

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

Con el nacimiento de la tecnología del DNA recombinante, esta biomolécula se ha vuelto una de las más fáciles de analizar. Se han realizado numerosos estudios con el propósito de conocer la organización de los genes y cual es su estructura molecular, para de esta manera lograr entender su función, regulación y origen.

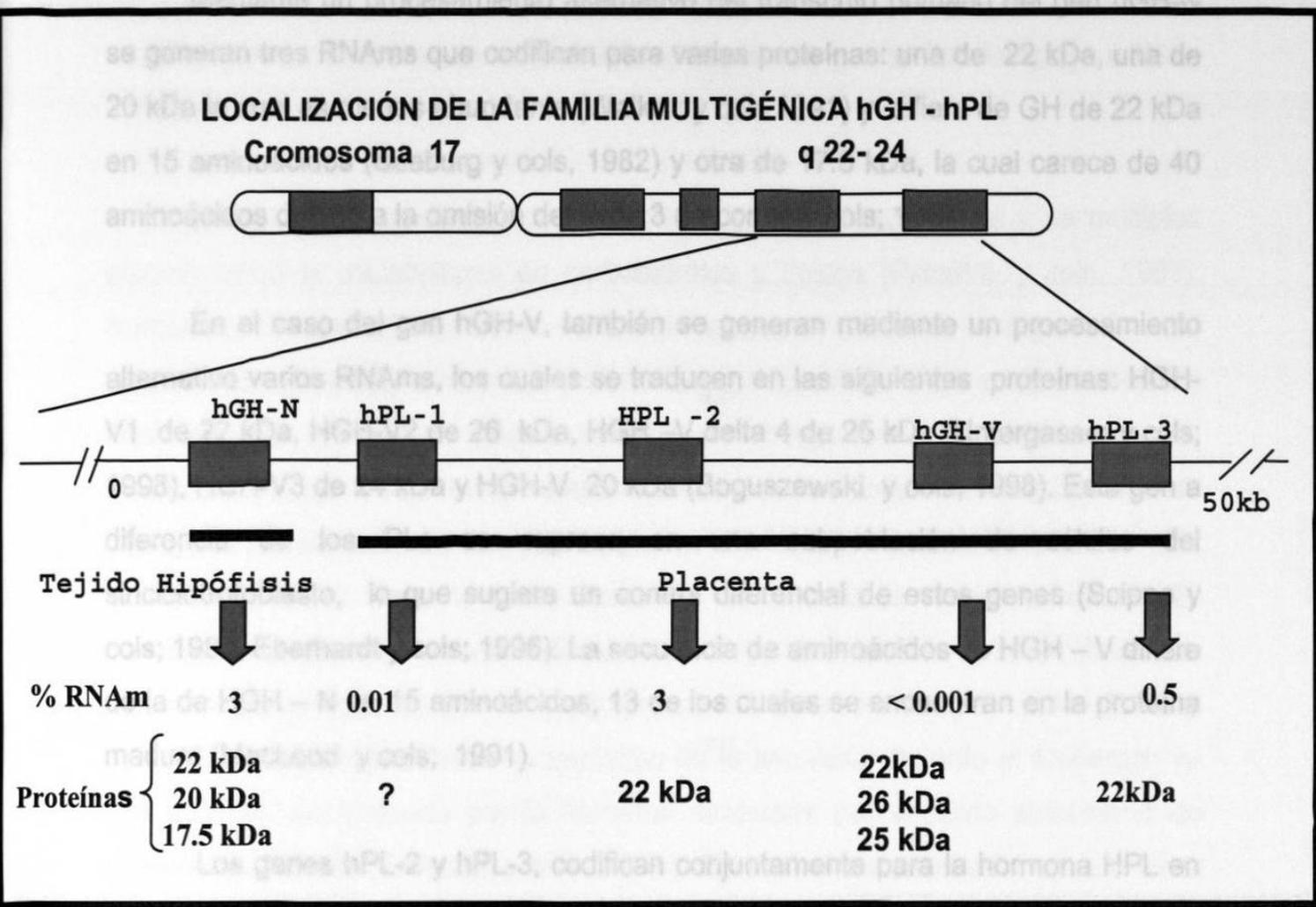
La expresión génica eficiente requiere de múltiples pasos que incluyen la transcripción y el procesamiento del pre-RNAm. Estos eventos nucleares son mediados por complejos de macromoléculas, las cuales han sido analizadas en detalle durante muchos años usando métodos bioquímicos, moleculares y genéticos tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos estudios han revelado los componentes moleculares y los mecanismos básicos implicados en la transcripción y procesamiento de los RNAs necesarios para la expresión de los genes. Pero para comprender por completo la regulación de la expresión génica, es importante revelar el espacio y la interacción temporal de estos eventos (transcripción, procesamiento de RNA, traducción) y analizar como se relacionan unos con otros; así como a la estructura del núcleo celular.

El estudio de las secuencias reguladoras nos permitirá tener una idea de cómo se llevan a cabo todos estos eventos, así como en un momento dado, controlar e incluso manipular la expresión de los genes. Una forma de lograr esto, es sin duda, aportar conocimientos sobre la interacción de estas secuencias con factores transcripcionales y algunas otras moléculas que al unirse al DNA, inician o potencian la transcripción del RNAm.

## **1.1 Modelo de estudio: El locus hGH-hPL**

La familia de los genes hGH y hPL consta de cinco miembros que se localizan en el brazo largo del cromosoma 17 entre las bandas q22- q24, los cuales están ordenados de 5' a 3' de la siguiente manera: hGH-N, hPL-1, hPL-2, hGH-V y hPL-3 (Chen y cols., 1988); todos ellos se encuentran en la misma orientación transcripcional y cada uno de ellos tiene cinco exones y cuatro intrones (Harper y cols, 1982), abarcando una región de aproximadamente 55 kb (Figura 1). Se cree que estos genes se originaron por duplicación a partir de un ancestro común; por lo tanto despliegan una similitud de secuencia nucleotídica superior al 90% (Nickel y cols, 1991). A pesar de ello, estos genes se expresan de manera selectiva: el gen hGH-N se expresa en las células somatotróficas de la adenohipófisis y los cuatro genes restantes lo hacen en el sinciotrofoblasto placentario (Chen y cols, 1988). En contraste con el gen hGH-N, del cual se conoce su función, todavía no se han logrado establecer con precisión los papeles funcionales de los genes placentarios hGH-V y hPLs. El RNAm del gen hGH-N constituye cerca del 3% del total del RNA sintetizado en la adenohipófisis, mientras que los RNAm de los genes que se expresan en la placenta varían desde un 3% para hPL-2 y hPL-3 hasta un 0.001% para el gen hGH-V, pasando por un 0.01% para hPL-1 del RNA placentario total (Chen y cols, 1988). Esta marcada expresión específica de tejido así como los diferentes niveles de expresión de los genes miembros del complejo génico hGH-hPL, lo convierten en un excelente modelo para el estudio de la regulación de la expresión génica en eucariotes superiores.

**Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH - V en células en cultivo"**



**Figura 1. Anatomía del complejo multigénico hGH – hPL. Se muestra el arreglo de estos genes, así como su expresión diferencial y específica de tejido y las proteínas sintetizadas a partir de cada uno de los genes (Harper y cols; 1982; Chen y cols; 1989)**

**1.2 Proteínas codificadas por el complejo hGH - hPL**

Los productos mejor caracterizados de esta familia son los polipéptidos hGH y hPL de 191 aminoácidos y tienen un peso molecular aproximado de 22, 000 daltons, son las proteínas más abundantes producidas por sus respectivos tejidos. Estas proteínas muestran una similitud de secuencia aminoacídica del 85 %, pero su expresión y función son diferentes (Kidd y cols, 1983).

**Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

Mediante un procesamiento alternativo del transcrito primario del gen hGH-N se generan tres RNAs que codifican para varias proteínas: una de 22 kDa, una de 20 kDa la cual es menos abundante (Walker, y cols 1991) y difiere de GH de 22 kDa en 15 aminoácidos (Seeburg y cols, 1982) y otra de 17.5 kDa, la cual carece de 40 aminoácidos debido a la omisión del exón 3 (Lecomte y cols; 1987).

En el caso del gen hGH-V, también se generan mediante un procesamiento alternativo varios RNAs, los cuales se traducen en las siguientes proteínas: HGH-V1 de 22 kDa, HGH-V2 de 26 kDa, HGH –V delta 4 de 25 kDa (Untergasser y cols; 1998), HGH-V3 de 24 kDa y HGH-V 20 kDa (Boguszewski y cols; 1998). Este gen a diferencia de los PLs se expresa en una subpoblación de células del sinciciotrofoblasto, lo que sugiere un control diferencial de estos genes (Scippo y cols; 1993, Eberhardt y cols; 1996). La secuencia de aminoácidos de HGH – V difiere de la de HGH – N en 15 aminoácidos, 13 de los cuales se encuentran en la proteína madura (MacLeod y cols; 1991).

Los genes hPL-2 y hPL-3, codifican conjuntamente para la hormona HPL en el sinciciotrofoblasto de la placenta, la cual se detecta en suero materno a partir de la cuarta semana de embarazo alcanzando niveles de producción de un gramo diario al final del embarazo, constituyendo el 10 % de la producción total de proteína placentaria (Barrera Saldaña y cols; 1983).

En cuanto al gen hPL-1, en los primeros experimentos de detección de transcritos del locus hGH-hPL realizados en placentas a término, no se detectó ninguno con las características esperadas para un transcrito de hPL-1 (Barrera Saldaña y cols; 1983). Además se encontró que contenía una mutación en el sitio donador para la remoción del segundo intrón, que en otros casos inactivan al gen donde se presenta (Reséndez Pérez y col; 1990). Por esta razón se pensó que hPL-1 era posiblemente un gen inactivo o pseudogen.

### **1.3 Funciones de las hormonas codificadas por los genes del complejo hGH – hPL**

HGH -N es responsable del crecimiento de los huesos largos y de múltiples efectos sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Paladini, y cols, 1983). Aunque la GH de hipófisis (hGH – N) tiene un papel crítico en la regulación del crecimiento postnatal, la hormona parece tener un papel limitado en el crecimiento fetal, ya que los tejidos fetales carecen de receptores para GH funcionales (Freemark y cols; 1999); en la sangre HGH se puede asociar con una proteína de transporte e interactúa con las células blanco mediante un receptor específico (De Vos y cols, 1992). Esta hormona tiene una vida media de aproximadamente 25 minutos, en mujeres no embarazadas y en hombres es secretada a la circulación en episodios pulsátiles con niveles muy bajos o indetectables entre cada pulso (Zadik y cols; 1985) habiendo un cambio dramático en la secreción durante el embarazo ya que ésta es reemplazada por la hormona secretada por el tejido placentario de manera no pulsátil (Eriksson y cols; 1988). Esta continua secreción parece tener importantes implicaciones en el ajuste fisiológico durante la gestación y especialmente en el control materno de los niveles de IGF-1 (factor de crecimiento parecido a insulina) (Alsat y cols; 1998) y sus efectos sobre el metabolismo pueden ser directos e indirectos al inducir la síntesis de IGF – 1 .

Los niveles de expresión de HGH-V se detectan en el plasma materno entre las semanas 10 – 12 de embarazo y alcanzan un máximo de 15 – 25 ng/ml en el tercer trimestre; ésto se encuentra asociado con la supresión de la producción de HGH-N en la hipófisis materna, convirtiéndose HGH – V en la forma predominante de GH en el suero materno durante la segunda mitad del embarazo (Freemark y cols; 1999). Los mecanismos de la supresión de la secreción de la GH de hipófisis durante el embarazo se desconocen, sin embargo se sabe bien que la somatomedina C ejerce una retroalimentación negativa y que los niveles de ésta aumentan durante el embarazo (Eriksson y cols; 1988). Probablemente la secreción continua de la GH

**Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

placentaria provoque los altos niveles de somatomedina C, lo cual resulta en la inhibición de los niveles de GH vía retroalimentación negativa (Eriksson y cols; 1988).

HGH – V no se ha detectado en el suero fetal en ningún momento durante el embarazo, lo que indica que los efectos de la hormona sobre el metabolismo fetal o crecimiento deben ser mediados indirectamente a través de acciones sobre tejidos maternos y posiblemente útero – placentarios. En contraste, la circulación fetal contiene abundantes cantidades de HGH–N, alcanzando niveles máximos a la mitad de la gestación (  $33.6 \pm 2.1$  ng/ml muestreo de sangre periumbilical) con un ligero decline de los niveles de 20 ng/ml aproximadamente al término del embarazo (Braunstein y cols; 1980). Las concentraciones IGF-1 en el plasma materno aumentan marcadamente durante el segundo y tercer trimestre de embarazo, de manera paralela con el aumento de las concentraciones de HGH–V (Caufriez y cols; 1990). Se ha propuesto que HGH-V puede ejercer una acción sobre el crecimiento fetal y placentario, mediante IGF-1 (Evain-Brion, y cols, 1994). El aumento en los niveles de IGF – 1 probablemente induce el crecimiento de los tejidos maternos incluyendo útero, senos y glándula tiroidea y sus efectos sobre el corazón y el riñón pueden incrementar el volumen de sangre materna (MacLeod y cols; 1991).

Las acciones biológicas de HGH – N, HGH – V y HPL están mediadas a través de uniones a receptores específicos y de alta afinidad localizados en la membrana plasmática de los tejidos blanco; se han caracterizado dos tipos de receptores para HPL y HGH–V: receptores somatogénicos (HGH) y receptores lactogénicos (HPRL) (Goffin y cols; 1996). HGH – V presenta la misma afinidad para el receptor GH que HGH–N (Kd 0.35 nM), pero su afinidad para el receptor de prolactina es considerablemente menor que HGH–N ( Kd 0.24 - 1 nM), por lo que se sugiere que hGH–V tiene una alta actividad somatogénica (promueve el crecimiento) pero presenta una actividad lactogénica débil (Hill y cols; 1988).

**Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

HPL tiene un papel anti-insulina importante en la regulación del metabolismo materno durante la gestación (Kim y cols; 1971), además de que promueve la retención de nitrógeno en la mujer embarazada. En el feto promueve la glucogénesis, la síntesis de ornitina descarboxilasa y la secreción de insulina en el feto (Hill y cols; 1992).

Las proteínas codificadas por los genes hGH-V y hPL actúan en conjunto en la madre para estimular la producción del IGF-1 y modulan el metabolismo intermediario, resultando en un incremento en la disponibilidad de glucosa y aminoácidos para el producto (Handwerger y cols; 2000). En el feto, HPL actúa vía receptores lactogénicos y posiblemente un único receptor PL module el desarrollo embrionario, regulando el metabolismo intermediario y estimulando la producción de IGFs, insulina y hormonas adrenocorticoideas (Handwerger y cols; 2000). HGH-V es una potente hormona somatogénica, la cual no es liberada en el feto. La secreción de GH de las células del trofoblasto placentario es suprimida por la glucosa, sugiriendo una participación de HGH – V sobre el metabolismo intermediario materno (Goodman y cols; 1991), por lo que es probable que los efectos biológicos de HGH – V sean similares a los de HPL y HGH–N; sin embargo, no existen estudios que revisen directamente los efectos de HGH–V sobre los tejidos maternos y fetales (Handwerger y cols; 2000). Se supone, que la GH placentaria en conjunto con el lactógeno placentario y la prolactina podrían tener un papel en la preparación de los senos para la lactancia (Nickel y cols; 1990).

Poco se conoce sobre la regulación de la producción de HGH – V en embarazos anormales, sin embargo estudios preliminares sugieren que los niveles de HGH–V maternos se encuentran reducidos en embarazos asociados con retardo en el crecimiento intrauterino (Mirlesse y cols; 1993). Se ha reportado un embarazo donde se detectó por medio de PCR la ausencia de los genes hPL–2, hPL-3 y hGH–V resultando en un severo retardo en el crecimiento fetal, un grado bajo de preclampsia y en el cordón umbilical se encontró una sola arteria, pero en general el producto que fue del sexo masculino no mostró anomalías físicas (Rygaard y

**Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

cols; 1998). Estudios de la familia génica hGH / hPL durante el embarazo revelan una compleja interacción de estas hormonas con algunos otros factores de crecimiento (ej. EGF, TGF- $\beta$ ) (Handwerger y cols; 2000).

**1. 4 Factores transcripcionales que influyen en la expresión de los genes del complejo hGH- hPL**

Numerosos factores transcripcionales están involucrados en la expresión de estos genes. Entre ellos se pueden citar factores ubicuos y factores específicos que se unen a la región río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Entre los primeros se encuentran: el Factor Estimulador río arriba (USF) que se une en la posición -290 / -257 y Sp1 que lo hace en la posición -140 / -116. Estos dos factores incrementan la transcripción del gen hGH-N (Lemaigre y cols; 1989). Entre los factores específicos destaca Pit-1, el cual se une al promotor en dos sitios: uno proximal que se localiza entre -92 a -65 pb en hGH-N, -97 a -61 pb para hPLs; (Nachtigal, 1989) y otro distal que se encuentra entre -130 a -105 pb en hGH-N , - 140 a -107 pb para hGH-V y -145 a -118 para hPL-2. Esta proteína que se produce en la hipófisis le confiere especificidad tisular al gen hGH-N y esta característica está dada en parte por el reconocimiento combinado de su promotor por varios factores que actúan en trans (Nickel y cols; 1990, Lefevre y cols; 1987).

Todos estos factores situados antes del sitio de inicio de la transcripción son necesarios para que comience la síntesis de los transcritos. Otros más son importantes para aumentar la producción de los RNAm de los lactógenos. Entre ellos se encuentran los elementos de respuesta a vitamina D localizados en los siguientes sitios: de -1100 a -1070, -600 a -588 y -540 a - 525 que estimulan la síntesis y liberación de HPL por un mecanismo que involucra la transcripción de los genes hPLs (Stephanou y cols; 1995). Se ha observado que la vitamina D no solo activa la transcripción del gen GH de hipófisis de rata, sino que también inhibe la transactivación mediada por ácido retinoico y triyodotironina para este gen (García – Villalba y cols ; 1995).

**Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

Se han localizado tres regiones que responden a triyodotironina y ácido retinoico en el promotor de hPL, los cuales están entre -550 a -523, -611 a - 558 además entre -978 a – 954; también se ha localizado un sitio de respuesta a triyodotironina en el promotor de hPL-2 entre – 67 a – 41 pb. Estas hormonas incrementan la liberación y expresión de los genes hPL's (Stephanou y cols; 1995, Voz y cols; 1991). En células de tumor de pituitaria de rata la concentración de los RNAm de GH se incrementa en respuesta a las concentraciones fisiológicas de triyodotironina (Dobner y cols; 1981), pero al contrario del gen GH de rata, el promotor de hGH-N es regulado de manera negativa por triyodotironina (Cattini y cols; 1986). También se ha demostrado en líneas celulares de hipófisis de rata que el ácido retinoico no incrementa la transcripción del gen GH (Bedó y cols; 1989).

Los sitios de unión de IL-6 están localizados entre -1134 a -1097 pb e incrementan la transcripción de los hPLs (Stephanou y cols; 1994)

Los elementos de respuesta de AMPc y ester de forbol se encuentran entre -1102 a –1096 habiendo una diferencia nucleotídica entre el promotor de hPL-3 respecto a hPL-2, lo cual provoca la regulación diferencial de la expresión de los hPLs (Oury, 1997). Se sabe que existen elementos de respuesta a AMPc 82 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen hGH-N y la regulación de este gen por la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) involucra la interacción entre un elemento tejido específico y un elemento que responde a AMPc. (Dana y cols; 1989).

Existen también regiones reguladoras involucradas en la expresión tejido-específica, de las cuales en los genes placentarios se encuentra una región de 263 pb (Elemento P), situada a -2 Kb del sitio de inicio de transcripción, que reprime la transcripción de estos genes en la hipófisis, pero no en la placenta. Esta secuencia se encuentra presente en todos los genes excepto en hGH-N (Nachtigal, 1992).

**Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

Además de los elementos de regulación que han sido ubicados en la región promotora del gen hGH-N, también han sido localizados otros en la propia unidad transcripcional, como el elemento de unión (o respuesta) a glucocorticoides localizado en el primer intrón entre +86 y +115, (Slater y cols, 1985). Más recientemente ha sido posible la caracterización de un elemento promotor localizado también dentro del primer intrón capaz de dirigir la expresión de genes reporteros, pero se desconoce si esta actividad es tejido-específica (Kolb y cols, 1998).

A pesar de que los genes de la familia hGH- hPL tienen una región reguladora muy similar, esta similitud disminuye río arriba a partir del sitio de inicio de la transcripción, ya que existen cambios sutiles en las secuencias reguladoras río arriba, los cuales podrían ser los responsables de las diferencias de expresión observadas entre los genes. Por ejemplo la diferencia de un nucleótido en el elemento de respuesta de éster de forbol y AMPc lleva a la regulación diferencial de la transcripción de los genes hPL-2 y hPL-3. Esto se debe a que ambas sustancias inducen la transcripción del promotor del gen hPL-2 mientras que el promotor del gen hPL-3 es únicamente regulado por éster de forbol, incrementando la expresión del gen hPL-2 (Oury y cols, 1997). Este tipo de evidencia sugiere que la variabilidad mostrada en la expresión de estos genes podría relacionarse en parte, a la fuerza de sus respectivos promotores (Nachtigal y cols, 1989; Nickel y cols, 1990).

Algunos estudios sugieren un novedoso papel fisiológico a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la regulación de la expresión de los genes lactógenos placentarios durante el embarazo (Handwerger y cols; 1995). La estimulación parece ser debido principalmente al pre- $\beta$  HDL, un componente menor del total de HDL en circulación que es mucho menor en tamaño que la forma de mayor circulación ( $\alpha$ -HDL), pero que contiene una proporción más alta de apolipoproteína (apo). Durante el embarazo, las concentraciones en plasma materno de pre- $\beta$  se incrementan con un patrón paralelo a HPL (Handwerger y cols, 1999). Se han reportado concentraciones bajas de apo A-I en severas condiciones patológicas

**Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

asociadas con una disminución en las concentraciones HPL plasmáticas, retardo en el crecimiento intrauterino e inclusive preclamsia ( Rosing y cols, 1989).

Aunque el lactógeno placentario abunda en la sangre de la mujer embarazada, el nivel de la hormona del crecimiento está muy disminuido después del parto, la hormona de origen placentario desaparece con rapidez, pero la hormona GH hipofisaria permanece bastante baja por algún tiempo. Algunos de los factores que se sabe inhiben a la HGH son la somatostatina y el factor parecido a insulina (IGF-1) que suprimen la expresión del gen hGH–N a nivel transcripcional (Niiori-Onishi y cols; 1999); la secreción de HGH-V probablemente también sea regulada de manera negativa por los inhibidores antes mencionados (Evain – Brion y cols; 1999).

Debe señalarse que la expresión de los genes hGH-hPL no se restringe a los tejidos señalados, pues recientemente se ha descubierto su expresión en otros tejidos como ovarios, donde se ha demostrado la producción de RNAm de GH-N, PL-2, PL-3 y sus correspondientes proteínas. (Schwärzler, 1997), también se han encontrado RNAs con diferentes procesamientos derivados de hGH-N en líneas celulares de linfocitos y de mielomonocitos y mediante análisis de RT-PCR se han determinado transcritos de hGH-N en fibroblastos de la dermis. Este descubrimiento fundamenta la importancia de la hormona de crecimiento en el desarrollo del sistema inmune y además sugiere un posible lazo regulatorio autocrino / paracrino en el tejido de la piel (Palmetshofer, 1995). Se ha logrado detectar RNAm del gen hGH-V con diferentes procesamientos en testículos los cuales codifican para las proteínas de 22 kDa, 26 kDa y una proteína de 25 kDa de longitud, desconociéndose también a la fecha la especificidad tisular y la función para la fisiología testicular del producto del gen hGH-V (Untergasser, 1998).

### **1.5 Influencia de la longitud de los promotores en la expresión.**

En nuestro laboratorio se han realizado experimentos de transfección en cultivos de células derivadas de placenta con construcciones portando delecciones en los promotores de los genes de esta familia multigénica (-2.2 kb, -500 pb, -140pb, -70pb), para comparar su expresión obteniéndose resultados muy interesantes. Por ejemplo, se observó que la construcción con la versión larga del promotor del gen hGH-V iguala los niveles de expresión del gen hPL-2 que es el que se expresa a los niveles más altos (3 %) en placenta (Canizales y cols; 2000).

Con el fin de investigar si la expresión de los genes endógenos hPL y hGH en las líneas celulares usadas en los ensayos de transfección correlacionaban con la fuerza transcripcional observada para las construcciones transfectadas de los promotores, se desarrollaron análisis de RT-PCR del RNA extraído de las líneas celulares JEG-3 línea celular que proviene de un coriocarcinoma humano, la cual secreta las hormonas gonadotropina coriónica, lactógenos placentarios y progesterona, (Kohler y cols; 1971), BeWo que proviene de un coriocarcinoma gestacional maligno de placenta, secreta la hormona gonadotropina coriónica, lactógenos placentarios y progesterona, (Pattillo y cols; 1979) y JAR esta línea fue establecida a partir de un tumor trofoblástico de placenta, produce estrógeno progesterona, gonadotropina y lactógenos en cultivo (ATCC revisión 2001), observándose expresión alta de los genes endógenos en la línea celular de BeWo y una expresión muy baja en la línea celular JEG-3. Esto sugiere que el control de la expresión de los genes es distinto en las diferentes líneas celulares, probablemente la maquinaria transcripcional regula de manera diferencial a los genes placentarios en las distintas líneas celulares (Nickel y cols; 1991).

## **1.6 Estimuladores de la Expresión de hPL**

### **1.6. 1 Suero materno.**

Se ha demostrado que células del citotrofoblasto pueden fusionarse y diferenciarse a un fenotipo que exprese grandes cantidades de hCG y hPL cuando son cultivadas con medio de cultivo suplementado con 10 % de suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo, el suero se utilizó en esta etapa porque es durante este período cuando se presenta un gran incremento en la masa placentaria (de 30 a 120 g), lo que hace pensar que es en este momento donde se encuentran factores involucrados en la diferenciación de los citotrofoblastos. hPL se expresa en el sinciotrofoblasto *in vivo*, en cambio en células trofoblástica *in vitro* con medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal es baja la expresión de este gen. Cuando células citotrofoblásticas son cultivadas con medio de cultivo suplementado con suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo, se observa que la expresión de hCG y hPL aumentan considerablemente, mientras que células cultivadas con medio de cultivo suplementado con suero de mujer no embarazada y de hombre, se diferenciaron hasta sinciotroblastos siguiendo un patrón casi idéntico al que se observó cuando las células fueron cultivadas en medio de cultivo suplementado con suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo, pero la cantidad de hormona liberada fue dos veces menor que lo observado con suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo. La extensa fusión de células, el nivel de expresión de hormona y el patrón regular en la expresión de las hormonas, sugiere que células del citotrofoblasto cultivadas en suero materno se pueden diferenciar hasta el estadio más avanzado de diferenciación trofoblástica. Las células también son más resistentes a la digestión con tripsina, contrario a lo sucede cuando se cultivan en medio suplementado con suero bovino fetal, en cuyo caso se deforman, tienen menos adherencia y no sobreviven más de dos semanas (Richards y cols., 1994).

## Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

### **1.6.2 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 RNAs de la subunidad  $\alpha$  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 expresión de hCG y estrógeno sintetasa (aromatasa) en cultivos primarios de trofoblastos obtenidos de placentas humanas a término (Lobo y cols, 1989).

### **1.6.3 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  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), 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 -  $\beta$  e IL -6 estimulan tanto la diferenciación como la proliferación de esta 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 para ese factor (Stephanou y Handwerger, 1995c).

**Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

**1.6.4 Moléculas esteroideas y triyodotironina.**

Se ha utilizado al 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 similitud 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 hipofisarias; 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)<sub>2</sub> D3 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).

## JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones realizadas hasta ahora para conocer como los factores transcripcionales regulan la expresión de los genes pertenecientes a la familia hGH-hPL se han realizado principalmente con los genes hPL-2 y hPL-3, debido a que estos genes presentan los niveles de expresión más altos en placenta.

Poco se conoce de la expresión del gen hGH-V y de su regulación por los diferentes factores transcripcionales. Por lo que se requieren estudios sobre la regulación de dicho gen con el propósito de avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos que regulan su funcionamiento.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1 Objetivo general**

Hacer un estudio comparativo de la regulación de la expresión del gen hGH-V por diferentes moduladores en cultivo celular (JEG-3 y GC).

#### **2.2 Objetivos Específicos**

**2.2.1 Determinar el patrón de expresión normal del gen hGH- V en la línea celular JEG-3.**

**2.2.2 Evaluar la expresión del gen hGH–V en la línea celular JEG-3 bajo la influencia de triyodotironina, éster de forbol y ácido retinoico.**

**2.2.3 Introducir por transfección en las líneas celulares JEG-3 y GC recombinantes que contengan los promotores distales del gen hGH-V y del gen hGH-N dirigiendo al gen reportero Beta galactosidasa, para estudiar su expresión bajo la acción de moduladores.**

**2.2.4 Introducir por transfección un plásmido que contenga el gen completo de hGH- V (promotor distal y unidad transcripcional) y estudiar su expresión en respuesta a los moduladores utilizando los transcritos del gen constitutivo GAPDH como referencia.**

## **CAPITULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Origen de los Reactivos**

Las cajas de plástico para cultivo celular se adquirieron de Corning incorporated (Corning, NY, EUA 14831).

Los medios de cultivo Opti – MEM I y Dubecco' s Modified Eagle medium (D – MEM) fueron 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 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 el fenol y los reactivos inorgánicos. El ácido retinoico, trioyodotironina, phorbol 12-myristate 13-acetate, provinieron de esta casa comercial. El isotiocianato de guanidina se adquirió de Gibco – BRL Life Technologies, Inc.

El rojo de cloro fenol -  $\beta$  - D – galactopiranósido (CPRG) fue adquirido en Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany).

El equipo para realizar el ensayo de ELISA para HGH fue de la compañía Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)

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

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

La enzima Taq DNA polimerasa y los dNTPS se adquirieron de Promega (Madison, WI, EUA).

Los oligonucleótidos utilizados en el análisis de PCR fueron sintetizados por GIBCO – BRL Life Technologies.

### **3.2 Secuencia de los Iniciadores Utilizados**

La secuencia de cada uno de los iniciadores utilizados se muestra a continuación:

Iniciador 5' para hGH – V : 5'-cgcgcccgtcgcctggta-3' (940719-1) (Clave ULIEG)

Iniciador 3' para hGH – V : 5'-tcgaattccaggagaggcactggg-3' (113) (Clave ULIEG)

Iniciador 5' para GAPDH : 5' –aggtcggagtcaacggattttgg-3'

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

### **3.3 Origen del material biológico**

Los vectores utilizados para los ensayos de transfección fueron obtenidos de la plasmidoteca del Laboratorio de Biología Celular de U.L.I.E.G.

La cepa bacteriana TOP 10 F' de *Escherichia coli* empleada en los ensayos de transformación y propagación de los recombinantes, se obtuvo del cepario de la ULIEG.

Las líneas celulares JEG-3 (derivada de coriocarcinoma de placenta humana) y GC (derivada de tumor de hipófisis rata) fueron donadas por el Dr. José Luis Castrillo del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid, en Madrid, España.

### **3.4 Equipo**

Se utilizó un horno de microondas Goldstar modelo Ma-857M, microcentrifugas Eppendorf modelos 5403 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 PT 150 (Watertown, MA, EUA), una balanza digital marca Sartorius modelo 1206 MP (Camnh Göttingen, Alemania), una balanza analítica OHAUS modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), micropipetas Pipetman Gilson de Rainin Instrument Co; Inc. (Emeryville, CA, EUA), un agitador G 10 marca New Bussines Scientific Co; Inc (Edison, NJ, EUA), un equipo de video-computadora marca BioRad, modelo Geldoc 1000 (Hercules, CA, EUA). Para observar las células se utilizó un microscopio invertido Karl Zeiss (Alemania). El pH de las soluciones se ajustó en un potenciómetro Beckman 320.

Las lecturas de absorbancia de los inmunoensayos se llevaron a cabo en un Microwell systems modelo Reader 100 ELISA de Organon Teknika ( Turnhout, Belgium).

El procesamiento de datos se realizó en computadoras marcas Macintosh modelos Clasic 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).

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

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; WI, EUA) y DNA Strider™ 1.1 (© Ch. Marck and CEA, 1989, Service de Biochimie -Département de Biologie - Institut de Recherche Fondamentale - CEA - Francia).

### **3.5 Condiciones del cultivo celular**

Las líneas celulares JEG-3 y GC se cultivaron en placas con medio Opti-MEM (Gibco-BRL) y D – MEM respectivamente, con SBF al 10 % y solución de antibióticos (sulfato de estreptomicina 100 µg / ml y penicilina 100 U/ml) a 37 °C en atmósfera húmeda con CO<sub>2</sub> al 5 %.

Para el mantenimiento del cultivo celular se siguió el siguiente protocolo:

- 1.- A un cultivo confluyente se le eliminó el medio y se le agregaron 2 ml de tripsina 1X (para desprender las células del sustrato) y se incubaron a 37 °C por 5 min.
- 2.- Una vez recuperadas las células de la caja y eliminada la tripsina por centrifugación a 3, 000 r.p.m. por 5 min, se resuspendieron en 3 ml de medio Opti-MEM o bien D – MEM, según el caso, se contaron en un hemocitómetro y se transfirió una alícuota conteniendo aproximadamente  $7 \times 10^4$  células a una nueva botella.
- 3.- Se agregaron 5 ml de medio complementado con un 10 % de SBF y antibióticos.
- 4.- Las células se incubaron en CO<sub>2</sub> a 37 °C y se les realizó cambio de medio de cultivo cada 48 a 72 h.

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

A partir de cultivos al 80 % de confluencia y en fase logarítmica, se procedió a levantar las células con tripsina 1X y realizar la cuenta celular. Se inocularon  $3 \times 10^5$  células en placas de 35 mm de diámetro, las cuales se incubaron por un período de 12 - 24 h, antes de la transfección o bien de la adición de los moduladores.

### **3.6 Transfección mediante lipofección**

Esta técnica de gran utilidad para introducir DNA a células eucarióticas, se basa en la formación de complejos de DNA – lípidos los cuales se fusionan a la membrana celular distribuyendo su contenido en el citoplasma, pueden obtenerse comercialmente de varios tipos (lipofectina, lipofectamina, DOTAP, etc) (Life-Technologies. LipofectAMINE™ Reagent. Información técnica).

Para las transfecciones tanto para JEG–3 y GC se utilizó el protocolo previamente estandarizado por el laboratorio de Biología Celular (Canizales-Espinoza; 1996) que se describe a continuación:

- 1.- Las células se sembraron en cajas petri de 35 mm con 1 mL de medio de cultivo completo.
- 2.- Se incubaron las células a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub> hasta una confluencia del 50 - 80 %. Lo que ocurría entre las 12 - 24 h.
- 3.- Se prepararon las siguientes soluciones en tubos de micro centrifuga estériles de 1.5 mL.

Solución A : Para cada transfección se diluyeron 3 µg de DNA ( 1 µg del control de transfección pCMV sport β - Gal y 2 µg del plásmido de interés) en 100 µL de medio libre de suero ( OPTIMEM I Reduced Serum Medium).

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

Solución B: Para cada transfección se diluyeron 2  $\mu\text{L}$  de lipofectamina y 1  $\mu\text{L}$  de Reactivo Plus en 200  $\mu\text{L}$  de medio libre de suero.

4.- Se combinaron las dos soluciones mezclando suavemente y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 45 min con el fin de que se formaran los complejos.

5.- A cada caja se le adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de la mezcla (previamente se les eliminó el medio de cultivo anterior) y se distribuyó suavemente la mezcla por toda el área.

6.- Se incubaron las células con el complejo por 5 h a 37 °C en una incubadora de  $\text{CO}_2$ .

7.- Después de la incubación se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de medio conteniendo la concentración normal de suero y antibióticos, sin remover la mezcla de transfección.

8.- Se reemplazó el medio, por medio fresco a las 24 h después de la transfección.

### **3.7 Detección de $\beta$ -Galactosidasa**

(Detección del gen reportero  $\beta$  - Gal)

Para la determinación de la actividad de  $\beta$  - Galactosidasa se siguió el protocolo descrito por Eustice y cols; 1994.

1.- Después de 48 - 72 h de haber sido realizada la transfección se retiró el medio de cultivo.

2.- Se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis en cada caja y usando un gendarme (scraper) se recuperaron las células y se colocaron en un tubo de microcentrífuga (1.5 mL).

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

3.- Las células se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación (la congelación se llevó a cabo en nitrógeno líquido y la descongelación a 37 °C baño María).

4.- Se preparó una curva estándar de diluciones seriadas (5U de la enzima de *E. coli*  $\beta$ - galactosidasa de Sigma - Aldrich en 100  $\mu$ L de Buffer -  $\beta$  - gal) conteniendo 2.5U, 1.25U, 0.625U, 0.312U, 0.156U, 0.078U, 0.039U, 0.019U.

5.- Una vez lisadas las células y completamente homogenizadas, una alícuota de 50  $\mu$ L para cada punto de la curva estándar fue transferida a los pozos de la placa control (los rangos de expresión de  $\beta$ - galactosidasa se encontraron entre 10,000 a 20,000 pg). Fue necesario diluir el extracto celular en buffer lisis. Una dilución 2:1 del extracto en buffer de lisis (100  $\mu$ L de extracto más 50  $\mu$ L de Buffer de Lisis) fue una buena dilución inicial, pero se puede usar hasta 150  $\mu$ L de extracto celular por reacción. Para el control negativo, se preparó la misma dilución de un extracto celular la cual se hizo a partir de células, que no fueron transfectadas con el gen beta-galactosidasa.

6.- Se adicionaron 150  $\mu$ L de 1 mg/ml de rojo de cloro fenol -  $\beta$ - D - galactopiranosido (CPRG) disuelto en buffer  $\beta$  - Gal. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en la oscuridad hasta que se desarrolló el color rojo (aproximadamente 30 min). El desarrollo del color continuó por aproximadamente 3 hrs.

7.- Se midió la absorbancia de 600 nm, colocando la tira en el microlector de ELISA.

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

La actividad de  $\beta$ -Galactosidasa se determinó mediante la siguiente fórmula (Carrol, 1992):

$$\text{Actividad de } \beta\text{-Galactosidasa (U)} = \frac{10^9 \times \text{Abs}^{589}}{(\# \text{ de células}) (t \text{ de incubación en h.)}}$$

Para normalizar la actividad de  $\beta$ -Galactosidasa en U /  $\mu\text{g}$  de proteína se cuantificó la concentración de proteína total en el extracto celular mediante la técnica de Bradford. Se realizó la normalización mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Actividad de } \beta\text{-Galactosidasa en U.}}{\mu \text{ g de proteínas totales}} = \text{U de } \beta\text{-Galactosidasa} / \mu \text{ g de proteína}$$

### **3.8 Cuantificación de proteínas totales ( Bradford, 1976)**

- 1.- Se colocaron en microtubos de 0.5 ml 1.0, 2.5, 5.0, 12.5 y 15  $\mu$ l de una solución estándar con una concentración de 0.5 mg / ml de albúmina sérica bovina.
- 2.- Cada tubo se aforó a 50  $\mu$ l con solución de NaCl 150 mM. Cada solución tenía una concentración equivalente a 0.5, 1.25, 2.5, 6.25 y 7.5  $\mu$ g.
- 3.- La reacción se llevó a cabo con la adición de 150  $\mu$ L del colorante azul brillante de Coomassie G-250 e incubó por 5 min a temperatura ambiente.
- 4.- Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. En paralelo con la elaboración de la curva de calibración, se determinó la concentración de proteína de cada una de las muestras problema mediante diluciones 1: 10.

### **3.9 Detección de HGH- N (ELISA)**

#### **Preparación de los estándares de HGH**

Se mezclaron 40  $\mu$ L de la solución stock de HGH (aprox., 10 ng / mL, solución 1) con 960  $\mu$ L del buffer de muestra (solución 6) (concentración final aprox. 400 pg / mL).

Se prepararon los estándares en diluciones seriadas de 1:2, como se describe en la tabla 1.

**Tabla 1.- Preparación de curva de estándares**

<b>Paso</b>	<b>Solución de trabajo de hGH</b>	<b>de Buffer de muestra (solución 7)</b>	<b>Concentración hGH (pg / mL)</b>
0	0	1000 $\mu\text{L}$	0
1	1000 $\mu\text{L}$	0	400
2	500 $\mu\text{L}$ del paso 1	500 $\mu\text{L}$	200
3	500 $\mu\text{L}$ del paso 2	500 $\mu\text{L}$	100
4	500 $\mu\text{L}$ del paso 3	500 $\mu\text{L}$	50
5	500 $\mu\text{L}$ del paso 4	500 $\mu\text{L}$	25
6	500 $\mu\text{L}$ del paso 5	500 $\mu\text{L}$	12.5

1.- Se pipetearon 200  $\mu\text{L}$  de la diluciones de los estándares o 200  $\mu\text{L}$  de las muestras en los pocillo.

2.- Se incubó durante 1 h a 37 °C.

3.- Se lavó 5 veces con buffer de lavado (solución 6) durante 30 s aprox.

4.- Se pipetearon 200  $\mu\text{L}$  de anti – hGH – DIG ( 1  $\mu\text{g}$  / mL) en los pocillos.

5.- Se incubó durante 1 h a 37 °C.

6.- Se lavó 5 veces con buffer de lavado (solución 6) durante 30 s aprox.

7.- Se pipetearon 200  $\mu\text{L}$  de anti – DIG – POD (200 mU /mL) en los pocillos.

8.- Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

9.- Se lavó 5 veces con buffer de lavado (solución 6) durante 30 s aprox.

10.- Se midió la absorbancia a 405 nm.

#### **4.0 Extracción del RNA**

El RNA total de las células en cultivo se extrajo por el método de isotiocianato de guanidina- fenol- cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987).

Todo el proceso se llevó a cabo en presencia de hielo.

1.- Se lavaron tres veces las cajas con 3 ml de solución PBS al 1X para eliminar el medio de cultivo.

2.- Se agregaron 500  $\mu$ L de solución D en cada caja.

3.- Se disgregó la monocapa de células con un "gendarme" y se recuperó la suspensión en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml.

4.- A éstos se les añadieron 50 $\mu$ l de acetato de sodio 2 M pH 4.0, se agitó por inversión.

5.- Se agregaron 500  $\mu$ l de fenol saturado con agua tratada con dietilpirocarbonato, se mezcló por agitación.

6.- Se adicionaron 100  $\mu$ L de cloroformo + alcohol isoamílico (49 : 1), luego se agitó en vortex durante 10 s para después incubar en hielo durante 15 min.

7.- Se centrifugó durante 15 min a 14 000 rpm y 4°C, después se recuperó el sobrenadante.

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

8.- Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto, frío. Se mezcló bien y los tubos se mantuvieron a -70 °C durante toda la noche para precipitar el RNA.

9.- Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 14 000 rpm y 4°C, se desechó el sobrenadante.

10.- Se añadieron 200µL de solución D, además de 500 µL de etanol absoluto frío; se dejó precipitar nuevamente a -70°C.

11.- Se centrifugó durante 10 min a 14 000 rpm y 4°C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar durante 30 min a temperatura ambiente y dentro de la campana de flujo laminar.

12.- Se resuspendió la pastilla en agua tratada con dietilpirocarbonato.

13.- La calidad y cantidad de RNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa - isotiocionato de guanidina al 1.5 %, comparándola contra la de un RNA estándar (131.6 ng/µl) (Goda y cols; 1995)

14.- Las electroforesis se corrieron inicialmente a 30 V y después de 30 min. se aumentó el voltaje a 90 V por aproximadamente 1h.

#### **4.1 Cuantificación de los Niveles de Expresión de hGH-V**

Para evidenciar la diferencia entre la expresión de este gen 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 de PCR.

### **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 2.

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

### **PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con iniciadores específicos que permitieron obtener productos amplificados del gen hGH-V. Para detectar el transcrito de hGH-V se utilizaron iniciadores específicos para amplificar este gen , debido a que sus niveles de expresión normalmente son muy bajos. El iniciador *antisentido* es el clave 113. Para efectuar la amplificación se utilizaron los reactivos descritos en la tabla 3.

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

**Tabla 2. Componentes de la Reacción de Transcripción Reversa**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
RNA total	2.5 µg
Buffer 5X	6.0 µL
DTT 100 mM	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. 30.0 µL

**Tabla 3. Preparación de la PCR para hGH-V**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
DNAC	3.0 µL
Buffer 10X	5.0 µL
MgCl <sub>2</sub>	3.0 µL
dNTPs 10 mM	1.5 µL
Primer hGH-V (5 µM)	5.0 µL
Primer 113 (5 µM)	5.0 µL
Taq DNA polimerasa (5u/µL)	0.5 µL
Agua miliQ	27.0 µL

**Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

El programa de PCR que se utilizó 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 hGH-V fue verificada por Iturbe Cantú (1995), quien utilizó diferentes condiciones de amplificación y probó las secuencias de lactógenos y de hormonas de crecimiento, asegurándose que se amplificaran exclusivamente los transcritos deseados en cada caso. Además, en un principio, por simulación computacional con el programa *Amplify*, se encontró que se producirían bandas de 586 y 838 pb para los de hGH-V. Esto es debido a la diferencia del procesamiento del transcrito primario.

**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 gliceraldehído- 3 - fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que tiene un nivel de expresión constitutivo, junto con el DNAc de la hormona de crecimiento placentaria. Las condiciones de reacción fueron las que se presentan en la tabla 4.

El programa de coamplificación de PCR consistió en una desnaturalización inicial durante 5 min. a 94 °C, seguida de 30 ciclos con 30 s de desnaturalización 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 1093 pb, en tanto que la de hGH – V fue de 586 pb.

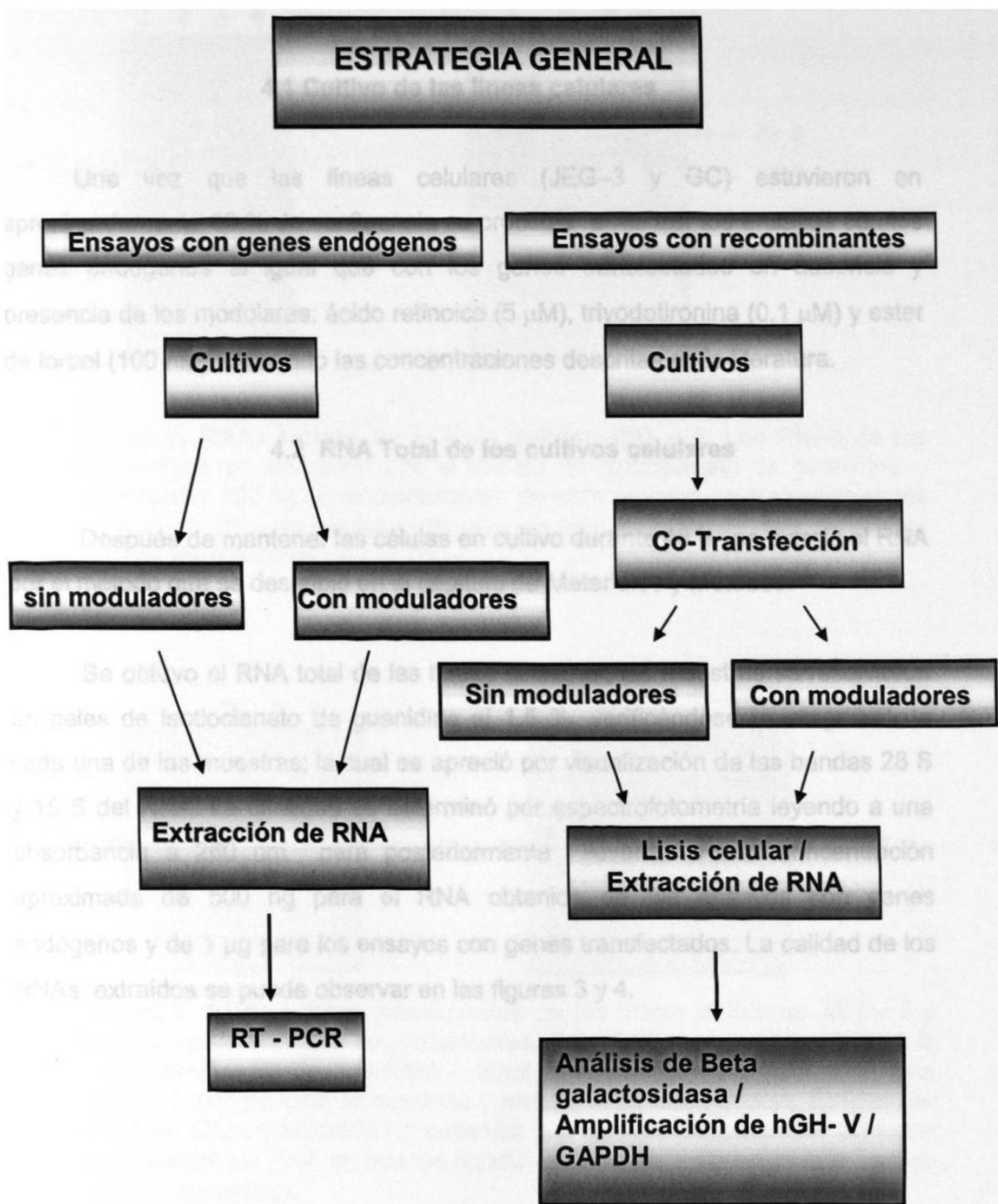
**Tabla 4. Preparación de la PCR para GAPDH / hGH-V**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
DNAC	5.0 $\mu\text{L}$
Buffer 10X	5.0 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	8.0 $\mu\text{L}$
dNTPs 10 mM	1.5 $\mu\text{L}$
Primer hGH-V (5 $\mu\text{M}$ )	5.0 $\mu\text{L}$
Primer 113 (5 $\mu\text{M}$ )	5.0 $\mu\text{L}$
Primers GAPDH (5 $\mu\text{L}$ )	2.0 $\mu\text{L}$
Taq DNA polimerasa (5u/ $\mu\text{L}$ )	0.5 $\mu\text{L}$
Agua miliQ	18.0 $\mu\text{L}$

### **Análisis**

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio para luego analizarse con el equipo de Gel Doc. Cada ensayo se realizó por triplicado.

**Material y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH - V en células en cultivo"**



**Figura 2. Estrategia general. Planeación de los experimentos que se realizaron con el fin para llevar a cabo este trabajo de tesis.**

## **CAPITULO IV**

### **RESULTADOS**

#### **4.1 Cultivo de las líneas celulares**

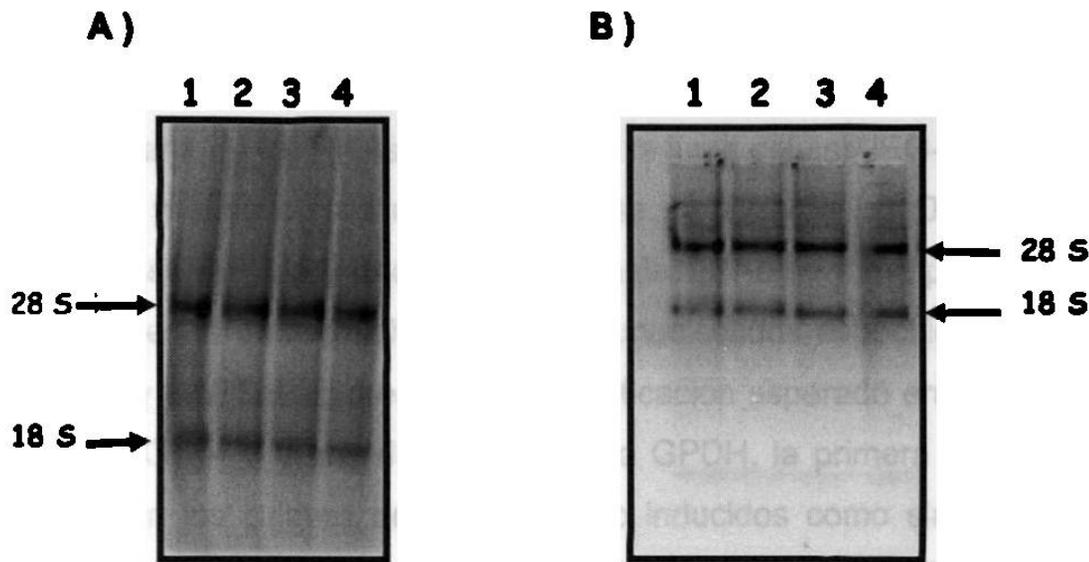
Una vez que las líneas celulares (JEG-3 y GC) estuvieron en aproximadamente 80 % de confluencia se procedió a realizar los ensayos con los genes endógenos al igual que con los genes transfectados en ausencia y presencia de los modulares: ácido retinoico (5  $\mu$ M), triyodotironina (0.1  $\mu$ M) y ester de forbol (100 nM), utilizando las concentraciones descritas en la literatura.

#### **4.2 RNA Total de los cultivos celulares**

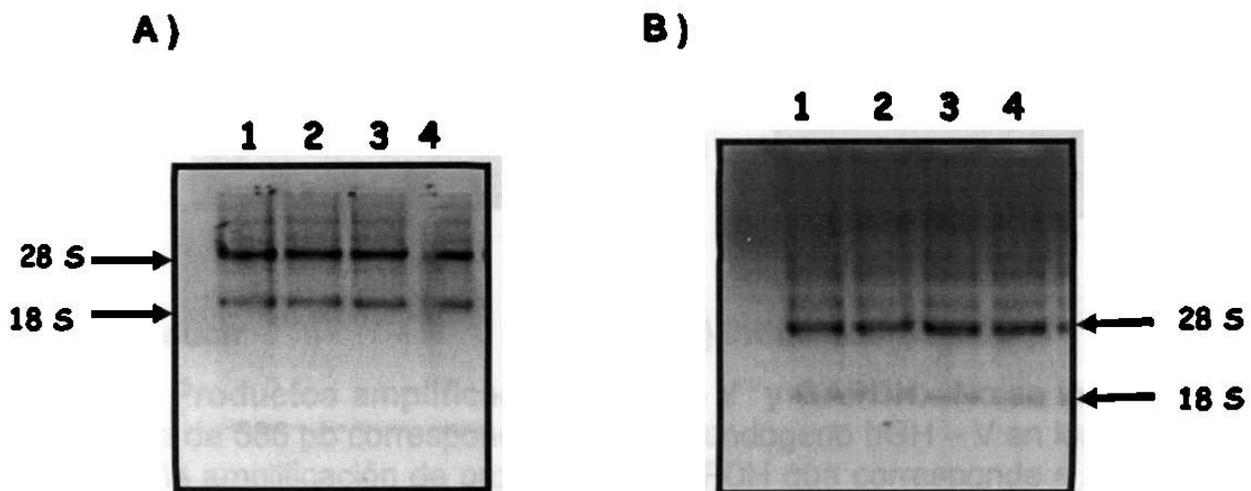
Después de mantener las células en cultivo durante 48 h., se extrajo el RNA por el método que se describió en el capítulo de Materiales y Métodos.

Se obtuvo el RNA total de las líneas celulares, las muestras se resolvieron en geles de isotiocianato de guanidina al 1.5 %, verificándose la integridad de cada una de las muestras; la cual se apreció por visualización de las bandas 28 S y 18 S del RNA. La cantidad se determinó por espectrofotometría leyendo a una absorbancia a 260 nm para posteriormente llevarlas a una concentración aproximada de 500 ng para el RNA obtenido de los ensayos con genes endógenos y de 1  $\mu$ g para los ensayos con genes transfectados. La calidad de los RNAs extraídos se puede observar en las figuras 3 y 4.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"



**Figura 3. RNAs totales de la línea celular JEG – 3.** Los RNAs de los diferentes cultivos se extrajeron con la técnica de isotiocianato de guanidina – fenol – cloroformo. 500 ng aproximadamente, de cada muestra se colocaron en los carriles 1 a 4 A) RNA de células cultivadas sin moduladores, B) RNA de células cultivadas con moduladores.

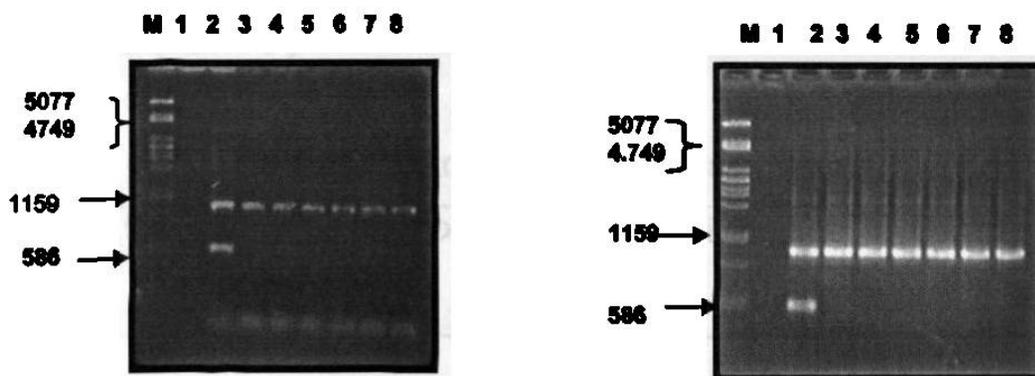


**Figura 4. RNAs totales provenientes de las líneas celulares JEG – 3 y GC transfectadas con los recombinantes.** Los RNAs se extrajeron con la técnica de isotiocianato de guanidina – fenol – cloroformo. A) RNA de la línea celular JEG – 3 transfectada en ausencia y presencia de moduladores, B) RNA de la línea celular GC transfectada en ausencia y presencia moduladores. En estos gels se muestran los RNA en buenas condiciones con una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  aproximadamente.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

**4.3 Amplificación de los genes Internos hGH – V / GAPDH en JEG-3**

A partir de los RNAs del cultivo de la línea celular JEG-3 sin transfectar, en presencia y ausencia de moduladores; se sintetizaron los DNAc con la enzima transcriptasa reversa y una alícuota de este DNAc se tomó para la amplificación por PCR, en la que se utilizaron los oligonucleótidos específicos para los genes hGH – V y GAPDH. El producto de amplificación esperado era una banda de 586 pb para hGH – V y una de 1093 pb para GPDH, la primera banda no se logró detectar en los cultivos de JEG -3 tanto inducidos como sin inducir pero si se detectó la banda esperada para GAPDH, lo cual nos indicó que el RNA se encontraba en buenas condiciones (Figura 5)



**A) Sin inducir**

**B) Inducidos**

**Figura 5. Productos amplificados de hGH- V y GAPDH.** No se logró detectar una banda de 586 pb correspondiente al gen endógeno hGH – V en los cultivos de JEG – 3, la amplificación de producto de GAPDH que corresponde a la banda de 1093 pb indica que el RNA estaba en buenas condiciones. Carriles M: Marcador  $\lambda$  Pst I, 1: testigo negativo de la PCR, 2: control positivo ( cDNA de placenta) , 3 a 8 : diferentes cultivos sin inducir o inducidos con ácido retinoico, triyodo tironina y éster de forbol.

#### 4. 4 Estudios de transfección

Para determinar las condiciones óptimas para los ensayos de transfección, se probaron diferentes concentraciones de DNA transfectando los plásmidos pHGH – V -  $\beta$ -Gal (3. 3 kb) y pCMV – hGH – N en células de JEG – 3 y analizando la actividad de la enzima  $\beta$  - Galactosidasa, resultante de la expresión. y de la hormona HGH .

La influencia del la concentración del DNA se puso de manifiesto al probar 500 ng y 1  $\mu$ g de DNA por caja; al realizar los ensayos de análisis de  $\beta$  – galactosidasa se observó primero un aumento progresivo en la intensidad del color, y posteriormente al hacer la cuantificación de  $\beta$  – galactosidasa esto se puso en evidencia (Tabla 5 ).

Tabla 5. Actividad de  $\beta$ - Galactosidasa

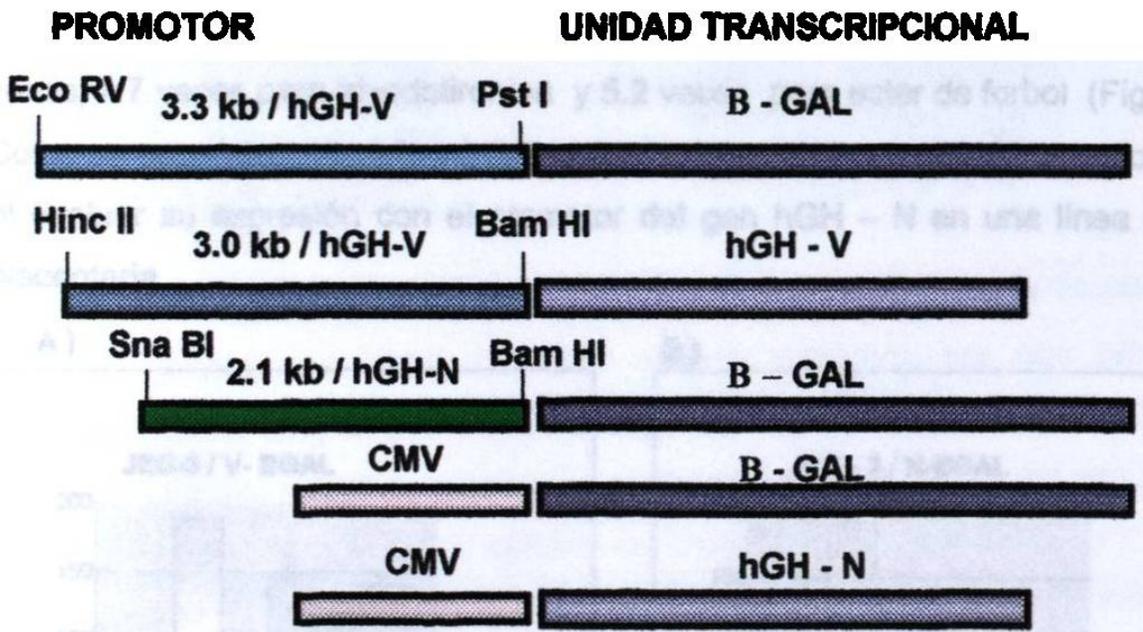
Muestra (las lecturas se hicieron por triplicado)	Actividad de $\beta$ - Galactosidasa U / $\mu$ g de prot. total
1.- Blanco	20 $\pm$ 0.38
2.- Control negativo	21 $\pm$ 0.38
3.- Control positivo (pCMVsport- $\beta$ gal)	262 $\pm$ 0.51
4.- 250 ng	208 $\pm$ 0.55
5.- 500 ng	220 $\pm$ 0.53*
6.- 1 $\mu$ g	291 $\pm$ 0.52*

Con estos ensayos, se determinó que las condiciones óptimas para los experimentos de transfección fueron 1  $\mu$ g para el plásmido pHGH – V -  $\beta$  - Gal y 500 ng para el plásmido pCMV – hGH – N. Se usaron 3  $\mu$ l de lipofectamina y 1 $\mu$ l de reactivo plus en cajas de 35 mm.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH - V en células en cultivo"

**4.4.1. Vectores utilizados para los ensayos de transfección**

Para los ensayos de transfección se usaron vectores que contienen los genes de interés para nuestro trabajo, los cuales ya se encontraban en el laboratorio de Biología Celular. (Figura 6). Se utilizaron los que contenían subclonadas las versiones mas largas subclonadas de los promotores del gen hGH - V y hGH - N, así como el gen completo del hGH - V; como controles internos de la transfección se usaron los vectores pCMV -  $\beta$ - Gal y pCMV - hGH - N (Figura 7).



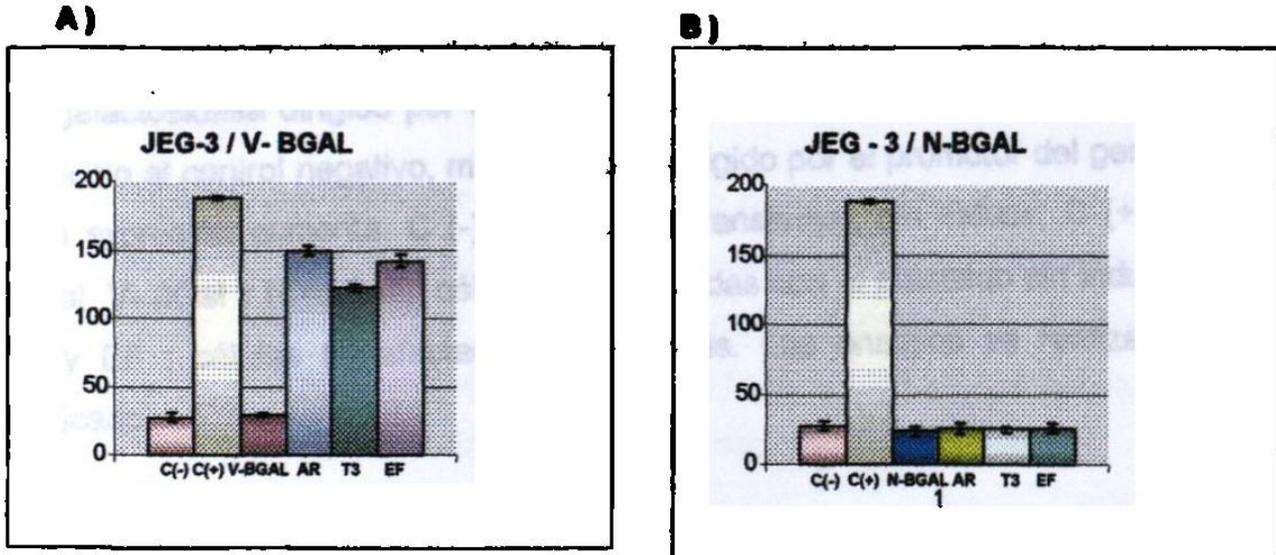
**Figura 6. Vectores utilizados en los ensayos de transfección.** Se muestra las construcciones que se usaron para llevar a cabo los ensayos de transfección. pHGH-V - $\beta$ -Gal, el cual contiene el promotor de hGH-V de 3.3 kb, pHGH-N- $\beta$ -Gal, con el promotor de hGH-N de 2.1kb, el vector que contiene el promotor de 3.0 kb y la unidad transcripcional de hGH-V y los vectores con el promotor de CMV dirigiendo las unidades transcripcionales de  $\beta$ -Galactosidasa y hGH-N.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH - V en células en cultivo"

**4. 5 Análisis de los genes reporteros  $\beta$  - Galactosidasa y hGH-N**

Se cotransfectaron los plásmidos phGH - V -  $\beta$  - Gal y pCMV - hGH-N y también phGH - N -  $\beta$  - Gal y pCMV - hGH-N en las líneas celulares JEG - 3 y GC, para evaluar la expresión tanto del promotor del gen hGH - V como del gen hGH - N en presencia de Ácido retinoico, Triyodotironina y Ester de forbol; utilizando como gen reportero a lac Z que codifica para  $\beta$  - galactosidasa.

En la línea celular JEG - 3, se observó un aumento en los niveles de expresión de  $\beta$  - galactosidasa con los diferentes moduladores con respecto a la muestra que no fue inducida, siendo para ácido retinoico un incremento de 5.76 veces, 4.7 veces para triyodotironina y 5.2 veces para ester de forbol (Figura 7). Como se esperaba, no se logró detectar expresión de la enzima  $\beta$  - galactosidasa al evaluar su expresión con el promotor del gen hGH - N en una línea celular placentaria.



**Figura 7. Análisis del gen reportero  $\beta$  - galactosidasa en la línea celular JEG - 3.** En estas gráficas se puede observar el aumento en la expresión del gen reportero  $\beta$  - galactosidasa dirigido por el promotor del gen hGH - V en JEG - 3, mientras que dirigido por el promotor del gen hGH - N la expresión no es significativa. C (-): células sin transfectar, sin inducir, C (+): CMV-  $\beta$ -gal, V-  $\beta$ Gal , N -  $\beta$ Gal : células transfectadas con el plásmido sin inducir, AR, T3 y EF : células transfectadas e inducidas. Los ensayos se realizaron por triplicado.