otra es una variante que posee 253 nucleótidos más (hGH-V2, 230 aminoácidos) del cuarto intrón, retenido gracias a un procesamiento alternativo y cuya proporción respecto al total del RNAm de hGH-V se estimó en 30% (Cooke y cols., 1988); 3) un tercer transcrito procede de la utilización alterna de un sitio donador de procesamiento, situado 4 pb hacia el 5' del sitio convencional entre el exón 4 y el intrón inmediato; este RNAm codifica una proteína de 25 kDa (219 aminoácidos) que pierde un sitio de N-glucosilación en la Asparagina 140 y lo adquiere en la posición 148, además de poseer un dominio rico en cisteínas hacia el extremo carboxilo terminal, posiblemente involucrado en la formación de múltiples puentes disulfuro (Untergasser y cols., 1998; Boguszewski y cols., 1998). La proporción de este transcrito dentro de la población de mensajeros para hGH-V se estimó de un 10% (Boguszewski y cols., 1998); 4) el cuarto transcrito se origina de la delección de 45 pb por el uso de un sitio alternativo de procesamiento dentro del exón 3 (similar al que ocurre en hGH-N); y de él se predice una isoforma de hGH-V de 20 kDa. Este RNAm se detectó en 2 de cuatro placentas normales a término (Boguszewski y cols., 1998).

1.3 Factores Involucrados en la Expresión Diferencial

Como ya se ha mencionado, los genes de la familia hGH-hPL presentan una alta similitud en su secuencia nucleotídica. Sin embargo, las diferencias que presentan juegan un papel decisivo en la expresión de cada uno de ellos. Si se hace una clasificación de la

4

secuencia de los genes, dividiéndolas en anteriores, internas y posteriores al sitio de inicio de la transcripción, se pueden detallar algunos de los numerosos factores involucrados en la expresión diferencial. Citando la región anterior al inicio de la transcripción, se vio que para la síntesis de los RNAm se necesitan tanto factores ubicuos, como el Factor Estimulador Río Arriba (Upstream Stimulatory Factor-USF, unido a -290/-257; Lemaigre y cols., 1989) y Sp1 (unido a -140/-116; Lemaigre y cols., 1989), como factores específicos, tales como Pit-1. Para la unión de este último factor transcripcional a la región promotora, se han descrito dos sitios, uno proximal (entre -97 a -61 pb para hPLs, -92 a -65 pb en hGH-N; Nachtigal y cols., 1989) y otro distal (-130 a -105 en hGH-N; -140 a -107 para hGH-V y -145 a -118 para hPL-2; Nickel y cols., 1990).

En los genes de lactógeno se identificó que la interacción de una proteína de 70kDa con la secuencia situada entre -15 y +1 (elemento iniciador), es necesaria para la completa actividad de sus promotores (Jiang y cols., 1994).

Estos factores situados antes del sitio de inicio de la transcripción, entre otros, son necesarios para que inicie la síntesis de los transcritos. Además de ellos, existen algunas secuencias involucradas en el aumento de la producción de los RNAm de lactógenos. Tal es el caso de los elementos de respuesta a vitamina D (entre -1100 a -1070; -600 a -588 y -540 a -525; Stephanou y Handwerger, 1995), a triyodotironina (entre -497 y -373, además entre -97 y -83; Voz y cols., 1991; Stephanou y Handwerger, 1995), a ácido retinoico e IL-6 (Stephanou y Handwerger, 1995) y a AMPc (Oury y cols., 1994). En forma interesante, Oury y cols. encontraron que el cambio de un sólo nucleótido en el elemento de respuesta a AMPc (-1102 a -1096) del promotor de hPL-3 respecto a hPL-2, hace que el gen hPL-3 resulte menos estimulado con este compuesto; quizá por la pérdida de interacción con una proteína de 100kDa.

Las variaciones que se presentan en las secuencias de estos genes, explican los cambios en la afinidad por diversos factores, y pueden involucrarse en la expresión diferencial que se manifiesta entre los genes del complejo. Así mismo, probablemente tengan una función en la expresión tejido-específica; idea validada por la identificación de una región de 263 pb (elemento P), situada a -2 kb, que reprime la transcripción de los genes de lactógenos y de hormona del crecimiento variante en una línea celular hipofisiaria, pero no en otra derivada de placenta. Tal secuencia se encuentra presente en todos los genes, a excepción de hGH-N (Nachtigal y cols., 1992).

Ya dentro de la unidad transcripcional, se apreció que esta porción del gen también tiene alguna relación con la producción de los RNAm. De hecho, en hGH-N se encontró un elemento de respuesta a glucocorticoides dentro del primer intrón (entre +86

y +115), que conduciría a la estimulación ante compuestos de esa naturaleza (Slater y cols., 1985).

Dentro de la región posterior al inicio de la transcripción, se identificó una secuencia con carácter potenciador. De hecho, se sabe que para el gen hPL-3, tal región de 138 pb, situada a 2.2 kb hacia el 3' del gen, es funcional (Walker y cols., 1990). Si bien hPL-1 y hPL-2 poseen secuencias similares a tal potenciador, no se ha demostrado que sean funcionales y paradójicamente hPL-2 se expresa generalmente a más alto nivel que hPL-3. Para explicar esta controversia se ha propuesto que el potenciador de hPL-3 puede interactuar más fácilmente con el promotor de hPL-2 que con el suyo propio, por la formación de un "loop" en el DNA nucleosomal (Jaquemin y cols., 1996).

1.4 Proteínas que se Obtienen de la Traducción de los RNAs de los Genes hGHs y hPLs.

1.4.1 HGH-N.

El gen hGH-N codifica para varias proteínas o isoformas: un procesamiento alternativo del transcrito primario de hGH-N genera tres RNAs, cada uno de los cuales codifica para una proteína diferente. La especie más abundante (80-90%) es de 22 kDa y 191 aminoácidos, pero además existe una variante de 20 kDa (que carece de los residuos aminoácidos entre las posiciones 32 a 46 de la isoforma de 22 kDa y que constituye del 10-15% de la HGH hipofisiaria; De Noto y cols., 1981) y otra de 17.5 kDa (sin 40 aminoácidos), derivada de la pérdida del tercer exón (hasta un 5%; Singh y cols., 1974; LeComte y cols., 1987) del transcrito primario.

La función primordial de la HGH es promover el crecimiento y desarrollo postnatales, procesos que van acompañados de una gran variedad de efectos metabólicos, fisiológicos y anatómicos; entre éstos se puede citar la influencia estimulante del transporte de aminoácidos a través de la membrana celular, el estímulo en la síntesis de proteínas, el aumento de los depósitos de glucógeno y el aumento en la liberación de ácidos grasos (Hill, 1992).

1.4.2 HGH-V.

En el caso del gen hGH-V, éste se expresa durante el desarrollo de la placenta y a partir de él se producen varios polipéptidos. Uno de ellos, HGH-V, con un peso molecular de 22 kDa, es una isoforma que se secreta y llega a la circulación materna y que al final del embarazo substituye casi completamente a la HGH producida por la hipófisis materna; la proteína madura difiere en 13 aminoácidos (la mayoría no conservados) respecto al producto de hGH-N. También se ha encontrado una forma de 25 kDa, procedente de la glucosilación de la hormona de 22 kDa. Además se ha detectado otro RNAm de hGH-V, del cual se predice la traducción de una proteína madura de 26 kDa (Cooke y cols., 1988) que al parecer retiene un dominio hidrofóbico que la anclaría en la membrana celular (Hill, 1992)

1.4.3 HPL.

El lactógeno placentario (HPL) también llamado somatomotropina coriónica humana (HCS), es una hormona que se produce en los sincitiotrofoblastos de la placenta (McWilliams y Boime, 1980), y se expresa a partir de dos genes (hPL-2 y hPL-3) que comparten un 98% de similitud. Ambos codifican para polipéptidos maduros idénticos (Barrera Saldaña y cols., 1983). Esta hormona se sintetiza únicamente durante el embarazo, a partir de un precursor de 25 kilodaltones (kDa) que pierde 26 aminoácidos del extremo amino terminal (secuencia señal); esto origina una proteína madura de 22 kDa, que posee dos puentes disulfuro intramoleculares y no tiene residuos de carbohidratos (Barrera Saldaña y cols., 1983).

HPL se detecta en el suero materno por radioinmunoensayo a partir de la tercera semana de gestación y su concentración va en aumento hasta alcanzar niveles de 5 a 7 mg/mL en la trigésima semana (Handwerger, 1991). Cerca del parto, la secreción de HPL es de alrededor de 1 gramo al día, lo cual es mucho mayor que para cualquier otra hormona proteica (Handwerger, 1991) y su nivel de expresión constituye un 5% del RNA total en placenta (Barrera Saldaña y cols., 1982). A pesar de ser expresada en tal cantidad, la función exacta que desempeña no está totalmente clara, pues si bien es cierto que hay una correlación directa entre los niveles circulantes de HPL en el suero materno y el incremento en la masa de la placenta, se han informado casos de mujeres embarazadas en cuya placenta hubo grandes deleciones que eliminaron en ambos cromosomas 17 a los

genes hPLs activos, y sin embargo tuvieron embarazos normales (Klassen y cols., 1989). Entre las funciones que se le atribuyen se encuentran la de producir intolerancia a la glucosa y promover la retención de nitrógeno, esto en la mujer embarazada. En el feto promueve la glucogénesis, la síntesis de ornitina descarboxilasa y la secreción de insulina (Hill, 1992).

1.5 Modelos Celulares de Expresión de los Genes hGH-hPL

Para el estudio de la expresión de los genes del lactógeno placentario y de la hormona del crecimiento variante se han empleado diversas alternativas. Por un lado, se han construido bibliotecas de DNAc a partir de los transcritos aislados de placentas a término. De esta forma se determinó la presencia de cada uno de ellos en placenta, así como sus niveles de expresión.

Más adelante, varios modelos celulares han sido útiles para estudiar la expresión genética en el complejo hGH-hPL. Ejemplo de ellos son las líneas derivadas de carcinomas de hipófisis de rata (GC) y de coriocarcinoma humano (JEG-3, JAR y BeWo) en diferentes estadios de diferenciación (MacLeod y cols., 1992). Otra alternativa ha sido utilizar células normales aisladas de placenta, que sirven para establecer cultivos primarios, de carácter fisiológico más similar a la placenta. En la figura 2 se presenta un esquema donde se resumen los diversos estudios que se han efectuado con células en cultivo y los genes que se han incluido en ellos.

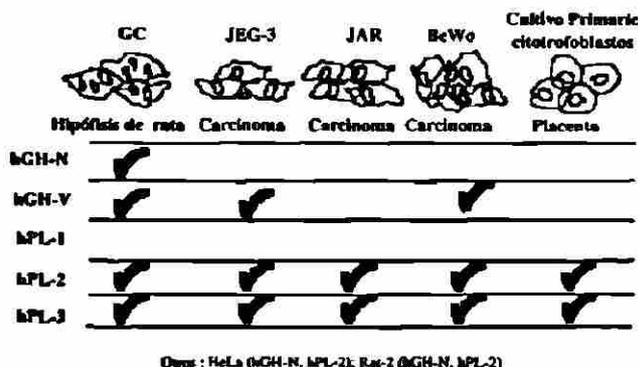


Fig.2. Estudios de expresión en cultivo celular. Estos se han enfocado principalmente a una porción de los genes (p.ej. promotor, potenciador, etc.). La flecha indica los genes estudiados en cada línea celular anotada.

1.5.1 Ensayos en células GC.

Los estudios de transfección de la secuencia de hGH-N en células GC, permitieron identificar algunos segmentos hacia la región 5' (-230 a -180 pb) que son necesarios para la transcripción eficiente de este gen (Cattini y cols., 1986). Así se determinó que el factor GHF-1/Pit-1, o uno semejante, se enlaza en forma eficiente tanto a la región distal (entre -145 a -118) como a la proximal (-97 a -61) del promotor de hPL-2 (Cattini y cols., 1987; Nickel y cols., 1990; Nickel y cols., 1991); por otro lado se reconoció que este mismo factor se une sólo a la región proximal (-97 a -61) del promotor de hPL-3 (Nickel y Cattini, 1996); y en el promotor de hGH-V únicamente en la región distal (entre -140 y -107) (Cattini y cols., 1987; Nickel y cols., 1990; Nickel y cols., 1991).

En otro estudio donde se utilizó al gen CAT como reportero, se encontró que el promotor del gen hPL-2 tiene de 5 a 25 veces más actividad en células GC que en HeLa o Rat 2. Esta actividad se incrementa aún más al adicionar 3, 3', 5-triyodotironina (Cattini y Eberhardt, 1987). Con estos resultados puede asumirse que las diferencias sutiles que existen entre los promotores de estos genes tienen relación directa con la intensidad a la cual será transcrito cada uno de ellos.

1.5.2 Ensayos en Células COS-7.

En esta línea celular se transfectaron diversos vectores de expresión, donde los DNAs de los genes hPLs y hGH-N se colocaron bajo el control del promotor del gen de la metalotioneína y del potenciador (enhancer) del virus de simio 40 (SV40). En este experimento se observó una mayor producción de RNAm a partir de la construcción con hPL-3 que la de hPL-2, en una proporción aproximada de 8:1 (Reséndez Pérez y cols., 1990).

1.5.3 Ensayos en las Líneas celulares JAR y JEG-3.

En las células de coriocarcinoma JAR y JEG-3 se han ensayado los genes hPL-2 y hPL-3 (Fitzpatrick y cols., 1990). Precisamente en estas líneas celulares se realizaron ensayos de expresión transitoria que permitieron mapear el potenciador de hPL-3 a una región de 138 pb. Allí se apreció que cuando se liga este fragmento de 138 pb hacia el 3' del gen CAT, se incrementa su expresión entre 25 a 30 veces sobre el nivel obtenido únicamente con el promotor de SV40 (Walker y cols., 1990). Además, en este estudio surgió evidencia adicional de que el potenciador puede asociarse con la expresión tejido-específica, debido a que los plásmidos que contienen esta región son de 20 a 40 veces más activos en células JEG-3 (de coriocarcinoma) que en Hep-G2 (de hepatoma), U373 MG (de glioblastoma) y HeLa (epiteliales) (Walker y cols., 1991).

El promotor de hPL-3 no muestra el carácter de especificidad, porque en conjunto con el potenciador de SV40 conduce a una expresión similar del gen CAT en ambas líneas celulares. Su papel parece estar más bien asociado sólo a conducir la expresión del gen hPL-3 (Fitzpatrick y cols., 1990).

1.5.4 Ensayos en Células BeWo.

Dentro de los estudios que se han realizado en esta línea celular, se encontró que el gen hGH-N no da señal de expresión en estas células, lo cual sugiere la expresión selectiva de los genes placentarios del complejo hGH-hPL, a diferencia de lo que ocurre en células GC y COS-7 (Cattini y Eberhardt, 1987; Voz y cols., 1991). Existe un

informe donde en base a los transcritos derivados de los genes hGH-hPL se apreció que la expresión relativa de los miembros placentarios de esta familia génica era mayor en BeWo que en JAR y en esta última a su vez mayor que en JEG-3. Esto sugiere que la proporción relativa entre los transcritos de hPLs y hGH-V cambia en función del tipo celular. Además, en ese trabajo se encontró que el tratamiento con T3 (10 nM) incrementó 6 veces los niveles de los RNAs de estos genes en células BeWo (Nickel y Cattini, 1991).

Se piensa que el tratamiento de las células BeWo con metotrexato (MTX) induciría un tipo celular intermedio entre el cito y el sinciciotrofoblasto. En ese estadio se produce una disminución en la expresión de los RNAs totales de hPLs-hGH-V y sólo se detectan hGH-V y especies alternas de hPL-2. Si el tratamiento con MTX realmente induce un tipo celular intermedio, surge la posibilidad de que hGH-V y hPLs tengan un patrón de expresión temporal diferente en el trofoblasto en desarrollo (Nickel, 1993).

Es útil señalar que estos modelos han sido de gran ayuda en el estudio de la expresión de los genes del complejo hGH-hPL. Sin embargo, presentan limitantes, como el origen de las líneas celulares : GC son de rata y JAR, JEG-3 y BeWo son derivadas de coriocarcinomas. Además, en cualquiera de los casos, estas células no representan la situación metabólica que ocurre en las células normales de la placenta.

Por lo anterior, una alternativa que permite estudiar la expresión de los genes que se expresan en la placenta en una situación más cercana a la fisiológica, son los cultivos primarios derivados de citotrofoblastos de placenta.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.6 Cultivo de Citotrofoblastos de Placenta

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Actualmente se puede establecer el cultivo primario en monocapa de células derivadas de placenta. Una estrategia que se emplea comúnmente es la que describieron originalmente Hall y cols. en 1977, y que fue modificada por Kliman y cols. en 1986, quienes utilizaron proteasas para dispersar las células de la placenta, luego las sometieron a purificación para obtener una fracción enriquecida de citotrofoblastos mononucleares, que ya en cultivo fueron capaces de fusionarse y formar los sinciciotrofoblastos. Después de 48 h los sinciciotrofoblastos pudieron secretar HPL (Jaquemin y cols. 1993; Handwerger y cols., 1994).

Para que se establezca el cultivo en monocapa son necesarias las interacciones entre algunas proteínas de la membrana celular con otras que se encuentran en la matriz extracelular, representada por las cajas de cultivo. De hecho se conoce que al recubrir tales cajas con fibronectina o colágeno, los citotrofbastos se pueden adherir a la superficie plástica y formar sincicios en cultivo con medio sin suero, posiblemente por asociación de los trofbastos al colágeno vía fibronectina (Kao y cols., 1988).

1.6.1 Obtención de los citotrofbastos y evolución del cultivo

Las técnicas de obtención de citotrofbastos incluyen la separación de las células a partir de las vellosidades placentarias, por digestiones con tripsina (Nelson y cols., 1986; Lobo y Bellino, 1989) y DNAsa (Kliman y cols., 1986; Kato y Braunstein, 1990; Jaquemin y cols., 1993). En otros casos la digestión se ha realizado con pancreatina y proteasa (Handwerger, 1994).

La digestión enzimática seguida de la purificación permite el aislamiento de una población predominante de citotrofbastos, los cuales mantienen su viabilidad hasta la décimotercera semana en cultivo en monocapa y a partir de su establecimiento se observan cambios morfológicos : la ultraestructura muestra desmosomas y una extensa red de microfilamentos citoplasmáticos (Nelson y cols., 1986).

Los citotrofbastos aislados de esta manera, y analizados con métodos de inmunocitoquímica, dan negativo a las tinciones para gonadotropina coriónica (HCG), HPL, glucoproteína β -1 (específica del embarazo) o citoqueratinas de bajo peso molecular; contrario a lo que sucede con los sinciotrofbastos. Por otra parte, no existe contaminación con células endoteliales, fibroblastos o macrófagos, lo que se demostró porque no reaccionaron con anticuerpos antivimentina o α -1-antiquimotripsina (Kliman y cols., 1986).

Tras 24-48 h en cultivo, las células se agregan en sincicios, cuya autenticidad se verificó por microinyección de α -actinina marcada con fluorescencia, la cual difundió completamente por todo el citoplasma sincicial en un tiempo de 30 min. (Kliman y cols., 1986). Estos resultados llevaron al grupo de Kliman a concluir que los citotrofbastos se diferencian en cultivo y se fusionan para formar sinciotrofbastos funcionales, y que es en esta etapa cuando son capaces de iniciar la secreción de HPL. Sin embargo, se demostró que la función endócrina en cultivo se puede iniciar independientemente de la formación del sincicio, al haberse detectado el aumento de la HCG en respuesta al 8-

bromo-AMPC (Feinman y cols., 1986; Klassen y cols., 1989). También se comprobó que antes de formar el sincicio, las células son capaces de sintetizar progesterona y estrógenos, en este caso al usar androstendiona como precursor (Kliman y cols., 1986).

1.6.2 Aislamiento de las células

Existen variaciones en cuanto al modo de procesar las células antes del cultivo. Jaquemin y cols. realizaron lavados con medio de Hank libre de calcio y magnesio, antes de la digestión, mientras que Kato y Braunstein lavaron con PBS, al igual que Klassen y cols. y Handwerger y cols. Después de la digestión, las células se han separado por gradientes discontinuos de Percoll de 5% a 70% con incrementos de 5% (Klassen y cols., 1989; Kato y Braunstein, 1990; Golos y cols., 1992; Jaquemin y cols., 1993;) de donde se separa la capa intermedia del gradiente (densidad 1.048-1.062), o bien por diversos filtros para eliminar células no separadas y sincicios, seguida de separación por densidad en Percoll al 20% (Handwerger y cols., 1994). Klassen y cols. efectúan una segunda centrifugación en Percoll al 60% en PBS con HEPES y libre de magnesio.

El medio que se utiliza generalmente para el cultivo es el Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 a 20 % de suero de ternera fetal (Lobo y Bellino, 1989; Jaquemin y cols., 1993) o bien el RPMI-1640 (Handwerger y cols., 1994).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.7 Estimuladores de la Expresión de hPL

1.7.1 Suero materno.

El suero materno que se ha utilizado provenía de mujeres en el segundo trimestre de su embarazo, fundamentalmente porque es durante este periodo cuando se presenta un gran incremento en la masa placentaria (de 30 a 120 g), lo que hace pensar que en esta

etapa se encuentran factores involucrados en la diferenciación de los citotrofoblastos. Al comparar diferentes tipos de sueros como suplemento al medio de cultivo, se apreció que el patrón de secreción de HPL en cultivo primario de trofoblastos es similar cuando se utiliza suero de mujer en el segundo trimestre del embarazo, suero de mujer no embarazada, o suero de hombre, lo que no ocurre con los niveles de secreción, ya que hay al menos el doble de hormona cuando se utiliza suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo. Las células también son más resistentes a la digestión con tripsina, contrario a lo que sucede cuando se cultivan en medio suplementado con suero de bovino fetal, en cuyo caso se deforman, tienen menos adherencia y no sobreviven más de dos semanas (Richards y cols., 1994).

1.7.2 AMPc.

Para verificar si los nucleótidos cíclicos tienen algún efecto en la expresión de los PL se ensayó con el 8-bromo-AMPc, y se descubrió que esta molécula es capaz de incrementar en promedio 4 veces los niveles de los RNAm's de la subunidad α de la CG y del PL (en diferentes tiempos cada uno) en células de placenta de mono rhesus obtenidas en los días 28, 50, 60 ó 140 de embarazo, lo que sugiere en este caso, una regulación mediada vía AMPc (Golos y cols., 1992). También se ha visto que este nucleótido tiene efecto estimulante para la expresión de hCG y estrógeno sintetasa (aromatasa) en cultivos primarios de trofoblastos obtenidos de placentas humanas a término (Lobo y Bellino, 1989).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.7.3 Interleucina 6 y Factores de crecimiento.

En otro estudio realizado con IL-6, además de los Factores de Crecimiento Epidérmico (EGF), Derivado de Plaquetas (PDGF) y Factor de Crecimiento Tumoral β (TGF- β), se pudieron reconocer algunos efectos que éstos tienen sobre los citotrofoblastos humanos en cultivo. En el caso del EGF se aprecia que estimula la síntesis de HPL y HCG, lo que lo vincula con el proceso de diferenciación; PDGF estimula la proliferación celular y TGF- β e IL-6 estimulan tanto la diferenciación como la proliferación de estas células (Aoki y cols., 1991). Al tercer y sexto día de estimulación

con 500 U/mL de IL-6 se aumenta la expresión de los hPLs entre 2.2 a 4.7 veces respecto a las células control, con un efecto dependiente de la dosis y con un mínimo estimulante de 50 U/mL (Stephanou y Handwerger, 1994a). Posteriormente se postuló que los efectos de la IL-6 sobre la expresión de los genes hPLs están mediados, al menos en parte, por el enlace del factor nuclear NF-IL6 a una región entre -1376 a -1088 en el promotor de hPL, que contiene tres elementos de respuesta a NF-IL6 (Stephanou y Handwerger, 1995 c).

1.7.4 Moléculas esteroideas.

Se ha utilizado el ácido retinoico (RA), triyodotironina (T3) y vitamina D3 (como la forma activa 1,25-dihidroxicolecalciferol). Los receptores de cada una de estas tres sustancias son miembros de la superfamilia de receptores nucleares tiroideos/esteroideos, que funcionan como activadores transcripcionales inducibles al unirse a su ligando y cuya secuencia comparte un alto grado de homología en el dominio enlazante de DNA (Stephanou y Handwerger, 1995b).

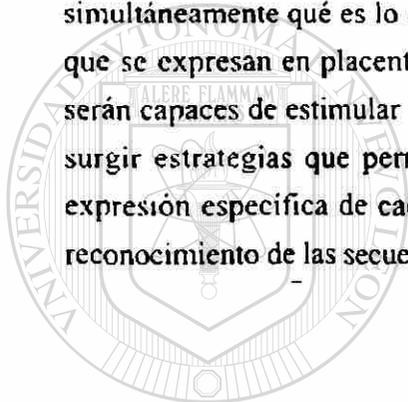
Para los casos de RA y T3 se ha comprobado que aunque no tienen efecto significativo sobre la formación del sincicio, ambos incrementan (en una relación dependiente de la dosis) la expresión y liberación de HPL en cultivos de citotrofoblastos humanos; además estimulan la expresión del RNAm de hGH en células de hipófisis; con RA se logra un aumento en la secreción de hasta 5.3 veces sobre el nivel de los controles, mientras que para T3 hay un aumento de 5.5 veces (ambos al quinto día); tanto RA como T3 estimulan la síntesis del RNAm de hPL previo al aumento en los niveles de proteína (Stephanou y Handwerger, 1995b).

La 1,25-(OH)₂D3 se produce en placenta, y en cultivo es capaz de estimular la secreción de HPL, en niveles de 2.54 y 4.14 veces mayores (al cuarto y quinto día) a los obtenidos en células control, con un efecto dependiente de la dosis, todo esto con un incremento previo en los niveles de RNAm (Stephanou y Handwerger, 1994b).

1.8 Justificación

El uso de los cultivos primarios derivados de placenta podría contribuir a esclarecer si el patrón de expresión de las hormonas placentarias está determinado por sustancias estimuladoras o inhibitorias procedentes de la madre o del feto, por factores autócrinos o parácrinos, por el cambio en la proporción citotrofoblastos/sinciotrofoblastos conforme avanza el embarazo, o bien por ser una propiedad intrínseca de los trofoblastos placentarios (Kato y Braunstein, 1989).

Por otra parte, se conoce que diversas moléculas son capaces de estimular la expresión de los genes de hPL-2 y hPL-3, sin embargo, hasta hoy no se ha evaluado simultáneamente qué es lo que sucede con los demás miembros del complejo hGH-hPL que se expresan en placenta. En este sentido, se puede especular que tales moléculas serán capaces de estimular también la expresión de tales genes o, en su defecto, podrían surgir estrategias que permitan determinar si hay otros factores involucrados en la expresión específica de cada gen, ya sea por su afinidad diferente o por un patrón de reconocimiento de las secuencias que sea distinto en cada caso.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

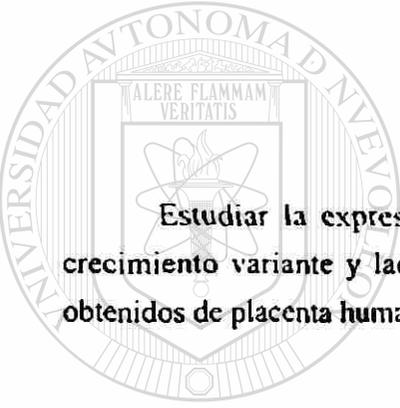
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general



Estudiar la expresión diferencial de los genes endógenos de hormona del crecimiento variante y lactógeno placentario en cultivo primario de citotrofoblastos obtenidos de placenta humana.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

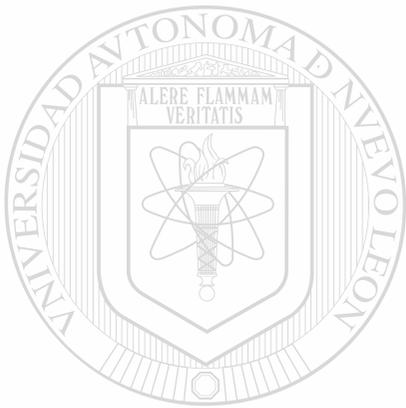
2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Adaptar una técnica para aislar citotrofoblastos a partir de placentas a término.

2.2.2 Establecer los cultivos primarios.

2.2.3 Determinar los niveles endógenos de expresión de los genes hGH-V y hPLs en el cultivo primario.

2.2.4 Evaluar la expresión de los genes de hGH-V y hPLs después de la inducción con ácido retinoico o suero materno de segundo trimestre, comparándola con la expresión de un gen constitutivo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

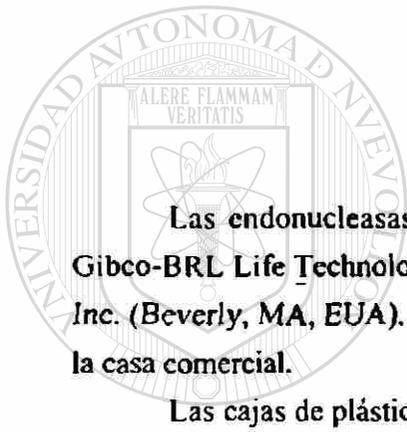


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen de los Reactivos



Las endonucleasas de restricción fueron adquiridas de las casas comerciales Gibco-BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, EUA) y New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, EUA). En cada caso se utilizaron las condiciones recomendadas por la casa comercial.

Las cajas de plástico para cultivo celular se adquirieron de Falcon (Lincoln Park, NJ, EUA).

El medio de cultivo RPMI-1640 fue de la compañía Gibco-BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, EUA); también la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (TR/MML-V).

El suero de bovino fetal se adquirió de la compañía Hyclone, Inc. (Logan, UT, EUA).

La tripsina fue de DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA).

De SIGMA-Aldrich (St.Louis, MO, EUA) se adquirió la DNAsa, así como el fenol y los reactivos inorgánicos. El ácido retinoico (todo *trans*) provino de esta misma casa comercial. El isotiocianato de guanidina se adquirió de Gibco-BRL Life Technologies, Inc.

El cloroformo utilizado fue de Merck® (EM SCIENCE, Gibbstown, NJ, EUA).

La enzima Taq DNA polimerasa se adquirió de Perkin Elmer-Cetus (Alameda, CA, EUA) y Promega (Madison, WI, EUA); los dNTP's también fueron de la corporación Promega.

El Percoll[®] fue de Pharmacia (Uppsala, Suecia).

Los oligonucleótidos utilizados en el análisis de PCR fueron sintetizados en el Laboratorio de Química Biomolecular de nuestro departamento, a excepción de los iniciadores para GAPDH que fueron donados por Gibco-BRL Life Technologies.

El sistema de RT-PCR en un solo paso, se adquirió de Gibco-BRL Life Technologies.

3.2 Secuencias de los Iniciadores Utilizados

Iniciador consenso para hGHs y hPLs (112): 5'-ctcaggatcctgtggacagetcaccta-3'

Iniciador consenso para hGHs y hPLs (113): 5'-tcgaattccaggagagcactggg-3'

Iniciador 5' para hGH-V: 5'-cgegecccgtcgcctggta-3'

Iniciador 5' para hPL-1: 5'-ccaggagtataagcttgggggaatgg-3'

Iniciador 5' para GAPDH: 5'-aggteggagtcacggatttgg-3'

Iniciador 3' para GAPDH: 5'-catgtggccatgaggtccaccac-3'

3.3 Origen del Material Biológico

Todas las placentas utilizadas fueron de embarazos normales, a término, y se recolectaron de la Unidad de Toco-Quirúrgica del Hospital Universitario "José Eleuterio González".

Los sueros humanos que se emplearon para suplementar el medio de cultivo se obtuvieron de donadores sanos, miembros de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG).

3.4 Equipo

Se utilizó un horno de microondas Goldstar modelo MA-857M, microcentrifugas Eppendorf modelos 5402 y 5415 C, una fuente de poder Gibco-BRL modelo 250, un ultracongelador marca So-Low Environmental Equipment (Cincinnati, OH, EUA), una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas City, MO, EUA). También se utilizó un termociclador MJ Research modelo PT150 (Watertown, MA, EUA), una balanza digital marca Sartorius modelo 1206 MP (Camibh Göttingen, Alemania), una balanza analítica OHAUS modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), micropipetas Pipetman Gilson de Rainin Instrument Co., Inc. (Emeryville, CA, EUA), un agitador G10 marca New Bussines Scientific Co., Inc (Edison, NJ, EUA), jeringas y agujas Becton Dickinson & Co. (Rutherford, NJ, EUA), láminas de bisturí Becton Dickinson (Juiz de Fiora, MG, Brasil), un equipo de video-computadora marca BioRad, xmodelo GelDoc 1000 (Hercules, CA, EUA). El pH de las soluciones se ajustó en un potenciómetro Beckman Φ 320. Para observar las células se utilizaron microscopios Karl Zeiss (Alemania).

El procesamiento de datos se realizó en computadoras marca Macintosh modelos Classic II, LC III y Power PC (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, EUA).

Se empleó el procesador de textos *Microsoft Word* versión 5.1a (©1987-1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft Power Point* versión 3.0(©1987-1992 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition* 2.5.1.(©1989-1993 Adobe Systems Inc.) y *Molecular Analyst* versión 1.5 de BioRad Laboratories (Hercules, CA, EUA).

Para efectuar los análisis relacionados con la Biología Molecular se usaron los programas Amplify versión 1.2b (Bill Engels © 1992, University of Wisconsin, Genetics M., Madison, WI, EUA) y DNA Strider™ 1.1 (©Ch. Marck and CEA, 1989, Service de Biochimie-Département de Biologie- Institut de Recherche Fondamentale-CEA-Francia). Para la búsqueda de información se empleó el servicio via Internet, bajo Netscape Navigator 2.0 y Netscape Navigator 4.0 (Netscape Communications Corp., ©1995-1996) dentro de la base de datos MEDLINE, servicio que proporciona el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.5. Cultivo Celular

3.5.1 Obtención de los citotrofoblastos y establecimiento de los cultivos primarios.

El protocolo se adaptó de las técnicas descritas por Handwerger y cols. y Kato y Braunstein.

A partir de placentas a término :

1. Se cortaron, con tijeras estériles, 3 ó 4 cotiledones de la placenta (aproximadamente 40 g) y se colocaron en PBS (pH 7.4, libre de calcio y magnesio) estéril y frío para su transporte al laboratorio. Tales porciones se tomaron de la región central de la placenta, de la parte más distal al cordón umbilical.
2. Se cortó el tejido con bisturí estéril, luego, se colocó en tubos de 50 mL estériles, se añadió PBS y se agitó por inversión. Se centrifugó 30 s a 1000 rpm; repitiéndose el proceso 3 veces. Los cortes se realizaron sobre cápsulas de porcelana (estériles) colocadas sobre hielo. Este proceso se llevó a cabo en la campana de flujo laminar.
3. Se digirió durante 30 min. a 37°C con 1 volumen de tripsina al 0.5% y 1 volumen de DNasa 100U Kunitz/mL (o bien Pancreatina 1 mg/mL); ambas en solución salina de Hank suplementada con HEPES. Transcurrido este tiempo, se colocó la suspensión en tubos de 50 mL y se centrifugó 2 min. a 2200 rpm. Se desechó el sobrenadante para añadir la misma cantidad de tripsina y DNasa. Enseguida se incubó durante 15 min. (10 min. cuando se usó pancreatina 1 mg/mL).
4. Después de la incubación se filtró la suspensión sobre tubos de 50 mL estériles (con tela de gasa estéril). Estos se centrifugaron durante 2 min. a 2200 rpm, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio RPMI-1640. Al tejido se le añadió nuevamente tripsina y DNasa y se incubó otros 15 min.. El proceso se repitió en una ocasión adicional.
5. Después de reunir los filtrados que contienen los citotrofoblastos, se centrifugó durante 2 min. a 2200 rpm (para concentrar en un volumen menor). Luego se colocó suavemente (con puntilla estéril) la suspensión obtenida sobre un gradiente discontinuo de Percoll de 10 a 50% (con incrementos de 10%, diluido en PBS estéril) y se centrifugó a 1200g (3360 rpm en la centrífuga Eppendorf 5403) durante 20 min. a 20°C.
6. Se removió la capa intermedia (densidad 1.048-1.062 g/mL) con una puntilla estéril, previo retiro de las capas superiores. A la capa con citotrofoblastos se le añadieron 7 vol. de PBS estéril, para lavar, y se centrifugó durante 2 min. a 2200 rpm. Después de

decantar el PBS, se añadió 1 mL de medio RPMI-1640, se tomaron 10 μ L y se hizo el conteo de células, enseguida se ajustó a una densidad que permitió tener 1×10^6 células por pozo. en placas de 24 pozos (1 pulgada cuadrada de área), los cuales contenían 250 μ L de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero de bovino fetal. Se colocaron en una incubadora a 37°C y una atmósfera con 5% de CO₂. Después de incubar 4 h se cambió el medio de cultivo, para empezar a cultivar en presencia de medio que contenía, según fuera el caso, 10% de suero de bovino fetal, de suero de hombre, de suero de mujer no embarazada o de suero de mujer en su segundo trimestre de embarazo. El proceso de cambio de medio de cultivo se repitió cada 48 h. Todo el proceso se esquematiza en la figura 3 (página siguiente).

3.5.2 Adición de ácido retinoico al medio de cultivo.

Después de dejar a las células en cultivo durante 24 h en medio suplementado con 10% de suero de bovino fetal, se procedió a iniciar los ensayos de adición de ácido retinoico al medio de cultivo. Para ello fue necesario trabajar con una luz tenue y alejada; entonces se procedió a hacer lo siguiente :

1. Se retiró el medio de cultivo con una puntilla estéril.
2. Adiciónose medio de cultivo RPMI-1640 con : (a) 10% de suero de bovino fetal; (b) 10% de suero de bovino fetal con 0.025% de dimetilsulfóxido (DMSO). o (c) 10% de suero de bovino fetal con ácido retinoico 0.5 μ M disuelto en DMSO.
3. Después se incubó de nuevo a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. El proceso se repitió cada 48 h, hasta que el cultivo estuvo en su séptimo día.

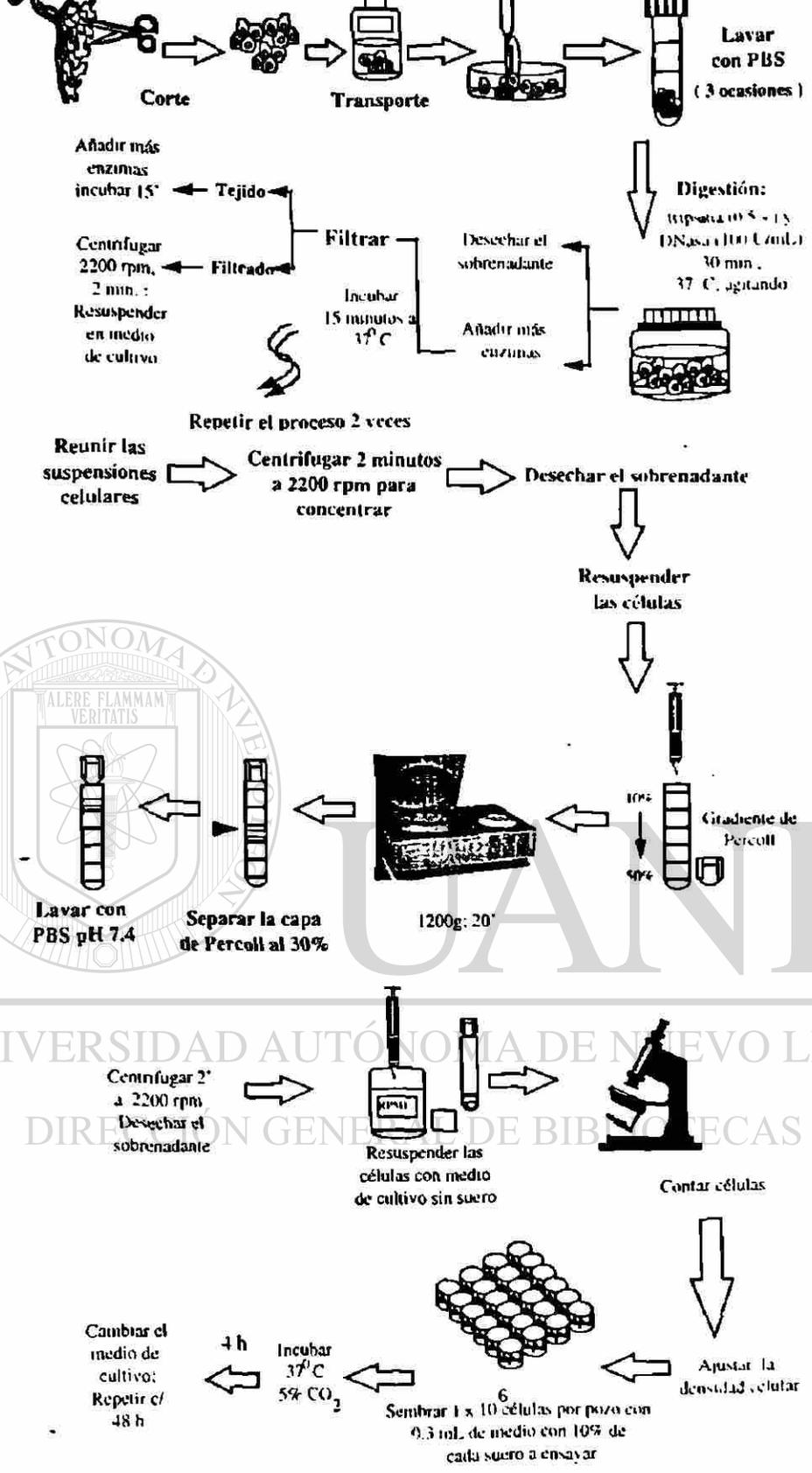


Fig.3. Diagrama de flujo para el aislamiento de citotrofoblastos a partir de placentas a término.

3.6. Extracción del RNA

El RNA total de las células en cultivo se extrajo por el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomezynski y Sacchi, 1987). Para ello se emplearon 200 μL de solución D en cada pozo, se disgregó la monocapa de células con un "gendarme" y se recuperó la suspensión de 3 pozos para colocar en total 600 μL en cada tubo Eppendorf de 1.5 mL. A éstos se les añadieron 60 μL de acetato de sodio 2 M pH 4.0, se agitó por inversión, se agregaron 600 μL de fenol saturado con agua tratada con dietilpirocarbonato, se mezcló bien y se adicionaron 120 μL de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Luego se agitó en vórtex durante 10 segundos para después incubar en hielo durante 10 min. y enseguida se centrifugó durante 10 min. a 14 000 rpm y 4°C. Después de la centrifugación se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 2 vol. de etanol absoluto, frío. Se mezcló bien y los tubos se guardaron a -70°C durante toda la noche para precipitar el RNA. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron durante 10 min. a 14 000 rpm y 4°C, se desechó el sobrenadante y se añadieron 200 μL de solución D, además de 500 μL de etanol absoluto frío; se dejó precipitar nuevamente a -70°C durante toda la noche, tras lo cual se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones; luego el RNA se lavó con 300 μL de etanol al 70% (en agua DEPC), se centrifugó igual, se desechó el sobrenadante y se dejó secar durante 30 min., a temperatura ambiente y dentro de la campana de flujo laminar. La calidad y cantidad de RNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa-isotiocianato de guanidina al 1.5%, comparándola contra la de un RNA estándar (131.6 ng/ μL)(Goda, SK; Minton, NP, 1995). Las electroforesis se corrieron inicialmente a 30 V y después de 30 min. se aumentó el voltaje a 90V.

3.7 Cuantificación de los Niveles de Expresión de hPLs y hGH-V

Para evidenciar la diferencia entre la expresión de estos genes bajo las distintas condiciones de cultivo ensayadas, fue necesario realizar la síntesis de DNAc, el cual sirvió después como molde en reacciones de amplificación específica por PCR.

3.7.1 Síntesis de DNAc.

El RNA total se convirtió a DNAc (Kawasaki, 1991) por transcripción reversa con iniciadores al azar (random primers). Para ello, se realizó la reacción detallada en la tabla 1.

El RNA se diluyó en el agua-DEPC y se sometió a desnaturalización durante 5 min. a 95°C. Luego se mantuvo en hielo durante 10 min., para enseguida añadirle la mezcla de los demás reactivos e incubar durante 30 min. a 37°C.

3.7.2 Amplificación.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con iniciadores específicos que permitieron obtener productos amplificados de cada gen hPL y del gen hGH-V. Para detectar los transcritos de hPL-2 y hPL-3 se utilizaron iniciadores consenso que permiten amplificar todos los genes del complejo hGH-hPL, pero como los genes anteriormente citados son los que se expresan mayormente, la cinética de su amplificación guiaba el curso de la reacción. La mezcla de reacción se describe en la tabla 2.

Tabla 1. Componentes de la Reacción de Transcripción Reversa

Reactivo	Cantidad
RNA total	2.5 µg
Buffer 5X	6.0 µL
DTT 100mM	1.0 µL
Random primers 100 mM	1.0 µL
dNTPs 10 mM	1.5 µL
TR/MML-V (200 U/µL)	2.0 µL
Agua tratada con DEPC	c.b.p. 30.0µL

Tabla 2. Preparación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para hPLs

Reactivo	Volumen (μL)
DNAC	3.0
Buffer 10X	5.0
MgCl ₂ 25 mM	3.0
dNTPs 10 mM	1.5
Primer 112 (5 μM)	5.0
Primer 113 (5 μM)	5.0
Taq DNA polimerasa (5 u μL)	0.5
Agua milliQ	27.0

El programa de PCR constó de los siguientes pasos : desnaturalización a 94°C, 1 min.; apareamiento de los iniciadores a 60°C, 1 min.; extensión a 72°C, 1 min.; luego se dieron 30 ciclos de estos 3 pasos para enseguida pasar a 94°C 1 min. y medio; 60 °C, 1 min. y finalizar con un tiempo de 5 min. a 72°C. Después de utilizar este programa se obtuvo una banda de 740 pb, a partir de los DNACs de hPLs.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

3.7.3 Amplificación preferencial de los DNACs de hPL-1 y hGH-V.

Se utilizaron iniciadores específicos para amplificar estos genes, debido a que sus niveles de expresión normalmente son muy bajos. El iniciador *antisentido* en ambos casos es el de clave 113. Para efectuar la amplificación se utilizaron los reactivos descritos en la tabla 3.

Tabla 3. Composición del Medio de Reacción para la Amplificación Específica de los DNAs de hGH-V o hPL-1

Reactivo	Volumen (μL)
DNAc	3.0
Buffer 10X	5.0
MgCl_2 25 mM	3.0
dNTPs 10 mM	1.5
Primer hGH-V o hGPL-1 (5 μM)	5.0
Primer I13 (5 μM)	5.0
Taq DNA polimerasa (5 u/ μL)	0.5
Agua milliQ	27.0

El programa de PCR que se utilizó en estos casos estuvo constituido por los siguientes pasos: desnaturalización inicial por 5 min. a 94°C; luego 35 ciclos de desnaturalización durante 1.5 min. a 94°C; apareamiento durante 1 min. a 63°C y extensión a 72°C por 1 min.

La especificidad y amplificación lograda con estos oligonucleótidos específicos para hPL-1 y hGH-V fue verificada por Iturbe Cantú (1995), quien utilizó diferentes condiciones de amplificación y probó las secuencias de lactógenos y de hormonas del crecimiento, asegurándose que se amplificaran exclusivamente los transcritos deseados en cada caso. Además, en un principio, por simulación computacional con el programa *Amplify*, encontró que se producirían bandas de 492 y 561 pb para los DNAs de hPL-1, y de 586 y 838 pb para los de hGH-V. En el primer caso, tales bandas serían producto de la remoción alternativa del segundo intrón en el transcrito primario de hPL-1; para hGH-V, la diferencia sería producto del procesamiento completo o de la retención del cuarto intrón.

3.7.4 Transcrito de referencia en la PCR.

Para normalizar los resultados de la RT-PCR se seleccionó la coamplificación del DNAc del gen que codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que tiene un nivel de expresión constitutivo, junto con los DNacs de los lactógenos placentarios. Las condiciones de reacción fueron las que se presentan en la tabla 4.

El programa de coamplificación de PCR consistió en una desnaturación inicial durante 5 min. a 94°C, seguida de 30 ciclos con 30 s de desnaturación a 94°C, apareamiento de 30 s a 64°C y extensión por 1 min. a 72°C; finalmente una extensión de 5 min. a 72°C. La banda del producto amplificado de GAPDH tuvo un tamaño aproximado de 983 pb, en tanto que la de hPLs fue de 740 pb.

Con el programa de coamplificación, los transcritos de hPLs que se vieron multiplicados representaban prácticamente la población de hPL-2 y hPL-3. Esto es debido a que, como ya se ha reiterado en varias ocasiones, los niveles de los RNAm de hPL-1 y hGH-V son mucho menores y en cierta forma quedaban ocultos.

Tabla 4. Preparación de la Mezcla para Coamplificar GAPDH con hPLs

Reactivo	Volumen (µL)
DNAc	5.0
Buffer 10X	5.0
MgCl ₂ 25 mM	8.0
dNTPs 10 mM	1.5
Primer 112 (5µM)	5.0
Primer 113 (5µM)	5.0
Primers GAPDH (5µM)	2.0
Taq DNA polimerasa (5 u/µL)	0.5
Agua milliQ	18.0

3.7.5 Coamplificación GAPDH con hGH-V.

Los DNAs de hGH-V y GAPDH se coamplificaron bajo las mismas condiciones de la PCR utilizadas para la coamplificación GAPDH/hPLs; obviamente, se substituyó el iniciador 112 por el específico de hGH-V.

3.7.6 Análisis densitométrico.

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% y se tiñieron con bromuro de etidio para luego analizarse con el equipo GelDoc.

3.7.7 Análisis con endonucleasas de restricción.

Una vez obtenidos los productos de las reacciones de PCR, se realizó la caracterización con endonucleasas de restricción. En el caso concreto de los productos de coamplificación, se utilizó la enzima *Pvu II*, que permitió diferenciar entre los productos de hPL-3 y hPL-2, ayudando a estimar así la proporción de los transcritos de cada uno de estos genes. Como resultado de la digestión enzimática con *Pvu II* se obtuvieron los siguientes fragmentos :

hPL-2 : 497, 172 y 68 pb.

hPL-3 : 569 y 172 pb.

3.7.8 Verificación de la identidad de los productos amplificados para hGH-V.

En la PCR para hGH-V se utilizó un oligonucleótido específico, que, junto con las condiciones de reacción, permitió la amplificación selectiva de los transcritos de este gen. Con el propósito de certificar que los transcritos que se detectaron en cultivo primario correspondían a hGH-V, se realizó una caracterización enzimática con la endonucleasa de restricción *Bgl II*, para la cual se presenta únicamente un sitio de corte en el producto de la PCR para este gen, obteniéndose fragmentos de 364 y 222 pb.

3.7.9 Verificación de la identidad de los productos amplificados para hPL-1 con *Rsa I*.

Al igual que para hGH-V, en la amplificación realizada para hPL-1 se utilizó un iniciador específico para este gen. También, y sólo para precisar que se trata de hPL-1, se realizó una caracterización con la endonucleasa de restricción *Rsa I*, de la cual se presenta sólo un sitio de corte en el producto de PCR específico de hPL-1.

Todas las reacciones de digestión se realizaron con 5.0 μ L de producto amplificado, con 10 U de cada enzima en reacciones con el buffer óptimo en cada caso y a un volumen final de 10 μ L. Después de incubar durante toda la noche, se analizaron los productos de digestión en geles de agarosa al 2%.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

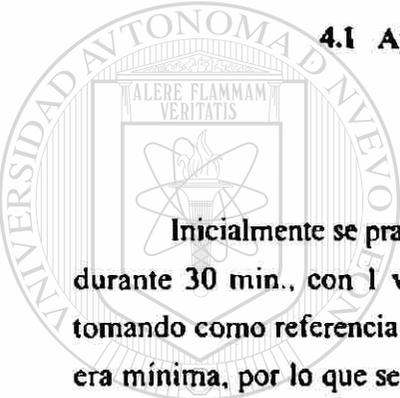


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Aislamiento y Cultivo de los Citotrofoblastos



Inicialmente se practicó un único paso de digestión de los cotiledones placentarios durante 30 min., con 1 vol. de tripsina (0.5%) y 1 vol. de pancreatina (2 mg/mL), tomando como referencia el peso del tejido a procesar. Así, la recuperación de células era mínima, por lo que se hicieron algunas modificaciones, como realizar 3 digestiones durante 15 min. después de la digestión inicial de 30 min., filtrando después los sobrenadantes de cada digestión para recuperar de ellos los citotrofoblastos.

La cantidad promedio de células recuperadas de 40 g de tejido fue de 1.2×10^7 , de manera que se podían cultivar 4 cajas de Petri de 35 mm de diámetro, con 3×10^6 células por caja. Con ello se cubría completamente la superficie de las cajas de Petri. Sin embargo, al retirar el medio de cultivo sólo permanecían adheridas aproximadamente un 30% de las células inoculadas.

Otra modificación que se hizo al mismo protocolo de aislamiento fue substituir la pancreatina (2 mg/mL) por DNAsa (100 U/mL). Con la combinación de tripsina (0.5%) y DNAsa (100 U/mL) se logró obtener un promedio de 1×10^7 células por cada 40 g de tejido, cultivándose 2.5×10^6 células por caja de Petri, suficientes para cubrir una superficie aproximada del 80%. Realizado el cambio de medio de cultivo, permanecía adherido un 90% de las células; debido a esto fue que se decidió tomar como método de rutina el protocolo ya citado, de la tripsina y DNAsa. Aun así, posteriormente se cambió el soporte para el cultivo, de cajas de Petri (35 mm de diámetro) a placas de 24 pozos (1

pulgada cuadrada de área), colocando 1×10^6 células por pozo para cubrir la totalidad de la superficie. Esto permitió asegurar la formación de la *monocapa de células* después de 4-6 h. Resultados similares se obtuvieron con tripsina (0.5%) y pancreatina (1 mg/mL).

En la figura 4 se muestra la imagen de las células tras 24 h en cultivo, tiempo suficiente para que iniciaran la agregación en sincicios, aunque todavía se observaban algunas células aisladas.

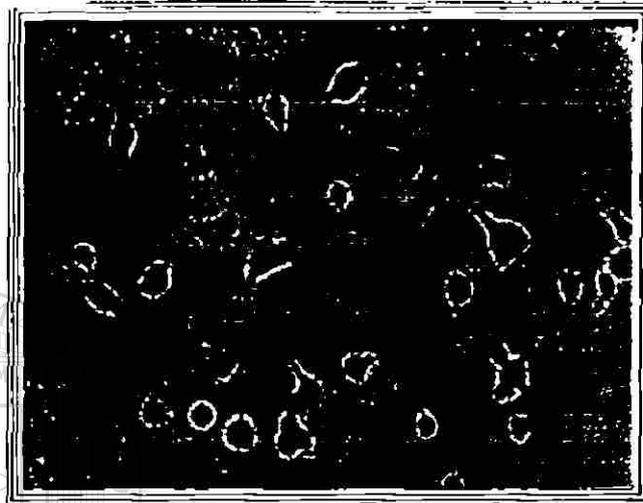


Fig. 4. Cultivo primario de citotrofoblastos de placenta a las 24 h. A este tiempo se aprecia claramente como se empieza a producir la fusión intercelular, evidencia de que se ha iniciado el proceso de diferenciación hacia la etapa de sinciotrofoblastos.

Después de las 48 h, la mayoría de los citotrofoblastos se ha fusionado para formar agregados celulares conocidos como sinciotrofoblastos, los que se pueden apreciar en la figura 5.

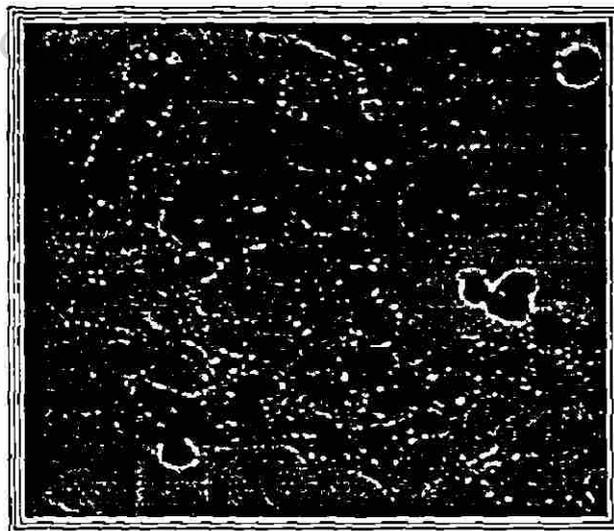


Fig.5. Cultivo primario después de 48 h. Básicamente toda la población celular se ha diferenciado hacia sinciotrofoblastos, que se observan como células multinucleadas.

4.2 Aislamiento del RNA Total de los Cultivos Primarios

Después de mantener las células en cultivo durante 7 días, plazo descrito en la literatura como el de mayor producción de los transcritos de hPLs en cultivos primarios (Handwerger y cols., 1994), se extrajo el RNA por el método de isotiacianto de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987).

4.3 Verificación de la Integridad y Cantidad de los RNAs

Inicialmente los RNAs se verificaron en geles de agarosa/MOPS-formaldehído, y se cuantificaron por espectrofotometría leyendo la absorbancia a 260 nm. Después, debido a la gran variabilidad en los resultados obtenidos en la cuantificación por espectrofotometría, se decidió revisar tanto la calidad como la cantidad por electroforesis en geles de agarosa-isotiocianato de guanidina. La integridad de las muestras se apreció por visualización de las bandas 28 S, 18 S y 5.8 S del RNAr. La cantidad se determinó por densitometría, para lo cual se construyó una curva de calibración (Fig. 6) con los datos de la intensidad de las bandas 28 S y 18 S del RNA, obtenidas de 3 muestras de concentración conocida (carriles 1 al 3 en la figura 7), de la línea celular BeWo y contra las cuales se comparaban las muestras problema (carriles 4 al 11 en la figura 7).

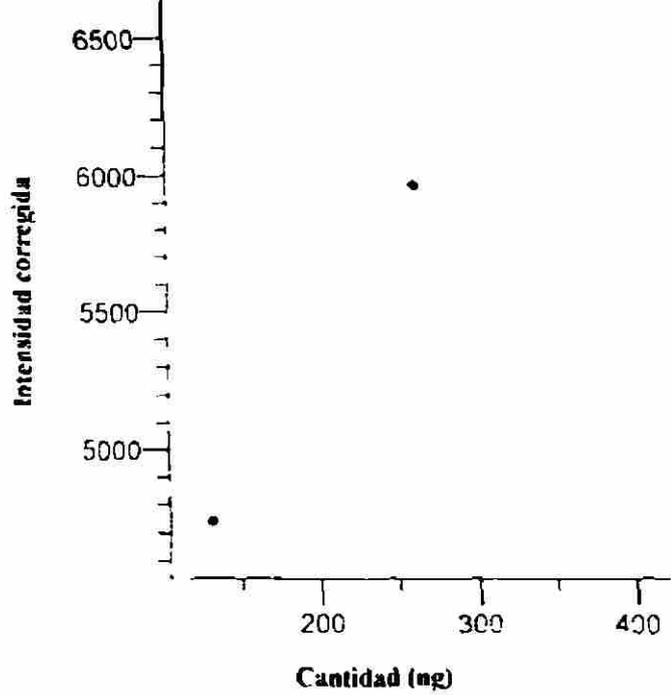


Fig. 6. Curva de calibración para cuantificar los RNAs de cultivo primario. De menor a mayor, los datos corresponden a la intensidad de fluorescencia emitida por los carriles donde se resolvieron 131.6, 263.3 y 395 ng de RNA de la línea celular BeWo. Los RNAs de cultivo primario se cuantificaron según la ecuación de la recta ya ajustada.

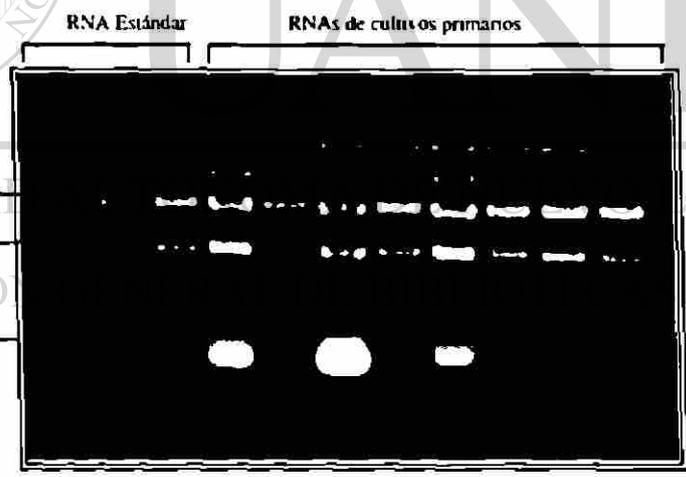
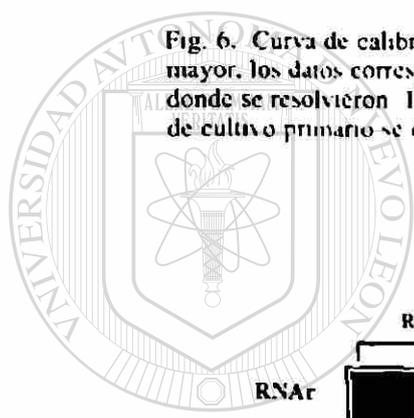


Fig. 7. RNAs totales de cultivos primarios de placenta. Los RNAs se extrajeron con la técnica de isotiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa-isotiocianato de guanidina, a 30V durante 30 min. y 1 h a 90V. Los primeros 3 carriles corresponden a diferentes cantidades de RNA estándar (131.6; 263.3 y 395 ng, respectivamente) obtenido de la línea celular BeWo y cuantificado contra el RNA comercial RNA ladder de GIBCO-BRL. El resto de las muestras son de RNAs extraídos de cultivos primarios.

4.4 Detección de los Transcritos Totales de hPLs por RT-PCR

A partir de los RNAs de los cultivos primarios se sintetizaron los DNAs con la enzima transcriptasa reversa, y una alícuota de este DNA se tomó para la amplificación por PCR, en la que se utilizaron oligonucleótidos consenso. Con éstos, se obtuvo una banda de 740 pb, que representaba básicamente a hPL-2 y hPL-3, debido a que los RNAs de hPL-1 y hGH-V constituyen cerca de 100 y 1000 veces menos, respectivamente, que los de hPL-2 y hPL-3 (Harper y cols., 1982; Chen y cols., 1989).

4.5 Caracterización del Producto Amplificado de hPLs

La digestión con *Pvu II* indicó que el producto obtenido de la PCR con los iniciadores 112 y 113 representaba esencialmente la población de mensajeros proveniente de los genes hPL-2 y hPL-3; ya que el producto amplificado de hPL-2 produjo la banda de 497 pb; en tanto que para hPL-3 los tamaños de las bandas producidas son de 569 y 172 pb, aunque en el caso de los ensayos con los distintos tipos de sueros prácticamente no se apreciaron. Los resultados mostraron que en los cultivos primarios, al igual que en la placenta, el gen hPL-2 se expresa en mayor proporción que hPL-3 (véase la figura 8).

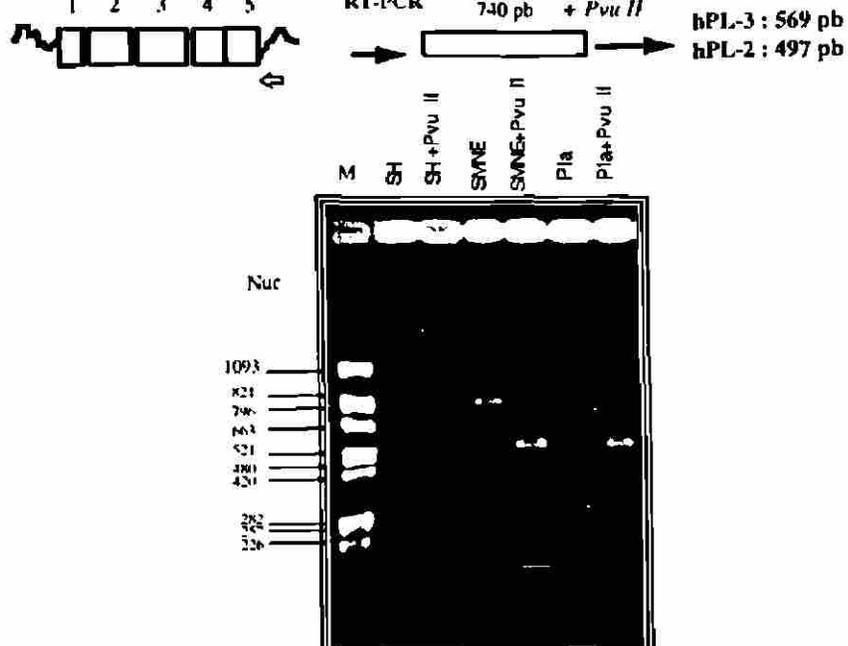


Fig. 8. Productos amplificados de los transcritos de hPL-2 y hPL-3; digeridos con *Pvu II* y separados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, 30 min. a 50V y 1 h a 90V. La banda sin digerir es de 740 pb; con *Pvu II* se genera un fragmento grande de 497 pb para hPL-2 y de 569 pb para hPL-3. La PCR se realizó con los iniciadores consenso 112 y 113, con una temperatura de apareamiento de 60°C. M= marcador de peso molecular; pPIC9 + *Alu I*; CPSH = cultivo primario con suero de hombre; CPSMNE = cultivo primario con suero de mujer no embarazada; Pla = placenta. Los rectángulos numerados simbolizan la secuencia codificante de los RNAs, las líneas representan las regiones 5' y 3' no traducibles y las flechas colocadas en ambos sentidos marcan los sitios de unión para los iniciadores utilizados en la PCR.

4.6 RT-PCR para Detectar los Transcritos de hGH-V

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

El iniciador *sentido* utilizado para amplificar los DNAs que corresponden a los RNAs alternativos del gen hGH-V fue específico para este gen y se alinea 32 nucleótidos antes del final del segundo exón; en tanto que el iniciador *antisentido* fue el iniciador consenso de todos los genes hGH y hPL (clave 113). El producto amplificado principal es de 586 pb (transcrito maduro).

Tras realizar las amplificaciones, se observó que en los cultivos primarios predomina el procesamiento completo de los RNAs, independientemente de las condiciones de cultivo.

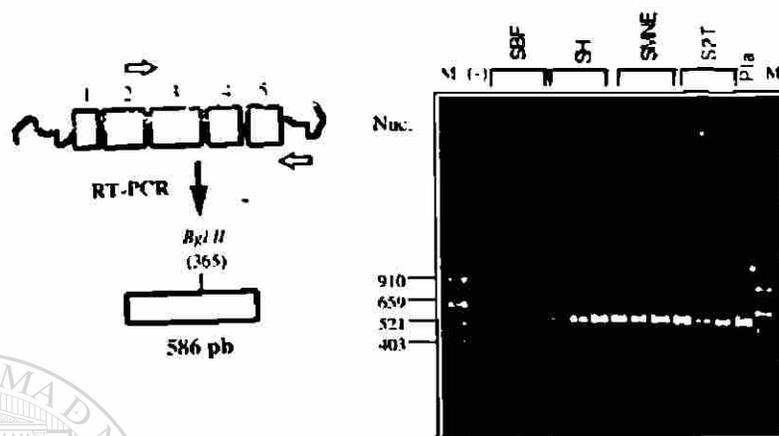


Fig. 9. Productos amplificados de hGH-V sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2%: 30 min. a 50V y 1 h a 90V. La PCR se realizó con el iniciador específico para hGH-V y el iniciador consenso 113, a una temperatura de apareamiento de 63°C. Se observa una banda de 586 pb que indica el transcrito maduro. M= marcador de peso molecular, pBR322 + *Alu I*; (-) = testigo negativo de la PCR; SBF = suero de bovino fetal; SH = suero de hombre; SMNE = suero de mujer no embarazada; S2T = suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo; Pla = placenta. Las flechas colocadas en ambos sentidos marcan los sitios de unión para los iniciadores utilizados en la PCR.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.7 Verificación de la Identidad del Producto Amplificado para hGH-V

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se utilizó la enzima *Bgl II*, que del producto de 586 pb deriva fragmentos de 364 y 222 pb. Como se aprecia en la figura 10, los productos amplificados que se obtuvieron correspondieron efectivamente a hGH-V.

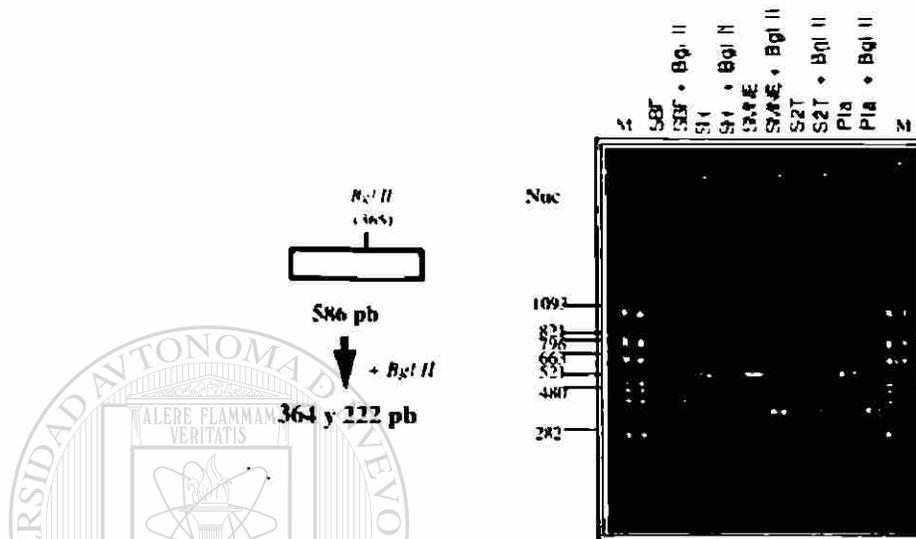


Fig. 10. Digestion de los productos de PCR de hGH-V con *Bgl II* separados por electroforesis en gels de agarosa al 2%, 30 min a 50V y 1 h a 90 V. El producto sin digerir es de 586 pb, y los fragmentos obtenidos son de 222 y 364 pb. M = marcador de peso molecular, pPIC9 + *Alu J*; SBF = suero de bovino fetal; SH = suero de hombre; SMNE = suero de mujer no embarazada; S2T = suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo; Pla = placenta.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.8 RT-PCR Selectiva de los Transcritos de hPL-I

Debido a que los transcritos de hPL-I tienen poca representatividad dentro de la población de RNAs en placenta (al igual que los de hGH-V), se recurrió a la alternativa de utilizar un oligonucleótido específico para este gen, en combinación con el antisentido de carácter consenso. El iniciador específico se aparea a una extensión del segundo exón que se origina por el patrón particular de procesamiento en este gen (en los demás genes del complejo, esta área forma parte del segundo intrón).

El patrón peculiar de procesamiento del gen hPL-1 dió como resultado una serie de bandas en muestras de placenta, de 492, 561, 818 y 1112 pb. Las primeras dos bandas corresponden a dos formas de RNAm ya citadas en la literatura (MacLeod y cols., 1992); la de 818 pb que coincide con la que encontró Iturbe Cantú (1995), mientras que la de 1112 pb corresponde al transcrito primario. En todas las muestras de cultivo primario se obtuvo la banda de 1112 pb; en algunos casos se observaron las bandas de 818 y 561 pb, señalando cierto grado de procesamiento de los RNAm del gen hPL-1. En la figura 11a puede compararse el patrón de expresión de hPL-1 para ambos tipos de muestras.

4.9 Verificación de la Identidad del Producto Amplificado para hPL-1

Los productos de la PCR para hPL-1 fueron sometidos a caracterización enzimática con *Rsa I*, que produjo los fragmentos del tamaño esperado, según se aprecia en la figura 11b (página siguiente).

4.10 RT-PCR para los transcritos de GAPDH

Con el propósito de normalizar los resultados obtenidos con los genes hGH-V y hPLs, se detectaron por RT-PCR los transcritos del gen constitutivo GAPDH (enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), para lo cual se utilizó un par de oligonucleótidos específicos, con los que se obtuvo una banda de aproximadamente 983 pb, tal y como se observa en la figura 12 (página siguiente).

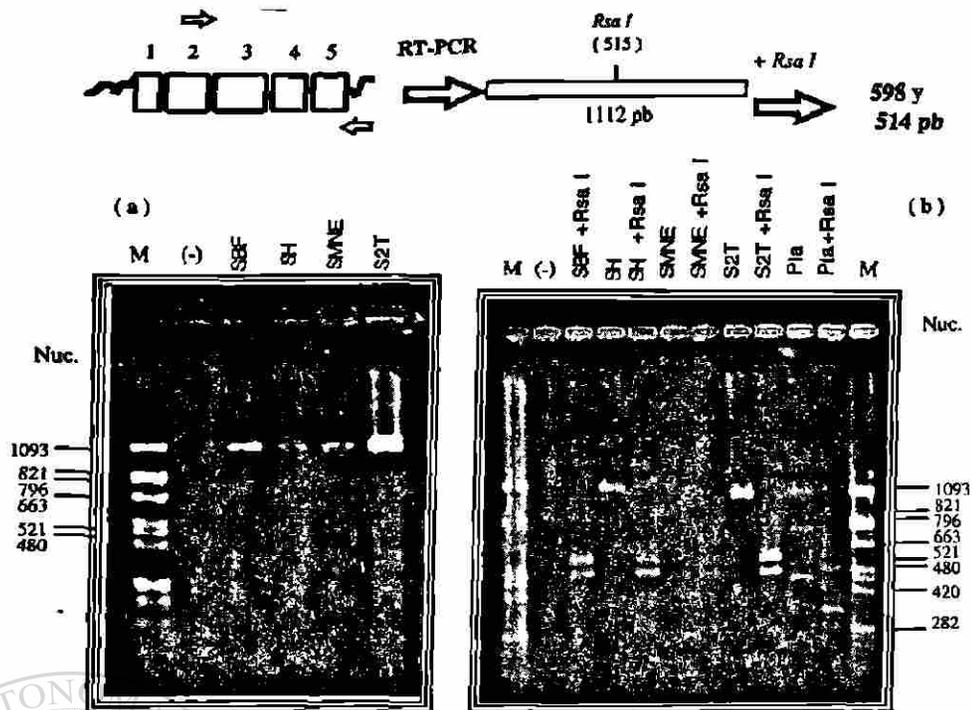


Fig. 11 (a). RT-PCR de los transcritos de hPL-1 en cultivo primario y placenta. Se observa una banda de 1112 pb obtenida del transcrito sin procesar, una banda de 818 pb y una banda de 569; ambas producto del procesamiento parcial de los RNAs de este gen. La PCR se efectuó con el iniciador específico para hPL-1 junto con el iniciador 113, con una temperatura de apareamiento de 63°C. M = marcador de peso molecular, pPIC9 + *Alu I*; (-) = testigo negativo de PCR; SBF = suero de bovino fetal; SH = suero de hombre; SMNE = suero de mujer no embarazada; S2T = suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo; Pla = placenta.

(b) Caracterización con *Rsa I* de los productos amplificados para hPL-1. Obsérvese que de la banda predominante de 1112 pb se originan fragmentos de 515 y 597 pb.

Todas las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%, 30 min. a 50V y 1 h a 90V.

Los rectángulos numerados simbolizan las regiones codificantes de los RNAs, las líneas representan las regiones 5' y 3' no traducibles y las flechas colocadas en ambos sentidos marcan los sitios de unión para los iniciadores utilizados en la PCR.

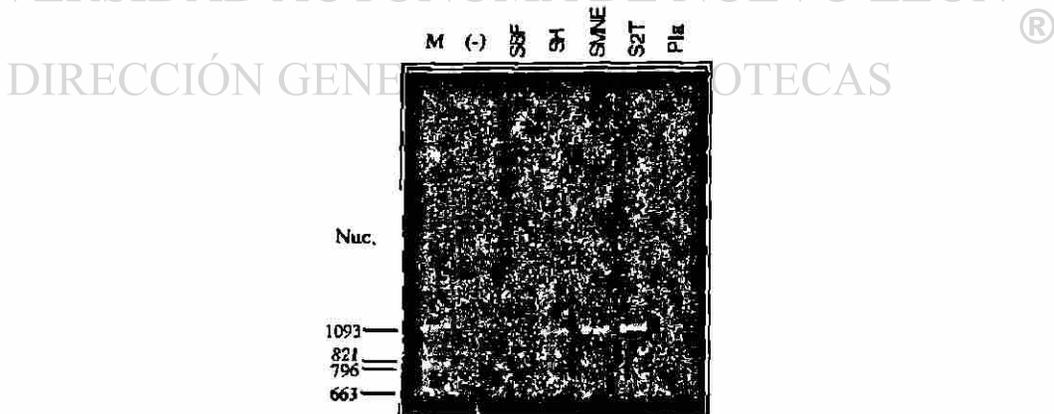


Fig. 12. Producto amplificado del transcrito de GAPDH, sometido a electroforesis en geles de agarosa al 2%, 30 min. a 50 V y 1 h a 90V. La PCR se realizó con iniciadores específicos para este gen, a una temperatura de apareamiento de 65°C; se obtiene una banda de 983 pb. M = marcador de peso molecular, pPIC9 + *Alu I*; (-) = testigo negativo de PCR; SBF = suero de bovino fetal; SH = suero de hombre; SMNE = suero de mujer no embarazada; S2T = suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo; Pla = placenta.

4.11 Coamplificación de los Transcritos de hPLs y GAPDH

Después de la coamplificación se detectaron dos bandas como resultado de la PCR, una de 983 pb (GAPDH) y otra de 740 pb (hPLs). Sin embargo, la reacción no resultó eficiente para las muestras de cultivo primario, ya que sólo se detectó un barrido a lo largo del carril (Fig. 13). Cabe remarcar que la reacción de coamplificación se realizó con la temperatura de apareamiento (64°C) y concentración de MgCl₂ (4mM) óptimas para GAPDH, no para hPLs (60°C y 1.5 mM). Incluso, la temperatura de apareamiento ideal para GAPDH es de 65°C y se disminuyó a 64°C para que la intensidad de la banda de este gen no resultara mucho mayor que la de la banda para hPLs.

Aunque se variaron las condiciones de la PCR para tratar de obtener las bandas de los dos genes con una intensidad apropiada para realizar la normalización, esto no se logró.

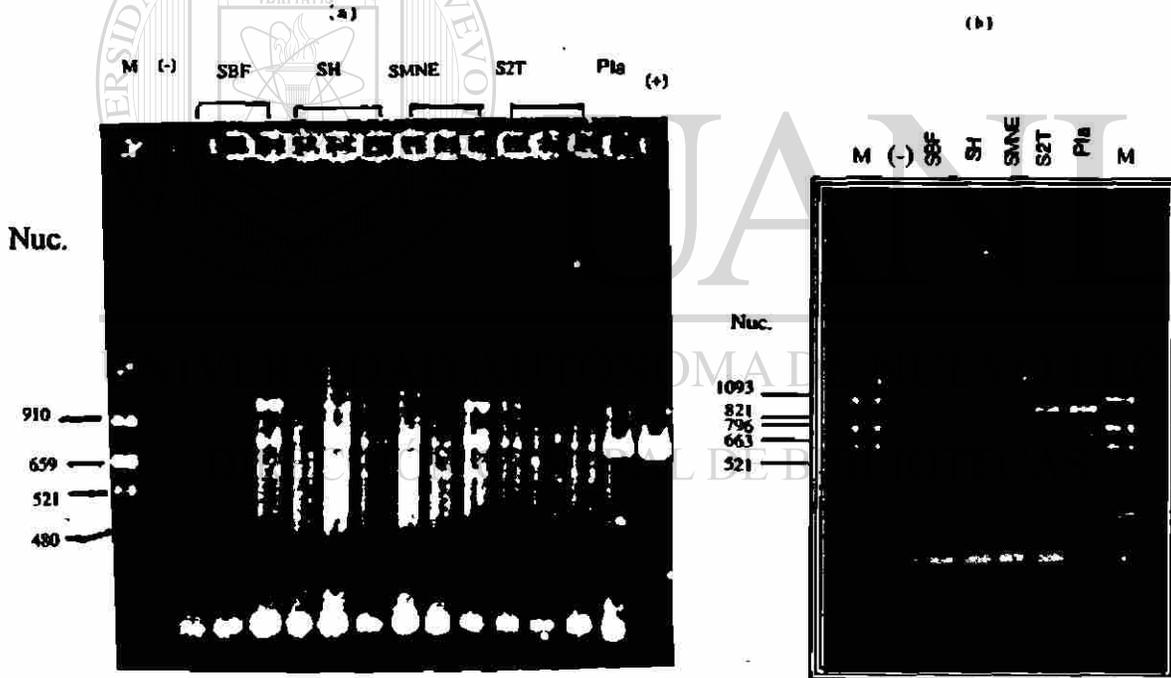


Fig. 13. Productos amplificados de los transcritos GAPDH y hPLs, separados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, 30 min. a 50 V y 1 h a 90V. La PCR se realizó con los iniciadores específicos de GAPDH, 112 y 113, con una temperatura de apareamiento de 64°C. Obsérvese la banda de 983 pb para GAPDH y la de 740 pb de hPLs. M = marcador de peso molecular, pBR322 + *Alu I* en el gel de la izquierda y pPIC9 + *Alu I* en el gel de la derecha; (-) = testigo negativo de PCR; SBF = suero de bovino fetal; SH = suero de hombre; SMNE = suero de mujer no embarazada; S2T = suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo; Pla = placenta. En la imagen (a) el S2T procede de la mezcla de distintas pacientes; en la imagen (b) dicho suero se obtuvo de una sola paciente.

4.12 Coamplificación GAPDH/hGH-V

Debido a que las temperaturas de apareamiento óptimas para los iniciadores que amplificaban GAPDH (65°C) y hGH-V (63°C) son similares, se decidió probar la coamplificación de estos genes con las muestras obtenidas de los cultivos primarios; esto para intentar la normalización de los resultados del gen hGH-V. En la figura 14a (página siguiente) se muestran los resultados obtenidos después de la PCR : una banda de 983 pb que correspondió a GAPDH, una banda de 586 pb indicativa de hGH-V, y una banda de aproximadamente 800 pb, cuya naturaleza se desconocía. Como la intención era tener una relación entre la expresión de hGH-V respecto a GAPDH, se decidió tratar los productos de coamplificación con la endonucleasa *Bgl II*. Esto permitió saber que la banda de 800 pb no correspondía a hGH-V, señalando que en esta reacción se producía además de los productos esperados, una banda inespecífica (ver figura 14b). Esto invalidó la coamplificación GAPDH/hGH-V como herramienta para la normalización, al menos bajo las condiciones que se ensayaron.

4.13 Efecto del Ácido Retinoico sobre la Expresión de los Genes hPLs-hGH-V

Como en la literatura está descrito que el ácido retinoico estimula la expresión de los genes hPLs, se adicionó este compuesto a cultivos primarios y se analizaron para ver si se podía detectar esta estimulación. En la figura 15 (página 44) se muestra que en los casos donde se adicionó ácido retinoico (0.5µM) a las células en cultivo primario, aumentó la intensidad de la señal para el caso de hPL-2 y hPL-3, respecto a las células control; para hGH-V la banda correspondiente sólo se derivó de las células a las que se les adicionó el ácido retinoico. La diferencia entre estos experimentos y los anteriores es que aquí se usaron 600 ng de RNA total, en una sola reacción consecutiva de RT-PCR (kit SuperScript One-Step, Gibco-BRL Life Technologies), en comparación con los 250 ng de DNAc total utilizados en los primeros experimentos, efectuados además como RT y luego PCR, lo cual seguramente incrementó en el primero la capacidad de detección del producto amplificado.

4.14 Caracterización de los Transcritos hPLs de las Células Tratadas con AR

Para verificar si el incremento en la intensidad de la señal de hPLs en las células tratadas con ácido retinoico fue ocasionado sólo por uno, o bien ambos, de los genes más activos (hPL-2 y hPL-3), se digirió el producto de PCR con *Pvu II*, tal y como se describió líneas arriba. Los resultados mostraron que sigue habiendo una mayor proporción de hPL-2, aunque la banda para hPL-3 se visualiza más fácilmente que cuando las células no recibieron el inductor (Fig. 16, página 44).

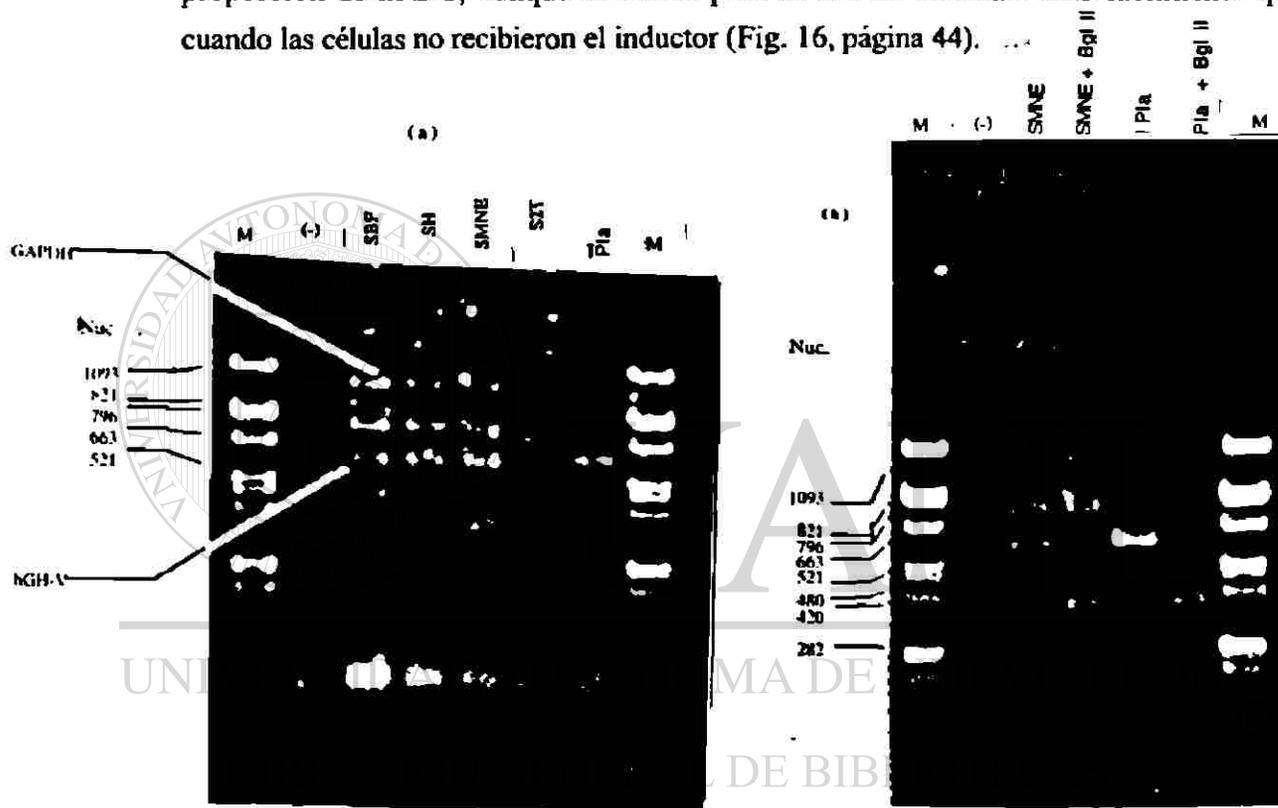


Fig. 14.(a) Productos de la coamplificación para GAPDH y hGH-V, separados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, con 30 min. a 50V y 1 h a 90V. Nótese que además de las bandas de GAPDH (983 pb) y de hGH-V (586 pb) se observa una banda no esperada (800 pb). La PCR se efectuó con los iniciadores específicos para GAPDH, el iniciador específico para hGH-V y el iniciador 113, a una temperatura de apareamiento de 64°C. M = marcador de peso molecular, pPIC9 + *Alu I*; (-) = testigo negativo de PCR; SBF = suero de bovino fetal; SH = suero de hombre; SMNE = suero de mujer no embarazada; S2T = suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo; Pla = placenta. (b) Tratamiento con *Bgl II* de los productos de la coamplificación GAPDH/hGH-V. Mientras la banda de 586 pb se digiere para dar los fragmentos del tamaño esperado, la banda de 800 pb permanece intacta, lo que indica que no es derivada de hGH-V. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%, 30 min. a 50 V y 1 h a 90 V.

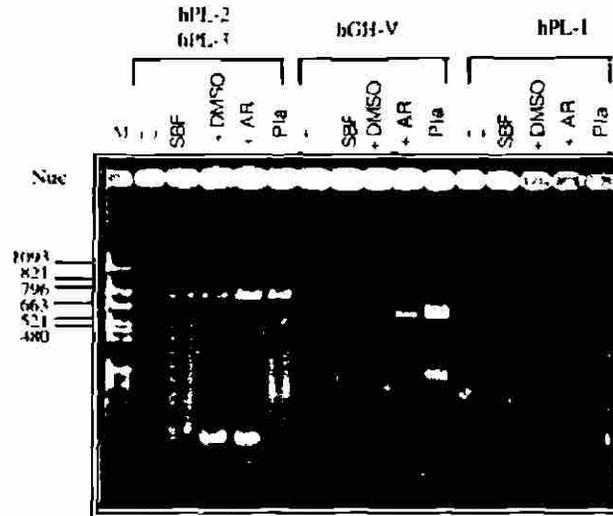


Fig. 15. Estimulación por ácido retinoico de la expresión de hPLs y hGH-V. Los cultivos primarios de citotrofoblastos fueron incubados en presencia de ácido retinoico (0.5 μ M). Después de 7 días de cultivo se obtuvo el RNA total y se realizaron las reacciones de RT-PCR bajo las condiciones ya mencionadas para cada tipo de transcrito analizado. M = marcador de peso molecular, pPIC9 + *Alu I*; (-) = testigo negativo de PCR; SBF = suero de bovino fetal; (+DMSO) = dimetilsulfóxido, disolvente del ácido retinoico; AR = ácido retinoico; Pla = placenta. Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, 30 min. a 50V y 1 h a 90V.

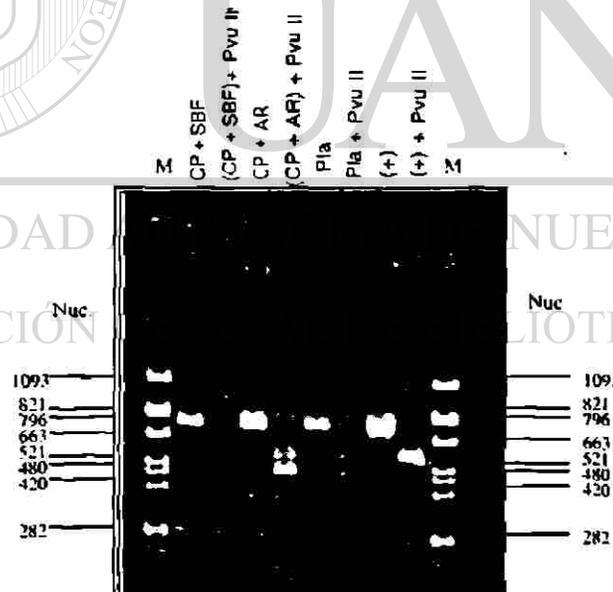


Fig. 16. Productos amplificados de los transcritos de hPL-2 y hPL-3, digeridos con *Pvu II* y resueltos en un gel de agarosa al 2%, corrido a 50V durante 30 min y luego a 100 V por 1 h. La banda sin digerir es de 740 pb; con *Pvu II* se genera un fragmento grande de 497 pb para hPL-2, y de 569 pb para hPL-3. La PCR se efectuó con los iniciadores consenso 112 y 113, con una temperatura de apareamiento de 60°C. Las abreviaturas empleadas son, M = marcador de peso molecular, pPIC9 - *Alu I*; SBF = suero de bovino fetal; AR = Ácido retinoico; Pla = placenta; (+) = control positivo de la PCR y digestión, plásmido que porta el DNac de hPL-3.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

Los sistemas de líneas celulares en cultivo se han utilizado ampliamente para analizar la función de la placenta, aunque posiblemente no son representativos de la situación fisiológica real, ya que son células transformadas. Estos estudios generalmente se han enfocado a tratar de dilucidar el papel que juegan algunos de los componentes del gen (p.ej. promotor, unidad transcripcional, potenciador, elementos de respuesta a metabolitos, etc.) en la expresión del mismo. Una alternativa para realizar estos estudios consiste en emplear cultivos primarios de citotrofoblastos, que una vez diferenciados se acercan más al comportamiento del tejido placentario, lo cual es importante cuando se desean validar los resultados de una investigación relacionada con los genes que se transcriben en tal tejido.

Si se considera la alta similitud que existe entre los genes del complejo hGH-hPL, y la expresión diferencial que presentan, junto con las ventajas del cultivo primario, se observa que la combinación de ambos sistemas constituye un modelo adecuado en el estudio de la regulación génica de este complejo de genes.

En este trabajo se investigó cuál es el comportamiento en cultivo primario, de todos los genes del complejo multigénico hGH-hPL que se expresan en placenta. Para ello, se estableció un protocolo de aislamiento de citotrofoblastos, basados de modo general en las técnicas ya descritas, pero adecuándolo a las condiciones de trabajo prevaecientes en nuestro medio. En un principio, sólo se logró mantener un 30% de las células adheridas a las cajas de cultivo después de hacer el primer cambio de medio de cultivo. Tal porcentaje no era conveniente, pues se necesitaba una mayor interacción entre las células para su diferenciación hacia sinciciotrofoblastos, estadio celular en el que se expresan los genes hPLs y hGH-V en placenta, por lo que se buscaron las mejores condiciones de digestión del tejido con las proteasas empleadas.

Establecidas las condiciones óptimas para aislar las células de interés y mantenerlas en cultivo, se analizó si todos los genes del complejo que se expresan en placenta, lo hacen también en el cultivo primario. En estudios previos, basados en hibridación a RNA, se determinó que estos genes efectivamente se expresan en cultivo, sin verificar si éste era un fenómeno atribuible a todos ellos o sólo a alguno(s) de ellos.

En nuestro caso, se emplearon herramientas experimentales más sensibles y más específicas, como la retrotranscripción seguida de reacción en cadena de la polimerasa. Así, se comprobó que todos los genes hPLs y el gen hGH-V, se expresan en cultivo primario.

Las reacciones de amplificación se efectuaron en forma conjunta para hPL-2 y hPL-3, y por caracterización enzimática con *Pvu II* se apreció que hPL-2 se expresa mayormente que hPL-3.

Para hGH-V en todos los ensayos de PCR se utilizó un iniciador específico, aumentándose la sensibilidad. Así se detectó una banda correspondiente al RNAm totalmente procesado, y en algunos casos se logró observar el transcrito de mayor tamaño, que retiene el cuarto intrón. En la literatura se cita que, conforme transcurre el embarazo, aumenta la detección de este último transcrito; se estima que en un principio constituye un 5% y termina como un 15% respecto al RNAm maduro de hGH-V (MacLeod y cols., 1992).

En el análisis de la transcripción del gen hPL-1 en los cultivos primarios, también se empleó un iniciador específico y se logró detectar un producto de PCR que corresponde al transcrito primario; y en algunos casos se observaron bandas que implicaban la presencia de transcritos parcialmente procesados. Cabe decir que al tiempo ensayado, las células en cultivo primario pueden procesar los transcritos de hPL-1, en forma similar a como ocurre en la placenta (Misra-Press y cols., 1994).

Con las evidencias reunidas, puede asegurarse que los citotrofoblastos que se aislaron con el protocolo señalado en este trabajo, son capaces de diferenciarse hacia sinciotrofoblastos y así pueden expresarse los genes de lactógeno placentario y de hormona del crecimiento variante.

Basados principalmente en los datos obtenidos con hGH-V y hPL-1, se sugiere realizar ensayos que permitan el seguimiento de la expresión de estos genes conforme transcurre el tiempo de cultivo. Con ello se podría analizar si hay algún cambio en la proporción de los transcritos detectados para hGH-V a lo largo del tiempo como sucede en la placenta; podría buscarse la existencia de una etapa celular plenamente establecida en la que se inicie el procesamiento de los RNAs de hPL-1, o incluso de los otros genes

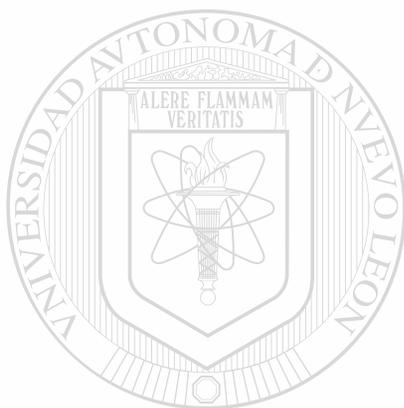
hPLs, al analizar en condiciones establecidas, la expresión de los genes hGH-hPL en cultivos de citotrofoblastos aislados de diferentes placentas.

Se cultivaron células con medio suplementado con distintos tipos de suero, para comparar los datos obtenidos con algunos citados en la literatura, donde se observó un aumento en la transcripción de los genes hPLs en las células cultivadas con suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo. Sin embargo, tuvimos resultados variables : por un lado, al coamplificar con GAPDH, no hubo diferencia en la intensidad de la banda de hPLs entre todas las muestras; por otro, únicamente se apreció producto amplificado para hPLs en los casos provenientes de cultivos con suero de mujer no embarazada y suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo.

En el caso donde no se observó diferencia, el suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo consistió de una mezcla de sueros colectados en un sitio externo, bajo condiciones que no fueron controladas y de distintas etapas. En otro ensayo (donde sí se observó diferencia), el suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo también procedía de una mezcla, de dos tomas realizadas con 15 días de intervalo, a una sola mujer. Puede especularse que la variabilidad de los resultados se originó, al menos en parte, por el diferente grado de homogeneidad entre estos sueros, sobre todo en lo que se refiere al período gestacional del cual provenían.

También se efectuaron algunos experimentos de adición de ácido retinoico al medio de cultivo, que dieron resultados similares a los citados en la literatura, esto es, la estimulación de la expresión de los genes hPLs y hGH-V. Esto se asumió por el aumento en la intensidad de la señal en el producto de la PCR respecto a los controles. Al cortar con *Pvu II*, en las muestras obtenidas de cultivos con distintos tipos de sueros, únicamente se logró apreciar el fragmento correspondiente a hPL-2, lo que impidió establecer la relación existente para la expresión de ambos genes. Sin embargo, cuando se analizaron las muestras del experimento con ácido retinoico, si fue posible distinguir ambas bandas, con una relación aproximada de 2: 1 entre hPL-2 y hPL-3. Además, se notó un aumento de la expresión de ambos genes cuando se añadió ácido retinoico, estimándose un incremento de 4 veces en hPL-2 y hPL-3 en comparación con los testigos; no obstante, estos experimentos deberán repetirse ya que esta proporción representa el resultado de sólo un experimento, y deberá tomarse en cuenta un control interno, que bien puede ser la expresión de un gen constitutivo, para tener así resultados cuantitativos. De cualquier manera, si puede observarse que, al igual que en la placenta, en los cultivos primarios, la expresión de hPL-2 supera a la de hPL-3, y que ambos son estimulados por el ácido retinoico.

Para tener resultados más comparativos entre los cultivos de células provenientes de diferentes placentas, y entre las condiciones de cultivo de éstas, se trató de utilizar un gen de referencia, cuya expresión es constitutiva : el de GAPDH. Sin embargo, la coamplificación de este gen y de los hPLs, o de hGH-V no dio resultados satisfactorios, debido principalmente a las diferencias en las condiciones óptimas de amplificación de ambos juegos de oligonucleótidos y a la presencia de una banda inespecífica, respectivamente.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

Las conclusiones derivadas del presente trabajo se presentan a continuación:

1. Se establecieron cultivos primarios de citotrofblastos a partir de placentas a término, con la adaptación de una técnica descrita por Kliman y cols. y Handwerger y cols.
2. A partir del cultivo primario se detectaron por RT-PCR los transcritos derivados de los genes del complejo hGH-hPL, y se pudo diferenciar de cuáles genes provenían.
3. El patrón de expresión de los genes hGH-hPL en cultivo primario es similar al que se presenta en la placenta, con la maduración completa de los transcritos de hPL-2, hPL-3 y hGH-V y procesamiento parcial de hPL-1.
4. La adición de ácido retinoico al medio de cultivo aumentó la expresión de los genes hPL-2 y hPL-3 en las células de cultivo primario, al igual que la del gen hGH-V.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS

El establecimiento de un protocolo para tener los cultivos primarios en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, permitirá aprovechar una serie de construcciones que contienen diversas secuencias de la familia multigénica hGH-hPL, entre las que se encuentran algunos híbridos entre los elementos de uno y otro gen, o aun con segmentos no relacionados con esta familia de genes. Al transfectar con estos DNAs recombinantes los cultivos primarios derivados de placenta (cuya actividad metabólica es más parecida a la que ocurre *in vivo*), se podrá tener un punto de comparación respecto a los informes en otros modelos celulares o en ensayos *in vitro* y esto permitirá asociar los resultados que se obtengan, con la presencia de factores exclusivos de placenta.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS

Aoki, Y; Adachi, S; Yoshiya, N; Honma, S; Kanazawa, K; Tanaka, K (1991). Effects of various growth factors on the proliferation and the differentiation of trophoblastic cells *in vitro*. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 43:11, 1527-1532 .

Barrera Saldaña, HA; Robberson, DL; Saunders, GF (1982). Transcriptional products of the human lactogen gene. *J.Biol.Chem.*, 257, 12399-12404

Barrera Saldaña, HA; Seeburg, PH; Saunders, GF (1983). Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J. Biol. Chem.*, 258, 3787-3793.

Boguszewski, CL; Svensson, PA; Janson, T; Clark, R; Carlsson, LM; Carlsson, B (1998). Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 83:8, 2878-2885.

Cattini, PA; Eberhardt, NL (1987). Regulated expression of chimaeric genes containing the 5'-flanking regions of human growth hormone-related genes in transiently transfected rat anterior pituitary tumor cells. *Nucleic Acids Res.*, 15:3, 1297-1309.

Cattini, PA; Peritz, LN; Anderson, TR; Baxter, JD; Eberhardt, NL (1986). The 5'-flanking sequences of the human growth hormone gene contain a cell-specific control element, *DNA* 5:6, 503-509.

Chen, EY; Liao, YC; Smith, DH; Barrera Saldaña, HA; Gelinas, RE; Seeburg, PH (1989). The human growth hormone locus : nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics*, 4, 479-497.

Chomczynski, P; Sacchi, N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, 162 (1), 156-159.

Cooke, NE; Ray, J; Emery, JG; Liehaber, A (1988). Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. *J.Biol.Chem.*, 263(18), 9001-9006.

De Noto, FS; Moore, DD; Goodman, HM (1981). Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure : possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*, 9, 3719-3730.

Feinberg, BB; Berman, S; Politch, J (1995). Rapid preparation of discontinuous Percoll density gradients. *Biotechniques*, 18:5, 802-803.

Feinman, MA; Kliman, HJ; Caltabiano, S; Strauss III, JF (1986). 8-bromo-3',5'-adenosine monophosphate stimulates the endocrine activity of human cytotrophoblasts in culture. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 63:5, 1211-1217.

Fitzpatrick, SL; Walker, WH; Saunders, GF (1990). DNA sequences involved in the transcriptional activation of a human placental lactogen gene. *Mol. Endocrinol.*, 4:12, 1815-1826.

Goda, SK; Minton, NP (1995). A simple procedure for gel electrophoresis and northern blotting of RNA. *Nucl.AcidsRes.*, 23:16, 3357-3358.

Golos, TG; Handrow, RR; Durning, M; Fisher, JM; Rilling, JK (1992). Regulation of chorionic gonadotropin-alpha and chorionic somatomammotropin messenger ribonucleic acid expression by 8-bromo-adenosine-3',5'-monophosphate and dexamethasone in cultured rhesus monkey syncytiotrophoblasts. *Endocrinology*, 131:1, 89-100.

Handwerger, S (1991). Clinical counterpoint : the physiology of placental lactogen in human pregnancy. *Endocrine Reviews*, 12:4, 329-336.

Harper, ME; Barrera Saldaña, HA; Saunders, GF (1982). Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am.J.Hum.Genet.* 34, 227-234.

Hill, DJ (1992). What is the role of growth hormone and related peptides in implantation and the development of the embryo and fetus. *Horm.Res.*, 38, 28-34.

Iturbe-Cantú, MA (1995). Formas alternativas de procesamiento de los ARN mensajeros de los genes lactógeno placentario I y hormona del crecimiento variante del genoma humano, y su abundancia relativa durante el embarazo. UANL, 52pp.

Jaquemin, P; Alsat, E; Oury, C; Belayew, A; Martial, JA; Evain Brion, D (1993). Efficient lipofection of human trophoblast cells in primary cultures. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 196:1, 376-381.

Jaquemin, P; Alsat, E; Oury, C; Belayew, A; Muller, M; Evain-Brion, D; Martial, JA (1996). The enhancers of the human placental lactogen B, A and L genes : progressive

activation during *in vitro* trophoblast differentiation and importance of the DF-3 element in determining their respective activities. *DNA&Cell Biol.*, 15:10, 845-854 .

Jiang, SW; Shepard, AR; Eberhardt, NL (1995). An initiator element is required for maximal human chorionic somatomammotropin gene promoter and enhancer function. *J.Biol.Chem.*, 270:8, 3683-3692.

Kao, LC; Caltabiano, S; Wu, S; Strauss III, JF; Kliman, HJ (1988). The human villous cytotrophoblast interactions with extracellular matrix proteins, endocrine function, and cytoplasmic differentiation in the absence of syncytium formation. *Dev. Biol.*, 130:2, 693-702.

Kato, Y.; Braunstein, GD (1990). Purified first and third trimester placental trophoblasts differ in *in vitro* hormone secretion. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 70:4, 1187-1192.

Kawasaki, ES in PCR protocols, a guide methods and applications (Innis, M; Gelfand, DH; Sninsky, JJ; White, TJ), (1991) 482 pp. Academic Press, London .

Klassen, ME; Nachtigal, MW; Cattini, PA (1989). Human chorionic somatomammotropin gene expression in primary cell cultures. *Placenta*, 10, 321-329.

Kliman, HJ; Nestler, JE; Sermasi, E, Sanger, JM; Strauss III, JF (1986). Purification, characterization, and *in vitro* differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, 118:4, 1567-1582.

LeComte, C; Renard, A; Martial, J (1987). A new natural hGH variant-17.5 kd-produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branch point selection. *Nucleic Acids Res.*, 15:16, 6331-6348.

Lemaigre, FP; Courtois, SJ; Lafontaine, DA; Rousseau, GG (1989). Evidence that the upstream stimulatory factor and the Sp1 transcription factor bind *in vitro* to the promoter of the human-growth-hormone gen. *J.Biochem.*, 181, 555-561.

Lemaigre, FP; Peers, B; Lafontaine, DA; Mathy-Harbert, M; Rosseau, GG; Belayew, A; Martial, JA (1989). Pituitary-specific factor binding to the human prolactin, growth hormone, and placental lactogen genes. *DNA* 8:3, 149-159.

Lobo, JO; Bellino, FL (1989). Estrogen synthetase (aromatase) activity in primary culture of human term placental cells : effects of cell preparation, growth medium. and serum on adenosine 3',5'-monophosphate response. *J.Endocrinol.Metab.*, 69:4, 868-874.

MacLeod, JN; Lee, AK; Liebhaber, SA; Cooke, NE (1992). Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J. Biol. Chem.* 267:20, 14219-14226.

McWilliams, D; Boime, L (1980). Cytological localization of placental lactogen messenger ribonucleic acid in syncytiotrophoblast layers of human placenta. *Endocrinology*, 107, 761-765.

Martínez-Rodríguez, HG; Guerra-Rodríguez, NE; Iturbe-Cantú, MA; Martínez-Torres, A; Barrera-Saldaña, HA (1997). Expression of human placental lactogen and variant growth hormone genes in placentas. *Arch. Med. Res.*, 28:4, 507-512.

Misra-Press, A.; Cooke, NE; Liebhaber, SA (1994). Complex alternative splicing partially inactivates the human chorionic somatomammotropin-like (hCS-L) gene. *J.Biol.Chem.* 269:37, 23220-23229.

Nachtigal, MW; Nickel, BE; Cattini, PA (1993). Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. *J.Biol.Chem.*, 18, 8473-8479.

Nachtigal, MW; Nickel, BE; Klassen, ME; Zhang, WG; Eberhardt, NL; Cattini, PA (1989). Human chorionic somatomammotropin and growth hormone gene expression in rat pituitary tumour cells is dependent on proximal promoter sequences. *Nucleic Acids Res.*, 17:11, 4327-4337.

Nelson, DM; Meister, RK; Ortman Nabi, J; Sparks, S; Stevens, VC (1986). Differentiation and secretory activities of cultured human placental cytotrophoblast. *Placenta*, 7:1, 1-16.

Nickel, BE; Bock, ME; Nachtigal, MW; Cattini, PA (1993). Differential expression of human placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin genes in choriocarcinoma cells treated with methotrexate. *Mol.Cell.Endocrinol.*, 91, 159-166.

Nickel, BE; Cattini, PA (1996). Nuclease sensitivity of the human growth hormone-chorionic somatomammotropin locus in pituitary and placenta suggest different mechanisms for tissue-specific regulation. *Mol.Cell.Endocrinol.*, 118(1-2), 155-162.

Nickel, BE; Cattini, PA (1991). Tissue-specific expression and thyroid hormone regulation of the endogenous placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin genes in a human choriocarcinoma cell line. *Endocrinology* 128:5, 2353-2359.

Nickel, BE; Kardami, E; Cattini, PA (1990). Differential expression of human placental growth-hormone variant and chorionic somatomammotropin in culture. *Biochem. J.* 267, 653-658.

Oury, C; Alsat, E; Jacquemin, P; Evain-Brion, D; Martial, JA; Muller, M (1997). A one-nucleotide difference in a cAMP and phorbol ester response element leads to a differential regulation of the human chorionic somatomammotropin A and B gene transcription. *J. Mol.Endocrinol.*, 18, 87-99.

Quinn, G; Boam, DS; Davis, JR; Glazier, JD; Mylona, D; Sides, K; Sibley, CP (1996). The human placenta expresses transcription enhancer factor-1 but there is no-correlation with the expression of placental lactogen. *J.Mol. Endocrinol.*, 16(2), 205-210.

Reséndez Pérez, D; Ramírez Solís, R; Varela Echavarría, A; Martínez Rodríguez, HG, Barrera Saldaña, HA (1990). Coding potential of transfected human placental lactogen genes. *Nucleic Acids Res.*, 18:16, 4665-4670.

Richards, RG; Hartman, SM; Handwerger, S (1994). Human cytotrophoblast cells cultured in maternal serum progress to a differentiated syncytial phenotype expressing both human chorionic gonadotropin and human placental lactogen. *Endocrinology*, 135:1, 321-328.

Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Second edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York*.

Singh, RNP; Seavey, BK; Lewis, UJ (1974). Heterogeneity of human growth hormone. *Endocr.Res.Comm.*, 1, 449-464.

Slater, EP; Rabenau, O; Karin, M; Baxter, JD; Beato, M (1985). Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol. Cell. Biol.*, 5:11, 2984-2992.

Stephanou, A; Handwerger, S (1994a). Interleukin-6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. *Endocrinology*, 135:2, 719-723.

Stephanou, A; Ross, R; Handwerger, S (1994b). Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology*, 135:6, 2651-2656.

Stephanou, A; Handwerger, S (1995a). Identification of a composite steroid hormone response element on the human placental lactogen promoter. *Mol.Cell.Endocrinol.*, 112:1, 123-129.

Stephanou, A; Handwerger, S (1995b). Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinology*, 136:3, 933-938.

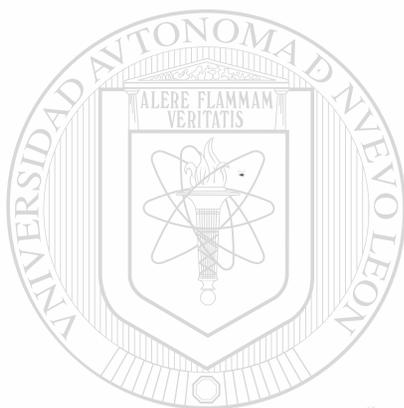
Stephanou, A; Handwerger, S (1995c). The nuclear factor NF-IL6 activates human placental lactogen gene expression. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 206:1, 215-222.

Untergasser, G; Hermann, M; Rumpold, H; Berger, P (1998). Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis. *Eur. J.Endocrinol.*, 139:4, 424-427.

Voz, ML; Peers, B; Belayew, A; Martial, JA (1991). Characterization of an unusual thyroid response unit in the promoter of the human placental lactogen gene. *J. Biol Chem.* 266:20, 13397-13408.

Walker, WH; Fitzpatrick, SL; Barrera Saldaña, HA; Reséndez Pérez, D; Saunders, GF (1991). The human placental lactogen genes : structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocr.Rev.* , 12:4, 316-328.

Walker, WH; Fitzpatrick, SL; Saunders, GF. Human placental lactogen transcriptional enhancer : tissue specificity and binding with specific proteins. *J.Biol.Chem.*, 265, 12940-12948 (1990).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

APÉNDICE A

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

NOTA : A menos que se indique lo contrario, todas las soluciones se esterilizan en autoclave durante 20 min., a 121°C y 15 lbs/pulgada² de presión.

Acetato de sodio 2M, pH 4.0 : En unos 15 mL de agua/DEPC (caliente) se agregan 16.4069 g de CH₃COONa (anhidro); se ajusta el pH a 4.0 con CH₃COOH glacial y se completa a 100 mL con agua/DEPC.

Acetato de sodio 3M pH 6.0 : En 5 mL de agua/DEPC (caliente) se agregan 4.9221 g de CH₃COONa (anhidro), se ajusta el pH a 6.0 con CH₃COOH glacial y se completa a 20 mL con agua/DEPC.

Ácido retinoico 20 mM : (Nota : Se trabaja en campana de flujo laminar y en la oscuridad). A una ampolla con 50 mg de ácido retinoico se le añade 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, esterilizado en autoclave), se mezcla bien y se traslada rápidamente a un tubo con 7.3208 mL de DMSO. Se mezcla y se dispone en alícuotas de 500 µL que se guardan en tubos Eppendorf de 1.5 mL, cubiertos con papel aluminio y preservados a -70°C.

Agua tratada con dietilpirocarbonato (agua/DEPC): Añadir 1 mL de dietilpirocarbonato a 1 litro de agua milliQ, se agita y se incuba a 37°C durante toda la noche. Después se afloja el tapón del frasco y se esteriliza. Con el agua DEPC se preparan todos los reactivos para la extracción de RNA.

Amortiguador de muestra para RNA : Se mezclan 0.72 mL de formamida, 0.16 mL de MOPS 10X, 0.26 mL de formaldehído, 0.12 mL de glicerol al 80%, 0.08 mL de azul de bromofenol (solución al 0.05% en agua) y 0.08 mL de xilencianol (al 0.05% disuelto en agua). No se esteriliza.

Amortiguador para la Reacción en Cadena de la Polimerasa 10X : Contiene 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9 a 25°C) y 1% de Triton X-100. No se esteriliza.

Amortiguador para Transcripción Reversa 5X : Contiene 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl y 15 mM de MgCl₂. No se esteriliza.

Amortiguador Tris-Borato-EDTA (TBE) 20X : Se pesan 360 g de Trizma base, 110 g de ácido bórico y 18.6 g de EDTA. Se afora a un volumen de 1 litro.

Amortiguador TBE 1X : 50 mL de TBE 20X se aforan a un volumen de 1 litro.

Bromuro de etidio : Pesar 5 mg de bromuro de etidio y disolverlos en 100 mL de agua milliQ. No se esteriliza; se guarda protegido de la luz.

Citrato de sodio 1M pH 7.0 : Se pesan 2.941 g de ácido cítrico (sal trisódica) y se añaden 8 mL de agua/DEPC. Se ajusta el pH a 7.0 con HCl concentrado y se completa a 10 mL con agua/DEPC.

Cloroformo : Alcohol Isoamílico : Mezclar 98 mL de cloroformo con 2 mL de alcohol isoamílico. No se esteriliza.

Cloruro de sodio 1.5 M : Pesar 0.8766 g de NaCl y disolverlos en 10 mL de agua destilada.

DNAsa 100 U-Kunitz/mL : Se pesan 0.03846 g de DNAsa (de 650 U-Kunitz/mg) y se disuelven en 250 mL de solución salina de Hank suplementada con HEPES (pH 7.4). Se disuelve con agitación suave y a 4°C. Esterilizar con un filtro de 0.2µM de poro.

EDTA 100mM pH 8.0 : Se disuelven 0.3722g de EDTA·2H₂O·2Na en 9 mL de agua/DEPC; se ajusta el pH a 8.0 con NaOH 10 N y se completa a 10 mL con agua/DEPC.

Etanol al 70% : A 35 mL de etanol absoluto se le añaden 15 mL de agua/DEPC. No se esteriliza. Guardar en refrigeración.

Fenol saturado con agua/DEPC : Se derrite un volumen de fenol y se vierte en un frasco limpio, esterilizado y horneado, que contiene unos 20 mL de agua/DEPC (para impedir la cristalización al contacto con una superficie fría). Luego se añade 1 volumen de agua/DEPC, se introduce un agitador magnético y se pone a mezclar durante toda la noche, a 4°C. Al día siguiente se retira el agua y se añade 1 volumen más de agua/DEPC y se repite el proceso de mezclado. Al final de ésta, se retira el exceso de agua y se verifica que la capa inferior (fenol ya saturado) no absorba más agua.

Esta mezcla no se esteriliza; se almacena a 4°C, protegido de la luz.

Geles de agarosa/isotiacianato de guanidina para RNA : Se pesan 0.3 g de agarosa en un matraz limpio, se añaden 20 mL de TBE 1X estéril y se calienta durante 25 s en el horno de microondas. Enseguida se añaden 100 µL de isotiacianato de guanidina 1M y 1 µL de bromuro de etidio concentrado. Se vacía en un molde y se deja gelificar.

Hidróxido de sodio 10 N : Pesar 7.9994 g de NaOH y disolverlos en 20 mL de agua/DEPC.

Jugo Azul 6X para DNA : Se mezclan 25 mg de xilencianol; 25 mg de azul de bromofenol y 3.0 mL de glicerol; luego se completa a un volumen de 10 mL con TE 1X. No se esteriliza.

Medio de cultivo Luria-Bertani (LB) : Se pesa 1.0 g de triptona, 0.5 g de extracto de levaduras y 1.0 g de NaCl; se llevan a un volumen de 100 mL con agua destilada y se disuelve con agitación.

Medio de cultivo RPMI-1640 : Se disuelve el contenido de un sobre en 200 mL de agua milli-Q estéril, luego se completa a 1 litro. A la solución así preparada, se le añaden 2.0 g de NaHCO_3 y 7.152 g de HEPES; además, 5 mL de estreptomina 10 mg/mL y 12.5 mL de penicilina 4000 U/mL. Se agita bien y se esteriliza por filtración sobre unidades con 0.2 μM de poro. Luego se dispone en fracciones de 100 mL en frascos limpios, esterilizados y homoeados previamente. Las botellas con el medio de cultivo se incuban a 37°C durante 24 h para verificar la esterilidad.

MOPS 10X : Pesar 1.1847 g de MOPS·Na/2.4% H_2O ; añadir 416.66 μL de CH_3COONa 3M pH 6.0 y 2.5 mL de EDTA 100mM pH 8.0. Llevar a un volumen de 25 mL con agua/DEPC. Esterilizar por filtración y guardar a 4°C, protegido de la luz.

Percoll al 90% : Mezclar, en condiciones de esterilidad, 9 volúmenes de Percoll más 1 volumen de NaCl 1.5 M. La solución tiene una osmolalidad aproximada de 300 mOsm/Kg de agua. No es necesario esterilizar.

Preparación del gradiente de Percoll : Mezclar las cantidades anotadas a continuación, para obtener las capas del porcentaje señalado

μL	μL	Porcentaje
Percoll 90%	PBS pH 7.4	
222.2	1777.8	10
444.4	1555.6	20
666.7	1333.3	30
888.9	1111.1	40
1111.1	888.9	50

Se trabaja en la campana de flujo laminar. No es necesario esterilizar.

Sarcosyl al 10% : Pesar 1 g de N-laurilsarcosina y disolver a un volumen de 10 mL con agua/DEPC.

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) : Pesar 8.182 g de NaCl; 0.2012 g de KCl; 1.4196 g de Na_2HPO_4 y 0.2042 g de KH_2PO_4 . Llevar a un volumen de 900 mL con agua destilada y ajustar el pH a 7.4; luego, aforar a 1 litro.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Mario Alberto Flores Valdez

Candidato para el Grado de

**Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética**



**Tesis : EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ENDÓGENOS
DE hGH-V Y hPLs EN CULTIVO PRIMARIO DE PLACENTA**

Campo de Estudio : Biología Molecular

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Biografía :

**Datos Personales : Nacido en Navojoa, Sonora, el 19 de enero de 1973,
hijo de Eleodoro Flores García y Guadalupe Valdez Rojo**

**Educación : Egresado de la Universidad de Sonora, grado obtenido Químico
Biólogo, con especialidad en Análisis Clínicos; con mención honorífica,
primer lugar de la generación. Reconocimiento como Mejor Alumno de
la Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e
Ingeniería Genética por el período 1997-1998.**

