

## Tesis de Posgrado

# Proliferación celular y expresión de oncogenes en tejidos adenohipofisarios de rata y humanos

Cherñavsky, Alejandra Claudia

1991

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Cherñavsky, Alejandra Claudia. (1991). Proliferación celular y expresión de oncogenes en tejidos adenohipofisarios de rata y humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2383\\_Chernavsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2383_Chernavsky.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cherñavsky, Alejandra Claudia. "Proliferación celular y expresión de oncogenes en tejidos adenohipofisarios de rata y humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2383\\_Chernavsky.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2383_Chernavsky.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

TESIS

"PROLIFERACION CELULAR Y EXPRESION DE ONCOGENES  
EN TEJIDOS ADENOHIPOFISARIOS DE RATA Y HUMANOS"

Autor: Alejandra Claudia Cheravsky  
Director: Dr. José Adolfo Burdman

*Tesis.*  
*2383.*  
*y. 2*

Lugar de Trabajo: Fundación Centro de Investigaciones  
Médicas Albert Einstein. Luis Viale 2831, Buenos Aires.

A Gustavo

A Daniela

A mis Padres

-Al Dr. José Burdman, el afectuoso reconocimiento por su valiosa dirección en estos años de trabajo.

-Al Dr. Leonardo Satz, por su cordial apoyo.

-A mis compañeros de grupo: Débora Rosenthal, Gloria Machiavelli, Marisa Romano y Marisa Grattone por la amistad y colaboración brindadas. A Diana Parma por su solidaridad incondicional. A los compañeros del CIMAE, por los buenos momentos compartidos.

-A los Dres. Armando Basso, Alberto Chervin y Marcelo Vitale, por proveer material de estudio y por su interés en el desarrollo de este trabajo.

-A los laboratorios SANDOZ, Argentina y Química HÖESCHT S.A., por el financiamiento del trabajo fotográfico y de impresión de esta Tesis.

## INDICE DE SECCIONES

	PAGINA
INTRODUCCION Y OBJETIVOS	1
MATERIALES Y METODOS	52
RESULTADOS	68
DISCUSION	87
INDICE GENERAL	103
<u>APENDICES</u>	
Apéndice 1: BIBLIOGRAFIA	
Apéndice 2: ABREVIATURAS	

INTRODUCCION  
OBJETIVOS

## INTRODUCCION

El sistema neuroendocrino relaciona al Sistema Nervioso Central con las glándulas endocrinas. A través de la interacción entre estas estructuras, se integran y coordinan diversas funciones del organismo para organizar respuestas ante estímulos internos y externos. La finalidad de estos procesos integratorios es el mantenimiento de la homeostasis.

El hipotálamo ejerce un control nervioso y hormonal sobre la hipófisis, enviando impulsos hormonales y neurales a través del sistema porta vascular y del tallo hipofisario. Esto conduce a modular la actividad secretoria de la hipófisis. Las trofinas hipofisarias regulan a su vez la función y la producción hormonal de las glándulas endocrinas periféricas así como diversos procesos metabólicos.

El estado secretorio de las células hipofisarias está estrechamente ligado con los mecanismos de control de su proliferación. Como se verá a continuación, existe una íntima relación entre liberación hormonal y proliferación celular. El aumento en la liberación de una determinada hormona se acompaña de un incremento en el número de células productoras de dicha hormona. La situación opuesta también se verifica, ya que la disminución de la actividad secretoria en una dada subpoblación celular se refleja en una disminución en el número de células de la misma.

## CARACTERISTICAS ANATOMICAS, HISTOLOGICAS Y FUNCIONALES DE LA HIPOFISIS

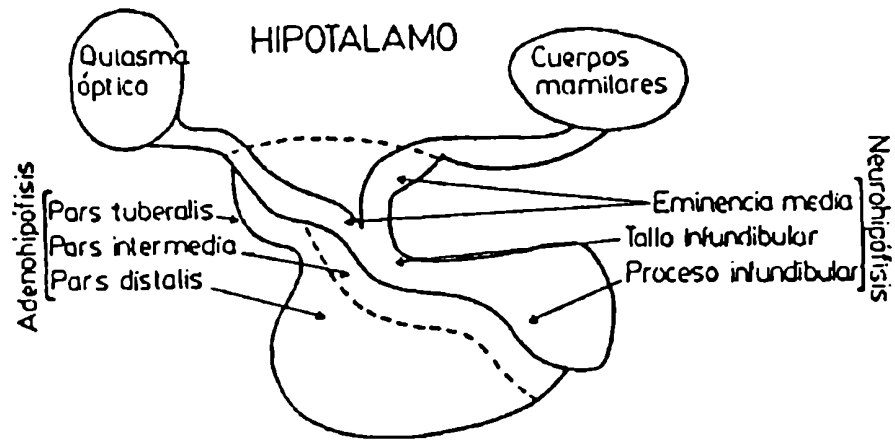
La hipófisis está localizada en la zona ventral de la cavidad craneal y unida al hipotálamo por el tallo hipofisario. Está compuesta por dos tipos celulares diferentes:

- células epiteliales, la adenohipófisis
- células neurales, la hipófisis posterior o neurohipófisis.

La adenohipófisis se puede dividir a su vez en dos sectores, la pars distalis o hipófisis anterior (APG) y la pars intermedia o hipófisis media (Figura 1).

En la APG se sintetizan por lo menos seis hormonas, de las cuales tres son polipéptidos: adrenocorticotrofina (ACTH), prolactina (PRL) y somatotrofina u hormona de crecimiento (GH), y tres son glicoproteínas

**Figura 1:** Esquema de las distintas partes de la hipófisis en los mamíferos.





complejas luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) y tirotrófina (TSH).

La irrigación de la adenohipofisis se realiza principalmente por un sistema denominado porta hipotálamo-hipofisario, que conecta la red capilar del hipotálamo ventro-medial con la red capilar adenohipofisaria. El flujo de sangre de los vasos se realiza en ambas direcciones, es decir de hipotálamo a hipofisis y de hipofisis a hipotálamo. Esto permite la llegada a la hipofisis de los factores humorales hipotalámicos que modifican la liberación de las trofinas hipofisarias y a su vez facilita la llegada de las hormonas hipofisarias al sistema nervioso para regular su propia secreción (Houssay y col., 1935; Bergland y Page, 1979).

El hipotálamo modula la actividad de la APG a través de un conjunto de sustancias denominadas factores liberadores o inhibidores de la secreción hormonal. Estos se sintetizan en los núcleos hipotalámicos, se depositan en la eminencia media y de ahí se liberan a la circulación portal.

### TIPOS CELULARES DE LA ADENOHIPOFISIS

La composición celular de la hipofisis anterior es heterogénea. Los diversos tipos celulares se han clasificado y caracterizado de diferentes maneras para su identificación. Originalmente se dividieron de acuerdo con sus propiedades tintoriales en: cromóforas, acidófilas y basófilas. Más tarde se las caracterizó de acuerdo con métodos histoquímicos (Herlant, 1960) y por sus características morfológicas, por microscopía electrónica. Entre estas últimas, ha resultado muy útil la caracterización del tamaño de los gránulos de secreción en las células que producen diferentes hormonas (Herlant, 1964). Finalmente, por medio de técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica se pudo localizar directamente a las hormonas producidas por cada tipo celular (Marshall, 1951; Nakane, 1970). De esta manera se puede hablar de células adrenocorticotrofas, somatotrofas, tirotrofas, prolactinicas y gonadotrofas, siendo estas últimas las únicas células que podrían secretar dos hormonas (FSH y LH) (Nakane, 1970; Dacheux y col., 1976). La producción de LH y FSH por un mismo tipo celular fue corroborado posteriormente mediante el uso de anticuerpos

monoclonales. (Kofler, 1982).

Nakane y col. (1977) determinaron por inmunocitoquímica los diferentes tipos celulares en la adenohipofisis de ratas macho adultas. Ellos observaron que el 26 % son somatotrofas, 24 % prolactínicas, 29 % gonadotrofas, 15 % corticotrofas, 7 % tirotrofas y un 4 % no se tiñeron con los antisueros contra las hormonas hipofisarias. Estas observaciones no concuerdan con los resultados de otros autores que han encontrado que en ratas macho adultas el 40 % de las células corresponde a somatotrofas y solo el 15 % a células prolactínicas. Estos mismos autores encontraron que en ratas hembra adultas disminuye el porcentaje de células somatotrofas a un 25 % y aumenta el de células prolactínicas (25 %) (Sasaki, Sano, 1980; Takahashi y Kawashima, 1982). Esto podría ser debido a la pronunciada influencia estrogénica en las hembras luego de la pubertad. Según otros estudios el porcentaje de células gonadotrofas (15 %) es similar en ratas macho y hembra y no cambia durante el ciclo estrual (Dada y col., 1983).

Se ha demostrado que el 75 % de las células gonadotrofas contienen FSH y LH, mientras que el 11 - 14 % contienen una sola de las gonadotrofinas. (Childs y col., 1981).

El porcentaje de estos tipos celulares cambia en diferentes condiciones fisiológicas o experimentales. Por ejemplo durante la lactancia o luego del tratamiento con estrógenos se incrementan las células prolactínicas (Pérez y col., 1985); la adrenalectomía aumenta la proporción de células ACTH (Stepien y col., 1981); la tiroidectomía incrementa el porcentaje de células tirotrofas (Astier y col., 1980), mientras que la castración aumenta el número de células gonadotrofas (Romano y col., 1984).

#### CICLO CELULAR

Una propiedad imprescindible para todas las células en crecimiento, es la capacidad de duplicar su ADN genómico y transmitir una copia idéntica a cada una de las células hijas. Así, todas las células en crecimiento atraviesan "ciclos".

El "ciclo celular" se divide en cuatro fases:  $G_1$  (gap 1), S (Síntesis de ADN),  $G_2$  (gap 2) y M (mitosis).  $G_1$  es el periodo comprendido entre el fin de la fase M y el inicio de la fase S.  $G_2$  es el periodo comprendido entre el fin de S y el comienzo de la fase M.

Para la mayor parte de las células en cultivo el intervalo de tiempo entre dos divisiones sucesivas es de diez a treinta horas. Dependiendo del tipo celular, la duración del periodo S es de seis a ocho horas, para  $G_2$  es de dos a seis horas, y para M es de aproximadamente una hora.  $G_1$  es el periodo de duración más variable, y en consecuencia el que define la duración global del ciclo celular. Las células en cultivo que carecen de nutrientes o de factores de crecimiento u hormonales, generalmente se arrestan en un estado de quiescencia llamado  $G_0$  (Cooper, 1979; Scott et al, 1982). El estímulo para retomar el ciclo celular puede ocurrir por adición de factores de crecimiento, nutricionales u hormonales, por pequeñas variaciones en el PH, u otros cambios ambientales diversos. Esto produce un retorno a la fase  $G_1$  que ocurre con aumentos en la síntesis de ARN y proteínas, y con cambios transitorios en la activación génica.

Por otra parte, las células ciclotantes atraviezan periódicamente la fase  $G_1$  sin pasar necesariamente a través de  $G_0$ . Estas expresan característicamente un grupo de genes llamados "ciclo-dependientes".

A continuación se esquematiza un patrón de activación génica temporal prototipo, asimilable a diversos tipos celulares de mamíferos (humanos, ratón, hámster) y que comprende la transición de  $G_0$  a S (Denhardt et al, 1986) (Figura 2)

Los genes "ciclo-dependientes" que pertenecen a los grupos I, II, III y IV se agrupan en base a dos parámetros :

- Inicio de su actividad transcripcional
- Periodo de mayor concentración citoplasmática de sus transcritos

Los genes que se subrayan son los genes tipo de cada uno de los grupos. Todos ellos son c-onc's. Los cultivos se sincronizaron de modo diferente en cada caso. Esto introduce un margen de error en la asignación del momento específico de la expresión de los genes individuales. Los grupos I y II son los llamados genes "tempranos". Particularmente el grupo

I comprende genes "inmediatamente tempranos" puesto que su activación ocurre a los pocos minutos luego del estímulo proliferativo. Los genes de ambos grupos son inducidos o aun superinducidos cuando se agrega un inhibidor de la síntesis proteica tal como la cicloheximida junto con el agente mitogénico. Esto sugiere que su activación es de tipo transcripcional. Los genes de los grupos III y IV dependen de la síntesis proteica para su inducción total, de modo que los factores regulatorios necesarios para su activación deben ser sintetizados durante la fase  $G_1$  precedente.

La clasificación de los distintos genes dentro de un determinado grupo no significa que dicho gen presenta un pico de expresión, ya que para muchos de éstos, el incremento transcripcional es sostenido a través de todo el ciclo celular. En este último caso, el criterio por el cual se los agrupo fue el inicio de su actividad transcripcional.

A lo largo del ciclo celular existen ciertos puntos de control que se definen en función de las señales externas requeridas para la transición a través de ellos.

La figura 3 corresponde a fibroblastos BALB/c3T3 en activa proliferación (ciclo externo) y a su retorno a través del ciclo celular a partir de un estado de quiescencia (ciclo interno).

En el caso de las células ciclantes, durante cada ciclo se induce un estado de "competencia" que posibilita el tránsito a través del ciclo posterior (Sherr et al, 1979). Esto permite un estado proliferativo continuo.

Se clasifican como "Puntos de restricción" en el ciclo celular a aquellos puntos en los cuales las células pueden ser arrestadas en ausencia de factores de crecimiento o nutrientes adecuados. Están indicados en el esquema los puntos "V", "W" y "R" así como los factores de crecimiento necesarios para superar la restricción que éstos imponen.

El primer punto restrictivo se denomina "V" y está indicado en la figura aproximadamente en la mitad del periodo  $G_1$  (Tushinsky and Warner, 1982).

"W" es otro punto restrictivo que se señala en la figura inmediatamente antes del comienzo de la fase S (Campisi and Pardee, 1984; Leof et al, 1982). Las células deprivadas de nutrientes se arrestan en este punto.

Aproximadamente dos horas antes de "W", se señala el punto restrictivo "R", el pasaje a través del cual depende de una síntesis proteica activa conjuntamente con la acción de factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento, los puntos restrictivos o la duración de cada fase, no pueden extrapolarse a otros tipos celulares puesto que son específicos para cada caso particular.

En conclusión, la regulación de la proliferación celular depende de un adecuado patrón temporal de expresión de múltiples genes. La desregulación en algún punto del ciclo celular puede contribuir al desarrollo de un estado neoplásico.

Como ya se destacó en la figura 2, los cuatro grupos de genes I, II, III, y IV poseen como prototipo respectivo a un protooncogen. Por esta razón el estudio de dichos genes celulares es de fundamental importancia y será en consecuencia discutido más ampliamente a continuación.

### REGULACION DE LA PROLIFERACION ADENOHIPOFISARIA

En la adenohipofisis (APG) de un animal adulto, el índice de proliferación celular es muy bajo. Hasta hace pocos años se pensaba que las células adenohipofisarias no se dividían (Sveringhaus, 19370; Leblond and Walker, 1976; Fand et al, 1967).

Crana y Looms en 1967, determinaron la incorporación de  $^3\text{H}$  al ADN en la adenohipofisis de ratas macho adultas, un parámetro que indica la existencia de un proceso activo de síntesis de ADN. Observaron una disminución de la incorporación del precursor acompañada por cambios en el índice mitótico y por variación en la actividad de enzimas relacionadas con el proceso de síntesis de ADN en función de la edad del animal (Hunt, 1943; Mastro y Hymer, 1973; Kalberman et al, 1979).

Figura 2. Orden temporal de expresión génica en fibroblastos de ratón.

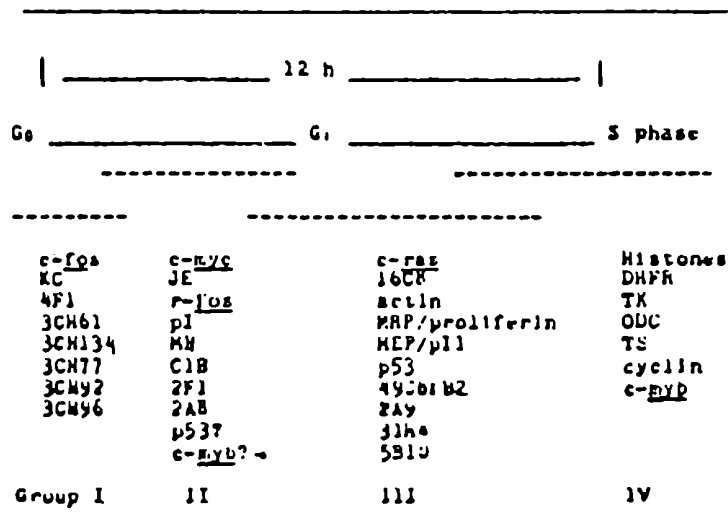
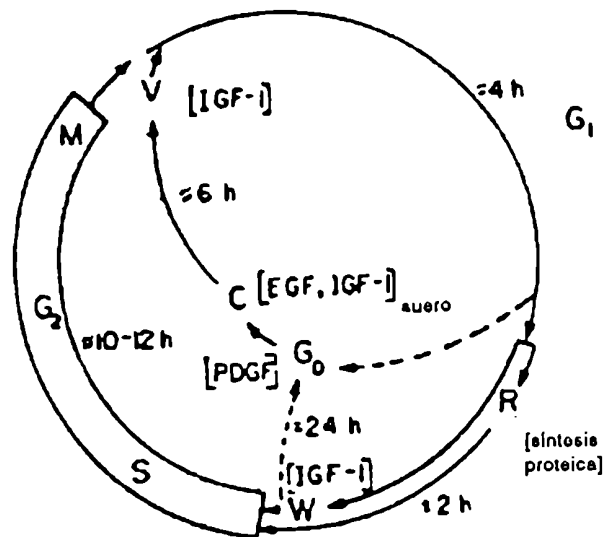


Figura 3: Puntos de control en el ciclo celular.



Estudios sobre síntesis de ADN y actividad ADN-polimerasa soluble en la APG de rata durante el desarrollo postnatal indicaron que existe una disminución aproximadamente paralela entre la síntesis de ADN y la actividad enzimática citada durante los primeros treinta días de vida de la rata (Kalberman et al 1979).

En la rata macho adulta, el índice mitótico varía siguiendo un ritmo circadiano en el cual el pico de mayor proliferación ocurre a las seis horas y el de menor proliferación ocurre a las once horas (Novet y kujas, 1975).

Los cambios en la síntesis de ADN adenohipofisario también se encuentran asociados con ciertas variaciones en el estado fisiológico del animal adulto. Así, durante el ciclo estral de la rata se observa un aumento en el número de núcleos que sintetizan activamente ADN y también en el índice mitótico durante el estro (Hunt and Hunt, 1966, Crane and Loomes, 1967). La preñez y la lactancia constituyen otras situaciones fisiológicas en las cuales ocurren cambios a nivel de la síntesis de ADN (Hunt, 1943, 1949; Hunt and Hunt, 1966).

Los estados fisiológicos mencionados que corresponden a los diferentes estados reproductivos en la rata, se caracterizan por cursar con importantes variaciones en la secreción de hormonas hipofisarias.

Se puede afirmar que toda vez que una situación fisiológica o un determinado tratamiento farmacológico involucre la liberación de hormonas hipofisarias, ocurre un aumento en la APG de la síntesis de la trofina en cuestión y de la proliferación de la población celular específicamente productora de la hormona volcada hacia la circulación sanguínea.

A continuación se enumeran y se describen brevemente algunos tratamientos farmacológicos o quirúrgicos que ejemplifican el concepto general enunciado :

A) La administración prolongada de estrógenos produce un aumento en la liberación de prolactina. Esta se acompaña de un efecto estimulador sobre la proliferación celular hipofisaria, particularmente sobre la población de células prolactínicas (Wolfe, 1935; Stevens y Helfenstein, 1966; Gersten y Baker, 1970; Lloyd et al, 1973 a y b). Se observa así la aparición de tumores prolactínicos al tiempo que los demás tipos celulares remiten (Clifton and Meyer, 1956; Furth and Clifton, 1966; Kaplan and De Nicola, 1976).

B) La castración produce un incremento marcado en la liberación de gonadotrofinas. Esta se acompaña de un aumento en la síntesis de ADN, en el índice mitótico, en el número de células LH (células gonadotropas) y en el peso de la APG, particularmente de las células gonadotropas (Hymer et al, 1970; Pomerat, 1941; Romano et al, 1984; Machiavelli et al, 1985). Estos efectos pueden ser revertidos luego de la administración de dihidrotestosterona (DHT) que constituye una terapia de reemplazo de los esteroides gonadales (Romano et al, 1984). Se ha descrito la formación de tumores hipofisarios en ratones, varios meses después de la castración (Dickie and Wooley, 1949).

C) La adrenalectomía bilateral produce un aumento en la secreción de ACTH acompañado de un aumento en la síntesis de ADN adenohipofisario. Estos efectos son revertidos luego de la administración de hidrocortisona (Crane and Looms, 1967; Stepien et al, 1981). También ha sido descrita la aparición de tumores hipofisarios adrenocorticotrofos en pacientes luego de la adrenalectomía bilateral (Nelson et al, 1960).

D) La tiroidectomía o las deficiencias tiroideas incrementan la secreción de TRH y consecuentemente el tenor sérico de TSH y PRL (Surks and Oppenheimer, 1976; Harris et al, 1978). A nivel de la APG, este aumento en la liberación de TRH se acompaña de un efecto mitogénico que resulta en la hiperplasia de la población celular tirotrófica y/o proláctínica. Este efecto puede ser revertido luego de la administración de tiroxina (Paswlikowski et al, 1975). Se ha descrito la formación de tumores adenohipofisarios de este origen tanto en humanos como en animales de experimentación (Leiba et al, 1960; Melnik and Greer, 1965).

Los ejemplos mencionados justifican la afirmación de que la estimulación de la liberación de hormonas hipofisarias se acompaña de un aumento en la síntesis de ADN de una determinada subpoblación celular, la productora de la hormona en cuestión, y de su proliferación. Cuando el estímulo es lo suficientemente intenso y prolongado, se puede llegar hasta la formación de un tumor hipofisario.



En virtud de los antecedentes expuestos y dado que nuestro laboratorio está interesado en la patogénesis de los tumores hipofisarios, se estudió el papel que tendría la liberación hormonal sobre la proliferación de las diversas células adenohipofisarias.

Las células prolactínicas constituyen el origen más frecuente de los tumores hipofisarios. Los estrógenos son importantes estimuladores de la liberación de prolactina y de la proliferación de lactotrofos (Perez et al, 1985). La administración crónica de estrógenos determina una marcada hiperplasia de la glándula que tal como se mencionó anteriormente puede culminar con la formación de tumores hipofisarios en la rata (Clifton and Meyer, 1956).

En nuestro laboratorio se estudió el efecto de los estrógenos y de los agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la síntesis de ADN (Kalberman et al, 1979 a y b) y sobre el número de mitosis en las células prolactínicas (Perez et al, 1985). Se postuló la existencia de un mecanismo de control de la proliferación de las células prolactínicas dependiente de la liberación hipofisaria de prolactina. La acción estimuladora de los estrógenos sobre la síntesis de ADN y la proliferación celular hipofisaria se ejercería solamente si la glándula es capaz de liberar prolactina. Así, los agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, lisuride) que inhiben la liberación de prolactina, suprimen el efecto mitogénico de los estrógenos sobre las células prolactínicas. Las drogas liberadoras de prolactina (sulpirida, haloperidol,  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-p-tirosina) lo potencian (Burdman et al, 1979, 1980, 1982; Jahn et al, 1980, 1982; Machiavelli et al, 1982).

También se observó que las drogas dopaminérgicas y antidopaminérgicas afectan la concentración de receptores estrogénicos en la adenohipofisis. Cuando disminuyen los niveles de dopamina por administración de  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-p-tirosina, un inhibidor de su síntesis, (Szijan et al, 1985) o se bloquean sus receptores en la APG, por administración de sulpirida, aumenta la concentración de receptores estrogénicos nucleares. De esta manera, aumentarían también los efectos que ejercen los estrógenos sobre las células prolactínicas, tales como el aumento en la síntesis y liberación de prolactina y la proliferación celular hipofisaria. Así también la administración de bromocriptina previene el aumento en la unión de [<sup>3</sup>H]estradiol producido por la  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-p-tirosina. Dicho efecto no se observa cuando el antagonista dopaminérgico se administra a ratas no tratadas.

Estos resultados sugieren que la dopamina puede regular los efectos biológicos del estradiol en la adenohipofisis a nivel de las células prolactínicas, a través de la disminución de la unión de la dopamina a sus receptores.

Se han descrito brevemente las diversas situaciones fisiológicas en las que se producen aumentos en la actividad proliferativa de diferentes subpoblaciones celulares en la APG de la rata. En el presente estudio es de particular interés la comparación de dos de dichas subpoblaciones: las células gonadotropas y las células prolactínicas. Una de las diferencias más importantes entre ellas es la frecuencia con que desarrollan tumores. De este modo, las células prolactínicas, tal como se mencionó anteriormente, presentan una fuerte tendencia al desarrollo de adenomas, mientras que en las células gonadotropas el proceso tumorigénico es infrecuente.

Estudios "in vivo" realizados en ambas subpoblaciones celulares indican que existe un periodo "lag" de aproximadamente veinte horas entre el inicio del estímulo proliferativo y el comienzo de la síntesis de ADN (Kalberman et al, 1979; Machiavelli, 1985). Observaciones similares fueron reportadas en diferentes sistemas estimulados a proliferar (Baserga et al, 1971).

### CONCEPTOS Y DEFINICIONES PRELIMINARES

El crecimiento y la diferenciación celular son procesos complejos coordinados por medio de numerosos factores. El desencadenamiento de un tumor es debido generalmente a la pérdida de los mecanismos regulatorios que operan en condiciones normales. (Land et al, 1983; Thompson et al, 1989). Luego de un evento inicial desencadenante, los procesos tumorales se desarrollan en etapas sucesivas. Un grupo de genes involucrado en la progresión tumoral son los protooncogenes.

Se clasifican como protooncogenes celulares (c-onc's) a genes celulares que posean alguna de las siguientes características:

- ser progenitores de los genes virales (v-onc's) presentes en el genoma de ciertos retrovirus.
- genes que luego de sufrir modificaciones generalmente pequeñas que serán descriptas a continuación, dan origen a oncogenes activos.

De acuerdo con el modo en que se los ha identificado se denominan "genes transformantes" a aquellas secuencias provenientes de ADN tumoral, con capacidad de transformar células normales en tumorales luego de un proceso de transfección. Con un criterio más amplio de clasificación, éstos pueden ser considerados como provenientes en última instancia de protooncogenes celulares.

Los c-onc's se comportan de manera típicamente Mendeliana tanto en su patrón de ocurrencia como en su segregación. Ocupan posiciones constantes dentro del genoma de una especie particular y están presentes en todos los miembros de la misma. Su tamaño oscila entre unas pocas o hasta 40 Kpb. Presentan un número variable de intrones en su versión celular. No hay intrones en la versión retroviral. El tamaño individual de dichos intrones también es muy variable aun dentro del mismo c-onc (Gohff et al, 1980; Vennstrom and Bishop, 1982). Otro de sus rasgos característicos es su amplia conservación evolutiva (Stehelin et al, 1976; Spector, 1978; Bishop et al, 1981). Esto sugiere que dichos genes son vitales para las especies en que se encuentran. Los siguientes, son algunos ejemplos de c-onc's altamente conservados sobre los cuales ha operado una fuerte presión selectiva en el transcurso de extensos períodos evolutivos.

- el gen c-myc está presente en los genomas de pollo, rata, ratón o humano.

-la familia de genes c-ras está presente en los genomas de ratón, rata, humano e insectos. Su presencia en insectos sugiere que hubo una duplicación ancestral del gen, previa a la radiación evolutiva que originó a este grupo de organismos.

-c-fps y c-fes que son dos versiones del mismo c-onc, en aves y en felinos (Shibuya et al, 1980 y 1982, Shibuya y Hanafusa, 1982).

Todos los c-onc's descritos hasta el presente, fueron encontrados en tejidos normales y tumorales (Ellis et al, 1983).

Su patrón de expresión es similar al de otros genes celulares. Se transcriben y originan especies de ARN precursoras nucleares con intrones y exones, y eliminan exones durante la maduración previa a alcanzar su localización final citoplasmática (Gonda et al, 1980). En función de estas características, los protooncogenes no pertenecen al grupo de los pseudogenes genómicos.

### FUNCIONES DE LOS PROTOONCOGENES CELULARES:

#### CLASIFICACION

Una de las estrategias para el estudio de las funciones de los c-onc's, consiste en la producción de antisueros inmunoreactivos utilizando los productos de v-onc's, proteínas virales con función transformante. Estos antisueros generalmente reconocen a los productos de c-onc's homólogos. Luego de la identificación, se realizan estudios bioquímicos tendientes a su caracterización funcional. La mayor dificultad que se encuentra está dada por su baja disponibilidad en células normales.

Se puede clasificar a los productos provenientes de c-onc's de acuerdo con su función o con su localización subcelular.

Por su localización, se distinguen proteínas nucleares caracterizadas por su capacidad de unión al ADN, y otro grupo más heterogéneo en sus funciones, constituido por proteínas de localización extranuclear. En el primero, se encuentran los productos de c-fos (Curran et al, 1984), c-myc (Evan and Hancock, 1985), L-myc (Nau et al, 1986), N-myc (Slamon et al, 1986a), c-myb (Slamon et al, 1986b) y erb A (Green et al, 1981), entre otros. El segundo grupo comprende proteínas con función de kinasas específicas de residuos

tirosina o de serina/treonina. Así, fosforilan residuos tirosina los productos de c-abl (Koda et al, 1985), c-erb B (Downward et al, 1984), c-fms (Rettenmier et al, 1985), c-fps (res) (Roebroek et al, 1985), met (Dean et al, 1985), neu (Klotzer et al, 1986) y c-src (Land et al, 1983), mientras que actúan sobre residuos serina/treonina los productos de c-mos (Klotzer et al, 1983) y c-raf (Bonner et al, 1986).

Es notable la diversidad de productos protooncogénicos con función tirosina-kinasa dado que sólo el 0,01% de los fosfoaminoácidos que constituyen las proteínas celulares son fosfotirosinas (Huntert y Sefton, 1980). Esto sugiere que a través de la fosforilación de residuos tirosina puede ejercerse una eficiente regulación de múltiples vías metabólicas.

Este grupo de protooncogenes también incluye a productos relacionados con factores de crecimiento o con sus receptores, importantes desde el punto de vista del control de la proliferación y de la diferenciación celular. Así, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF (Rao et al, 1986), el factor de crecimiento epidérmico, EGF (Bargmann et al, 1986) o el factor estimulador de colonias en macrófagos, M-CSF (Sherr et al, 1985) constituyen algunos ejemplos.

Los factores de crecimiento gobiernan procesos mitogénicos. Esta importante función involucra en muchos casos la acción concertada de ciertos protooncogenes. El PDGF es un buen ejemplo ya que una de sus subunidades funcionales está codificada por el protooncogen c-sis y su proteína receptora en membrana, está codificada por un miembro de la familia del protooncogen c-src. La interacción receptor-ligando desencadena la expresión de otro conjunto bien definido de protooncogenes celulares tales como c-myc y c-fos (Stiles, 1985).

Como contrapartida a la inducción de la expresión de protooncogenes en respuesta a la acción de factores de crecimiento, hay una disminución de dicha expresión para algunos c-onc's (c-myc y c-Ha-ras), en respuesta a la acción de interferones. Estos últimos poseen la característica fundamental de modular negativamente el crecimiento celular (Clemens, 1986).

Se ha mencionado una de las funciones más generales de los protooncogenes: su participación en procesos de proliferación celular. En vertebrados así como entre los eucariotas inferiores (Reymond et

al,1986), la diferenciación celular involucra frecuentemente la participación de c-onc's. A continuación se señalan algunos ejemplos:

-Cuando se induce la diferenciación a macrófagos a partir de células indiferenciadas se comienza a expresar el protooncogen c-fos inmediatamente pero en forma transitoria (Mitchell et al,1986). También está involucrada la participación de c-fps y de c-fes (Carmier y Samarut,1986).

-En algunas células hematopoyéticas, la diferenciación terminal se encuentra bajo control de interferón endógeno. Este actúa como factor autocrino responsable de la disminución en la expresión de c-myc y del cese de la actividad proliferativa. El tratamiento con anticuerpos antiinterferón bloquea ambos efectos e impide concomitantemente la diferenciación (Retznitzky et al,1986).

-Un sistema de diferenciación "in vitro" es la línea eritroide murina F-mel. Distintos inductores de dicha diferenciación, tienen a la vez efectos moduladores sobre la expresión de c-myc, provocando una expresión bifásica. Cuando se impiden las fluctuaciones tempranas o se provoca una expresión constitutiva de este protooncogen, se interrumpe también el proceso de diferenciación (Kukowska and Prochownick,1986; Coppola and Cole,1986).

-El protooncogen c-fos participa directamente de la regulación de genes cuyo patrón de expresión varía en el curso de la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos, actuando como factor transcripcional (Distel et al,1987). Ha sido también involucrado este protooncogen en procesos de diferenciación de otros tipos celulares. Más adelante se mencionarán algunos ejemplos al referirnos a las funciones del protooncogen c-fos.

### MECANISMO DE "ACTIVACION" DE PROTOONCOGENES CELULARES

En su forma nativa, los protooncogenes celulares son incapaces de producir transformación celular (Bishop, 1987; Cooper, 1982). Sin embargo el genoma de muchas células tumorales posee oncogenes activos. Se identificaron secuencias transformantes en neoplasias de ratón, rata, pollo y humanas. Específicamente nos referimos a aquellos tumores que no reconocen un origen viral ya que en este último caso el mantenimiento del estado de transformación se debe a la integración de v-onc's.

Se demostró que toda célula normal contiene genes potencialmente capaces de inducir transformación.

El término "activación" describe de un modo amplio la conversión de c-onc's en v-onc's o bien las alteraciones de estructura o de expresión que dan origen a los oncogenes celulares a partir de los protooncogenes. Esto puede ocurrir a través de mecanismos diversos y variados.

La estrategia experimental que ha permitido verificar esta hipótesis consistió en realizar transfecciones sucesivas de ADN de células normales, a fibroblastos murinos NIH3T3. Estas células se utilizan como recipientes del ADN donador debido a que su transformación se acompaña de la integración estable al genoma celular (Wigler et al, 1978). De este modo pudo observarse que fragmentos de ADN de elevado peso molecular no poseen capacidad transformadora en células normales. Esta se genera luego de su fragmentación de entre seis y sesenta veces. Cuando se repitió el procedimiento con el ADN de estas primeras células huésped en nuevos recipientes normales, se conservaba la capacidad de transformación (Cooper, 1980). Estos resultados sugirieron que:

- los genes potencialmente transformantes podían ser activados como consecuencia de rearrreglos durante la integración del ADN donador.
- la fragmentación podría disociar porciones génicas estructurales de sus secuencias de regulación normales y facilitar su recombinación con secuencias correspondientes a otros genes (Cooper, 1982).

Los siguientes son algunos de los mecanismos que conducen a la activación de protooncogenes celulares en las células normales.

-A- Activación por inserción proviral: Existen retrovirus que carecen de v-onc's en sus genomas (v-onc's<sup>-</sup>). Células en cultivo infectadas con estos virus no se transforman (Teichin, 1982). No obstante, muchos tumores sobreviven luego de la infección con retrovirus v-onc<sup>-</sup> (Varmus, 1982).

El evento primario que desencadena el proceso tumorigénico en estos casos es la activación de c-onc's debida fundamentalmente a inserciones provirales. La estimulación del gen "target" es mediada por elementos enhancer o promotores, contenidos dentro de la secuencia LTR viral (long terminal repeat) (Hayward, et al, 1981; Fung et al, 1983).

Se han encontrado v-onc's tales como v-myc, v-erb B, v-myb, v-mos, int-1 e int-11 y v-Ha-ras en tumores de diverso origen (pollo, rata, ratón, gato) y de diverso tipo (linfomas B o T, nefroblastomas, plasmacitomas, carcinomas mamarios, o fibroblastos transformados) (Varmus, 1984). La inserción proviral modifica algún aspecto de la expresión del gen target tal como la eficiencia de traducción de sus productos, o el tipo de producto final.

-B- Activación por rearrreglos genómicos: Es frecuente la translocación de c-onc's entre sitios cromosómicos distantes entre sí. Así, los c-onc's se colocan bajo el control de elementos reguladores no propios. Un caso típico es la translocación que reúne al protooncogen c-myc con loci de inmunoglobulinas en linfomas y plasmacitomas, que será discutida más adelante al mencionar específicamente a dicho c'onc.

Otro caso a mencionar es el de la leucemia mielogénica crónica. Una translocación recíproca entre el protooncogen c-abl y la región bcr (breakpoint cluster region) sobre otro cromosoma, resulta en la formación de un gen híbrido. Su producto es una proteína de fusión, que confiere el fenotipo transformado.

Los rearrreglos cromosómicos están involucrados en el desarrollo de neoplasias. Esto se fundamenta en que una gran cantidad de tumores de diverso origen (rata, ratón o humano) y tipo (linfomas, leucemias, plasmacitomas) exhiben rearrreglos de un tipo determinado en forma constante (Varmus, 1984).

-C- Activación por amplificación génica: El elevado nivel de expresión de protooncogenes en ciertos tumores, condujo a la búsqueda de una correlación con el grado de amplificación génica. En tumores de diverso origen, los



clásicos marcadores cariológicos tales como los cromosomas doble minuto(DM's) o las regiones de tinción heterogénea(HSR's)resultaron contener abundantes copias de c-onc's.Sin embargo,la amplificación de protooncogenes como mecanismo de activación de los mismos es de baja frecuencia . Solo en unos pocos casos se pudo hallar una correlación con el estadio de desarrollo tumoral.Tal es el caso de las amplificaciones de N-myc(Brodeur et al,1984),c-myc(Little et al,1983) o L-myc(Reedy,1983).

En los distintos casos en que se presentan amplificaciones el número de copias es variable,en algunos casos alcanza varios centenares (Nishimura and Sekiya,1987).

-D-Activación por una sustitución única:La familia de protooncogenes RAS ejemplifica otro de los mecanismos de activación frecuentes.Este consiste en la sustitución de un nucleótido(transiciones o transversiones)con el consecuente cambio en un aminoácido y en la función biológica del producto final.Mutaciones de este tipo fueron identificadas en tumores de rata o humanos de diverso tipo(Varmus,1984)

De modo similar,una mutación puntual en el dominio extracelular del receptor para el factor estimulante de la formación de colonias de macrófagos(CSF-1) producto del protooncogen celular c-fms,activa su potencial transformador(Roussel et al,1988).

### RETROVIRUS

Los retrovirus inducen una gran cantidad de procesos neoplásicos y están ampliamente distribuidos entre las diversas especies de vertebrados.Ya se ha mencionado que no todos los miembros de la familia de los retrovirus son patogénicos .Sin embargo todos comparten las siguientes características:

- morfología
- estructura del ARN genómico
- presencia de una ADN-polimerasa\ARN-dependiente,que se denomina Transcriptasa reversa(Baltimore,1970).

-estrategia replicativa, basada en la síntesis de un intermediario viral constituido por dos cadenas de ADN, y que se integra eficientemente dentro del ADN de la célula huésped (Bader, 1965).

-Presencia de v-onc's : algunos retrovirus poseen además de sus propios genes estructurales, secuencias muy relacionadas con genes celulares. Su presencia le confiere al virus la capacidad de inducir la transformación de células en cultivo. Por esa razón han sido denominados "genes virales transformantes" u oncogenes (v-onc's). Dichos retrovirus patógenos son v-onc's<sup>+</sup>.

Se ha propuesto que los retrovirus evolucionaron a partir de elementos transponibles. Se aislaron partículas similares a retrovirus a partir de células de *Drosophila melanogaster* (VLP, virus-like particles). Estas contenían ARN con secuencias homologas a los elementos transponibles COPIA, asociado con una proteína con actividad de transcriptasa reversa. Se postuló que las VLP podrían ser el nexo entre los transposones, capaces de rearrreglar secuencias dentro del genoma y los retrovirus, capaces de rearrreglar secuencias entre genomas (Finnegan, 1983).

Los primeros aislamientos de retrovirus datan de principios de siglo y fueron obtenidos por Payton Rous. En las últimas décadas, sus genomas han sido clonados y de esta manera se conoce con exactitud las respectivas secuencias nucleotídicas.

Existen retrovirus que permanecieron integrados en las líneas germinales de determinadas especies de vertebrados en forma de provirus endógenos, y son transmitidos verticalmente como elementos Mendelianos.

#### ORIGEN DE LOS V-ONC'S:

#### HIPOTESIS TRANSDUCTIVA

Durante mucho tiempo había sido incierto el origen de los v-onc's. Fue trascendente el hallazgo de que el genoma de aves y mamíferos contenía secuencias nucleotídicas idénticas a la secuencia del oncogen v-src presente en el genoma del virus del sarcoma de Rous (Stehelin et al, 1976; Spector et al, 1978) De este modo, comenzó la búsqueda de

secuencias homólogas con las de otros oncogenes retrovirales en el genoma celular. Dichas secuencias fueron identificadas para la mayoría de los v-onc's conocidos. Esto evidenciaba la hipótesis de que los v-onc's se originaron a partir de c-onc's (Weiss et al, 1982; Bishop, 1981).

El mecanismo que explica el origen de los v-onc's es la transducción desde el genoma celular hacia el genoma viral. Una hipótesis alternativa acerca del origen de los v-onc's es la "hipótesis del provirus" (Temin, 1980) según la cual el genoma retroviral ha sido ensamblado a partir de genes de origen celular como resultado de numerosos reordenamientos del ADN. Sin embargo, la "hipótesis transductiva" es la más ampliamente aceptada.

El vehículo transductor de información es un retrovirus cuyo provirus, constituido por dos cadenas de ADN, se integra eficientemente en el genoma celular en posición 5' respecto de un protooncogen celular, sin existir sitios preferenciales dentro del genoma huésped para dicha integración. El rearrreglo de secuencias de ADN fusiona al provirus con el protooncogen, originándose así una unidad transcripcional híbrida. La configuración obtenida con más frecuencia, comprende una porción viral 5' que contiene al promotor transcripcional, unida a una porción del protooncogen celular 3', que contiene las señales para la terminación de la transcripción. La remoción de segmentos de ADN puede originar esta configuración. La maduración de los transcritos primarios da lugar a una cadena de ARN híbrido que posee una versión incompleta del protooncogen celular, de la cual han sido removidas las secuencias intrónicas originales. La porción viral del ARN híbrido permite la encapsidación de heterodímeros dentro de las partículas virales que serán liberadas de la célula huésped. Con la reinfección de un nuevo huésped comienza el proceso de transcripción reversa que originará el intermediario viral de ADN doblecatenarío. Durante este proceso está facilitada la recombinación entre una hebra de ARN viral salvaje y una hebra del ARN viral híbrido. Así, el virión producto de dicha recombinación es portador de una copia de la porción del protooncogen celular transducida originalmente, separada de sus propias señales de inicio y de terminación de la transcripción e incluida dentro de un genoma retroviral. Esta partícula viral es generalmente defectiva para su replicación ya que frecuentemente se han perdido algunos de sus propios

genes estructurales.

El proceso de transducción es extremadamente raro. En varios niveles del mecanismo descrito surgen restricciones que determinan su rareza. Entre éstas se destacan:

-la baja probabilidad de integración en la región 5' de un protooncogen celular

-dado este primer evento, la baja probabilidad de que los rearrreglos cromosómicos resulten en una unidad híbrida con las características mencionadas.

La transducción parece ser un hecho igualmente probable para todos los genes. No hay rasgos estructurales ni de expresión que confieran a los onc's una mayor aptitud para ser adquiridos por retrovirus.

Así, todos los genes celulares son susceptibles de captura con la única condición de poseer un tamaño adecuado. El hecho que varía es la posibilidad de detectar a todo retrovirus portador de cualquier secuencia génica. Hay algunas evidencias en contra de la igualdad teóricamente postulada:

-Ha emergido repetidas veces el mismo protooncogen celular en la misma especie en ocasiones separadas.

-Han sido transducidos en la misma especie (rata), genes muy relacionados, tales como las variedades Harvey (Ha-ras) y Kirstein (Ki-ras) del protooncogen ras.

-A partir de diferentes especies ha emergido el mismo protooncogen: Ha-ras en rata y ratón, y c-fps/c-fes en aves y en felinos (Ellis et al, 1981; Shibuya et al, 1980).

-Al menos en una ocasión ha habido co-transducción de dos protooncogenes celulares distintos mediada por el virus de la eritroblastosis aviar, los genes c-erb A y c-erb B (Vennstrom and Bishop, 1982). Estos dos v-onc's se expresan como unidades transcripcionales independientes a partir del genoma del retrovirus. Ha sido aislado un caso en que sólo se movilizó el gen c-erb B a partir del genoma de pollo.

### CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE LOS V-ONC'S

-A-Pueden estar ubicados en cualquier sitio dentro del genoma viral. Su inserción generalmente determina deleciones en dicho genoma, A esto se debe la dependencia de coinfección mixta con virus "helper", proveedores de las funciones perdidas para su replicación.

-B-Están constituidos por una porción del respectivo c-onc homologó, pero siempre bajo el control transcripcional de un promotor retroviral.

-C-Salvo excepciones, como el caso de v-src, el producto de los v-onc's es una proteína de fusión tal que la proteína viral aporta las señales de inicio y fin de la traducción.

-D-El marco de lectura de los c-onc's se reconstruye en los v-onc's mediante una precisa fusión de sus exones. Los v-onc's carecen de intrones, característica común a todos los genes retrovirales pero no a los celulares.

### FUNCIONES DE LOS V-ONC'S

Las proteínas codificadas por v-onc's poseen una gran diversidad funcional. Una característica común a todas ellas consiste en su participación a distintos niveles en la diferenciación o en el crecimiento celular. Esto ocurre en tejidos embrionarios o adultos y de orígenes diversos.

Debido a su diversidad y al continuo descubrimiento de nuevos miembros de esta familia, la clasificación según su función resulta dificultosa (Bishop, 1983; Bishop and Varmus, 1982; Bishop and Varmus, 1984).

Existen productos de oncogenes que poseen las funciones que se mencionan a continuación:

-A-Factores de crecimiento (Hunter, 1985)

-B-Receptores para factores de crecimiento u hormonas (Green and Chambon, 1986)

-C-Proteínas relacionadas con la transducción de señales extracelulares hacia el núcleo (Vandembuer, 1986). Los productos de Ha-ras y Ki-ras son proteínas de 21 KDa (p21), muy similares a las p21 producto del c-onc ras. Unen fuertemente nucleótidos de guanina pero impiden su posterior hidrólisis. A través de este mecanismo, bloquean la transmisión de señales que fluye hacia el núcleo cuando está presente el producto homólogo normal, proveniente del c-onc, en respuestas mediadas por AMPc.

-D-Factores de activación transcripcional localizados en el núcleo celular (Kingston et al, 1985). La característica funcional que reúne a los productos de oncogenes de localización nuclear es la capacidad de actuar como reguladores de la actividad transcripcional. Este grupo está integrado por los productos de v-myc, v-myb, fos, N-myc, v-ski y v-erb A. Mencionaremos especialmente la función del gen v-erb A, descrito en aves (Damm et al, 1989). Esta proteína posee una alta homología con el producto de c-erb A, el receptor de la hormona tiroidea  $T_3$ . La mayor diferencia entre ambas es que v-erb A carece del dominio de unión al ligando que posee c-erb A. Como consecuencia de este hecho, v-erb A se transforma en un represor constitutivo de la transcripción del conjunto de genes normalmente controlados por el receptor de  $T_3$  y funciona como antagonista de dicha hormona. Ha sido descrita también una alta homología en muchas especies, entre el producto del oncogen v-erb A y los receptores de hormonas esteroideas (Weinberger et al, 1985; Green et al, 1986. Greene et al, 1986). Así, los oncogenes empiezan a ubicarse dentro de una familia de genes cuyos productos contribuyen a orquestar la especialización de funciones celulares entre los que se encuentra el receptor de estrógenos y el de glucocorticoides.

Por primera vez se ubica al producto de un oncogen al nivel de un grupo de proteínas que cumplen la función de adaptadores moleculares de señales extracelulares que fluyen hacia el núcleo celular (Bishop, 1986).

En contraposición con la simplicidad de la estructura de sus ligandos, estas moléculas regulatorias poseen una compleja estructura de dominios especializados en la unión al ligando, en la interacción con el

ADN y en la modulación de dicha interacción (Gehring, 1987). La existencia de proteínas oncogénicas con funciones regulatorias de la actividad transcripcional no es sorprendente dado que ésta es la última etapa de una secuencia de eventos que en conjunto controlan la proliferación y la diferenciación celular.

Los productos de protooncogenes así como los de oncogenes actúan a todos los niveles en que se ejercen dichas funciones de control.

Más adelante se volverá sobre la descripción del mecanismo de acción de los demás integrantes de este grupo de proteínas oncogénicas de localización nuclear. Esta descripción se realizará detalladamente puesto que se trata de los oncogenes que han sido estudiados particularmente en este trabajo (c-myc y c-fos).

-E-Proteínas kinasas. Estas pueden actuar sobre residuos serina y treonina (mos y raf), aunque la mayor parte de ellos actúan sobre residuos tirosina (src, yes, fes, abl, ros, fgr, erb-B, neu y fms). Algunas proteínas kinasas son a su vez receptores para factores de crecimiento (erb B, neu y fms). Se localizan en la membrana plasmática, y se autofosforilan luego de la interacción con sus ligandos. El producto del gen v-src se incluye en la membrana plasmática luego de una modificación post-traducciona que consiste en la unión covalente de ácidos grasos. Desde esta localización ejerce su acción de kinasa sobre sustratos intracitoplasmáticos.

Las otras proteínas que integran este grupo son kinasas citoplasmáticas. El producto del oncogen v-ros, una kinasa intracelular, actúa sobre intermediarios de la síntesis de fosfatidil inositol 4,5 difosfato ( $PIP_2$ ). Este glucolípido ocupa una posición central en procesos en que existe una interacción ligando-receptor a nivel de la superficie celular (Michell, 1984). Así, la ruptura del  $PIP_2$  desencadena la formación de mensajeros intracelulares que por diversas vías facilitan el flujo de información en dirección al núcleo celular. Por lo tanto, existe también una estrecha relación entre el producto de oncogenes y el "turnover" de los lípidos del inositol. Este reciclado constituye un eslabón fundamental en el control de la proliferación celular, hecho que se volverá a considerar al discutir los resultados del presente estudio.

-Factores de diferenciación celular: Existen evidencias de la participación de los oncogenes en procesos de diferenciación celular. La expresión de v-onc's interfiere o aun bloquea la diferenciación en diversos sistemas "in vitro". Esto sucede probablemente como resultado de desregulación en su expresión o de expresión en tipos celulares inapropiados (Muller, 1986). A continuación se mencionan algunos ejemplos:

-En células mieloides la diferenciación puede ser inducida "in vitro" por el factor de crecimiento estimulante de la formación de colonias de macrófagos (M-CSF). Ciertos v-onc's estarían involucrados directamente en la diferenciación de estas células, ya que su expresión reemplaza los requerimientos de M-CSF.

-Se estudió la cooperación "in vivo" de dos oncogenes, myc y ras. Estos fueron colocados bajo el control transcripcional de un promotor hormono-dependiente e introducidos en ratones transgénicos. La expresión de ambos transgenes interfirió en el proceso de diferenciación funcional e histológica de la glándula mamaria (Andres et al, 1988).

-Existe otro grupo de virus que luego de infectar células huésped son capaces de conducir a la transformación celular.

Se trata de ciertas familias de ADN-virus portadoras de oncogenes. Entre ellas se encuentran la de adenovirus, papovavirus y herpesvirus. La descripción de los mecanismos que conducen a la transformación mediada por estos agentes virales escapa de los alcances de esta introducción.

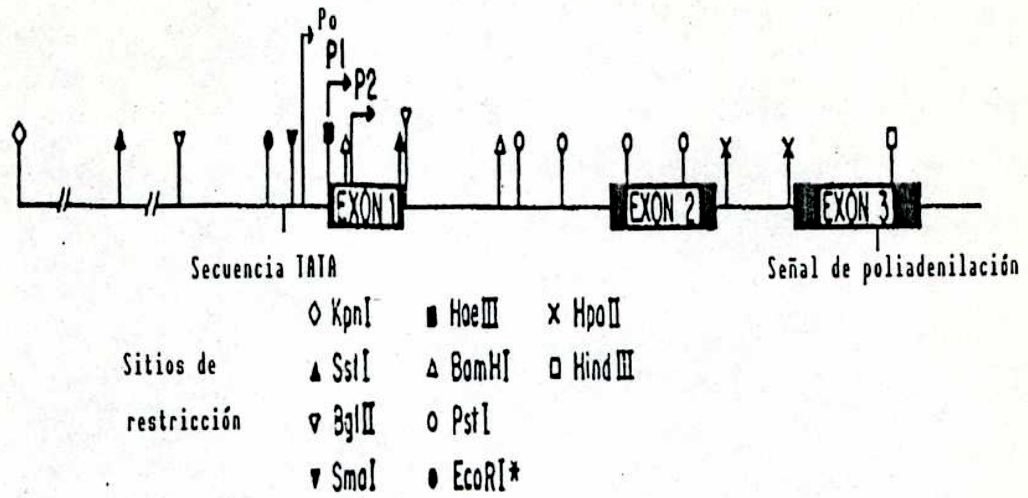
#### ESTRUCTURA Y FUNCION DEL PROTOONCOGEN C-MYC

Los virus de la mielocitoblastosis aviar (MC29) constituyen un grupo de retrovirus con capacidad de inducir un amplio rango de neoplasias que incluyen carcinomas, endotelomas, sarcomas y mielocitomatosis.

Su patogenicidad ha sido atribuida a la presencia de un único oncogen, v-myc. Este oncogen está relacionado y muy posiblemente deriva de un gen presente en el genoma de los vertebrados, el gen c-myc (Alitalo et



Figura 4: Estructura del proto-oncogen c-myc



al,1983). Otro grupo de virus aviáres, los virus de la leucosis (ALV), son agentes inductores de linfomas de células B. Aunque no son portadores del oncogen *v-myc*, el potencial transformador se relaciona con su capacidad de activación de *c-myc* luego de la infección de células huésped (Hayward et al,1981).

La estructura de *v-myc* difiere en los distintos retrovirus pudiendo presentarse fusionado a una porción del gen viral *gag* del que se origina una proteína estructural viral. En este caso se genera una proteína de fusión a partir de dicho gen híbrido, denominada  $p110^{gag-myc}$ . En otros casos se han descrito proteínas  $p90^{gag-myc}$ , o bien proteínas *v-myc* como unidad transcripcional independiente.

En células infectadas por el virus MC29, los productos  $p110^{gag-myc}$  o  $p90^{gag-myc}$  se encuentran en el núcleo, unidos al ADN con alta afinidad.

El gen *v-myc* ha sido secuenciado (Alitalo et al,1983). Posee una capacidad codificante tal que la secuencia polipeptídica deducida es un producto de 46 KDa. Este polipéptido, unido a una porción de *gag* origina la proteína mencionada,  $p110^{gag-myc}$ . La secuencia de aminoácidos de *v-myc* contiene residuos serina y treonina que son modificados por fosforilación post-traducciona.

Luego de la infección con MC29 en células de pollo, se origina un transcrito de 1,5 Kpb a partir de *v-myc*, mientras que el transcrito *c-myc* posee 2,5 Kpb. Esto sugiere que la secuencia de *c-myc* no está representada en su totalidad en el oncogen viral *v-myc*.

El protooncogen *c-myc* ha sido identificado no solamente en el genoma de aves, sino también en el de otras especies de vertebrados y su estructura resulta muy conservada a través de periodos evolutivos prolongados.

Diversos estudios estructurales indicaron la existencia de dos regiones promotoras  $P_1$  y  $P_2$  distanciadas por 160 pb, ambas en el primer exón. A partir de ellas se transcriben dos especies de ARNm de 2,4 y 2,2 Kpb respectivamente (Battey et al,1983). En células linfoblastoides y en fibroblastos predomina el transcrito proveniente de  $P_2$ . En distintas líneas provenientes de linfomas de Burkitt esta proporción se revierte pudiendo llegar a ser mayor el uso de  $P_1$  sobre  $P_2$  (Taub et al,1984). Existe una tercera zona promotora ubicada fuera del primer exón, 5' de los promotores  $P_1$  y  $P_2$ , que se denomina  $P_0$ .

El gen c-myc humano se localiza en el segmento q24 del cromosoma 8. Se ha realizado su clonado molecular a partir de una librería de cADN obtenida en células leucémicas de la línea K562 (Watt et al, 1983a). Estos primeros estudios indicaban la existencia de una secuencia nucleotídica de 2121 pb y de un producto proteico de 46 KDa. Las diferencias entre el gen v-myc y el c-myc humano estarían constituidas por unas pocas adiciones o deleciones de aminoácidos. La región secuenciada representaba solo la porción 3' del c-myc humano. Estudios adicionales completaron la información acerca de su estructura (Figura 4).

Este gen consta de tres exones y dos intrones. La extensión entre la secuencia TATA, 5' del sitio de inicio de la transcripción, y la secuencia señal para la poliadenilación, es de 5200 pb (Watt et al, 1983b). Además de la secuencia consenso TATA, se han identificado en la misma zona promotora otras secuencias de unos pocos nucleótidos con posible función regulatoria.

Determinada la secuencia nucleotídica del protooncogen humano, se comenzó a estudiar sus productos proteicos. Dada la alta conservación entre especies se trabajó con anticuerpos dirigidos contra los productos de v-myc o c-myc de pollo para reconocer y aislar específicamente a los productos provenientes del c-myc humano (Ramsay et al, 1984). Dichos antisueros reconocieron dos fosfoproteínas, la más abundante de 62 KDa y la especie minoritaria de 66 KDa. Los tamaños de estas proteínas fueron deducidos de estudios de movilidad electroforética y difieren de los tamaños predichos a partir de los estudios de secuencia (Watt et al, 1983). Estas discrepancias fueron observadas también en otras especies, pudiendo deberse a alguna propiedad física particular de c-myc, aun no descripta.

Los polipéptidos pp66<sup>c-myc</sup> y pp62<sup>c-myc</sup> poseen una corta vida media, de 30 minutos aproximadamente. La velocidad de síntesis y degradación es la misma para ambos.

La proteína proveniente del gen c-myc humano existe como un oligómero "in vitro". El dominio de oligomerización se encuentra en la porción COOH-terminal de cada monómero, que presenta una estructura típica para cumplir esta función, del tipo "zipper de leucina" (Dang et al, 1989).

La capacidad codificante de c-myc humano y de su contraparte en ratón reside enteramente en el segundo y tercer exón, los cuales además presentan el mayor grado de conservación evolutiva. El primer exón, con una extensión aproximada de 564 pb en la versión humana, tiene una capacidad potencial para codificar un polipéptido de 188 aminoácidos.

Se identificaron dos proteínas, de 32 kDa y de 58 kDa respectivamente, provenientes del primer exón humano (Gazin et al, 1986). Es difícil aún asignarles una función. Se propuso que el primer exón del c-myc humano ejercería un control sobre la activación transcripcional o sobre la vida media de los transcritos que se originan a partir de los otros exones. No resulta sencillo concebir que en un genoma tan complejo como el eucariote, exista una asociación topológica entre dos polipéptidos aparentemente independientes como serían el proveniente del primer exón y el proveniente del segundo y tercero.

En las otras especies descritas, el primer exón posee gran diversidad. Carece de capacidad codificante y constituye una extensa secuencia "leader" no traducida.

Para estudiar la localización subcelular del producto de pp62<sup>c-myc</sup>, células de origen humano fueron incubadas durante un tiempo corto con precursores proteicos radiactivos. Se realizó un fraccionamiento subcelular y estudios de microscopía de complejos inmunofluorescentes. El polipéptido pp62<sup>c-myc</sup> es rápidamente translocado hacia el núcleo celular luego de su síntesis. En un principio se asoció dicha proteína a la matriz nuclear. Una posterior purificación de subfracciones del compartimiento nuclear, indicó que dicha asociación se pierde luego de introducir variaciones en las concentraciones salinas o en el pH durante la obtención de subfracciones. Esta posibilidad de modular la localización subnuclear de pp62<sup>c-myc</sup> "in vivo" le confiere un rasgo regulatorio adicional, por compartimentalización, más aun considerando que el reciclado de esta proteína en el pool celular es muy rápido (Evan and Hancock, 1985).

Un sistemático análisis mutacional permitió definir correlaciones entre cambios en la estructura primaria del gen c-myc y cambios en algunas de sus funciones. Así se definen dos regiones:

-Región responsable de la transformación de células embrionarias normales cuando se expresan c-myc y c-ras conjuntamente (co-transformación).

-Dos regiones asociadas con el correcto transporte de la proteína hacia el núcleo.

Debe destacarse que las regiones de c-myc humano imprescindibles para ambas funciones son las regiones también más conservadas evolutivamente (Stone et al, 1987, Dang and Lee, 1988).

Fue clonada una región del genoma de rata que contiene al gen c-myc (Hasashi et al, 1987). El segundo y tercer exón tienen capacidad codificante y poseen elevada homología con los genes murino y humano. Considerando la distancia evolutiva entre estas dos especies, una dada secuencia de ADN libre de presión selectiva debería ser absolutamente diferente para ambas.

El primer exón tiene codones sin sentido en todos los posibles marcos de lectura y carece de codones de inicio de la transcripción, y en consecuencia de capacidad codificante. Presenta una menor homología con los genes c-myc de las otras especies estudiadas. A nivel de intrones y de las zonas 5' del inicio transcripcional también hay alta conservación entre los genes de rata y humano. La gran conservación evolutiva del gen c-myc en secuencias fuera de la región codificante sugiere mecanismos regulatorios comunes.

#### REGULACION DE LA EXPRESION DE C-MYC

En diferentes sistemas experimentales, cuando se estimula la proliferación celular aumenta la transcripción de un grupo variable de genes o bien la concentración de sus ARNm's citoplasmáticos. El protooncogen c-myc se incluye generalmente en este grupo dado que aumenta su expresión hasta veinte veces luego del estímulo proliferativo con diversos factores de crecimiento, para retomar los niveles basales antes del comienzo de la síntesis de ADN (Rollins and Stiles, 1988).

El comportamiento descrito en diferentes sistemas para el gen c-myc, sugirió dos alternativas posibles:

- 1) c-myc es un gen que se expresa específicamente en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, y por lo tanto se trata de un gen "ciclo-dependiente"
- 2) Los aumentos transitorios luego de la estimulación de células quiescentes se deben al evento de activación que coloca a las células en estado "competente" para la síntesis de ADN (Kelly et al, 1983)

Para discriminar ambas posibilidades, se estudió una población de células no sincronizadas sometidas a estímulo proliferativo continuo debido a la presencia de factores de crecimiento.

-Se observaron niveles de expresión de c-myc constantes a través de todo el ciclo celular. Estos no disminuyeron aun cuando el estímulo proliferativo operó sobre células quiescentes, arrestadas por densidad.

-Hubo un aumento transitorio en la expresión de c-myc luego de la activación por medio de factores inductores de competencia, aun en el caso de arresto celular.

Ambas observaciones sugieren que la expresión de c-myc no es consecuencia de una regulación ciclo-dependiente. (Thompson et al, 1985; Lacy et al, 1986). Del mismo modo, la síntesis de la proteína proveniente de dicho c-onc respecto de la síntesis de proteínas totales no varía durante el ciclo celular, ni tampoco las modificaciones de tipo post-traduccionales tales como su fosforilación (Hann et al, 1985).

Otros genes tales como el que codifica para la enzima timidina kinasa o la histona 2b sufrieron variaciones en las distintas fases del ciclo celular en el mismo ensayo en que fue estudiado el gen c-myc. Estos genes aumentaron su expresión durante la fase S, pero no en condiciones de arresto por densidad.

En linfocitos y fibroblastos se observan aumentos inmediatos en los niveles de c-myc luego de la inducción de la proliferación de células quiescentes. En ambos se genera una señal mitogénica primaria que inicia la transición de  $G_0$  a  $G_1$  y desencadena una extensa red de respuestas secundarias intracitoplasmáticas que culminan en la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular. Entre las respuestas tempranas comunes a ambos

tipos celulares, se pueden mencionar las siguientes:

-Aumentos en señales iónicas tales como en la concentración de  $Ca^{++}$  o el PH intracelular. Se detectan 10'' después de la adición del agente estimulador.

-Ruptura del  $PIP_2$  y producción de  $IP_3$  y DAG. Esto es simultáneo a los cambios en señales iónicas y PH.

-Estimulación metabólica general de las células. Esta se caracteriza por un aumento en la glucólisis y en la captura de diversos metabolitos así como por la transcripción de ARNm's específicos en particular de los

protooncogenes *c-myc* y *c-fos*. Esto ocurre en un estadio posterior, entre 5' y 60'. Así, dichos genes establecen un vínculo temprano entre la señal primaria y la posterior síntesis de ADN.

-Incremento general en la síntesis de ARN y proteínas (Metcalfe et al, 1985). Esto ocurre entre las seis y las ocho horas luego de la estimulación.

A continuación se mencionan evidencias acerca de la participación de *c-myc* en procesos de proliferación y diferenciación

1-El AMPc regula negativamente la proliferación en numerosos sistemas celulares. El tratamiento con activadores de la adenilato ciclasa en células precursoras de linfocitos B, induce la inmediata acumulación de AMPc. Esta se acompaña de un arresto de las células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y simultáneamente una "down-regulación" transiente de la expresión del protooncogen *c-myc* a nivel transcripcional y traduccional (Blomhoff et al, 1987).

2-En linfocitos T, la proliferación celular es orquestada mediante la expresión coordinada de un grupo de genes, entre ellos el que codifica para interleukina 2 (IL2), receptor de IL2 (IL2R) o receptor de Transferrina (TfR). Se demostró que luego de diversos estímulos mitogénicos ocurre una expresión secuencial de protooncogenes. Tempranamente se expresan los protooncogenes *c-myc* y *c-fos*, y los genes correspondientes a IL2 e IL2R. Posteriormente se expresan *c-myc*, *N-ras* y TfR (Reed et al, 1986).

3-En la línea Nb2 proveniente de un linfoma humano, *c-myc* está involucrado en la proliferación celular. La adición de hormona de crecimiento (GH) a un cultivo estacionario induce proliferación que se acompaña de aumentos de hasta veinticinco veces en la expresión de *c-myc* durante las tres primeras horas. La remoción de la hormona disminuye ambos efectos (Flemming et al, 1985).

4-La línea promielocítica humana HL60 se diferencia luego del tratamiento con ácido retinoico. Se observa una disminución de los niveles basales de

expresión de c-myc condicionada al estado diferenciado de dichas células (Bentley and Groudine, 1986). En estas mismas células, estudios de "run on" arrojaron importantes resultados acerca de la regulación de la expresión de c-myc. Se describió un bloqueo de la ARN polimerasa II (Pol II) a nivel de la elongación de transcritos primarios. A esto se debe la disminución específica en la transcripción de dicho gen. Se origina un sitio hipersensitivo a DNAsas en correlación con el efecto de bloqueo transcripcional. La ocurrencia de cambios conformacionales en la estructura secundaria del gen sería responsable del bloqueo en la elongación transcripcional. Se localizó este sitio en la zona de unión entre el primer exón y el primer intrón. En concordancia con este hecho estructural, se detectó una mayor proporción de transcritos provenientes del primer exón que del segundo, condicionada al estado diferenciado (Bentley and Groudine, 1986). Similares bloqueos intragénicos a nivel de elongación fueron descritos en otros protooncogenes humanos tal como c-myb.

Los estudios "in vivo" de "run on" no permitían discriminar entre terminación o pausas en la transcripción, ni tampoco excluir la probabilidad de un rápido procesamiento post-transcripcional que desestabilizara al transcrito nascente. En trabajos posteriores se utilizó un sistema de transcripción "in vitro" en el cual la enzima purificada puede transcribir la longitud total del molde de ADN siempre que no existan secuencias que causen terminación o pausas en la progresión del complejo transcripcional. El monitoreo de los productos de reacción en función del tiempo confirmó la existencia de dos sitios de terminación y de varios sitios de pausas en la elongación. (Kerppola and Kane, 1988). La localización de estos sitios fue coincidente con la descrita en las células HL60 (Bentley and Groudine, 1986). Ambos sitios de fin de la transcripción en el protooncogen c-myc consisten en una secuencia de residuos T en la hebra no transcrita así como de la presencia de otros elementos de secuencia en sus alrededores, aun no caracterizados.

#### ACTIVACION DEL PROTOONCOGEN C-MYC

Se han descrito distintos mecanismos para la activación de c-myc, en los diversos tejidos tumorales :



A) En linfomas de Burkitt, neoplasias humanas que involucran a linfocitos B, ocurren rearrreglos genómicos que activan a dicho gen: son frecuentes las translocaciones recíprocas entre el segmento cromosómico 8q24, que contiene el gen *c-myc*, y uno de los segmentos cromosómicos portadores de genes de inmunoglobulinas (14q32 IgH, 2p12 IgK, 22q11 IgL).

B) En plasmacitomas murinos ocurren translocaciones similares en las cuales el loci de Ig $\lambda$  en la región génica de cadenas pesadas de Ig's, es la secuencia blanco para el gen *c-myc*. El alelo que se transloca generalmente carece de las secuencias de su primer exón o incluso del primer intrón, su actividad transcripcional es alta pues escaparía de su control normal (Nishikura et al, 1983). La activación de la proliferación celular, se debería a una mayor concentración de transcritos provenientes del alelo translocado. Se ha identificado un factor proteico líbil cuyo sitio de unión al ADN ocurre en una secuencia situada en la posición -290 respecto del promotor P1, que correspondería a un factor de regulación negativo que actuaría en trans.

Se han hallado dos regiones de 75 pb, una en el primer exón y otra en el segundo, que podrían formar un "loop" en el ARNm. Así, la estructura secundaria resultante determinaría una menor eficiencia de traducción (Darveau et al, 1985). Esto podría explicar la correlación positiva observada entre pérdida del primer exón y desarrollo del fenotipo transformado.

C) El estudio de la activación de oncogenes en diversos sistemas llevó a una clasificación de los mismos en dos grupos funcionales de los que *c-myc* y *c-ras* son los prototipos respectivos. Así, por ejemplo, para la conversión tumorigénica de un cultivo primario de células fibroblásticas es necesaria la cooperación de dos oncogenes representantes de ambos grupos complementarios entre sí (Land et al, 1983), hecho ya referido al describir la estructura del *c-onc c-myc*.

Otro tipo de experimentos se realizaron utilizando animales transgénicos con el fin de superar las limitaciones que ofrecía el sistema de células "in vitro". Se observó que la expresión sinérgica de *c-myc* y de *c-ras* promovía la formación de tumores en forma acelerada (Sinn et al, 1987).

D) El gen murino pim-1 había sido involucrado en la formación de linfomas T debido a su frecuente activación por inserción del virus de la leucemia murina. Ratones transgénicos portadores del gen pim-1 fueron infectados con dicho virus, obteniéndose una alta frecuencia de linfomas T. En estos tumores hubo a su vez una alta frecuencia de eventos de activación del protooncogen c-myc por inserción proviral. Esto sugiere una probable cooperación entre c-myc y pim-1 en el desarrollo de linfomas T (Maarten van Lohvizen et al, 1989).

#### ESTRUCTURA DEL PROTOONCOGEN C-FOS

Se han identificado dos retrovirus portadores del oncogen v-fos. El virus del osteosarcoma murino de Finkel-Biskis-Jenkins (FBJ-MuSV) y el de Finkel-Reill y Biskis (FBR-MuSV) (Finkel et al, 1966; Finkel et al, 1983).

FBJ-MuSV es un retrovirus de 4026 nucleótidos en el cual una secuencia de 1639 nucleótidos ha sido adquirida a partir del genoma celular, y corresponde al protooncogen c-fos. Dicha secuencia origina la fosfoproteína v-fos, de 381 aa y 55 KDa ( $p55^{vfos}$ ) y contiene sus señales propias de inicio y fin de la traducción (Bishop, 1967).

FBR-MuSV es un retrovirus de 3791 nucleótidos que codifica a un producto de fusión entre una porción del protooncogen c-fos adquirido por transducción y una porción del gen estructural viral gag ( $p75^{gag-fos}$ ).

El protooncogen c-fos murino da origen a una proteína constituida por 360 aa, tamaño similar al del producto oncogénico que proviene de FBJ-MuSV.

En la secuencia de los primeros 332 aa, v-fos y c-fos murino difieren solamente en cinco residuos, mientras que los últimos 48 aa de ambas proteínas están codificados según diferentes marcos de lectura debido a que ocurre una delección de 10 nucleótidos de c-fos durante la transducción (Figura 5).

Se ha obtenido la secuencia nucleotídica completa del protooncogen c-fos proveniente de células de origen humano (hc-fos) (Van Stratén et al, 1983). El gen hc-fos posee 3415 pb. entre la secuencia "TATA" box y la señal de poliadenilación. Contiene cuatro regiones ausentes en v-fos, tres de las cuales poseen características de intrones, y la cuarta coincide con la región cuya delección ocurrió durante el proceso de transducción a partir del gen murino. Como producto de la transcripción a partir del gen hc-fos se obtiene una única especie poliadenilada de 2,2 Kpb.

Los genomas humano y murino divergieron hace aproximadamente 70 millones de años. No obstante las regiones codificantes en c-fos tienen una homología del 90%. Es alta también la homología en las zonas adyacentes a la región codificante, en 3' y 5'.

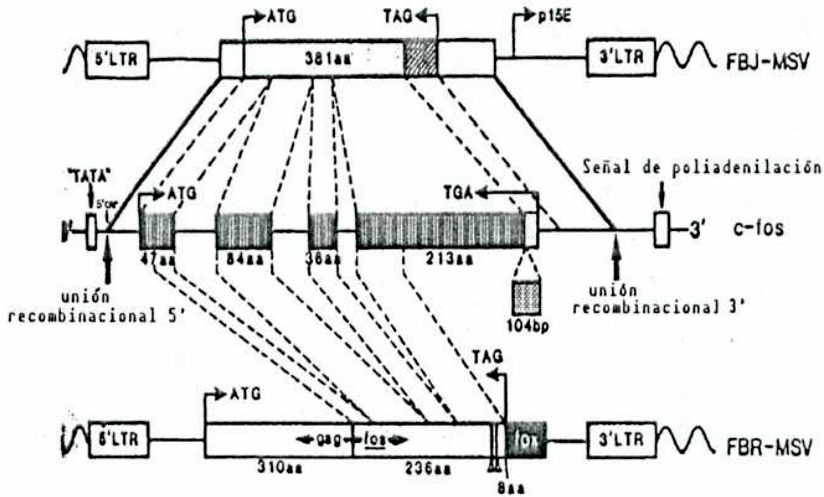
El producto de este gen es una proteína ácida e hidrofílica que posee una alta proporción de residuos serina aunque no presenta los sitios típicos de glicosilación que involucran a estos aminoácidos.

#### REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROTOONCOGEN C-FOS




El protooncogen c-fos se induce rápidamente en respuesta a la interacción celular con mitógenos y agentes de diferenciación. La inducción de c-fos es una de las respuestas de activación génica más tempranas entre las conocidas. Es transiente y generalmente precede a la activación de c-myc. En consecuencia, hay una gran acumulación de ARNm citoplasmático, que retorna a los niveles de preestimulación al cabo de 1 o 2 horas. Al igual que lo descrito para c-myc, se ha verificado una acumulación del producto proteico en el núcleo.

Una zona esencial para la activación transcripcional ha sido localizada en la región flanqueante 5', entre los nucleótidos -327 y -276. Esta zona se comporta como estimuladora de la transcripción, de modo independiente de su orientación y de su distancia a la región estructural del gen. Es homóloga a la región enhancer de los virus SV40 y polyoma aunque no puede ser sustituida por ninguna de ellas. Otra secuencia necesaria para obtener inducción temprana y transiente de c-fos se localiza en su región flanqueante 3'. Cuando el elemento enhancer 5' está intacto y

Figura 5: Estructura del proto-oncogen c-fos murino



ATG: Codón de inicio de síntesis proteica  
 TGA, TAG: Codón de fin de síntesis proteica.

-  Porción de FBJ-MuSV que se traduce con un marco de lectura diferente al de c-fos.
-  Deleción en c-fos que introduce el cambio en el marco de lectura en FBJ-MuSV.
-  Exones de c-fos

fusionado a unidades transcripcionales completas heterólogas, los genes híbridos resultantes presentan menor inducibilidad por factores séricos y niveles más persistentes de ARNm. Solo los genes híbridos conteniendo la región 3' de c-fos y ambas zonas flanqueantes intactas pueden dar origen a transcritos cuya inducibilidad y vida  $t_{1/2}$  es la misma que para el gen nativo (Treisman, 1985).

Ha sido identificado un elemento de respuesta al suero (elemento SRE) y un polipéptido que se une a él (SRF). El SRE se encuentra en la región 5' del gen, a una distancia de 300 pb del inicio de la transcripción. SRF es un polipéptido de 67 KDa, purificado por cromatografía de afinidad a sitios SRE (Treisman, 1987). La secuencia SRE es necesaria para la inducción de c-fos mediada por la acción de la proteína kinasa C, EGF, PDGF e insulina, aunque no por AMPc y  $Ca^{++}$ . Específicamente se requiere una secuencia contenida en SRE, de 20 pb, denominada DSE (Dyad symmetry element). El dominio de unión al DSE, en la proteína fos es una zona con cargas positivas, flanqueada por dos regiones de aminoácidos cargados negativamente. Dicho dominio de unión al ADN tiene características particulares, distintas a las de otros dominios de unión previamente descritos. Las cuatro estructuras típicas de unión al ADN previamente descritas son: a-"helix-turn-helix"; b-"Zinc-fingers" de leucina; c-"leucina-zipper" y d-"α-hélice con carga positiva" (Mitchell and Tjian, 1989).

A partir de extractos nucleares de células Hela, fue purificada otra proteína que se une al enhancer de c-fos (f-EBP). Su PM es de 62 KDa y posee una afinidad  $10^4$  veces mayor por el elemento DSE que por otras secuencias de ADN (Prywes and Roeder, 1987). El mismo dominio de unión al DSE es necesario para una correcta dimerización de dos polipéptidos SRF. Esta proteína, p62, forma un complejo ternario con SRE/p67. La proteína f-EBP no se une directamente al SRE sino que necesita la formación previa del complejo binario SRE/p67. Sin embargo, no se puede discernir si las interacciones ocurren entre p62 y SRE, o bien si la unión al ADN la ejerce p62 unida previamente a p67. Indistintamente, cualquiera de ambas proteínas podría ser encargada de transmitir la señal de transducción dentro del compartimento nuclear y, por lo tanto, blanco de modificaciones post-traduccionales que modulan la actividad del complejo transcripcional como un todo (Shaw et al, 1989).

La estimulación sérica de células quiescentes condujo a un aumento inmediato en la transcripción del gen que codifica para el factor SRF. Así este gen pertenecería a la misma familia que c-fos, constituida por genes de expresión temprana (Norman et al, 1988).

MECANISMO DE ACCION DEL PROTOONCOGEN C-FOS:  
FACTOR TRANSCRIPCIONAL AP-1

Los estudios sobre la función de proteínas oncogénicas nucleares han convergido con estudios sobre función de factores transcripcionales. Un complejo transcripcional, denominado AP-1 (Activator Protein-1) está compuesto por una familia de proteínas que han sido purificadas a partir de extractos nucleares de células de mamíferos. Todas ellas tienen alta afinidad con oligonucleótidos de secuencia "TGACTCA". Los productos oncogénicos que integran AP-1 provienen de los genes c-jun (Maki et al, 1987), jun B (Chiu et al, 1989), c-fos y otros varios genes relacionados con c-fos (Rauscher et al, 1988), las proteínas Fras (antígenos relacionados con c-fos).

Este complejo es el mediador nuclear de la inducción de diversos genes en respuesta a múltiples señales extracelulares: activadores de la proteína kinasa C, factor de necrosis  $\alpha$ , interleukina 1 o al factor de crecimiento tumoral  $\beta$ .

La especificidad en el reconocimiento de una secuencia de ADN es compartida por todos los miembros de AP-1. Esta se debe a que todos ellos poseen un dominio de unión al ADN con la estructura de "zipper de leucina" ya mencionada. La homo o heterodimerización entre miembros de esta familia es un importante punto de regulación de su actividad transcripcional. De este modo, cuando c-jun y c-fos son sintetizados en un sistema de traducción "in vitro", se forman heterodímeros sobre AP-1. El producto p39<sup>c-jun</sup> puede formar alternativamente homodímeros sobre AP-1 mientras que p55<sup>c-fos</sup> no se homodimeriza.

Se ha postulado que la unión jun-fos está dada por la interacción entre dos dominios con estructura secundaria de  $\alpha$ -hélice, en los cuales

residuos de leucina ubicados periódicamente se interdigitan creando una zona altamente hidrofóbica (Curran and Franza, 1986).

Hay numerosas evidencias en sistemas procariotas y eucariotas acerca de la interacción de los factores transcripcionales como dímeros, con secuencias palindrómicas. La posibilidad de formación de distintos heterodímeros confiere diferente grado de afinidad por una secuencia de ADN dada y se establece así una jerarquía en dicho reconocimiento. La asociación de los distintos miembros de AP-1 con su secuencia de reconocimiento puede asimilarse a una unión que conduce a la modulación transcripcional, entre ligandos altamente variables y un receptor genómico.

#### FUNCIONES DEL PROTOONCOGEN C-FOS

Se destaca la participación del producto de c-fos en dos tipos de eventos:

- A-Proliferación celular y
- B-Diferenciación celular

-A-Los niveles de ARNm correspondientes al protooncogen c-fos son muy bajos durante todo el ciclo celular en fibroblastos de la línea NIH3T3 o Swiss BALB/C 3T3. Esto sugiere que no se requiere una elevada expresión de c-fos durante los ciclos continuos de proliferación de dichas células. Sin embargo, los niveles de expresión en células NIH3T3 en activo estado proliferativo o en subclones transformados, son mayores a los observados en células quiescentes (Curran and Franza, 1986). Estudios más detallados para analizar la respuesta a la estimulación sérica en estas mismas células inicialmente privadas de suero, revelaron que la expresión de c-fos aumenta en dos órdenes de magnitud y retoma sus niveles basales en un lapso de 2 horas luego del inicio del tratamiento, con un pico de expresión a los 45 minutos. Paralelamente a las variaciones en la expresión de ARNm, se induce una población heterogénea de polipéptidos relacionados inmunológicamente con p55<sup>c-fos</sup> de entre 55 y 72 KDa. La vida  $\frac{1}{2}$  promedio de estos polipéptidos es de 2 horas. Entre éstos se encuentra una proteína ya

mencionada, que proviene de c-jun(p39<sup>c-jun</sup>), cuya asociación con c-fos ha sido ampliamente descripta.

El tratamiento con distintos factores de crecimiento séricos purificados, tales como EGF, FGF, o PDGF, todos ellos inductores del estado de "competencia", indujo un aumento en la expresión de c-fos correlacionado con el grado de estimulación mitogénica ejercida por dichos factores (Muller et al, 1984). Dada la drástica inducción de c-fos en respuesta a factores de crecimiento, se sugiere que la misma estaría asociada con funciones que no son ejercidas por p55<sup>c-fos</sup> durante el ciclo celular normal.

Hemos mencionado las evidencias a partir de las cuales se postula que la regulación de c-myc no es ciclo-dependiente sino consecuencia directa del efecto de ciertos factores de crecimiento (Kelly et al, 1983). Estudios similares sobre regulación de c-fos indicaron que la expresión de este c'onc tampoco es específica de una determinada fase del ciclo celular (Bravo et al, 1986). Las células estudiadas responden a la inducción por factores de crecimiento, independientemente del estadio del ciclo en que se encuentren, tal como sucede con células quiescentes. Ambos protooncogenes están involucrados en conferir un estado de "competencia" en fibroblastos, probablemente a través de la inducción del pasaje desde G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub> del ciclo celular.

En células NIH3T3 los sistemas intracelulares mediadores del estímulo originado por factores de crecimiento, son los productos de la hidrólisis del PIP<sub>2</sub> y el ion Ca<sup>++</sup>. Se determinó que ambos sistemas están directamente involucrados en la regulación de la expresión de c-fos. Lo mismo sucede con el AMPc, otro de los mediadores intracelulares. Esto coloca al gen c-fos en un punto de convergencia que le confiere la posibilidad de ser regulado de un modo multifacético (Yamaguchi et al, 1986).

En linfocitos humanos, los aumentos en la expresión de c-fos, inducidos por estimuladores de la pKC o por ionóforos de Ca<sup>++</sup>, no se correlacionaron con aumentos en la incorporación de [<sup>3</sup>H]Timidina al ADN. Esto indica que la expresión temprana de c-fos no es suficiente para inducir la síntesis de ADN (Pompidou et al, 1987).

Se realizaron estudios en la línea Swiss 3T3 de fibroblastos murinos, sometidos a un estímulo mitogénico con TPA (Tetradecanoil Phorbol Acetato). Se clonaron las secuencias inducidas y se las denominó secuencias



TIS (secuencias inducidas por TPA). Uno de los clones así obtenidos, TIS28 cDNA, corresponde parcialmente al gen c-fos. Los genes TIS se caracterizan porque los incrementos en su expresión ocurren luego de unos pocos minutos de inducción, son transientes dado que retornan a sus niveles de preinducción luego de 4 hs, y son superinducidos en presencia de inhibidores de la síntesis proteica (Tippetts et al, 1988).

-B-La expresión de c-fos se correlaciona con diferenciación en tipos celulares particulares entre los cuales se encuentran las membranas fetales durante la gestación (Muller et al, 1983), los precursores de células nerviosas, células hematopoyéticas o células embrionarias precursoras de teratocarcinoma.

Algunos de estos sistemas en que participa c-fos ya han sido comentados en el apartado sobre "funciones de los c-onc's". Otros ejemplos serán brevemente mencionados a continuación.

-La línea celular PC12, derivada de un feocromocitoma de rata, adquiere las propiedades funcionales y morfológicas típicas de las neuronas simpáticas en presencia del factor de crecimiento neural (NGF), mientras que la dexametasona les confiere características de células cromafínicas. Se observó una rápida pero transiente expresión de c-fos en el primer caso pero no en el segundo. Sin embargo la expresión de c-fos en estas células ocurre en respuesta a numerosos factores no inductores de la diferenciación tales como EGF, insulina o AMPc, lo cual apoya la idea de que la expresión de c-fos no es suficiente para inducir diferenciación neuronal (Krujier et al, 1985). Las células neuronales diferenciadas retienen la misma capacidad de inducción de la expresión de c-fos en respuesta al NGF, a diferencia de lo que sucede en macrófagos terminalmente diferenciados en cuanto a su capacidad de respuesta al CSF-1 respecto de las precursoras hematopoyéticas (HL60).

-El desarrollo embrionario normal es controlado por la expresión de diversos genes regulatorios. La línea celular F9 proveniente de un teratocarcinoma humano, ofrece un sistema adecuado para el análisis de los cambios en el patrón transcripcional que ocurren durante la diferenciación celular. En esta línea pluripotente, distintos tratamientos originan células musculares o neurales. En la vía de diferenciación muscular están involucrados c-fos, que sufre aumentos a nivel transcripcional, y

genes conteniendo homeoboxes. Estas últimas son secuencias de 180 pb altamente conservadas, que controlan el desarrollo en diversas especies (Dony and Gruss, 1988).

Para estudiar el mecanismo de activación de c-fos, se construyeron genes híbridos que contienen porciones estructurales de los genes c-fos murino y v-fos, y se evaluó la capacidad transformadora adquirida en cada caso (Miller et al, 1984). El potencial transformador de c-fos se adquiere luego de dos modificaciones independientes: debe unirse a la región 5' del gen una secuencia "enhancer" transcripcional tejido-específica, y debe eliminarse una región 3' que es inhibitoria de la transformación.

#### REGULACION HORMONAL DE LA EXPRESION DE ONCOGENES

Uno de los modelos que se eligió para el estudio de la regulación de la expresión de protooncogenes fue una situación fisiológica en la cual está involucrada la acción de múltiples hormonas: el nacimiento. Se utilizaron ratones, y se observó un aumento transitorio en la expresión del protooncogen c-fos, de entre diez y cien veces en el día del nacimiento. Los niveles de expresión prenatales eran casi indetectables, el aumento fue específico para dicho protooncogen y generalizado, ya que se observó en los diversos órganos analizados. Entre los numerosos factores desencadenantes del nacimiento se encuentran las catecolaminas, cortisol, y los estrógenos a través de la acción liberadora de las prostaglandinas la cual sigue un patrón temporal similar al que se describió para los cambios transcripcionales del gen c-fos. No se pudo determinar fehacientemente la naturaleza de este estímulo altamente específico, pero sí que se trata de la inducción fisiológica "in vivo" de un c-onc, muy probablemente asociada a la acción hormonal, prevaleciente en la situación fisiológica estudiada (Kasik et al, 1987).

Hemos mencionado anteriormente que una de las funciones más generales de los c-onc's es su participación en la respuesta ante estímulos proliferativos. Muchas veces este tipo de estímulo se desencadena por acción hormonal.

En tejido mamario, por ejemplo, los estrógenos intervienen en la regulación del crecimiento normal y neoplásico, por lo que resulta de gran interés el estudio de la participación de c-onc's en el mecanismo de acción estrogénico (Lippman et al, 1987). En este tejido, el efecto estimulador de los estrógenos sobre la síntesis de ADN es mediado por los siguientes efectos:

- Transcripcionales (timidina-kinasa, dihidrofolato reductasa)
- Modificaciones en el metabolismo del fosfatidil inositol. Este efecto es lento respecto de otros tejidos regulados hormonalmente. La causa del retardo posiblemente se deba a que entre la acción estrogénica, y dicho efecto metabólico deba mediar la acción de factores de crecimiento autocrinos, responsables directos del mismo.
- Estimulación de la producción de factores de crecimiento
- Alteraciones en la actividad secretoria (glicoproteínas, factores angiogénicos, proteasas)

Existen muchas líneas celulares tumorales provenientes de tejido mamario humano dependientes de estrógenos, (MCF-7, T47-D) o independientes de estrógenos (MDA-MB-231, HS578-T). Se observó que los medios de cultivo condicionados, provenientes de células MCF-7, tenían actividad mitogénica sobre otras células MCF-7. A su vez, el crecimiento de los cultivos era más rápido si la frecuencia de cambios de medio era menor. Esto sugirió que las células MCF-7 tendrían actividad secretoria de factores de crecimiento (Jackesz et al, 1984). A partir de dichos medios condicionados se purificó EGF, IGF-1, TGF $\alpha$ -like, TGF $\beta$  (De Larco y Todaro, 1978) y PDGF. Por otro lado estas células poseen en su membrana receptores para algunos de estos factores, salvo para el PDGF, mientras que TGF $\alpha$  actúa vía EGF-R (Receptor de EGF). La mayor parte de los factores de crecimiento secretados en respuesta a los estrógenos actuaría de un modo autocrino, mientras que el PDGF tendría efectos paracrinos. Las líneas Eg-independientes poseen un mayor nivel constitutivo de producción y secreción de factores de crecimiento (Dickson et al, 1983). Dado que la inducción de factores de crecimiento mediada por estrógenos en células Eg-dependientes colabora en

el mantenimiento del fenotipo maligno, se postula que los mecanismos que desencadenan los Eg existirían constitutivamente en las células Eg-independientes.

Con el fin de estudiar la relación entre el efecto estrogénico y la expresión de oncogenes en células Eg-dependientes, se trabajó "in vitro", transfectando células MCF-7 con el oncogen v-Ha-ras. Las características diferenciales entre el clon MCF-7ras obtenido, y las células progenitoras fueron las siguientes:

- Adquisición de capacidad tumorigénica "in vivo" en ausencia de estrógenos, en ratones atímicos.
- Aumentos en la actividad secretoria de factores de crecimiento.
- Menor sensibilidad a efectos estrogénicos o antiestrogénicos sobre el crecimiento celular, aunque hubo persistencia de otras respuestas biológicas ante la acción estrogénica, tal como la inducción de receptores a progesterona.
- Capacidad de inducir formación de colonias de células MCF-7, en cultivos libres de estrógenos.

Se concluyó que los estrógenos y la transfección de v-Ha-ras son dos estímulos tumorigénicos independientes en células MCF-7, con algunas características en común tales como la producción de ciertas proteasas tumorales (Dickson et al, 1987; Kasid et al, 1987). Así, la expresión del gen c-ras, no sería un mediador de la respuesta estrogénica.

Más recientemente, se hizo un estudio comparativo exhaustivo de la expresión de polipéptidos celulares y secretados en presencia o ausencia del oncogen ras transfectado, luego de un estímulo estrogénico (células MCF-7, MCF-7 ras y MCF-7 ras/Eg) (Worland et al, 1989):

- Los Eg o el oncogen ras indujeron diferentes grupos de polipéptidos celulares o de secreción.
- Un pequeño grupo fue sin embargo modulado sinérgicamente, por supresión o por estimulación. Estos péptidos específicos estarían involucrados en el desarrollo tumorigénico desencadenado por ambos estímulos.

Un análisis comparativo sobre expresión de oncogenes en células portadoras de receptores estrogénicos (ER+) o carentes de ellos (ER-), indicó luego de la adición de Eg:

-Un aumento de diez veces en la expresión de c-myc. Esta comienza a los 15' y se hace máximo entre una y dos horas de tratamiento en células ER+. En las células ER-, el nivel de c-myc fue alto e independiente del agregado de estrógenos.

-Ausencia de modificaciones en los niveles de expresión de c-ras, en ambos tipos de células.

Las variaciones en la expresión de c-myc serían específicas, aunque no necesariamente un efecto directo de la acción estrogénica. Alternativamente, éstas podrían constituir uno de los fenómenos que caracteriza a la proliferación celular (Don Dubick et al, 1987). El elevado nivel de expresión constitutivo de c-myc podría ser un prerequisite para la elevada capacidad proliferativa en células ER-. Dos grupos de trabajo discuten acerca de la naturaleza de la regulación de c-myc. El primero de ellos sostiene que ésta es transcripcional (Don Dubick and Shiu, 1988) mientras que el segundo da evidencias a favor de una regulación post-transcripcional (Santos et al, 1988). El primer grupo también señala diferencias en la vida media de los transcritos en células Eg+ o Eg-.

Diversos estímulos esteroideos que llevan a la diferenciación celular en una variedad de sistemas, inducen cambios en la expresión del protooncogen c-fos (Mitchell et al, 1985). Los estrógenos inducen cambios en el estado de diferenciación de las células MCF-7, que se acompañan de variaciones leves en la expresión de dicho protooncogen. Su expresión basal aumenta entre cuatro y seis veces luego del tratamiento de estas células con factores de crecimiento polipeptídicos (TGF- $\alpha$  e IGF-1) y ésteres de forbol (TPA), un efecto mediado por la activación de la proteína kinasa C. La acción de esteroides sobre células mamarias sería mediada por la inducción de factores de crecimiento los cuales, vía activación de la PKC, modularían la expresión de protooncogenes como el c-fos (Wilding et al, 1988).

Los tumores mamarios humanos, hormono-dependientes, muchas veces evolucionan hacia un estado hormono-independiente determinando el inicio de una fase más agresiva de la enfermedad con ausencia de respuesta ante una terapia antiestrogénica. Por esta razón, es de fundamental importancia el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen esta pérdida de dependencia hormonal. En ratas, dos agentes carcinogénicos inducen tumores mamarios experimentales. En un caso solamente, la inducción es

mediada por la activación del oncogen ras. Para correlacionar la presencia del oncogen ras y la dependencia hormonal, animales portadores de tumores individuales de un origen determinado fueron ovariectomizados y se evaluó en ellos el comportamiento tumoral. Sin embargo se obtuvo un porcentaje similar de tumores en progresión y en regresión en animales portadores de ambos tipos de tumores, independientemente de la presencia del oncogen ras. La activación del oncogen ras sería uno de los mecanismos moleculares involucrados en la iniciación del tumor, pero que no determinaría su pérdida de dependencia hormonal durante estadios más avanzados del desarrollo neoplásico (Sukumar et al, 1988).

A continuación se mencionarán otros sistemas en que se ejerce una acción hormonal sobre la expresión de c-onc's.

A-Estrógenos, en útero de rata u oviducto de pollo

B-Glucocorticoides, en líneas celulares

C-Andrógenos, en próstata ventral de rata

D-Hormonas peptídicas diversas, en líneas celulares o cultivos primarios.

A-Este punto es de particular importancia dado que se hace referencia a la inducción de protooncogenes "in vivo", luego del tratamiento con estrógenos. Esto se relaciona estrechamente con el tema de trabajo del presente estudio. En la Discusión de los resultados, se volverá a mencionar este punto.

Un trabajo pionero reportó la expresión de los protooncogenes c-myc y N-myc en útero de rata, luego del tratamiento estrogénico "in vivo", siendo éste el primer caso de regulación estrogénica de c-onc's (Murphy et al, 1987a). La cinética de la inducción "in vivo", fue similar a la que se había descrito para numerosos sistemas "in vitro", caracterizada por presentar un pico máximo de expresión de ocho a diez veces sobre el valor basal, que ocurre luego de tres horas de la inyección de  $17\beta$ -estradiol. Otra respuesta más temprana ante el estímulo estrogénico es la expresión de N-myc, de magnitud similar al anterior, pero a los 15' del inicio del tratamiento (Murphy et al, 1987). Un trabajo más reciente, en el mismo modelo experimental, indicó expresión de c-fos con una cinética de inducción

paralela a la de formación del complejo hormona-receptor estrogénico nuclear, con un máximo a los 30' del inicio del tratamiento (Loose Mitchell et al, 1988). La expresión de los tres c-onc's mencionados luego de la acción estrogénica fue específica ya que el estudio de expresión de numerosos protooncogenes adicionales fue negativo. Respecto del mecanismo de acción esteroidea que conduce a la activación transcripcional, debe tenerse en cuenta que la regulación génica a nivel nuclear es rápida, en concordancia con el tipo de respuesta encontrado. Sin embargo no puede descartarse que los Eg, al igual que los factores de crecimiento, estimulen la transcripción de c-fos, c-myc o N-myc a través de cascadas de fosforilaciones proteicas dado que aquellos estimulan la autofosforilación de su propio receptor (Auricchio et al, 1987).

Existen dos situaciones diferentes en las cuales pueden establecerse analogías en cuanto a la expresión de c-myc. Se trata de las células ciclantes y de la expresión "in vivo" (Weisz y Bresciani, 1988).

-Así como los niveles de expresión de c-myc en células ciclantes son invariantes durante todas las fases de crecimiento, no varía la expresión de c-myc durante el ciclo estral de la rata.

-De modo similar a lo que ocurre en células ciclantes, los estrógenos actuarían en el útero de rata como un factor de "competencia" que solo en combinación con factores de "progresión" adquieren carácter mitogénico. Se describió que los estrógenos inducen la producción de IGF-1 en útero además de la producción de esromedinas, el cual podría constituir uno de dichos factores de progresión (Murphy et al, 1987b).

En el oviducto de pollo, la administración de estrógenos "in vivo" induce proliferación. El aumento en la síntesis de ADN se correlaciona con aumentos transitorios en la expresión de c-myc, c-fos y más tardíamente de c-Ha-ras (Chen y Pollard, 1986). En este mismo órgano primitivo, la acción estrogénica completa la diferenciación. Existe una expresión constitutiva de c-onc's (c-myc, Ha-ras, c-fos y c-erbB). Luego de una interrupción del tratamiento primario con estrógenos, con la readministración de estrógenos se retoma la síntesis de proteínas específicas y la actividad proliferativa. Sin embargo, y en contraposición a los resultados observados en útero de rata, hay un descenso de los niveles de c-myc, c-fos y c-erbB, que indica que en este caso la proliferación no se acompaña de aumentos en la expresión de c-onc's (Cohrs et al, 1988). El efecto de "down-regulación" de

los estrógenos puede explicarse teniendo en cuenta la acción de la progesterona que se observa luego del tratamiento "in vivo". Esta induce una rápida disminución en la expresión de c-myc entre los cinco y diez minutos y un retorno a los niveles basales luego de ocho horas del inicio del tratamiento (Fink et al, 1988).

B) Los glucocorticoides poseen efectos antiproliferativos sobre las células linfoides. Luego de su tratamiento "in vitro", se observa un cambio en la distribución celular entre los distintos estadios del ciclo, con acumulación de células en la fase  $G_0/G_1$  (Harmon et al, 1979). Los glucocorticoides, deberían entonces inducir la expresión de factores que previenen la progresión a través de la fase  $G_1$ , o alternativamente impedir la expresión de aquellos que inducen dicha progresión. Se observó una drástica disminución a nivel transcripcional en la expresión de c-myc en células P1798 provenientes de una linfoma tímico murino. Esto confirmó la correlación entre arresto celular y expresión de c-onc's y corroboró la función asignada a c-myc como factor necesario para la progresión a través del ciclo celular (Forsthoefel y Thompson, 1987).

En ratas hepatectomizadas se observó una disminución en la acumulación hepática de ARNm proveniente de Ha-ras concomitante con el efecto antiproliferativo de la administración de glucocorticoides (Krasilnikov et al, 1988).

C) Los andrógenos promueven el crecimiento y la diferenciación de la próstata de rata dependiendo del estado de maduración de la misma. En un órgano totalmente desarrollado, el efecto hormonal "in vivo" es pequeño pero luego de la castración, se desarrolla una hiperrespuesta ante la reestimulación androgénica. La regulación de la expresión de c-myc estaría involucrada en conferir esta diferente capacidad de respuesta. La acción trófica "in vivo" de los andrógenos luego de la castración se acompaña de una disminución en los niveles de expresión de c-myc, un resultado de alguna manera contrario al encontrado en la mayor parte de los sistemas proliferantes estudiados "in vivo" (Quarmby et al, 1987).



D)El factor liberador de somatotrofina(GRF) y la somatostatina regulan la biosíntesis y la secreción de hormona de crecimiento (GH) así como la proliferación de las células productoras de esta última hormona.En este efecto mitogénico estaría involucrada la expresión de c-fos dado que en cultivos primarios de células provenientes de APG de rata se observa un aumento transcripcional en la expresión del gen c-fos ,cuya cinética es la típicamente observada en otra gran variedad de sistemas "in vitro".Como contrapartida de este efecto,la somatostatina inhibe parcialmente los aumentos en la expresión de c-fos (Billestrup et al,1987).

Otro péptido hipotalámico,el factor liberador de tirotrópina (TRH) estimula la biosíntesis y liberación de prolactina en la línea celular GH3/B6,proveniente de un tumor pituitario de rata.El tratamiento con TRH indujo un aumento transitorio en la expresión de c-fos aunque este efecto pareció ser independiente de la proliferación celular,y estar relacionado con la actividad secretoria(Weisman et al,1987).

En cultivos primarios de células de Sertoli,la hormona foliculo estimulante (FSH) indujo un aumento en la expresión de c-fos,también transiente y a nivel transcripcional.Este pareció estar relacionado con el proceso de diferenciación celular desencadenado por la gonadotropina.El producto de c-fos es un activador transcripcional que actuaría sobre la expresión más tardía de los genes involucrados en la diferenciación (Hall et al,1988).

La línea celular NB<sub>2</sub>,proveniente de un linfoma de células T de rata,es dependiente de hormonas lactogénicas para su proliferación.Los niveles de ARNm del gen c-myc,incrementan rápidamente con el agregado de GH o PRL.A pesar de que estos niveles descienden con la remoción de las hormonas,el producto inducido sería suficiente para iniciar la síntesis de ADN(Murphy et al,1988).

#### ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS

La patología más frecuente en la hipófisis es la tumoral.La mayoría de los adenomas pituitarios son de crecimiento lento,y benignos desde el punto de vista de sus características histológicas.Algunos pocos adenomas

presentan una velocidad de crecimiento mayor, y se extienden al área supraselar e invaden tejidos vecinos. Estos adenomas pueden causar típicamente alteraciones de tipo visual u otros síntomas relacionados con la compresión de nervios intracraneales.

Las células adenomatosas pueden sintetizar y secretar hormonas hipofisarias produciendo así alteraciones en el equilibrio endocrino.

La excesiva secreción hormonal determina anomalías tales como acromegalia, gigantismo, síndrome de amenorrea-galactorrea, infertilidad enfermedad de Cushing o hipertiroidismo.

Los tumores de mayor incidencia son los que secretan prolactina (20-25 %) o somatotropina (15%). Una tercera clase de adenomas se denomina "No Funcionante" (20-25%) y en ellos la sintomatología predominante está dada por el crecimiento tumoral dentro de la cavidad endocraneana. Desde el punto de vista ultraestructural éstos presentan indicios de cierta diferenciación endocrina. Tienen una baja velocidad de síntesis hormonal o bien producen moléculas precursoras o fragmentos de hormonas biológicamente inactivas.

Entre los criterios de clasificación de los adenomas hipofisarios se encuentran los de tipo funcional o morfológico. En el primer caso se consideran el tamaño, la apariencia histológica, las características ultraestructurales y tincionales y la granularidad (Kovacs and Horvath, 1987).

Acerca del origen de los tumores hipofisarios hay evidencias tanto a favor de que las causas se encuentran a nivel hipotalámico como a nivel de la propia glándula en la cual residiría el defecto primario.

De acuerdo con la primera alternativa, trastornos a nivel de factores regulatorios de la secreción de hormonas hipofisarias determinarían un aumento en la liberación hormonal, que sería un estímulo para la proliferación celular. Eventualmente esto podría llevar a la formación de un tumor. Se comprobó que el defecto que produce hipersecreción de hormona de crecimiento o prolactina no reside a nivel de la membrana plasmática ya que la función normal de los receptores hipofisarios a factores hipotalámicos generalmente no está alterada (Cronin et al, 1980; Reubi and Landolt, 1984).

De acuerdo con la segunda alternativa, el desbalance que determina la disfunción en la secreción hormonal podría residir a nivel de la estructura del ADN o bien a nivel de expresión genética.

Un estudio en tumores somatotróficos humanos reveló la ausencia de alteraciones estructurales a nivel de los genes de la familia de la hormona de crecimiento. Sin embargo en este mismo estudio se encontró una disminución en el grado de metilación de dichos genes. Esto es consistente con el concepto de que la hipometilación es parcialmente responsable del aumento en la expresión génica el cual podría llevar a la hipersecreción hormonal (Lan, 1984).

Del mismo modo que en prolactinomas y acromegalias, los estudios en tumores secretantes de ACTH favorecen la hipótesis del origen tumoral en la glándula. No descartan sin embargo que una baja proporción de los mismos pudiera deberse a disfunción hipotalámica (Molitch, 1987).

## OBJETIVOS DEL PRESENTE ESTUDIO

En base a lo expuesto acerca de la relación entre liberación hormonal y proliferación adenohipofisaria y con la finalidad de avanzar en el conocimiento de este tema, serán definidos a continuación los objetivos del presente estudio .

Los sistemas membranosos celulares, y fundamentalmente la membrana plasmática están involucrados en los fenómenos de liberación hormonal previamente mencionados. Entre los efectos que se derivan de dicha actividad, se ha hecho una referencia especial a la proliferación celular, que se ejerce a nivel nuclear.

El objetivo trazado consiste entonces en el análisis de los factores intracelulares que establecen una conexión entre los extremos de un eje físico que vincula ambos compartimientos subcelulares, la membrana plasmática y el núcleo. Desde el punto de vista funcional, se trata del análisis de eventos intracelulares involucrados entre dos fenómenos aparentemente "independientes" tales como la liberación hormonal y la proliferación celular adenohipofisaria.

Uno de los hechos característicamente asociados con la proliferación celular en sistemas muy variados consiste en la expresión de protooncogenes celulares . Específicamente, algunas de las proteínas protooncogénicas constituyen en sí factores mitogénicos, otras son receptores de factores de crecimiento , transductoras de señales mitogénicas extracelulares o factores de activación génica intranuclear. De este modo , abarcan un amplio espectro de acción en relación a la proliferación celular tanto desde el punto de vista de su localización como de sus funciones.

En virtud de las características que exhiben los productos de protooncogenes, que han sido ampliamente descritas en la Introducción, se decidió enfocar nuestro estudio hacia el análisis de la expresión de dichos genes.

En particular, se estudiará la expresión de los protooncogenes c-myc y c-fos en diversas situaciones farmacológicas en las cuales la actividad proliferativa está aumentada respecto del bajo nivel basal que presenta la glándula adenohipofisaria de la rata :

-Administración "in vivo" de antagonistas dopaminérgicos o de estrógenos, y sus efectos sobre las células prolactínicas. Reversión de los efectos proliferativos por medio de la administración de agonistas dopaminérgicos.

-Supresión del efecto regulatorio sobre la liberación hormonal ejercido por los esteroides gonadales en células gonadotropas, mediante la orquidectomía. Reversión de los efectos proliferativos por medio de una terapia de reemplazo de los esteroides gonadales.

En segundo término, se analizará la expresión de genes hormonales así como la expresión de oncogenes en tumores hipofisarios humanos originados en distintas estirpes celulares. El objetivo particular de dicho análisis es:

-Convalidar el uso de la metodología desarrollada en tejidos animales para estudios en masas pequeñas de tejido tumoral humano.

-Proveer un parámetro adicional de utilidad en la clasificación de los diversos tipos de adenomas hipofisarios

-Profundizar en el estudio de la patogénesis de estos tumores, específicamente a través del análisis de expresión de oncogenes.



MATERIALES Y METODOS1-MATERIALES1-1 REACTIVOS, ENZIMAS Y PRODUCTOS RADIOACTIVOS

Los reactivos utilizados fueron de grado de pureza analítico. Las enzimas utilizadas se adquirieron en diferentes compañías:

- ADN polimerasa I y endonucleasas de restricción BRL-BIOLAB
- DNAasa I, Lisozima, Proteínasa K, RNAasa A SIGMA

Los productos radiactivos se adquirieron a través de New England Nuclear (NEN). Los dNTP's ( $\alpha^{32}\text{P}$ ) radiactivos se hallaban en solución acuosa, en concentración 10 mCi/ml, con actividad específica de 3000 Ci/mmol.

1-2 CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIOTICOS SELECTIVOS

Las cepas bacterianas utilizadas fueron las siguientes:

- Escherichia coli JM101 (Messing, 1979) (lac-proAB), sup E, thi,  
(F tra D36, proAB, lac I<sup>q</sup>,  
ZM15)
- Escherichia coli HB101 (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969) F<sup>-</sup>, hsd S20(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>)  
rec A<sub>13</sub>, ara-14, pro A<sub>2</sub>  
lacY1, gal K2, rps L20(Sm<sup>R</sup>)

Los medios para el cultivo de bacterias (Maniatis y col., 1982) fueron los siguientes:

- LB Luria Broth: contiene Bacto triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio, ajustado a pH 7
- LB agar: al medio descrito se le agrega agar 1,2 %.

Se prepararon las siguientes soluciones madre de antibióticos(1000X) en agua bidestilada, para seleccionar bacterias (Maniatis y col.,1982):

- Ampicilina,100mg/ml
- Tetraciclina,20mg/ml

Las soluciones se esterilizaron por filtración a través de membranas Millipore de 0,44  $\mu$ m de poro y se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas soluciones se agregaron a los medios de cultivo esterilizados por autoclavado y enfriados hasta  $50^{\circ}\text{C}$ .

### 1-3 CONSTRUCCIONES PLASMIDICAS UTILIZADAS PARA MARCADO RADIOACTIVO

A continuación se listan los diferentes insertos específicos utilizados en este estudio así como los vectores en que éstos fueron subclonados.

-Hormona de crecimiento humana (hGH cADN) :cADN subclonado entre los sitios BgLI y BamHI en pBR322.

Cedido por G.Paulakis,National Institute of Health (Martial et al,1979)

-Prolactina de rata (rPrI-cADN) :subclonado en el sitio PstI en pBR322(pPRLI)

Cedido por R.Maurer,Universidad de Iowa (Gubbins et al,1980)

-Prolactina humana (hPrIc-ADN) :subclonado en el sitio PstI en pBR322

Cedido por H.Friesen,Universidad de Manitoba (Cooke et al,1981)

-Protooncogen c-myc humano (fragmento genómico de 9 Kb) :Subclonado entre los sitios EcoRI y HindIII en pBR322.

Provisto por la American Type Culture Collection

-Protooncogen c-myc humano,tercer exón :subclonado entre los sitios ClaI y EcoRI en pBR322

Provisto por la American Type Culture Collection

-Protooncogen c-fos murino (fragmento genómico de 1,6 Kb,2do.3 $^{\circ}$  y 4 $^{\circ}$  exón) :



Subclonado en el sitio SstI en pSP65  
Provisto por el Dr. Charles Stiles.

-ADN ribosomal (rADN 18S), cADN subclonado en pBR322

#### 1-4 ANIMALES Y DROGAS PARA TRATAMIENTOS FARMACOLOGICOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, cuyos pesos oscilaban entre 200 - 250 g, peso que se alcanza entre los tres y cuatro meses de edad. Los animales se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada y con régimen de 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad. La alimentación consistió en una dieta sintética (Purinas) y agua "ad libitum".

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Cada hipófisis se disecó rápidamente, se descartó el lóbulo posterior y cuando fue necesario se pesó en una balanza de torsión con una precisión de 0,1 mg. Cuando las glándulas se utilizaron para purificación de ARN, fueron lavadas rápidamente en solución de isotiocianato de guanidina 4M y colocadas inmediatamente a -70°C hasta su uso.

Se mencionan a continuación las drogas utilizadas en los diversos tratamientos farmacológicos: Diundicelinato de 3,17- $\beta$  estradiol (Etrosteron, donado por Gador, Argentina) preparado en vehículo oleoso; mesilato de 5- $\alpha$ -Bromocriptina (donado por Sandoz, Argentina), preparado en 70 % etanol 0,14 M NaCl (1:1,5 v/v); Haloperidol (Johnson and Johnson); 5- $\alpha$ -androstano-17- $\beta$ -ol-3-ona, dihidrotestosterona, DHT (Sigma Chemical Company), preparada en una suspensión de carboximetil hidroxietil celulosa 3 % en agua destilada.

Para realizar los experimentos con animales orquidectomizados que se describirán en la sección de "Resultados", los animales fueron castrados bajo anestesia con éter y sacrificados a diferentes tiempos luego de la castración. Se usaron animales control de la misma edad y de peso similar a los tratados.

Subclonado en el sitio SstI en pSP65  
Provisto por el Dr. Charles Stiles.

-ADN ribosomal (rADN 18S), cADN subclonado en pBR322

#### 1-4 ANIMALES Y DROGAS PARA TRATAMIENTOS FARMACOLOGICOS

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, cuyos pesos oscilaban entre 200 250 g, peso que se alcanza entre los tres y cuatro meses de edad. Los animales se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada y con regimen de 12 hs. de luz y 12 hs. de oscuridad. La alimentacion consistió en una dieta sintética (Purinas) y agua "ad libitum".

Los animales fueron sacrificados por decapitacion. Cada hipofisis se disecó rapidamente, se descartó el lóbulo posterior y cuando fue necesario se pesó en una balanza de torsion con una precision de 0,1 mg. Cuando las glándulas se utilizaron para purificacion de ARN, fueron lavadas rapidamente en solucíon de isotiocianato de guanidina 4M y colocadas inmediatamente a -70°C hasta su uso.

Se mencionan a continuacion las drogas utilizadas en los diversos tratamientos farmacologicos: Diundecinato de 3,17- $\beta$  estradiol (Erosteron, donado por Gador, Argentina) preparado en vehículo oleoso; mesilato de 5- $\alpha$ -Bromocriptina (donado por Sandoz, Argentina), preparado en 70 % etanol 0,14 M NaCl (1:1,5 v/v); Haloperidol (Johnson and Johnson); 5- $\alpha$ -androstano-17- $\beta$ -ol-3-ona, dihidrotestosterona, DHT (Sigma Chemical Company), preparada en una suspensíon de carboximetil hidroxietil celulosa 3 % en agua destilada.

Para realizar los experimentos con animales orquidectomizados que se describirán en la seccion de "Resultados", los animales fueron castrados bajo anestesia con éter y sacrificados a diferentes tiempos luego de la castracion. Se usaron animales control de la misma edad y de peso similar a los tratados.

## 2-METODOLOGIA

### 2-1 TECNICAS CORRIENTES DE PURIFICACION Y CONCENTRACION DE ACIDOS NUCLEICOS

#### 2-1-1 PRECIPITACION CON ETANOL

Los ácidos nucleicos en solución se recuperaron por precipitación con etanol (Maniatis y col.,1982).La solución acuosa se llevó a una concentración de 0,3M Acetato de sodio por agregado de 0,1 volúmenes de una solución madre 3M (pH 5,2).Luego se agregaron dos volúmenes de etanol y los ácidos nucleicos se precipitaron durante 24 hs a  $-20^{\circ}\text{C}$  : 30' a  $-70^{\circ}\text{C}$ .El ADN se centrifugó a 12000 g durante 30' a  $4^{\circ}\text{C}$ .El precipitado se lavó con etanol 70 % para remover trazas de sales,se secó a ambiente y luego se resuspendió en buffer TE (1 mM EDTA,10mM Tris-clH pH 7) o en agua bidestilada.

#### 2-1-2 EXTRACCION CON SOLVENTES ORGANICOS

El ADN en solución se purificó de proteínas contaminantes por extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:48:2,v/v)(Maniatis y col.,1982).A la solución acuosa de ADN se le agregó un volumen igual de fenol:cloroformo(1:1,v/v) equilibrado en buffer TE pH 7,5.La mezcla se agitó con vortex durante 30''.Se separaron las fases centrifugando 5' en microcentrifuga.Se reextrajo la fase orgánica con un volumen igual de buffer TE y se juntaron ambas fases acuosas.La última extracción de la fase acuosa se hizo con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1,v/v).El ADN se recuperó finalmente por precipitación con etanol (2-1-1).

### 2-2 CARACTERIZACION DE SECUENCIAS DE ADN POR ANALISIS DE RESTRICCION

Los ensayos de restricción se realizaron en general en un volumen de 15 ul,salvo en digestiones preparativas donde se aumentó el volumen a 100 ul en las condiciones de uso corriente(Maniatis y col.,1982).Se utilizaron los buffers de reacción comerciales adquiridos con las enzimas respectivas. Dado que las enzimas de restricción se conservan en buffer que contiene 50 % de glicerol se incubó en condiciones tales de no sobrepasar una concentración del 5 % en las mezclas de reacción.Las reacciones de

digestión se desarrollaron a 37°C durante 2 hs con 5 unidades enzimáticas (UE)/ $\mu$ g de ADN. En caso de dobles restricciones con enzimas que actúan en diferentes condiciones de salinidad, se utilizó la enzima que actúa con la menor salinidad, se adicionaron las sales necesarias y a continuación se agregó la segunda enzima.

Los productos de la digestión enzimática se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa, analíticos o preparativos.

## 2-3 PURIFICACION DE ADN PLASMIDICO

Se utilizó el método de la lisis alcalina (Birboim y Doly, 1979) para la purificación de ADN plasmidico.

### 2-3-1 PURIFICACION EN PEQUEÑA ESCALA (minipreparación)

Las minipreparaciones se realizaron a partir de cultivos de 12-16 hs ("overnight":ON) de 5 ml en medio de cultivo LB en baño termostaticado a 37°C, con agitación continua. Las bacterias se cosecharon por centrifugación y se resuspendieron en volumen adecuado de solución I (25 mM Tris-clH pH 8, 10 mM EDTA y glucosa 50 mM). La suspensión se dejó en hielo y luego se le agregó un volumen adecuado de solución II (NaOH 0,2N, SDS 1 %) y tras un nuevo periodo de incubación a 0°C se agregó un volumen adecuado de solución III (NaAcO 5M pH 4,8). Luego de una centrifugación en microcentrifuga se extrajo el sobrenadante con solventes orgánicos y luego se precipitó el ADN con etanol. El pellet final fue resuspendido en buffer TE.

### 2-3-2 PURIFICACION EN GRAN ESCALA (maxipreparación)

Cuando se requería una gran cantidad de ADN plasmidico y con alto grado de pureza, se utilizó el método de lisis alcalina en gran escala seguido de una centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (Maniatis y col., 1982).

El procedimiento fue similar al descrito en 2-3-1 pero se partió de un volumen mayor de cultivo (entre 50 y 500 ml). A la fase acuosa recuperada luego de la extracción con solventes orgánicos se le agregó Bromuro de

Etidio(BrEt) y se lo dejó en contacto con el ADN durante 5' a Tº ambiente. Se centrifugó brevemente a 5000 RPM y se agregó cloruro de cesio al sobrenadante. Se ultracentrifugó a 20ºC durante 40 hs a 36000 rpm. Se separó cuidadosamente la banda plasmídica y se la extrajo varias veces con butanol saturado en agua. Luego se dializó contra buffer TE durante 12 hs y se recuperó el ADN por precipitación etanólica. El pellet final se resuspendió en buffer TE.

### 2-3-3 CUANTIFICACION DE ADN

#### 2-3-3-1 CUANTIFICACION POR ABSORBANCIA

Se midió la concentración de ADN por absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de densidad óptica ( $UDO_{260}$ ) equivale a 50  $\mu\text{g/ml}$  de ADN doble cadena (Maniatis y col., 1982). Como índice de pureza del ADN se midió la absorbancia a 280 nm y se estimó la relación  $DO_{260}/DO_{280}$ . Se consideró un cociente de 1,8-2 como un índice de pureza adecuado. Esto indica que el ADN está libre de proteínas. Para evitar sobreestimaciones por presencia de ARNm u otras moléculas de ADN, se utilizó el método de comparación con patrones de concentración conocida en geles de agarosa que se describe a continuación.

#### 2-3-3-2 CUANTIFICACION POR COMPARACION CON ADN DE MASA CONOCIDA

Se sembró en un gel de agarosa-BrEt cantidades crecientes del ADN en estudio (diferencias de un orden de magnitud) junto con cantidades crecientes de un ADN patrón de concentración conocida (fago ). Luego de la corrida electroforética se comparó la intensidad de las bandas del ADN a cuantificar con las del ADN patrón. Las bandas de igual intensidad de fluorescencia poseen la misma masa de ADN. La cantidad mínima detectada fue de 10 ng de ADN por banda.

### 2-4 TRANSFORMACION BACTERIANA

2-4-1 PREPARACION DE CELULAS COMPETENTES

El tratamiento de las bacterias previo a su transformación con ADN plasmidico aumenta su capacidad de incorporación de moléculas de ADN e induce un estado que fue descrito como "estado de competencia". Los procedimientos tradicionales están basados en la acción del  $Cl_2Ca$  a nivel de las paredes bacterianas.

Se hizo crecer el cultivo bacteriano en medio de cultivo LB en baño termostaticado a  $37^\circ C$  hasta un valor de absorbancia a 650nm de 0,2. El pellet bacteriano obtenido por centrifugación se incubó en 0,1M  $Cl_2Ca$  frío. El tiempo de esta incubación se prolongó por 24 hs siendo ésta la principal modificación introducida a los protocolos tradicionales (Dagert y Ehrlich, 1979).

2-4-2 TRANSFORMACION DE CELULAS COMPETENTES

Las transformaciones se llevaron a cabo incubando 10 ng de ADN con 30-50  $\mu l$  de bacterias competentes durante 20' a  $4^\circ C$ . Luego se realizó un shock térmico a  $42^\circ C$  durante 1' y se volvió a incubar a  $4^\circ C$  durante un tiempo breve. Se dejó replicar las células durante 1 h a  $37^\circ C$  previo agregado de medio de cultivo LB fresco. Finalmente se seleccionaron bacterias transformadas, por plaqueo en LB-agar en presencia de los antibióticos adecuados.

La eficiencia de transformación de células competentes obtenidas como se describió fue de  $10^7$  colonias/ $\mu g$  de ADN plasmidico.

2-5 PURIFICACION DE ARN TOTAL

Los protocolos que se mencionan a continuación fueron utilizados cuando el material de partida fue un cultivo celular, un pellet de linfocitos, tejido normal de diverso origen o masas tumorales.

Desde el comienzo de la manipulación del material de partida hasta la siembra de ARN en geles o la preparación de "dot blots" sobre filtros de nitrocelulosa (NC) se trabajó con material libre de RNAsas. Así, el material de vidrio se trató durante seis a ocho horas en estufa a  $180^\circ C$ . El material

de plástico utilizado fue nuevo y autoclavado (1 atm,60').El agua bidestilada destinada a preparación de soluciones recibió el mismo tratamiento de autoclavado, en recipientes de vidrio pretratados en estufa. Preparadas las soluciones, se volvieron a autoclavar. Cuando fue indispensable la reutilización de material de plástico, éste fue tratado en baño termostático a 60°C con agitación continua ON, en solución de dietilpirocarbonato 0,01 % y luego autoclavado en las condiciones descriptas.

#### 2-5-1 EXTRACCION POR EL MEDIO DE SOLUCIONES CON DETERGENTES Y FENOL

El tejido se homogeneizó en solución de 0,5 % de Nonidet P-40 en buffer 10 mM Tris-ClH pH 7,1 ; 1 mM EDTA. Se separaron los núcleos por centrifugación a 17000 rpm durante 2'. El sobrenadante se digirió con proteinasa K, 0,1 % SDS, 5 mM EDTA pH 8 durante 30' a 37°C. Luego se realizó una extracción fenólica y una precipitación etanólica del ARN. El pellet obtenido se lavó con etanol 70 % y se resuspendió en agua. Se conservó cuantificado y alicuotado a -20°C hasta su uso.

#### 2-5-2 EXTRACCION DE ARN POR UN UNICO PASO DE PURIFICACION

El siguiente método fue descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). El material de partida se homogeneizó en una solución desnaturante (4M tiocianato de guanidina; 25mM Citrato de sodio; 0,1M 2-mercaptoetanol; 0,5 % Lauril-sarcosina en homogeneizador manual de teflon-vidrio. El paso siguiente fue una extracción por agregado secuencial de NaAcO, fenol saturado en agua y cloroformo-alcohol isoamílico (49:1v/v). A éste le siguieron dos precipitaciones con alcohol isopropílico. El pellet de ARN así obtenido fue posteriormente tratado como en 2-1-1.

#### 2-5-3 CUANTIFICACION DE ARN

##### 2-5-3-1 CUANTIFICACION POR ABSORBANCIA

Se procedió del mismo modo que para la cuantificación de ADN(2-3-3-1). Se consideró que una  $UDO_{260}$  equivale a 40 ug/ml de ARN (Maniatis y col., 1982).

#### 2-5-3-2 CUANTIFICACION POR REACCION CON ORCINOL

El método siguiente fue descrito por Schneider(1957). Se basa en la degradación ácida de los residuos de ribosa y la posterior cuantificación de los mismos por su reacción con orcinol en presencia de  $FeCl_3$ . A la solución de ARN se le agrega un reactivo que contiene orcinol 1 % p/v,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0,5 % (p/v) en ClH. Se incubó durante 20' a  $100^\circ C$ , y luego durante 5' en hielo. Se midió la  $DO_{660}$  y se consideró que 1  $UDO_{660}$  equivale a 25 ug de ARN/ml. Simultáneamente se hizo una curva de calibración con ARN sintético

#### 2-6 METODOS ELECTROFORETICOS

##### 2-6-1 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

Los geles de ADN para electroforesis se prepararon en buffer TAE 1X (TAE 50X : Tris-AcOH 2M, pH 8, 50mM EDTA ).

Previo al sembrado en el gel, se agregó a las muestras 0,3 volúmenes de Buffer de Siembra (BS : buffer TAE 3X; glicerol 50 % ; azul de bromofenol 0,25 % ), y se llevó a cabo la electroforesis aplicando un campo eléctrico de 5V/cm. Al finalizar la corrida el gel se tiñó con BrEt (0,5 ug/ml). En el caso de los minigeles o de los geles preparativos se incluye BrEt en la preparación del gel (Maniatis y col., 1982).

Cuando fue necesario, los geles fueron fotografiados sobre transiluminador de luz UV de 300 nm usando una cámara Polaroid MP-4 provista de filtro rojo (RPC4) con película Polaroid 667.

##### 2-6-2 PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN POR ELECTROFORESIS PREPARATIVA



Para purificar un fragmento de ADN determinado se lo corrió en gel de agarosa/BrEt. Se extrajo el taco de agarosa conteniendo la banda de interés y se lo colocó en bolsa de diálisis con buffer TAE 1X. Se continuó la electroforesis durante 30' a 100 V. Se controló que finalizada la electroelución la sección de gel estuviese libre de ADN, por transiluminación con luz UV. El material recuperado de la bolsa de diálisis se extrajo con fenol y luego se precipitó dos veces con isopropanol. El fragmento de ADN se visualizó por electroforesis en gel de agarosa analítico.

Como marcadores de PM se utilizaron los fragmentos de digestión con HindIII del fago  $\lambda$  cuyos tamaños son 23;9,4;6,7;4,3;2,3;2;0,5 y 0,1 respectivamente. Para conocer el tamaño de una banda de ADN determinada, se corrió simultáneamente la muestra incógnita y los marcadores de PM. La movilidad de una macromolécula es proporcional al logaritmo del peso molecular de la misma (Helling, 1974).

### 2-6-3 ELECTROFORESIS DE ARN EN GEL DE AGAROSA

#### 2-6-3-1 ELECTROFORESIS ANALITICA

Las muestras de ARN se calentaron 30' a 60°C para desagregar las macromoléculas y luego se mantuvieron a T° ambiente. Se agregaron 0,2 volúmenes del buffer de siembra que es similar al descrito previamente pero contiene  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10mM. Este último fue también el buffer de corrida y el que se utilizó para preparar los geles de agarosa 1 %.

Para visualizar el ARN se realizó una tinción del gel por alcalinización en NaOH 50mM/BrEt 0,5 ug/ml, seguida de la neutralización con NaAcOH 200mM .

#### 2-6-3-2 ELECTROFORESIS PREPARATIVA. TRANSFERENCIA A MEMBRANAS

Las muestras de ARN se desnaturalizaron en glioxal 1M (desionizado por tratamiento con resina de intercambio mixta BioRad AG 501-X8, dimetilsulfóxido 50 %, buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  15mM pH 6,5 a 50°C durante una hora.

Las condiciones de corrida fueron las descritas (2-6-3-1)

Se transfirió el ARN glioxilado a membranas de NC (Schleider and Schwell, BA85 0,45 um de poro) utilizando buffer SSC 20X (3M NaCl/0,3M citrato de Na).

## 2-7 DOT BLOTS DE ACIDOS NUCLEICOS

### 2-7-1 DOT BLOT DE ADN PLASMIDICO

Los filtros de NC fueron pretratados con SSC 20X y sobre ellos se sembró ADN monocatenario (20 ug/100 ul de 20 mM Tris-ClH pH 7,4 ; 1 mM EDTA el cual queda adsorbido en la membrana luego de su filtración aplicando vacío. Se utilizó en todos los casos un aparato Minifold de capacidad para 96 muestras (Schleider and Schwell). La fijación de las macromoléculas sobre los filtros se realizó por calentamiento en estufa a 80°C durante dos horas.

El límite inferior de detección por hibridación en estas condiciones es de 1-3 pg de ADN (Anderson and Young, 1985).

### 2-7-2 DOT BLOT DE ARN

El pretratamiento de los filtros de NC así como la metodología y el dispositivo utilizados para la aplicación de las muestras fue similar a la descrita (2-7-1).

Las muestras de ARN fueron desnaturalizadas por incubación a 50°C durante 60' de modo similar al referido (2-6-3-2) pero se excluyó el dimetilsulfóxido de la mezcla desnaturalizante (Anderson and Young, 1985). Concluido el periodo de incubación, se agregó SSC 15X hasta una concentración final de 8 ug/100 ul. Las diluciones previas al sembrado en dot blots se realizaron con SSC 15X como diluyente.

## 2-8 EXTRACTOS CITOPLASMATICOS CRUDOS : DOT BLOTS

Se utilizó una técnica simple para la determinación de los niveles relativos de ARNm específicos por hibridación en extractos citoplasmáticos (White y Bancroft, 1982).

El tejido de partida se homogeneizó en 10 mM Tris-ClH pH 7,5; 1 mM EDTA, 0,5% NonidetP-40. Se centrifugó a 1000 rpm para descartar núcleos. Luego de una segunda centrifugación a 15000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se lo desnaturizó por calentamiento a 60°C durante 15', en solución SSC 6X / formaldehído 7,5 %. Los extractos citoplasmáticos así obtenidos se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Se determinó la concentración de proteínas en los extractos citoplasmáticos por medio de la técnica de Lowry (Lowry et al, 1951). Los extractos fueron llevados a concentración final de 1 ug de proteína/2 ul ajustando los volúmenes con SSC 6X. Estas últimas constituyeron las soluciones madre para cada extracto citoplasmático.

A diferencia de lo descrito en el caso de trabajar con ADN plasmídico o ARN para sembrar dot blots (2-7), los extractos ya desnaturizados no se sometieron a pretratamientos adicionales. Solo se los diluyó en forma seriada utilizando SSC 6X antes de su siembra sobre filtros de NC. Se trabajó con cantidades de extracto conteniendo un rango de entre 20 y 0,6 ug de proteína / dot.

## 2-9 PREPARACION DE SONDAS RADIACTIVAS

### 2-9-1 MARCADO DE ADN DOBLE CADENA POR "RANDOM PRIMING"

Se marcaron fragmentos de ADN eluidos de geles de agarosa preparativos utilizando el método de extensión de primers no específicos. Para ello se utilizó el Kit comercial "Multipriming" (Amersham) según condiciones de trabajo especificadas en sus instrucciones. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando entre 25 y 100 ng de ADN y 25-50 uCi de [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]dCTP. La actividad específica lograda fue de  $5 \cdot 10^8$  -  $2 \cdot 10^9$  cpm/ug de ADN. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante el pasaje de la mezcla de incubación a través de columna de Sephadex G-50 (Maniatis y col., 1982) usando buffer TE pH 7,5 como eluyente.

### 2-9-1 MARCADO DE ADN DOBLE CADENA POR "NICK TRANSLATION"

En este caso se incubaron 50-100 ng de ADN con una mezcla de 0.1 mM dATP, 0.1 mM dGTP, 0.1 mM dTTP y 3 ul de [ $^{32}$ P]dCTP (3000 Ci / mmol), 1 ul de DNAasa I 0.1 ug/ml, 1U ADN-Polimerasa I en buffer de "nick translation" (Maniatis y col., 1982). Luego de dos horas de incubación a 14°C se detuvo la reacción por agregado de un agente quelante. Los nucleótidos no incorporados se separaron de la sonda radiactiva del modo que se describió en 2-9-1.

## 2-10 HIBRIDIZACION CON SONDAS RADIATIVAS

### 2-10-1 PREHIBRIDIZACION

La solución de prehibridización contiene formamida 50 % desionizada en el momento de su uso, SSC 5X, 50 mM buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Denhardt 5X (0,1 % ficoll, 0,1 % polivinilpirrolidona, 0,1 % albumina sérica bovina) y ADN de esperma de salmon (sonicado) 250 ug/ml (Satz y Singer, 1984). En algunos casos se incluye también dextrán sulfato 10 % final.

La incubación se realizó en baño termostático a 42°C con agitación continua, entre 18 y 24 hs.

### 2-10-2 CONDICIONES DE HIBRIDIZACION Y LAVADO

Se utilizó 50 - 100 ul de solución de hibridización por cada  $\text{cm}^2$  de membrana (en general, 5 - 10 ml por bolsa). Finalizada la prehibridización se agregó la sonda radiactiva por microinyección y resellado de la bolsa, previo hervor durante 5'. Todas las hibridizaciones se realizaron con al menos  $10^6$  cpm/ml de solución.

El periodo de hibridización osciló entre 12 y 18 hs en baño termostático a 42°C con agitación continua. Los filtros recuperados se lavaron entre tres y cuatro horas con seis cambios del buffer adecuado según el caso.

Para sondas de alta homología (> 90 %) la temperatura de hibridización fue 42°C. Se hicieron seis lavados comenzando con solución SSC 2X a T° ambiente hasta solución SSC 0,1X a 50°C en presencia de SDS 0,1 %.

Para sondas de baja homología (< 90 %) la hibridación transcurrió a igual temperatura pero los lavados comenzaron con solución SSC 2X a T<sub>0</sub> ambiente hasta solución SSC 0,5X a 42°C siempre en presencia de SDS 0,1 %.

### 2-10-3 AUTORADIOGRAFIA Y DENSITOMETRIA

Los filtros lavados se secaron al aire y se cubrieron con Saran Wrap. Se introdujeron en cassette para su exposición en contacto con película Kodak X-OMAT con pantallas intensificadoras (Dupont-Cronex) a -70°C. El tiempo de exposición varió entre 24-48 hs para sondas de prolactina hormona de crecimiento o rADN y 20-25 días para sondas de oncogenes.

Las películas se densitometraron en densitómetro Shimadzu.

### 2-10-4 CALCULO DE COEFICIENTES DE CORRECCION

Para cada experimento que se presentará en la sección de "Resultados" se obtuvieron distintas autoradiografías luego de la hibridación de un determinado filtro con diferentes sondas radiactivas .

-En primer lugar se realizó el análisis densitométrico de la autoradiografía obtenida con [<sup>32</sup>P]rADN .El aparato utilizado realiza la integración automática del área bajo la curva densitométrica y le asigna un valor numérico. En base a este análisis se calcularon los coeficientes de corrección del modo que se indica a continuación.

-Al resultado que se obtuvo para el grupo control del experimento con rADN se le asignó arbitrariamente un valor unitario

-Se calculó el cociente entre el resultado obtenido con rADN para cada grupo experimental y el del grupo control. El valor de este cociente osciló alrededor de uno. De este modo, para cada muestra se dispuso de un coeficiente de corrección diferente.

-Cuando la diferencia entre el valor de un coeficiente de corrección y el valor unitario fue mayor al 5 % se utilizaron los coeficientes para corregir los valores obtenidos por densitometría luego de la hibridación con el resto de las sondas utilizadas. Cuando la diferencia fue menor o igual al 5 %, se consideró a los fines prácticos que la muestra control y la muestra en cuestión poseían la misma cantidad de ARNm. En consecuencia no

se utilizaron esos coeficientes para la corrección de los restantes valores obtenidos para dichas muestras.

-En segundo término se densitometraron las diversas autoradiografías obtenidas a partir del mismo filtro con diferentes sondas y sobre dichos resultados se aplicaron los coeficientes de corrección. Para una muestra dada, el valor numérico corregido final asignado es el cociente entre el resultado densitométrico específico y su coeficiente de corrección.

## 2-11 OTROS PARAMETROS BIOQUIMICOS DETERMINADOS

### 2-11-1 INCORPORACION DE <sup>3</sup>H-TIMIDINA AL ADN ADENOHIPOFISARIO

El ensayo de incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina se realizó según el procedimiento utilizado habitualmente en el laboratorio. La incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina se expresó como actividad específica relativa (A.E.R. ± S.E.M.):

$$\text{A.E.R.} = \frac{\text{d.p.m. en la fracción insoluble en TCA / mg ADN}}{\text{d.p.m. en la fracción soluble en TCA / mg de APG}} \times 1000$$

### 2-11-2 DOSAJES HORMONALES

En el momento del sacrificio de las ratas se recogió sangre troncal, se dejó coagular a 4°C y se separó el suero por centrifugación a 6500 rpm durante 30'. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Se realizaron los dosajes de LH y Prolactina séricos por radioinmunoensayo (RIA) del modo que se realiza habitualmente en el laboratorio (Romano et al, 1983). Los reactivos utilizados en el RIA de prolactina y de LH fueron donados por el Dr. A. Parlow, Hormone Distribution Program, NIAMDD, EEUU.

Se utilizaron como patrones las preparaciones standard de prolactina o de LH de rata NIAMDD RP-1. Las variaciones inter- o intra-ensayo nunca fueron mayores al 10%. La concentración de prolactina o de LH en suero se expresó como ng/ml.

### 2-11-3 EVALUACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS

Se utilizó el test "t" de Student, análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Tuckey o el de Dunnet y análisis de la varianza de dos factores de acuerdo con los requerimientos de cada experimento. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando el valor p fue menor que 0,05.

### 2-12 INMUNOHISTOQUIMICA y DETERMINACION DEL NUMERO DE MITOSIS

Se realizaron las determinaciones inmunohistoquímicas del modo que se lleva a cabo de rutina en nuestro laboratorio utilizando anticuerpos procedentes del National Institute of Health. La metodología de trabajo ha sido ampliamente descripta (Perez et al, 1985).

Una vez finalizado el procedimiento inmunohistoquímico, se procedió a la determinación del número de células arrestadas en metafase. Esto se llevó a cabo en cortes histológicos adenohipofisarios escogidos al azar. El tratamiento previo de los animales con colchicina y otros detalles metodológicos ya han sido descriptos previamente (Pérez et al, 1985). El índice mitótico se expresó como  $N^{\circ}$  de mitosis /  $mm^2$

RESULTADOS



## RESULTADOS

UTILIZACION DE EXTRACTOS CITOPLASMÁTICOS PROVENIENTES DE ADENOHIPÓFISIS DE RATA PARA ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GENÉTICA

En este capítulo se describirá el trabajo realizado por medio de hibridaciones de extractos citoplasmáticos sembrados en dot blots sobre soportes sólidos de nitrocelulosa (NC). Las figuras seleccionadas en todos los casos son representativas de entre tres y cinco experimentos realizados con diferentes grupos de animales.

Diferentes alicuotas de un extracto citoplasmático adenohipofisario fueron sometidas a los tratamientos que se indican a continuación.

- digestión con ARNasas
- digestión con proteasas
- sin digestión enzimática

Los extractos fueron diluidos en forma seriada y sembrados sobre filtros de NC. Estos se hibridaron con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{prl}$  y la autoradiografía obtenida se muestra en la figura 1. El análisis densitométrico de la película autoradiográfica reveló que el 85 % de la señal de hibridación obtenida en el extracto crudo sin digestión enzimática se conserva luego del tratamiento con proteasas. Luego del tratamiento con ARNasas la señal desapareció.

En todos los experimentos que se presentan a continuación los esquemas de tratamiento utilizados fueron escogidos en base a resultados previos de nuestro laboratorio. Se determinaron diversos parámetros bioquímicos indicativos de la efectividad de dichos tratamientos en animales de las mismas camadas que los utilizados en los experimentos de expresión génica. Los resultados se mostrarán agrupados en forma de tablas en los capítulos siguientes para mayor claridad de exposición.

La figura 2 A corresponde a un experimento de estrogenización durante siete días. Se observa la autoradiografía obtenida luego de la hibridación con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{prl}$  de un filtro conteniendo extractos provenientes de animales control y estrogenizados. La señal de hibridaciones claramente mayor en el segundo de dichos grupos. La figura

2 B es la autoradiografía obtenida luego de la hibridización de extracto adenohipofisario y de hígado de las mismas ratas con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GH}$ . Con el primer material la señal es positiva mientras que con el segundo es prácticamente indetectable. Lo mismo ocurrió cuando el filtro mostrado en la figura 2 B fue hibridizado con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{prl}$  (resultados no mostrados).

Se realizó un estudio de la expresión del gen de la prolactina a diferentes tiempos luego de la estrogenización "in vivo". Diferentes grupos de animales fueron sacrificados luego de los periodos de tiempo que se indican en la figura 3. Se obtuvieron los extractos citoplasmáticos adenohipofisarios respectivos los cuales fueron hibridizados con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{prl}$ . Como se observa en la figura 3, los aumentos en la concentración del ARNm de prolactina son visibles luego de 18 hs de iniciado el tratamiento.

En la siguiente etapa del trabajo se quisieron evaluar las posibilidades de detección de variaciones a nivel de expresión de genes por medio de la metodología de hibridización con extractos citoplasmáticos.

Se había demostrado previamente en nuestro laboratorio que la administración de antagonistas dopaminérgicos a ratas adultas, producía un marcado aumento en la incorporación de precursores radiactivos al ADN adenohipofisario veinte horas más tarde (Kalberman et al, 1979; Macchiavelli et al, 1982) junto con la liberación de prolactina.

Siguiendo el esquema de tratamiento utilizado en dichos trabajos, se administró una única dosis de haloperidol (300  $\mu\text{g}$ /rata) a ratas previamente estrogenizadas durante siete días. Veinte horas después, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron los diferentes extractos citoplasmáticos. La figura 4 corresponde a la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{prl}$ . Tanto en la columna  $E_{7d}$  (animales estrogenizados durante siete días) como en la columna  $E_{7d}+H$  (animales estrogenizados que recibieron haloperidol) las señales de hibridización son claramente mayores que en la columna Co (animales control). Se observa también una mayor concentración del ARNm de prolactina en animales estrogenizados y tratados con el antagonista dopaminérgico respecto de la concentración en APG de animales estrogenizados.

Nuestro grupo demostró, por otro lado, que la administración de agonistas dopaminérgicos (Bromocriptina) a ratas estrogenizadas durante siete días induce junto con una disminución en la liberación de prolactina, una disminución en la incorporación de precursores radiactivos al ADN adenohipofisario, en el número de células prolactínicas, así como en la liberación de prolactina (Perez et al, 1985). Nosotros observamos que estos cambios se acompañan de una disminución en la concentración del ARNm de prolactina tal como se muestra en la figura 5. Esta corresponde a la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]prl de un filtro conteniendo extractos de APG provenientes de animales que recibieron los siguientes tratamientos:

-control

-Bromocriptina

-Estrógenos durante siete días

-Estrógenos durante siete días y bromocriptina

Se observó una disminución en la concentración del ARNm de prolactina en los animales tratados con bromocriptina respecto de los animales control. A su vez hubo una reversión de los aumentos en dicha concentración inducidos por la estrogenización. Esto último se observa en el material proveniente de APG de los animales tratados con estrógenos y bromocriptina.

Por último, otra situación experimental analizada por medio de esta metodología de trabajo fue la castración de animales macho adultos. Se evaluaron las diferencias en la concentración del ARNm de prolactina en la APG de animales intactos o castrados quince días antes del estudio. En la figura 6 se observa la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]prl. La concentración del ARNm de PRL en el extracto proveniente de APG de animales castrados es significativamente menor a la concentración en la APG de animales intactos (figura 6).

Obtenido este conjunto de resultados derivados del estudio de la expresion del gen de la prolactina, abundante en la APG, nos abocamos al estudio de la expresion de protooncogenes. Para ello utilizamos los mismos filtros de NC conteniendo las diferentes muestras de extractos citoplasmáticos referidos en los experimentos ya descritos.

Se realizaron numerosos intentos de reutilización de dichos filtros para su hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-myc y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-fos. Como se menciono anteriormente, para cada situacion experimental analizada se disponia de entre tres y cinco filtros. Una dificultad encontrada sistemáticamente en los ensayos de hibridización con diferentes sondas para el estudio de expresion de protooncogenes, fue la falta de reproducibilidad en los resultados. De este modo, no fue posible determinar con certeza si existian variaciones en la expresion de los mismos. Este hecho será analizado en la "discusion" de los resultados aquí presentados.

No obstante, una situacion experimental que pudo ser estudiada y en la cual se obtuvieron resultados de un modo reproducible fue la estrogenización "in vivo" durante siete días.

El estudio de la expresion del gen c-myc en la APG de ratas estrogenizadas revelo un aumento del 52 % en la concentracion de dicho c'onc respecto de la concentracion en la APG de animales utilizados como control (figura 7 A). En este experimento se utilizo además un extracto citoplasmático proveniente de linfocitos humanos estimulados a proliferar por la accion de una lectina. De este material se esperaba obtener una señal de hibridización positiva con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-myc. El material utilizado como control negativo de hibridización con dicha sonda fue un extracto citoplasmático proveniente de corazon de las mismas ratas utilizadas para la obtención de APG control.

El análisis de la expresion del gen c-fos fue realizado utilizando el mismo filtro que se muestra en la figura 7 A. En este caso se utilizo un extracto citoplasmático proveniente de placenta humana como control positivo y el mismo control negativo de hibridización.

Se observo un aumento del 38 % en la concentracion de ARNm especifico en la APG de animales estrogenizados durante siete días respecto de la concentracion en la APG de animales control. La figura 7 B corresponde a la autoradiografia obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-fos.

Finalmente se rehibridizó el trozo de filtro conteniendo los extractos Co y E<sub>7d</sub> con una sonda de ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P) rADN que reconoce a la especie ribosomal de 18S presente en todas las muestras biológicas (figura 7 C).

Con la misma se esperaba obtener igualdad en la intensidad de la señal de hibridización a igualdad de la cantidad de las diferentes muestras sembradas. En base a su análisis densitométrico se calculó un coeficiente de corrección que correlaciona el valor de la señal obtenida en el grupo E<sub>7d</sub> respecto del valor obtenido para el grupo control. El cálculo de los coeficientes de corrección está explicado en la sección de Materiales y Métodos.

En la figura 8 se muestran comparativamente las variaciones en la expresión de ambos c-onc's con la estrogenización durante siete días. Las determinaciones fueron repetidas entre tres y cinco veces con diferentes grupos de animales. Se calcularon las variaciones relativas al control respectivo de cada experimento. Para ello, en cada caso dicho valor control fue considerado arbitrariamente unitario. Para cada situación experimental, las barras representan el valor promedio  $\pm$  S.E.M. de las variaciones versus los controles respectivos de los diferentes experimentos.

Todos los experimentos que figuran a continuación fueron realizados con muestras de ARN total adenohipofisario (ARNtot) en lugar de los extractos citoplasmáticos utilizados hasta el momento. En la "Discusión" de los resultados se analizarán los motivos que llevaron al cambio en dicho aspecto de la metodología.

Se utilizaron dos métodos distintos de purificación de ARN. El que se basa en la extracción con detergentes y fenol fue descartado luego de los primeros ensayos dado que la hibridización del material luego de su separación electroforética indicaba degradación intrínseca de las muestras. En la figura 9 A se observa la imagen obtenida por tinción con Bromuro de etidio de un gel de agarosa 1 % en el que se separaron electroforéticamente dos alícuotas (2  $\mu$ g de ARNtot/alícuota) purificadas del modo referido. Se distinguen claramente las bandas que corresponden al ARNr 28 S y 18 S, de 5,5 y 2,5 Kb respectivamente.

## Resultados

En la figura 9 B se observa la autoradiografía típicamente obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]p<sub>ri</sub> de muestras de ARN<sub>tot</sub> así obtenidas. A pesar de que la imagen observada en la figura 9 A era la esperada ya que se visualizan las especies mayoritarias, la ausencia de bandas netas luego de la hibridización motivó la determinación de cambiar la metodología de purificación de ARN<sub>tot</sub>.

FIGURA 1

Extractos citoplasmáticos de AFG:

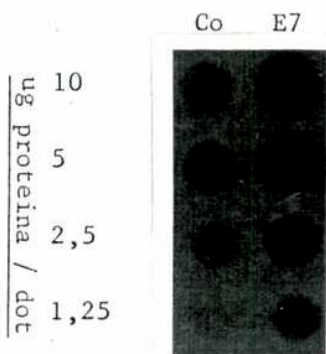
Digestión con proteasas y ARNasas



FIGURA 2

Dot blots de extractos citoplasmáticos de AFG e hígado de rata

2A)



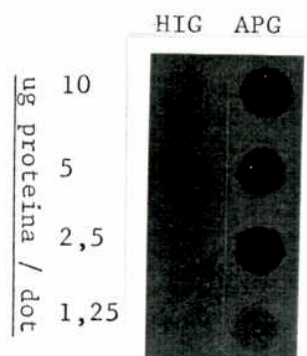
2A) Co: control

E7: Estrogenizados 7 días

Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]prl

Tiempo de exposición: 48 hs

2B)



2B) APG: adenohipófisis

HIG: hígado

Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]prl

Tiempo de exposición: 48hs

figura 3

Dot blots de extractos citoplasmáticos de APG.  
Efecto de la administración de Estrógenos por tiempos cortos

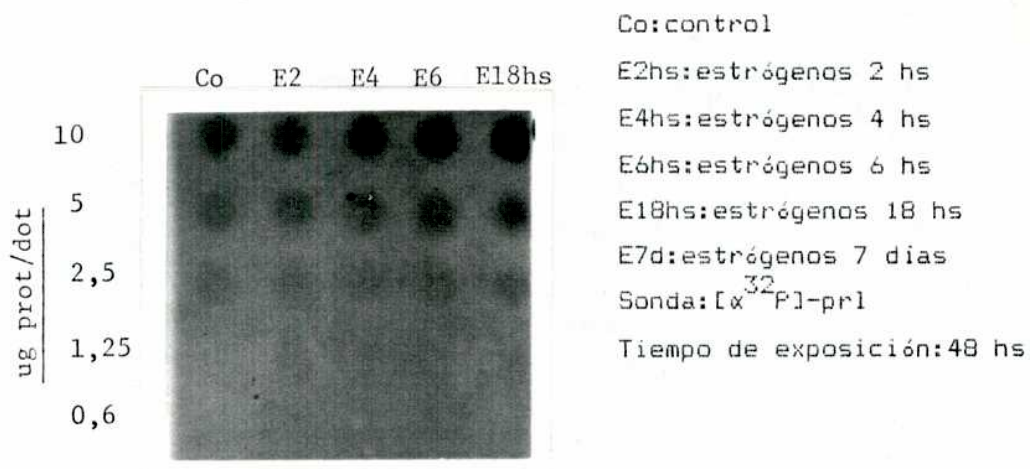


Figura 4

Dot Blots de extractos citoplasmáticos de APG  
Efecto de la administración de estrógenos y antagonistas dopaminérgicos

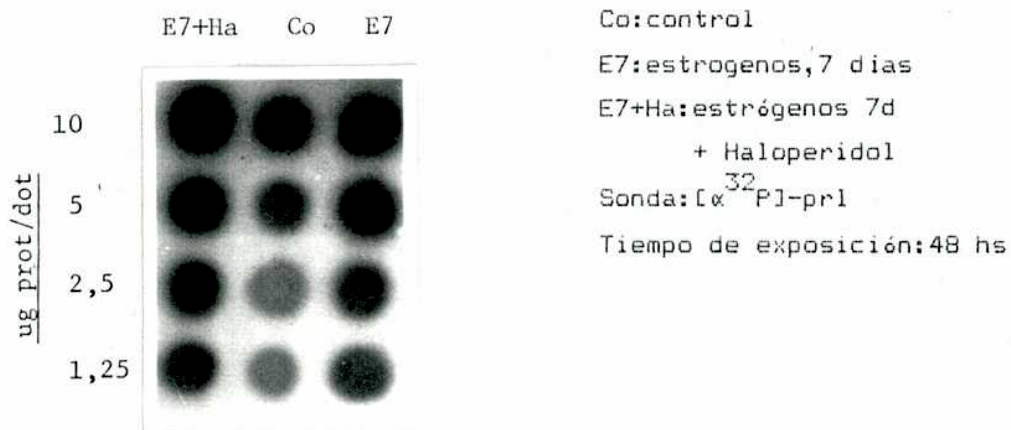




figura 5

Dot Blots de extractos citoplasmáticos de APG

Efecto de la administración de estrógenos y agonistas dopaminérgicos



figura 6

Dot Blots de extractos citoplasmáticos de APG

Efectos de la orquidectomía bilateral

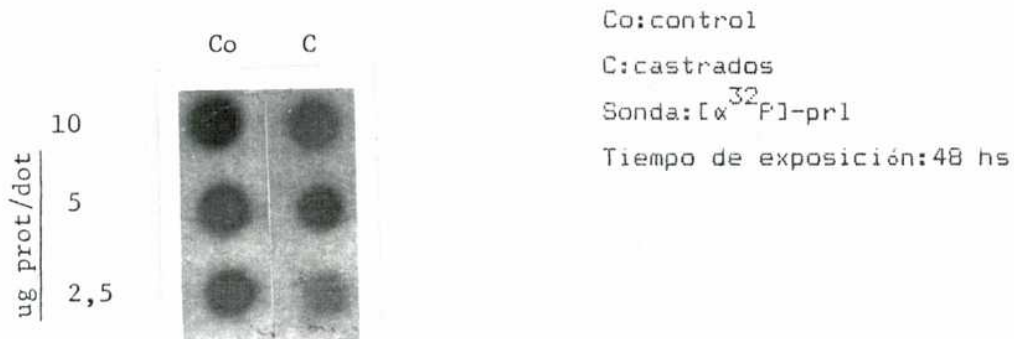
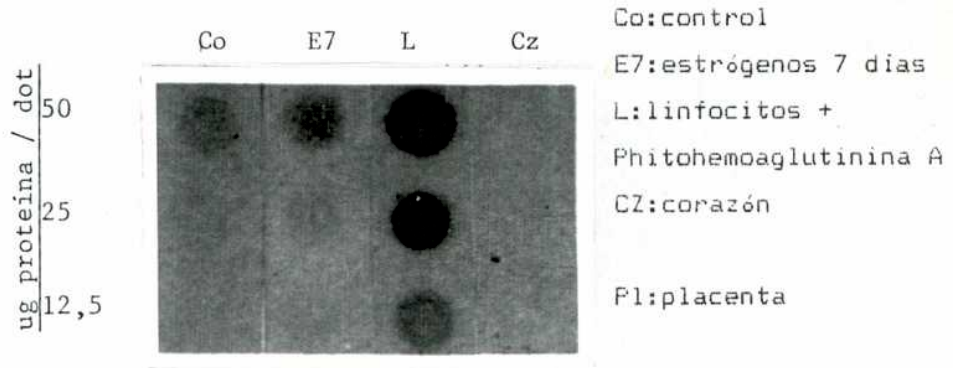


figura 7

Dot Blots de extractos citoplasmáticos de APG  
Administración de estrógenos durante siete días

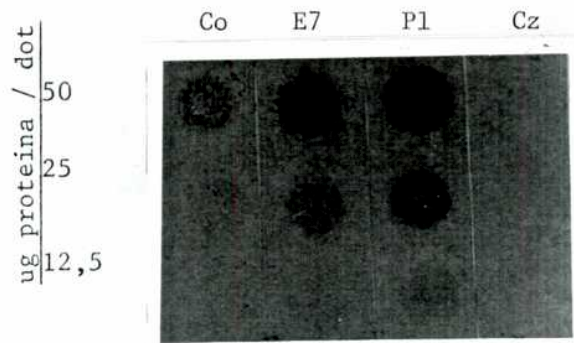
A) Sonda: [ $\alpha^{32}$ P]-c-myc

Tiempo de exposición: 24 días



B) Sonda: [ $\alpha^{32}$ P]-c-fos

Tiempo de exposición: 21 días



C) Sonda: [ $\alpha^{32}$ P]-rADN

Tiempo de exposición: 48 hs

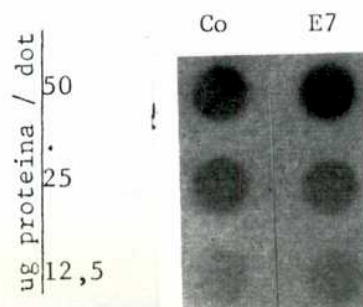
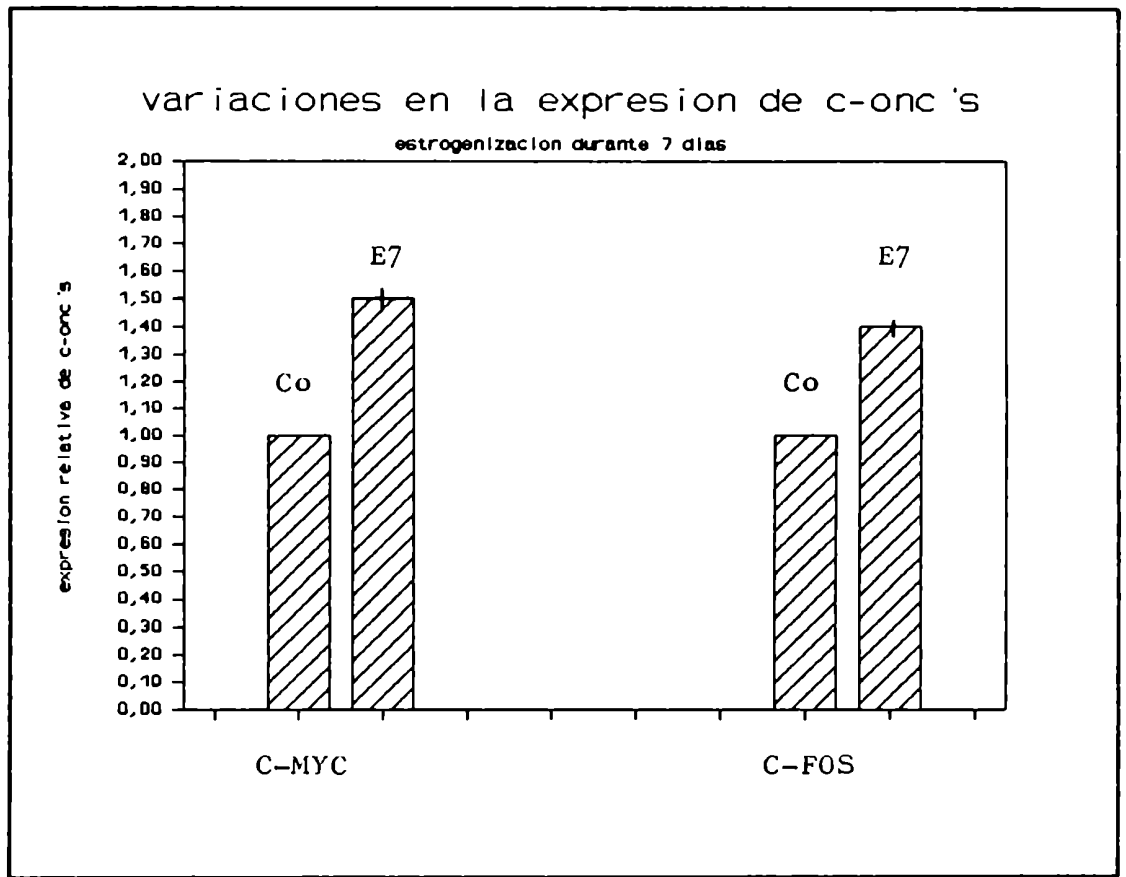


FIGURA 8



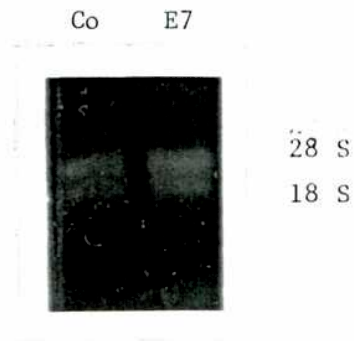
Co=control

E7=estrógenos 7 días

figura 9

Electroforesis en gel de agarosa 1 % de ARN total:  
Northern blot e hibridización con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]prl

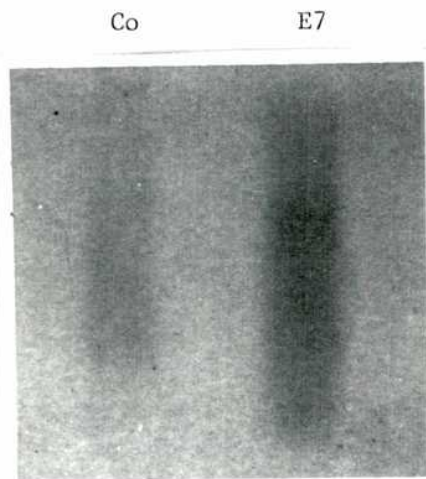
A) ARN total adenohipofisario:gel de agarosa



Co:control

E7:estrógenos 7 días

B)Hibridización



Sonda:[ $\alpha$ - $^{32}$ P]-prl

Tiempo de exposición:48 hs

ARNm prolactina

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS PROTOONCOGENES C-MYC Y C-FOS LUEGO DE LA ESTROGENIZACIÓN

En todos los experimentos que se presentan a continuación se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- a-Tratamiento farmacológico o quirúrgico (orquidectomía : ver más adelante)
- b-Sacrificio de los animales por decapitación:
  - Recolección de sangre periférica:determinaciones hormonales
  - Obtención de APG:purificación de ARN total y estudios de expresión genética.

EFECTOS DE LA ESTROGENIZACIÓN POR TIEMPOS CORTOS

Algunos de los experimentos descritos anteriormente fueron repetidos con muestras de ARN<sup>tot</sup> adenohipofisario en reemplazo de los extractos citoplasmáticos utilizados hasta el momento.

El primer experimento que se realizó corresponde a un estudio de la expresión del gen de la prolactina a tiempos cortos luego de la inyección de estrógenos.Los tiempos de estudio posteriores a la estrogenización son los mismos en los cuales se analiza a continuación la expresión de c-onc's,y se indican en la figura 10.El número de animales osciló entre 10 y 12 ratas/grupo experimental dado que es necesaria una mayor cantidad inicial de tejido para obtener rendimientos adecuados en la purificación posterior de ARN.

El análisis densitométrico a partir de la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $^{32}$ P]prl indicó que en los primeros 120' luego de la estrogenización no ocurren cambios a nivel de la concentración del ARNm específico del gen de la prolactina(resultados no mostrados).

En la figura 10 se presentan los resultados del análisis de la expresión del gen c-myc (10 A) y c-fos (10 C) a los 15',30',60'y 120'después de la estrogenización.Las muestras utilizadas como control positivo o negativo para cada una de dichas sondas son las mencionadas al describir el uso de estas sondas para hibridización de extractos citoplasmáticos.Sin embargo se utilizó ARN<sup>tot</sup> purificado a partir de

dichos tejidos en lugar de extractos citoplasmáticos. Para el análisis densitométrico de los resultados se calcularon los coeficientes de corrección mencionados en la sección de Materiales y Métodos, en base a los datos de la hibridización con ( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)rADN (figura 10 B y D). Solo se consideraron los dots de cada muestra con la mayor concentración sembrada (Figura 10 B y D).

El aumento en la concentración del ARNm correspondiente a c-myc fue gradual a lo largo del periodo de tiempo estudiado. Se registró un incremento del 66 % respecto de los niveles basales luego de 30' y del 80 % a los 60'. La máxima concentración fue observada a los 120' y superó el 100 % de aumento respecto de la concentración del mismo transcrito en la APG proveniente de los animales control.

El perfil de las concentraciones obtenidas en el caso del ARNm del protooncogen c-fos mostró un pico de aumento máximo de 50 % a los 15' del inicio del tratamiento. A los 30' y durante todo el periodo de tiempo estudiado dicha concentración fue similar a la presente en la APG de animales control.

En la figura 11 se dispusieron en forma conjunta las variaciones en la expresión de ambos protooncogenes luego de la estrogenización por tiempos cortos. Se evaluaron y se expresaron los resultados del modo explicado en la figura 8.

#### EFFECTOS DE LA ESTROGENIZACIÓN CRÓNICA Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS

Se trabajó con tres grupos de animales. Dos grupos fueron estrogenizados durante siete días. Uno de ellos recibió además tres dosis de Bromocriptina (2 mg/rata) 72 hs, 48 hs y 24 hs antes del sacrificio.

Como se observa en la tabla 1, el índice mitótico en la APG de las ratas adultas es muy bajo. El tratamiento con estrógenos durante siete días produjo un incremento significativo en el índice mitótico, en la prolactinemia y en el número de células proláctínicas. La administración del

agonista dopaminérgico a ratas previamente estrogenizadas revirtió estos efectos estrogénicos.

Se analizó la expresión del gen de prolactina en preparaciones de ARN total obtenido a partir de las APG provenientes de ratas de los tres grupos mencionados.

La figura 12 A corresponde a la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]prl. Se encontró un aumento en la concentración del ARNm de prl de 450 % respecto de la concentración en las muestras provenientes de APG de animales control. El tratamiento con el agonista dopaminérgico produjo una reversión en los niveles de expresión de ARNm a valores que no difirieron significativamente de los determinados para los animales control.

Se reutilizaron estos filtros para el estudio de la expresión de protooncogenes. En la figura 12 B y C se muestran las autoradiografías obtenidas luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-myc (12 B) y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-fos (12 C).

En el primer caso se determinó que la concentración de ARNm específico aumentó en un 230 % luego de la estrogenización durante siete días. El tratamiento con Bc revirtió aproximadamente en 80 % los efectos estrogénicos sobre la expresión de c-myc.

En el segundo caso se determinó que la concentración de ARNm correspondiente al protooncogen c-fos aumentó en un 280 % luego de la estrogenización durante siete días. El tratamiento con Bc revirtió un 70 % de los efectos estrogénicos sobre la expresión de c-fos. Los datos densitométricos obtenidos luego del análisis de la figura 12 A, B y C fueron corregidos en base a los coeficientes calculados a partir de la autoradiografía obtenida por hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]rADN (figura 12 D).

La figura 12 E corresponde a la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-myc de un Northern blot realizado con las mismas muestras de ARNtot pertenecientes a los siguientes grupos de animales:

- Co: control
- E7d: estrogenizados durante siete días
- E7d, tratados con Bromocriptina

Dos calles adicionales corresponden a los controles de hibridización positivo (ARN de linfocitos estimulados a proliferar con una lectina) y negativo (ARN proveniente de corazón de rata) respectivamente. La banda de hibridización que se observa en todas las calles salvo en el control negativo posee un tamaño de 2,3 Kb, el cual coincide con el tamaño esperado para el ARNm del protooncogen c-myc. De un modo similar al que se observó en la figura 12 B, como resultado de la hibridización por siete días ocurre un aumento específico en la expresión del protooncogen c-myc el cual es parcialmente revertido luego del tratamiento con Bc.

La figura 12 F corresponde a la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $^{32}$ P]c-fos de un Northern blot realizado con las mismas muestras referidas en la descripción de la figura 12 E. En este caso, el control positivo de hibridización consistió en ARN proveniente de placenta humana mientras que el control negativo fue el mismo que en el caso anterior. La banda de hibridización observada posee un tamaño de 2,2 Kb, el cual coincide con el tamaño esperado para el ARNm buscado, en tejidos de rata. Los efectos de la estrogenización durante siete días y del tratamiento con Bc que se observan en la figura 12 F coinciden con los obtenidos por el análisis mediante hibridización en dot blots utilizando la misma sonda radiactiva.

Nuestro análisis está basado principalmente en un estudio por medio de hibridización molecular en dot blots. La separación electroforética de las especies de ARN previa a su hibridización con las mismas sondas utilizadas en dicho análisis (northern blot) brinda información adicional a la obtenida por medio de dot blots. En particular, es posible corroborar a partir de las figuras 12 E y F que ambas sondas radiactivas homologas a protooncogenes reconocen respectivamente a especies de ARNm del tamaño esperado.

En la figura 13 fueron dispuestos en forma conjunta los resultados obtenidos sobre expresión de c-onc's durante la estrogenización crónica así como la reversión con Bromocriptina. Se evaluaron y expresaron los resultados del modo explicado en el caso de la figura 8.



TABLA 1

DIVERSOS EFECTOS ESTROGENICOS SOBRE LA APG DE RATA Y SU REVERSION POR EL AGONISTA DOPAMINERGICO BROMOCRIPTINA .

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>No DE CEL.</u>	<u>INDICE</u>	<u>PRL SERICA</u>	<u>AER ±</u>
	<u>PROLACTINICAS</u>	<u>MITOTICO</u>	(ng/ml)	<u>S.E.M.</u>
VEHICULO	3114 ± 139	1 ± 0.2	30 ± 11	69 ± 7
ESTRADIOL(7D)	4946 ± 186*	25 ± 2*	135 ± 14*	128 ± 12*
ESTRADIOL + BC	2922 ± 127**	1.6 ± 0.6**	23 ± 4**	53 ± 6**

\* p < 0.005 Estradiol(7d) vs control

\*\* p < 0.005 Estradiol + Bc vs Estradiol(7d)

AER : Actividad Especifica Relativa

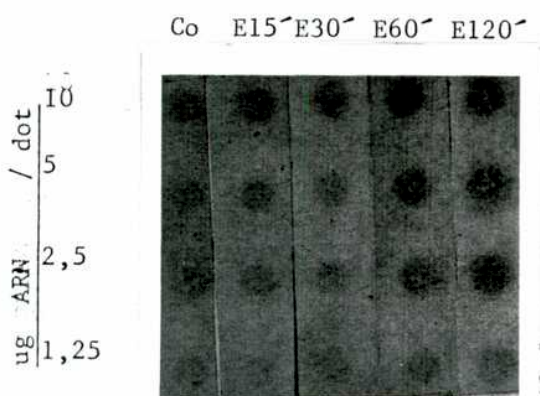
figura 10

Dot Blots de ARNt adenohipofisario

Efecto de la administración de estrógenos por tiempos cortos

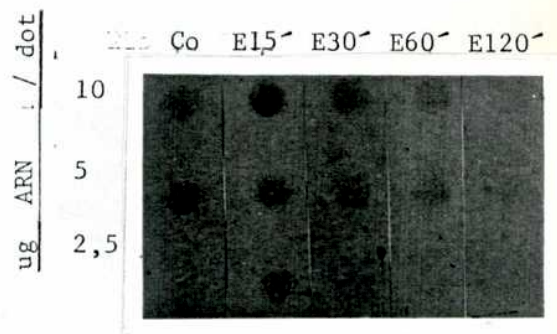
A) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-myc

Tiempo de exposición: 24 días

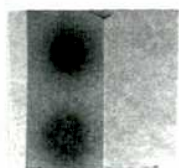


C) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-fos

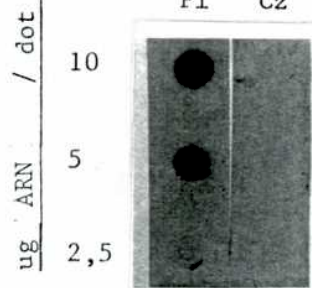
Tiempo de exposición :24 días



L+PMA Cz

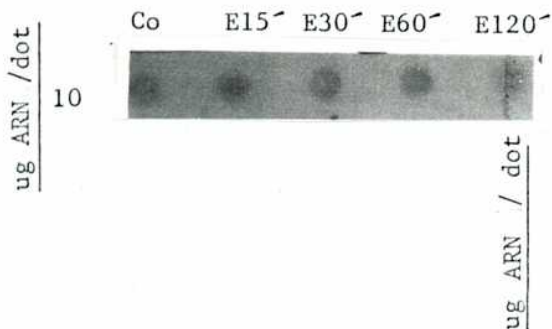


P1 Cz



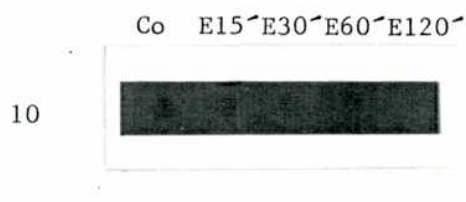
B) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]r-ADN

Tiempo de exposición: 72 hs



D) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]r-ADN

Tiempo de exposición :72 hs

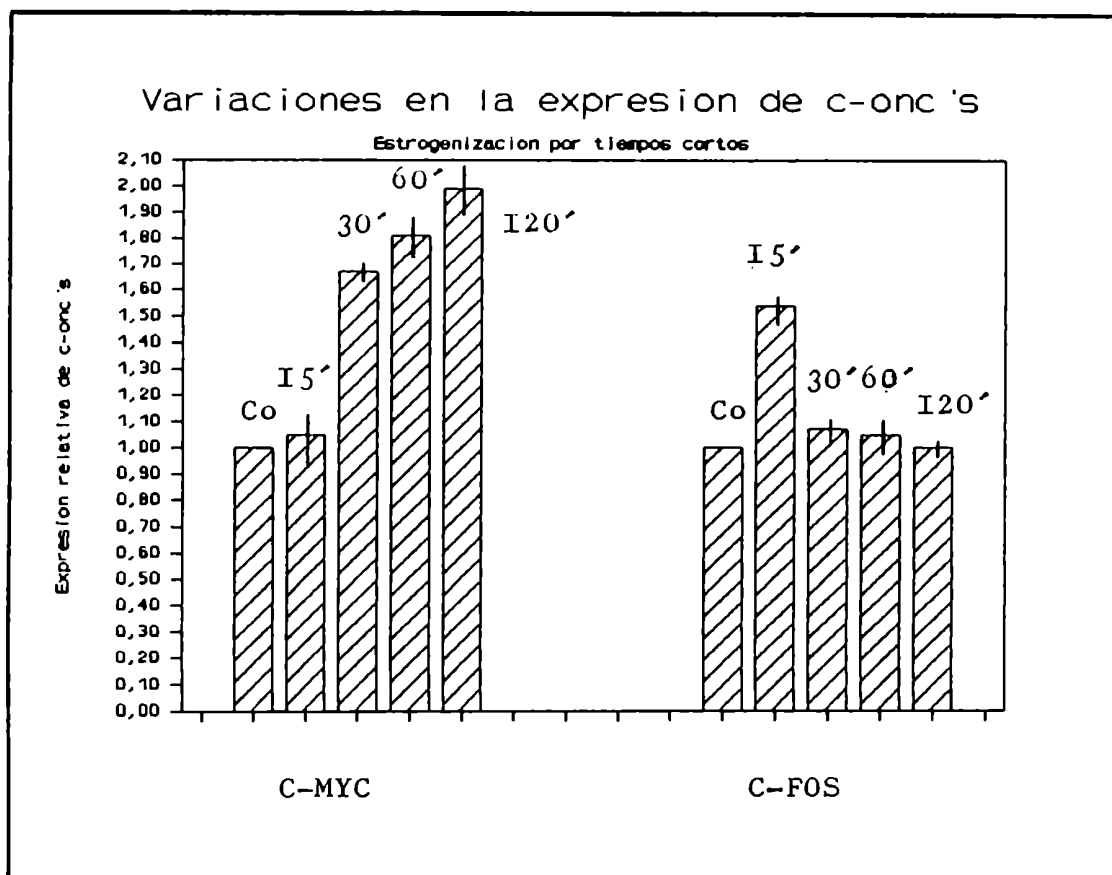


Co: control. Tiempos de estrogenización: E15', E30', E60', E120'

L+PMA: linfocitos + Phytohemaglutinina A,

P: placenta, Cz: corazón.

FIGURA 11



Co=control

Tiempos de estrogenizacion: 15',30',60',120'.

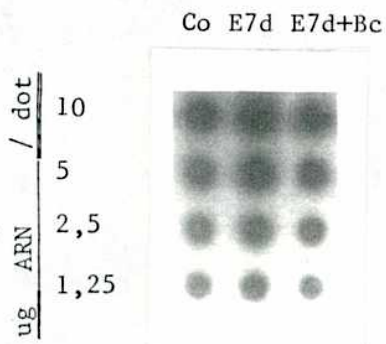
figura 12

Dot Blots de ARN total adenohipofisario

Estrogenización crónica: Efectos del agonista dopaminérgico Bromocriptina

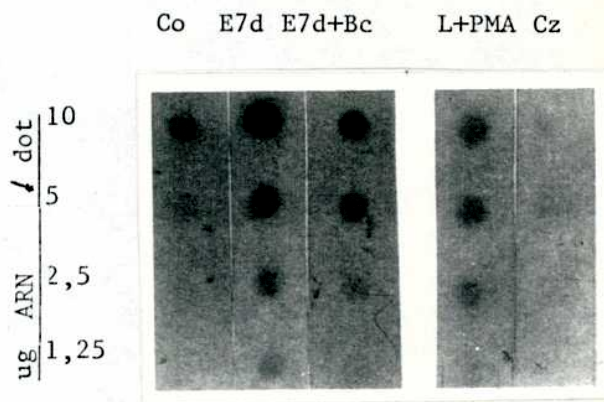
A) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-pri

Tiempo de exposición: 48 hs



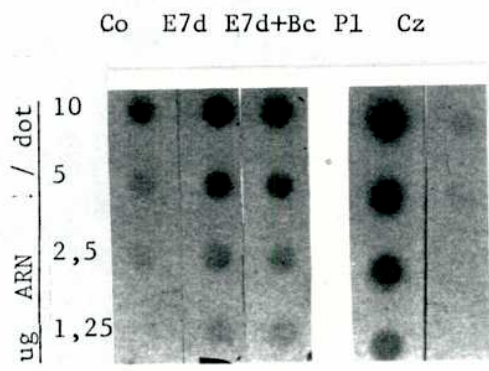
B) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-myc

Tiempo de exposición: 24 días



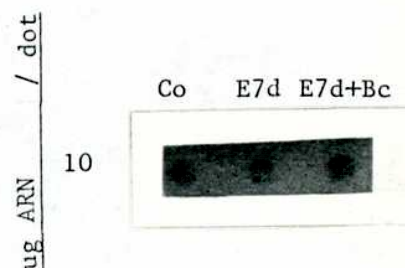
C) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-fos

Tiempo de exposición: 22 días



D) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-r-ADN

Tiempo de exposición: 48 hs



Co: control,

E7d: estrógenos 7 días,

E7d+Bc: estrógenos 7d + Bromocriptina,

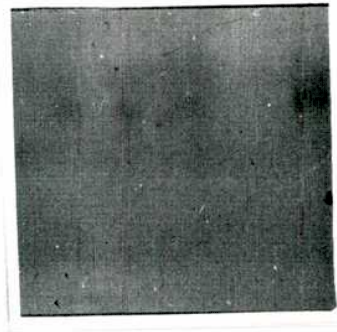
L+PMA: linfocitos + Phytohemaglutinina A, P: placenta, Cz: corazón.

## FIGURA 12

Northern blot de ARN total adenohipofisarioEstrogenización crónica: Efectos del agonista dopaminérgico BromocriptinaE) Sonda utilizada: [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]c-myc

Tiempo de exposición: 25 días

(-) (+)  
Co E7d E7d+Bc Cz L+PMA

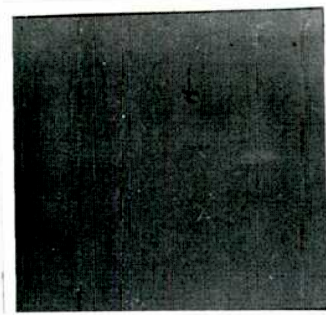


ARNm c-myc

F) Sonda utilizada: [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]c-fos

Tiempo de exposición: 25 días

(+) (-)  
Pl Cz Co E7d E7d+Bc



ARNm c-fos

Co: control

E7d: estrógenos, siete días

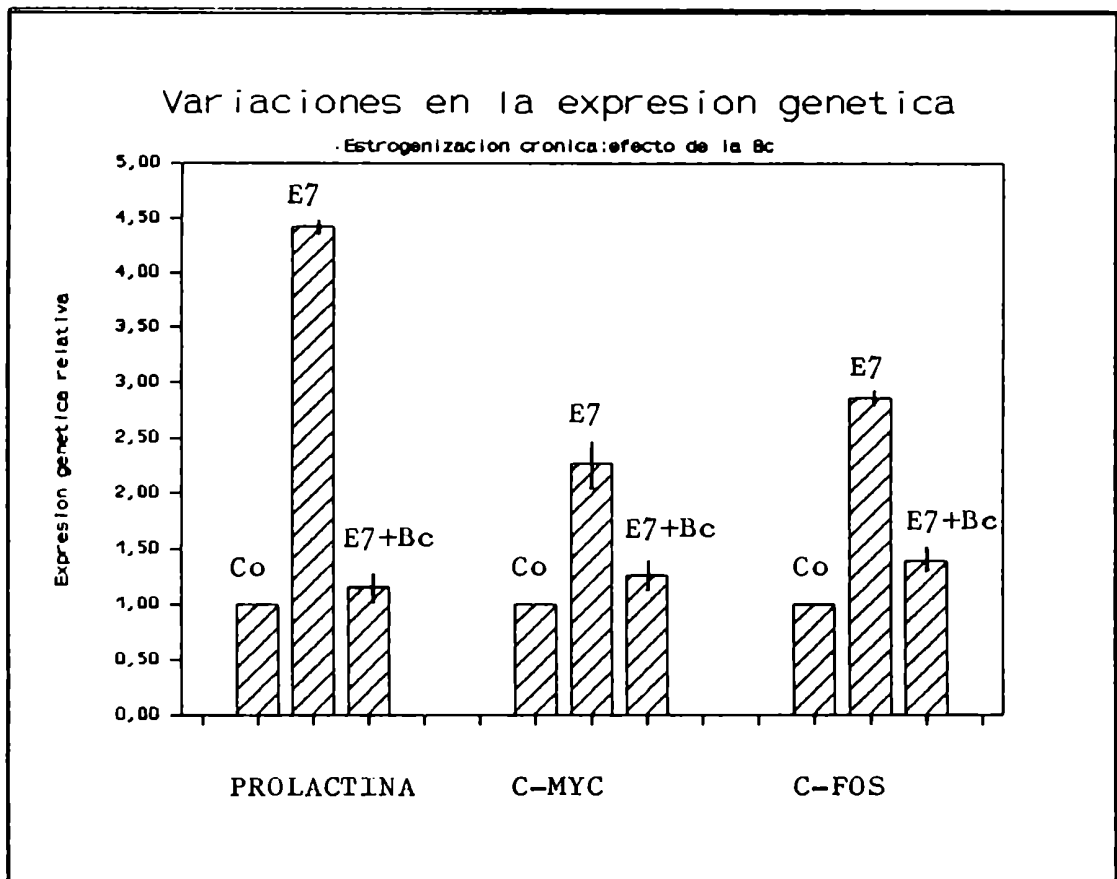
E7d + Bc: E7d + bromocriptina

Pl: placenta

Cz: corazón

L+PMA: linfocitos + Phitohemoaglutinina A

FIGURA 13



Co=control

E7=estrógenos 7 días

E7 + Bc=estrógenos 7 días + bromocriptina

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS PROTOONCOGENES C-MYC Y C-FOS  
LUEGO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTAGONISTA DOPAMINÉRGICO HALOPERIDOL

Tres grupos de animales recibieron una única inyección (300 ug/rata) de haloperidol y fueron sacrificados 30', 90' y 4 hs luego del inicio de dicho tratamiento. Se trabajó además con un grupo control no tratado. Dos grupos diferentes de animales fueron estrogenizados durante siete días. Los animales de uno de estos grupos recibieron también una dosis de haloperidol y fueron sacrificados a los 15'.

En la tabla 2B se observa que el nivel de prolactina sérica fue aproximadamente treinta veces mayor que los niveles basales, en los animales tratados con haloperidol durante 30'. Los valores disminuyeron paulatinamente y luego de 4 hs el nivel de prolactina sérica fue diez veces mayor que el normal. En los animales estrogenizados dicho valor es aproximadamente cuatro veces mayor que en los animales no tratados. Luego de 15' de la administración de haloperidol se determinó un aumento de seis veces sobre el valor basal.

Se evaluaron las variaciones en la concentración del ARNm proveniente del gen de la prolactina y los resultados se muestran en la figura 14 A. Se determinó un aumento en la concentración del ARNm específico a los 30' cuya magnitud fue de aproximadamente 400 % respecto de los valores iniciales. Durante el periodo de tiempo abarcado en estos experimentos se observó una paulatina disminución en la concentración de ARNm. Luego de 4 hs, su valor fue 100 % mayor respecto de los valores anteriores a la administración del antagonista.

Los mismos filtros fueron reutilizados para el análisis de la expresión de c-myc (figura 14 B). El análisis densitométrico indicó que no hubo variaciones en la concentración de ARNm específico en los diferentes tiempos luego del tratamiento con haloperidol durante el periodo de tiempo estudiado. En el caso de la rehibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-fos tampoco detectamos variaciones en la concentración del ARNm (no se muestra la autoradiografía).

Por otro lado, se realizó el estudio de la expresión de c-onc's en ratas previamente estrogenizadas y tratadas con haloperidol y en los mismos intervalos de tiempo utilizados en el estudio realizado con

animales no estrogenizados.

La figura 15 A corresponde a la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]prl. Se determinó un aumento en la concentración del ARNm específico luego de 30' del inicio del tratamiento. Dicho valor disminuyó gradualmente aunque permaneció aumentado en un valor aproximadamente 400 % mayor que el basal luego de 4 hs.

En la figura 15 B se muestra la autoradiografía correspondiente a la rehibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-myc. Se determinó que la concentración de dicho ARNm está aumentada en un 80 % respecto de la concentración determinada al inicio del tratamiento, luego de 90'. Transcurridas 4 hs dicha concentración retornó a su valor basal.

En la figura 15 C se muestra la autoradiografía correspondiente a la rehibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-fos. En este caso se determinó un aumento de 220 % a los 30' del comienzo del tratamiento. Este valor retornó al nivel basal a partir de los 90'.

Para la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]rADN se utilizaron los dots de mayor concentración para cada una de las muestras (figura 15 D). En la figura 16 se dispusieron en forma conjunta los resultados obtenidos del análisis de la expresión de c-onc's luego del tratamiento con haloperidol. Se evaluaron y expresaron los resultados del modo explicado en el caso de la figura 8.



TABLA 2A  
EFFECTOS DEL AGONISTA DOPAMINERGICO HALOPERIDOL SOBRE LA SINTESIS DE ADN EN LA  
APG DE RATA

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>TIEMPO LUEGO DE LA INYECCION</u> <u>DEL ANTAGONISTA DOPAMINERGICO</u>	<u>RADIOACTIVIDAD ESPECIFICA</u> <u>RELATIVA PROMEDIO ± S.E.M.</u>
--------------------	---	---

---

VEHICULO	---	69 ± 7
HALOPERIDOL	20 hs	98 ± 11 *
ESTROGENOS		128 ± 12 *
ESTROGENOS + HALOPERIDOL	20 HS	266 ± 28 **

\* Haloperidol vs.vehiculo / Estrógenos vs.vehiculo      p < 0,02  
 \*\* Estrógenos + Haloperidol vs Estrógenos                      p < 0,005

TABLA 2 B  
EFFECTO DEL HALOPERIDOL SOBRE LA CONCENTRACION DE PROLACTINA SERICA

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>TIEMPO LUEGO DE LA INYECCION</u> <u>DEL ANTAGONISTA DOPAMINERGICO</u>	<u>NIVELES DE PROLACTINA</u> <u>SERICA (ng / ml)</u>
--------------------	---	---

---

VEHICULO		22 ± 7
HALOPERIDOL	30 '	650 ± 50 *
HALOPERIDOL	90	320 ± 28 *
HALOPERIDOL	4 hs	210 ± 16 *
ESTROGENOS	7 dias	81 ± 15 *
ESTROGENOS (7 Dias) + HALOPERIDOL	15 '	439 ± 50 **

\* Haloperidol vs.vehiculo / Estrógenos vs. vehiculo      p < 0,002  
 \*\* Estrógenos + Haloperidol vs Estrógenos                      p < 0,002

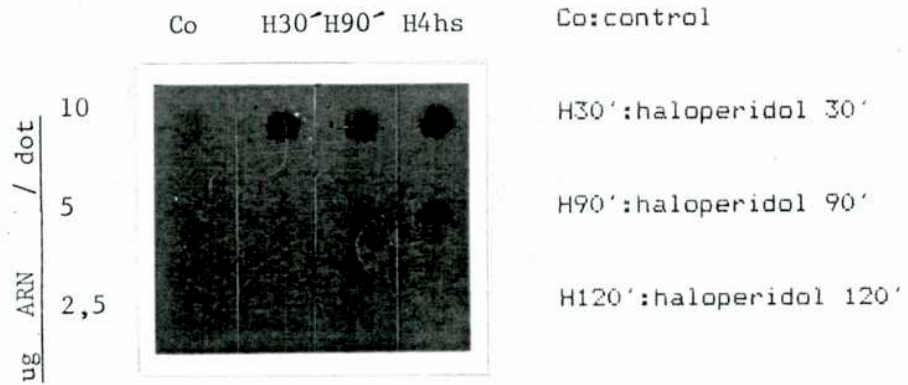
figura 14

Dot Blots de ARNt adenohipofisario

Efecto del tratamiento con Haloperidol en ratas no estrogenizadas

A) Sonda:  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{prl}$

Tiempo de exposición: 72 hs



B) Sonda:  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{c-myc}$

Tiempo de exposición: 25 días

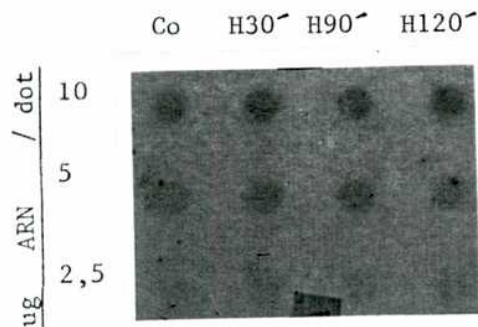


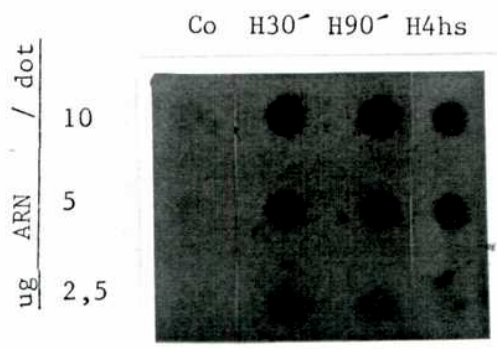
figura 15

Dot Blots de ARNt adenohipofisario

Efecto del tratamiento con Haloperidol en ratas estrogenizadas

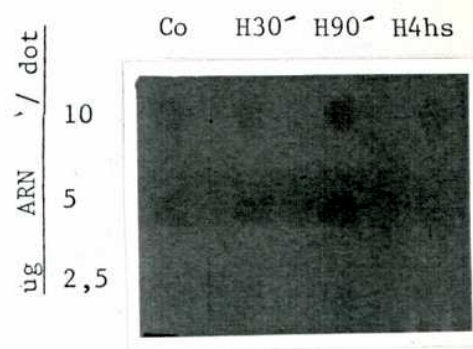
A) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-prl

Tiempo de exposición: 48 hs



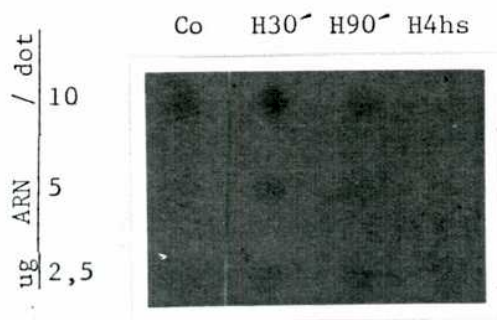
B) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-myc

Tiempo de exposición :25 días



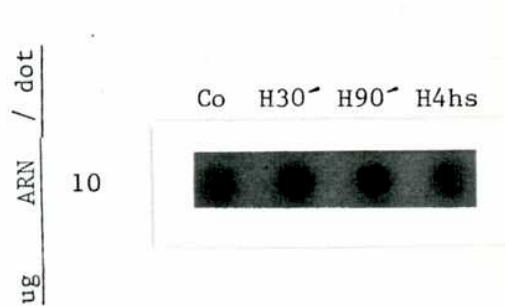
C) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-fos

Tiempo de exposición:24 días



D) Sonda: [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]r-ADN

Tiempo de exposición :72 hs



Co: control,

H30': haloperidol 30',

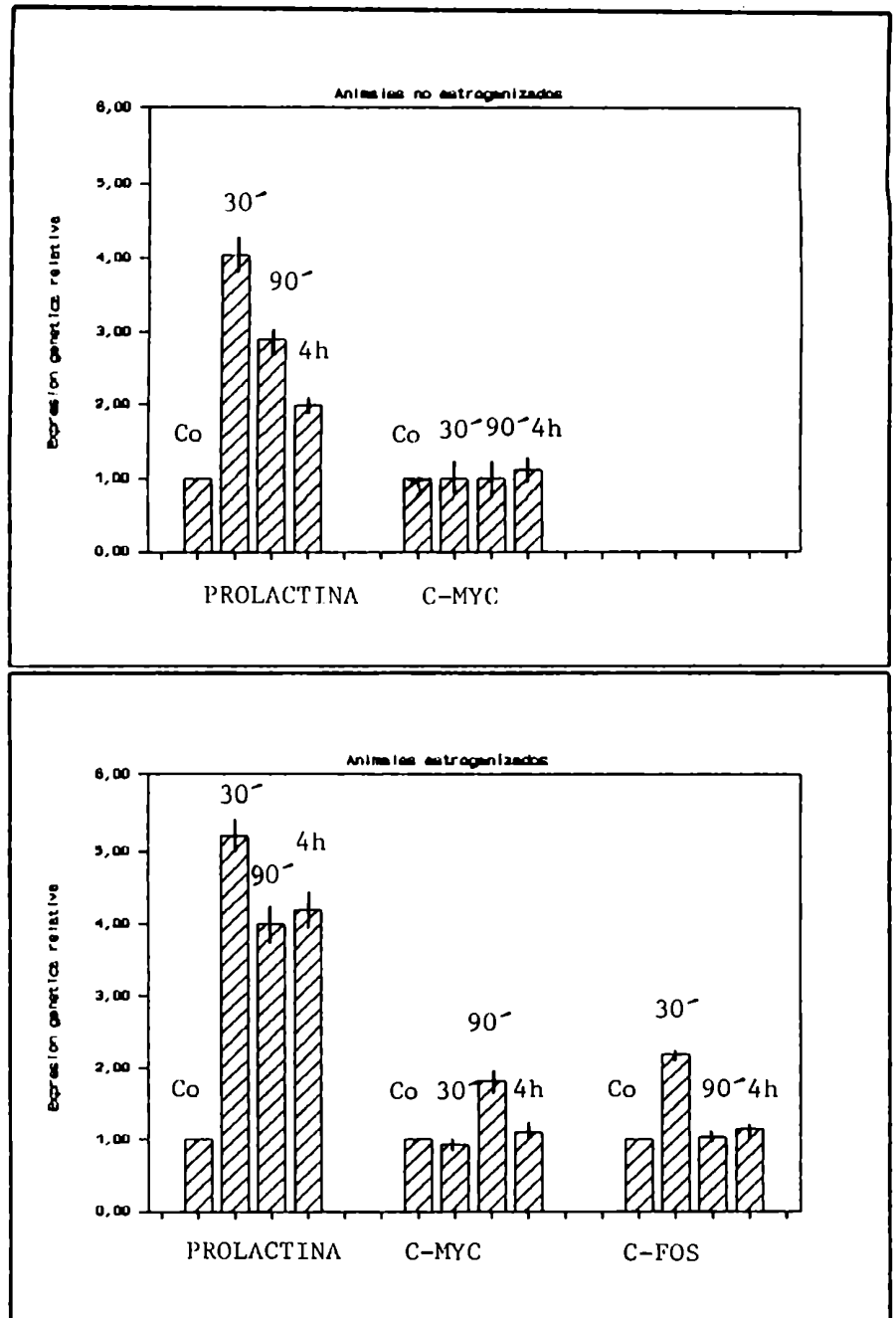
H90': haloperidol 90',

H120': haloperidol 120',

L+FMA: linfocitos + phytohemaglutinina A, Cz: corazón, Pl: placenta

FIGURA 16:

Variaciones en la expresion genetica  
Efectos del haloperidol



Co=control. Tiempos de administracion de Haloperidol: 30', 90', 4h

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS PROTOONCOGENES C-MYC Y C-FOS LUEGO DE LA  
ORQUIDECTOMÍA BILATERAL EN RATAS MACHO ADULTAS

En la tabla 3 se resumen los resultados obtenidos luego del análisis de diversos parámetros tales como la incorporación de [ $^3$ H]Timidina al ADN o el número de mitosis/mm<sup>2</sup> en la APG de animales castrados durante distintos periodos de tiempo. Por otro lado, se dosó el nivel de LH sérica observándose un aumento de quince veces respecto del nivel basal 24 hs después de la castración. A los quince días el nivel de LH permaneció significativamente elevado. También en este momento se observó un aumento significativo en la incorporación de [ $^3$ H]Timidina al ADN. El tratamiento con DHT revirtió ambos efectos retornándose a los niveles encontrados en animales intactos.

La figura 17 A corresponde a la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]prl. No se observaron diferencias significativas en la concentración de ARNm entre las muestras provenientes de APG de animales intactos o de animales castrados 24 hs antes de su sacrificio. La concentración de dicho ARNm fue un 15 % menor que la observada en animales intactos y se mantuvo constante luego del tratamiento con DHT.

La figura 17 B corresponde a la autoradiografía obtenida luego de la hibridización del mismo filtro con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]c-myc. La concentración de dicho ARNm disminuyó en 10 % respecto de la concentración en la APG de animales intactos 15 días después de la operación y no se modificó luego del tratamiento con DHT. Por otro lado la concentración de [ $\alpha$ - $^{32}$ P]c-myc en APG de animales intactos fue similar a la detectada 24 hs después de la operación.

El análisis densitométrico de los resultados mostrados en la figura 17 A y B, fue realizado en base a la hibridización con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]rADN (figura 17 C). En la figura 18 se disponen en forma conjunta los resultados del estudio de expresión genética en la APG de animales castrados por diferentes periodos de tiempo. Se evaluaron y expresaron los resultados del modo descrito en el caso de la figura 8.

TABLA 3

DIVERSOS EFECTOS DE LA CASTRACION EN LA APG DE RATAS O ADULTAS Y LA ADMINISTRACION DE DIHIDROTESTOSTERONA

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>AER ± S.E.M.</u>	<u>Nº DE MITOSIS POR mm<sup>2</sup></u>	<u>PRL SERICA (ng / ml)</u>	<u>LH SERICA (ng / ml)</u>
ANIMALES INTACTOS	101 ± 3	2 ± 0,1	18 ± 7	34 ± 3
CASTRADOS 24 hs	121 ± 12	No det	No det	577 ± 45 *
CASTRADOS 15 días	174 ± 10 *	21 ± 0,8	5 ± 2	451 ± 31 *
CASTRADOS 15 días + DHT	22 ± 8 **	No det	11 ± 5	80 ± 12**

\* Castrados vs. control p < 0,01

\*\* Castrados + DHT vs. castrados p < 0,01

AER :Actividad Especifica Relativa

No det :no determinado

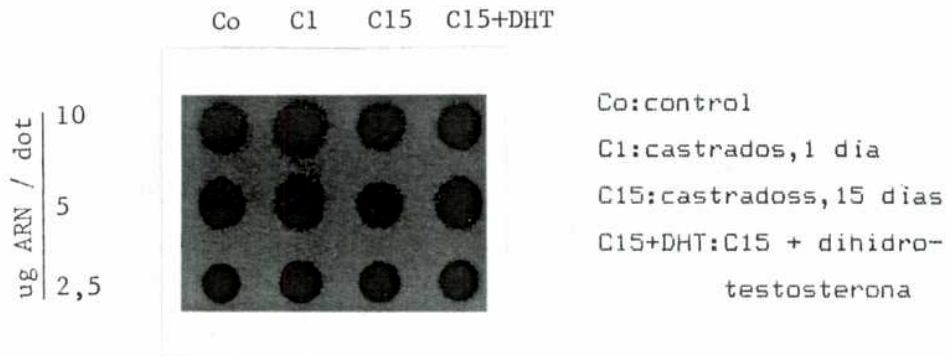
Figura 17

Dot Blots de ARNt adenohipofisario

Efectos de la castración

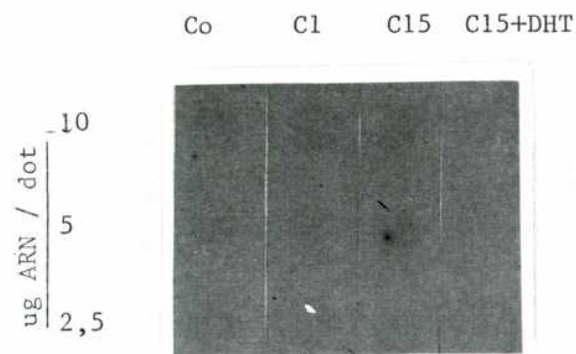
A) Sonda: [ $\alpha^{32}$ P]prl

Tiempo de exposición: 48 horas



B) Sonda: [ $\alpha^{32}$ P]c-myc

Tiempo de exposición: 21 días



C) Sonda: [ $\alpha^{32}$ P]-rADN

Tiempo de exposición: 48 hs

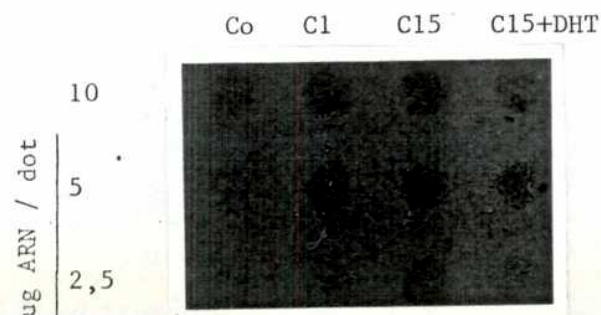
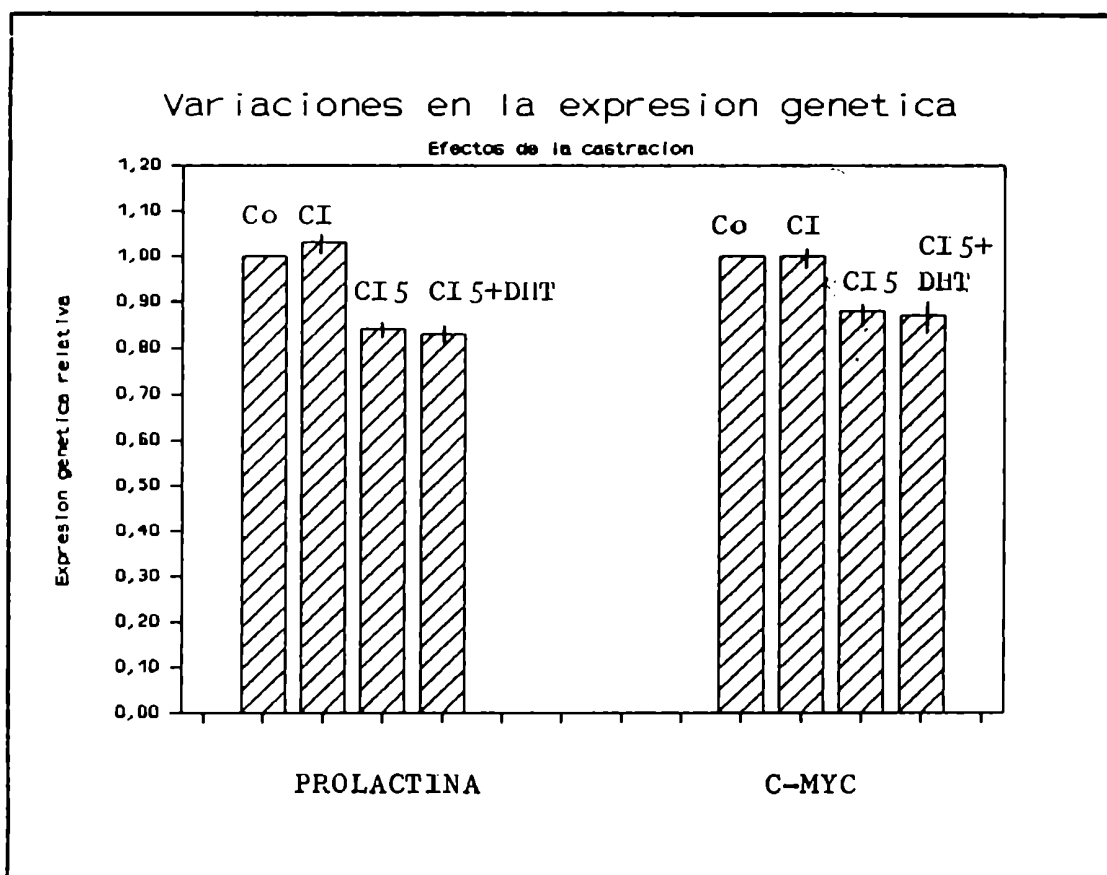


FIGURA 18



Co=control

C1=castrados, 1 dia

C15=castrados, 15 dias

C15+DHT=C15 + dihidrotestosterona (48 hs antes del sacrificio)



ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS

Se realizó un estudio de la expresión de genes hormonales adenohipofisarios (prolactina y hormona de crecimiento) en una población de treinta pacientes portadores de adenomas hipofisarios de orígenes diversos.

Las muestras tumorales obtenidas luego de la cirugía, fueron mantenidas en hielo seco y enviadas en esas condiciones para su almacenamiento a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su procesamiento.

Las pacientes analizadas en este estudio provinieron en todos los casos del Servicio de Neurocirugía del Hospital Santa Lucía.

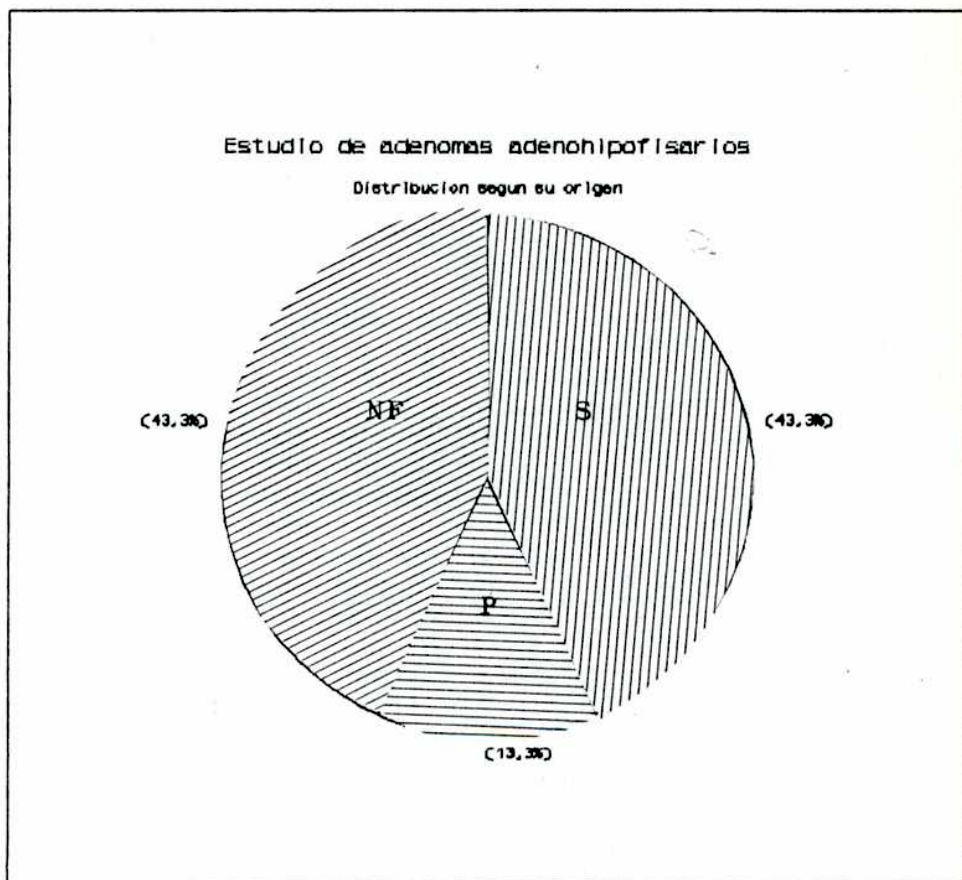
En la figura 19 se representa gráficamente la distribución de los diferentes tipos de tumores adenohipofisarios analizados.

En la tabla 4 se agruparon los datos clínicos de los pacientes portadores de las patologías hipofisarias abarcadas en este estudio. En todos los casos se trata de macroadenomas cuyo tamaño es mayor de  $10\text{ mm}^3$ .

TABLA 4  
PARAMETROS CLINICOS

<u>TIPO DE ADENOMA</u>	<u>Nº DE CASOS</u>	<u>RANGO DE EDAD</u>	<u>SEXO</u>	
			M	F
ACROMEGALIAS	13	36-47	7	6
PROLACTINOMAS	4	29-35	1	3
Nº FUNCIONANTES	13	39-45	7	6

FIGURA 19



Adenomas no funcionantes=13 (NF)  
Adenomas prolactinicos=4 (P)  
Adenomas somatotróficos=13 (S)

Se utilizó entre 25 y 50 mg de tejido de cada una de las diferentes muestras para la obtención de extractos citoplasmáticos. Luego de su cuantificación se los sembró sobre filtros de NC para su análisis por hibridación con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{hPrI}$  y  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{hGH}$ .

A continuación se muestran algunos de los resultados obtenidos, representativos del tipo de información obtenida por medio de este análisis.

En la figura 20 se observa la autoradiografía obtenida luego de la hibridación de un mismo filtro sucesivamente con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{hGH}$  (fig. 20 B) y  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{hPrI}$  (fig. 20 A). En este filtro se sembraron 11 muestras representativas de las diferentes patologías abarcadas en este estudio: prolactinomas (tres), adenomas no funcionantes (cuatro) y adenomas somatotróficos (cuatro). A uno de los pacientes portadores de prolactinoma (\*) se le suministró previamente a la cirugía un agonista dopaminérgico (bromocriptina). Todas las muestras provenientes de tumores somatotróficos resultaron positivas luego de la hibridación con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{hGH}$ . La intensidad de la señal fue variable en las diferentes muestras que resultaron positivas a pesar de haber sembrado en todos los casos la misma cantidad de material (extractos conteniendo 10; 5 y 2,5  $\mu\text{g}$  de proteína). Todos los extractos provenientes de tumores no funcionantes fueron negativos. Solo en uno de los prolactinomas se detectó señal de hibridación. No obstante, ésta fue menor a la obtenida en todos los casos de tumores somatotróficos incluidos en este mismo filtro y por lo tanto hibridados en idénticas condiciones.

En la figura 20 A se observan señales positivas de hibridación de intensidad variable solo en los tumores prolactínicos. En acromegalias y en adenomas No Funcionantes no se obtuvieron señales cuando se trabajó con la sonda que detecta ARNm proveniente del gen de la prolactina.

Asumiendo que las diferencias en la cantidad de material sembrado en las diversas muestras es pequeña, se asignó a todos los resultados un valor semicuantitativo basado en el análisis densitométrico directo. Se agruparon los valores en tres categorías y los resultados de esta clasificación se presentan en la tabla 5.

-Negativos (-)

-Positivos tenues (+)

-Positivos francos (++)

TABLA 5

CLASIFICACION SEMICUANTITATIVA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS  
POR HIBRIDIZACION EN ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS

<u>TIPO DE TUMOR</u>	<u>[<math>\alpha</math>-<sup>32</sup>P]hGH</u>			<u>[<math>\alpha</math>-<sup>32</sup>P]hPr1</u>		
ACROMEGALIAS	0	3	10	11	2	0
PROLACTINOMAS	3	1	0	0	1*	3
NO FUNCIONANTES	11	2	0	12	1	0

(\*)Paciente portador de prolactinoma ,al que se le suministró Bromocriptina previamente a la operacion

En la figura 21 se muestra la autoradiografía obtenida luego de la hibridización de un filtro que contiene diferentes muestras provenientes de adenomas hipofisarios. Esta autoradiografía se presenta debido a que es interesante destacar especialmente una de dichas muestras: el material que figura rotulado como "NF". Se trata de una muestra proveniente de un paciente masculino de 27 años que fue sometido a cirugía con un diagnóstico presuntivo de adenoma cromóforo basado en datos clínicos. El análisis inmunohistoquímico indicaba la presencia de hormona de crecimiento inmunoreactiva en el 70 % de las células y de prolactina inmunoreactiva en el 40 % de las mismas.

Cuando realizamos el análisis de la expresión genética que se muestra en la figura 21, detectamos la presencia de ARNm proveniente del gen de hormona de crecimiento. Como un control interno dentro del mismo experimento es útil la comparación de esta señal con las obtenidas en idénticas condiciones en material proveniente de adenomas somatotróficos y no funcionantes. El análisis de la expresión del gen de la prolactina en este mismo material indicó ausencia de dicho ARNm (resultados no mostrados).

Como se menciona anteriormente, una vez recibidas las muestras tumorales se procedió en primer lugar a la obtención de extractos citoplasmáticos. A pesar de tratarse de macroadenomas, en muchos casos no fue posible recuperar una cantidad de tejido suficiente para la purificación posterior de ARN. Para esto último es necesario disponer al menos de 100 mg de tejido por lo que solo en los casos que fue posible se purificó ARN a partir de muestras individuales. El material restante fue agrupado por tipo de patología juntando tres o cuatro muestras diferentes por grupo, antes de proceder a la purificación de ARN total a partir de los mismos.

Se realizó una separación electroforética sembrando 15  $\mu$ g de ARN<sub>tot</sub> en cada calle en geles de agarosa 1 % y posteriormente se transfirió a filtros de NC (Northern Blot).

En la figura 22 A se observa la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]hPr1 de un filtro conteniendo material proveniente de adenomas de los diversos tipos que se abarcaron en este estudio. Para determinar el tamaño de la banda obtenida, se sembró ARN<sub>tot</sub> purificado a partir de tejido tiroideo normal, en ambas calles adyacentes a las que contenían las muestras. Finalizada la corrida electroforética

se localizaron las bandas correspondientes al ARNr 18S y 28S por transiluminación del gel con luz UV. Siendo conocido el tamaño de estas especies moleculares y la distancia migrada, se calculó el tamaño de la especie revelada por hibridización.

Así, el tamaño estimado según la posición de la banda obtenida en las muestras de adenomas proláctinos fue de aproximadamente 900 pb. Este coincide con el tamaño esperado para la misma. No se obtuvo señal de hibridización en las muestras provenientes de tumores no proláctinos.

El mismo procedimiento se utilizó para el análisis por hibridización con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{hGH}$ . En la figura 22 B se observa la autoradiografía obtenida luego de la hibridización de un filtro conteniendo muestras provenientes de adenomas individuales proláctinos, somatotróficos y no funcionantes. El tamaño estimado para la especie obtenida por hibridización en este caso fue aproximadamente 800 pb, el cual coincide también con el tamaño esperado. La señal de hibridización obtenida fue específica en este caso para los tumores somatotróficos. En los tumores de distinto origen no se detectó expresión del gen en estudio.

A continuación se utilizó ARN<sub>tot</sub> obtenido a partir de muestras agrupadas por patología. En la figura 23 se observa la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{c-myc}$ .

En el filtro que se presenta se sembró material proveniente de dos grupos de adenomas no funcionantes, dos grupos de adenomas proláctinos y un grupo de adenomas somatotróficos. Se incluyó también ARN total obtenido a partir de tejido tiroideo humano normal como un control negativo de hibridización. Como control positivo se sembró ARN<sub>tot</sub> obtenido a partir de células U-937. Estas son células hematopoyéticas que presentan un elevado nivel de expresión constitutiva del protooncogen c-myc previo a su diferenciación (Lars-Gunnar Larsson et al, 1987). Se obtuvo una señal de hibridización claramente más intensa en el material proveniente de adenomas somatotróficos respecto de la obtenida en material proveniente de tumores de otro origen. Idénticos resultados se obtuvieron luego de analizar comparativamente otros grupos de muestras.

En la figura 24 se observa la autoradiografía obtenida luego de la hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]c-fos. Los distintos tipos de tumores analizados expresan dicho oncogen, sin embargo no detectamos una expresión diferencial en ningún tipo particular. A diferencia de lo que ocurre en el caso de c-myc, en las células U-937 detectamos señales de hibridización tenues por lo que éstas no constituyen un buen control positivo de la expresión de c-fos en tejidos de origen humano.

Figura 20

Dot blots de extractos citoplasmáticos:  
adenomas hipofisarios humanos

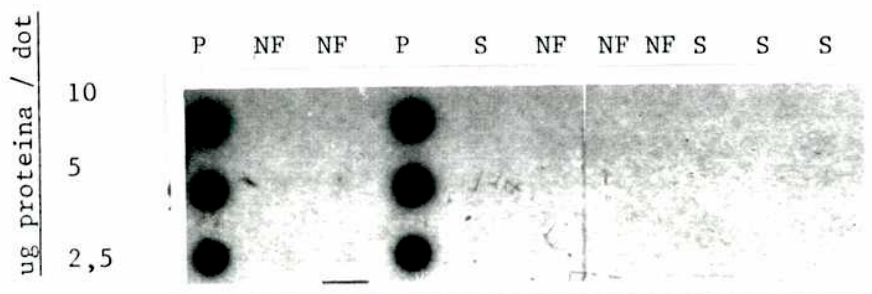
A) Sonda utilizada: [ $^{32}$ P]prl

Tiempo de exposición: 48 hs

S: adenoma somatotrofo

P: adenoma prolactinico

NF: adenoma no funcionante



B) Sonda utilizada: [ $^{32}$ P]hGH

Tiempo de exposición: 48 hs

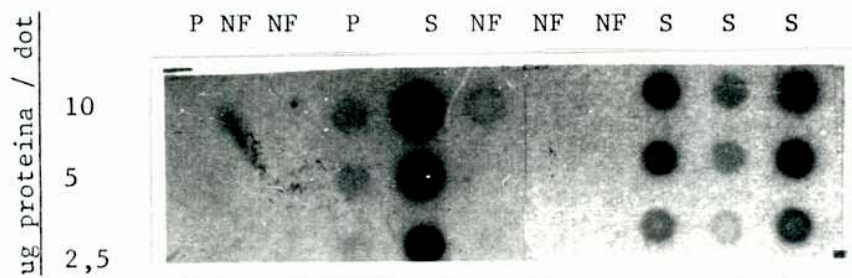


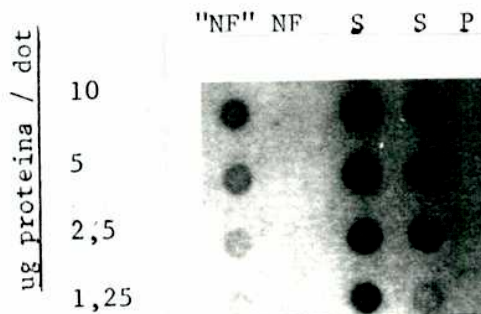


FIGURA 21

Dot blots de extractos citoplasmaticos:  
 analisis de la expresion de GH en adenoma "NF"

Sonda utilizada: [ $^{32}$ P]hGH

Tiempo de exposici3n: 48 hs



S:adenoma somatotrofo

P:adenoma prolactinico

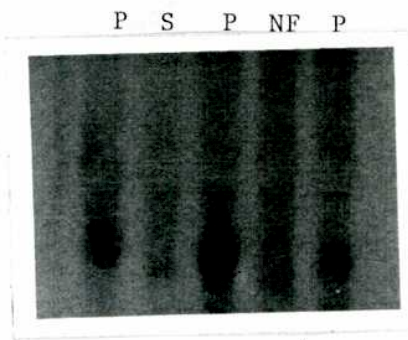
NF:adenoma no funcionante

'NF':adenoma presuntamente  
no funcionante

## FIGURA 22

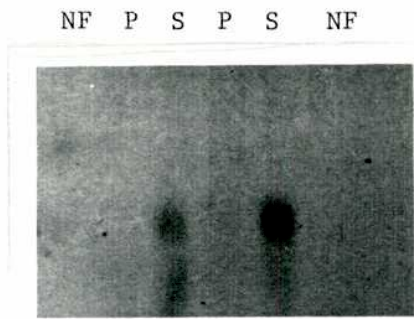
Northern blot de ARN total:adenomas hipofisarios humanos

A) Sonda utilizada: [ $^{32}$ P]prl  
 Tiempo de exposición: 48 hs



18 S  
 28 S  
 ARNm prolactina

B) Sonda utilizada: [ $^{32}$ P]hGH  
 Tiempo de exposición: 48 hs



18 S  
 28 S  
 ARNm hGH

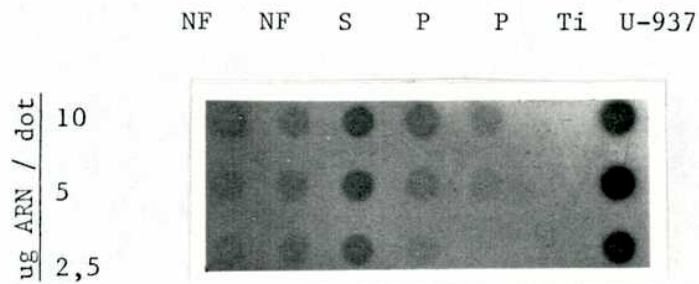
S: adenoma somatotrófico  
 P: adenoma prolactínico  
 NF: adenoma no funcionante  
 Ti: adenoma tiroideo

FIGURA 23

Dot blots de ARN total de tumores adenohipofisarios humanos

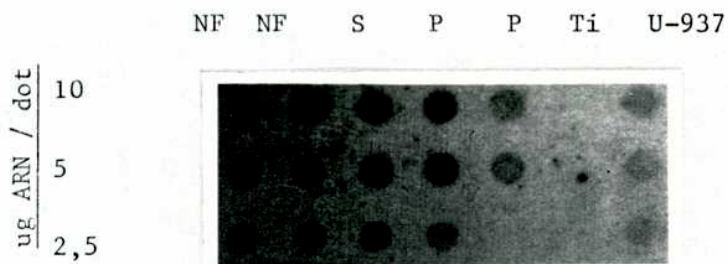
A) Sonda utilizada: [ $^{32}$ P]c-myc

Tiempo de exposición: 21 días



B) Sonda utilizada: [ $^{32}$ P]c-fos

Tiempo de exposición: 21 días



S: ARNtot adenoma somatotrofo

P: ARNtot adenoma prolactinico

NF: ARNtot adenoma no funcionante

Ti: ARNtot adenoma tiroideo



DISCUSION  
CONSIDERACIONES GENERALES

En esta sección se discutirán los resultados obtenidos, en el contexto de los objetivos que nos trazábamos al planear este estudio. A su vez se tratará de interpretar los resultados en términos de la interrelación entre un fenómeno de membrana (liberación hormonal) y un fenómeno nuclear (Síntesis de ADN).

La primera etapa del desarrollo de este estudio insumió una parte importante de tiempo en la puesta a punto de la metodología de hibridización sobre extractos citoplasmáticos. Se adoptó una técnica sencilla que brinda la posibilidad de analizar simultáneamente y en forma semicuantitativa los niveles relativos de especies individuales de ARNm en numerosas muestras. A su vez requiere cantidades mínimas de tejido con el cual se realiza una muy breve manipulación previa a su análisis. Esta misma metodología fue utilizada por otros autores para analizar regulación de la transcripción de GH por el factor hipotalámico liberador de hormona de crecimiento (GRF) en líneas celulares provenientes de glándula pituitaria humana (Gick et al, 1984). Otros estudios se centraron en la regulación de la transcripción del gen de la prolactina (Carrillo et al, 1985; Wark et al, 1983; Nagaya et al, 1990).

A partir de los resultados obtenidos por hibridización con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ppri luego del tratamiento de los extractos citoplasmáticos con ARNasas o proteasas, se puede afirmar que:

- La persistencia de las señales de hibridización luego del tratamiento con proteasas indica que las proteínas presentes en las muestras no impiden la detección de especies de ARNm.
- La ausencia de las señales de hibridización luego del tratamiento con ARNasas indica que la sonda radiactiva reconoce específicamente ARN. Se descarta la probabilidad de hibridización con macromoléculas de ADN.

Sin embargo, a partir de estas pruebas no se puede determinar el grado de sensibilidad en cuanto a la detección de la totalidad del ARNm presente. Quizás, por medio de la hibridización de extractos citoplasmáticos se detecta solo una fracción de ARNm de cada especie buscada.

El peso húmedo de la APG de una rata adulta es de aproximadamente 6 mg. La sensibilidad de la hibridización sobre extractos permite detectar ARNm correspondiente a genes de expresión abundante, como los que estudiamos en primer término, en tan solo 1/100 de la masa de una APG. La cantidad de extracto que puede ser retenida en la superficie de un "dot" es limitada. Por esta razón, cuando se intentó aumentar demasiado dicha masa se obtuvieron señales de saturación luego de hibridizar con sondas radiactivas.

Los resultados obtenidos en los experimentos que se presentan en el primer capítulo fueron descriptos en forma cualitativa. Esto se debe a que el principal objetivo de los mismos era convalidar el uso de una metodología de trabajo adecuada para la detección de variaciones importantes a nivel de la concentración de un ARNm dado. Posteriormente, y luego de un cambio metodológico se analizaron los resultados por densitometría.

En la "Introducción" se caracterizó la expresión de c-onc's en diversos sistemas. En base a dicha caracterización se consideró interesante el estudio de la misma en la APG, en situaciones de proliferación selectiva de sus diferentes tipos celulares.

El estado proliferativo de un determinado tipo celular se indujo mediante tratamientos farmacológicos o quirúrgicos "in vivo". Si bien nos basamos en trabajos anteriores de nuestro grupo que habían determinado las mejores condiciones para cada uno de los mismos, se comprobó su eficacia en los grupos de animales utilizados. Esto se realizó por medio de la determinación de los parámetros bioquímicos que se indican en cada caso. Un control adicional e importante dado que se realizó mediante la misma metodología que se utilizaría a continuación, consistió en la hibridización de los filtros con la sonda de prolactina. Esto se llevó a cabo previamente al estudio de la expresión de c-onc's.

Cuando se intenta determinar la concentración de un c-onc cuya expresión es baja, se debe sembrar una mayor cantidad de muestra respecto de la utilizada para determinar concentraciones de ARNm's de hormonas, dentro de las posibilidades mencionadas anteriormente. Aun trabajando con un rango mayor (25-75 ug de proteína/dot) con los mismos extractos utilizados anteriormente no fue posible detectar variaciones en la expresión de c-onc's. La principal dificultad fue la falta de reproducibilidad en los

resultados .A su vez, los periodos de exposicion necesarios para detectar señales muy débiles de hibridizacion fueron extensos cuando se trabajo con sondas de c-myc o de c-fos.

Solo en un caso pudimos detectar claramente variaciones en la expresion de dichos c-onc's. Especificamente, se determino un aumento de 50 % en la concentracion de ARNm de c-myc y un aumento del 40 % en el caso del ARNm de c-fos como consecuencia de la estrogenizacion durante siete dias. Esta primera observacion de modificaciones a nivel de expresion de c-onc's se convalido por medio de la rehibridizacion del mismo filtro con una sonda radiactiva que reconoce ARN ribosomal. La conveniencia de este procedimiento ha sido explicada anteriormente y se basa en que iguales cantidades de ARN total poseen similar cantidad de ARN ribosomal independientemente del origen de la muestra.

Luego del tratamiento estrogénico hay un aumento significativo en el numero de células prolactinicas en la APG, lo cual determinaria un numero de células prolactinicas adecuado para la deteccion de ARNm's provenientes de genes de baja expresion.

En la APG de ratas estrogenizadas, el aumento en la incorporacion de <sup>3</sup>H-Timidina, en el numero de celulas adenohipofisarias y en el indice mitotico se localizo exclusivamente en las células prolactinicas. Por otro lado los agonistas y antagonistas dopaminérgicos que ejercen efectos sobre dichas celulas, también produjeron modificaciones en la expresion de c-onc's , como se vera a continuacion. Por estas razones, y a pesar de que los c-onc's se expresan en todos los tipos celulares, estimamos que las especies de ARNm's de c-myc y de c-fos que fueron detectadas provienen principalmente de las células prolactinicas.

Los alcances de esta metodologia no resultaron suficientes para los fines que nos proponiamos. Sin embargo esta nos permitio determinar que en un tejido normal y de baja proliferacion como es la APG en las ratas adultas, existe una expresion basal detectable de c-onc's. Esto ultimo es inusual ya que la expresion de c-onc's está principalmente asociada con tejidos de activa proliferacion. Se hizo un estudio similar en otros tejidos provenientes de los mismos animales (cerebro, riñon y corazon) en el cual se confirmo que en un tejido de baja actividad proliferativa , la expresion basal de c-onc's es baja. Como se vio en la seccion de "Resultados", algunos

de estos materiales fueron utilizados inclusive como controles negativos de hibridizacion con sondas de c-onc's.

Los diferentes tipos celulares que constituyen la adenohipofisis expresan diferentes genes hormonales luego de un proceso de diferenciacion a partir de un primordio comun. Las hormonas pituitarias se comienzan a expresar siguiendo un patron temporal en el cual la prolactina y la hormona de crecimiento son las más tardias.

Estudios realizados durante la ontogenia de la glándula pituitaria en raton sugirieron que las células que sintetizan y liberan prolactina derivan de celulas que sintetizan y liberan hormona de crecimiento (Hoeffler et al,1985). También se sugirio que bajo la influencia estrogénica las células somatotropicas pueden adquirir características de lactotropicas (Strattmann et al,1974). Estos y otros estudios llevaron a formular un modelo para explicar el origen de ambos tipos celulares en la APG de roedores a partir de una célula madre primitiva, incapaz de sintetizar prolactina u hormona de crecimiento (Bodner et al,1988).

Recientemente, se ha descrito en la glándula pituitaria de la rata, la existencia de factores regulatorios transcripcionales especificos denominados Pit-1. Se observo que Pit-1 activa directamente la transcripcion del gen de la prolactina luego de su union a secuencias regulatorias en cis (Nelson et al,1986; Nelson et al,1988). De esta manera, las células que poseen el factor transcripcional mencionado comienzan a adquirir características fenotipicas propias de las células prolactinicas. En ratones transgénicos se observo una expresion especifica en lactotropos cuando se trabajo con fusiones genicas conteniendo las secuencias regulatorias de la expresion del gen de la prolactina (Crenshaw,1986).

La expresion del gen de la hormona de crecimiento en las células somatotropicas de la rata también requiere la interaccion entre Pit -1 y secuencias regulatorias especificas localizadas en cis (Behringer et al,1988). Sin embargo ,en ratones transgénicos se observó que es necesaria una mayor concentracion de Pit-1 para una efectiva expresion de fusiones genicas conteniendo la secuencia del gen de la hormona de crecimiento respecto de la requerida para la expresion del gen de la prolactina. Este mismo factor transcripcional también se encuentra en baja concentracion en celulas tirotropas, lo cual sugiere la existencia de algun factor adicional para una expresion genética especifica en cada tipo celular.



En el caso de las células somatotróficas, ha sido descrito otro factor transcripcional específico para la expresión del gen de la hormona de crecimiento en la rata, denominado GHF-1. Se describió su presencia también en lactotropos a pesar de no ser éste indispensable para la expresión del gen de la prolactina (Bodner et al, 1988; Ingraham et al, 1988).

Mediante el uso de la misma metodología que se describió anteriormente para el análisis de expresión genética en APG de rata, se realizó a su vez la primer parte del estudio de expresión genética en los adenomas hipofisarios humanos. Así, se convalidó el uso de la hibridización utilizando extractos citoplasmáticos en masas pequeñas de tejido tumoral humano. Obtuvimos una muy buena correlación entre la caracterización clínica de los adenomas y la expresión de genes hormonales distintivos para cada tipo de patología diferente. En 2/13 tumores somatotróficos detectamos una débil expresión del gen de la prolactina mientras que en ninguno de los prolactinomas estudiados se determinó la presencia de ARNm del gen de la hormona de crecimiento (GH).

En un estudio realizado en adenomas secretantes de GH se observó en una elevada proporción la presencia de ARNm de prolactina. En muchos pacientes los adenomas de este tipo se acompañan a su vez de hiperprolactinemia. El hallazgo de ARNm de prolactina en dichos tumores sería un elemento a favor de un origen tumoral en la adenohipofisis a través de procesos de desdiferenciación celular y manifestado a nivel de expresión génica. A su vez, la ausencia de ARNm de prolactina en estos mismos tumores estaría avalando su origen en una disfunción hipotalámica por una hiperestimulación de la proliferación de células GH mediada por GHRH más que debido a la actividad "in situ" en la masa tumoral (Nagaya et al, 1990). El trabajo mencionado, conjuntamente con los resultados en la población estudiada por nosotros indica que podrían existir dos tipos de tumores somatotróficos diferentes en cuanto a su mecanismo de producción.

Por otra parte, entre los 13 especímenes provenientes de adenomas no funcionantes, 2/13 y 1/13 expresan niveles bajos de GH y de prolactina respectivamente. Este hecho ha sido descrito anteriormente en trabajos de hibridización "in situ" de especies de ARNm en unos pocos casos de adenomas pituitarios no funcionantes humanos (Levy and Lightman, 1988).

No se descarta la posibilidad de una contaminación de la masa extraída quirúrgicamente, con tejido normal adyacente al adenoma. Esto constituiría un aporte de especies de ARNm provenientes de tipos celulares adenohipofisarios no propios del adenoma en estudio.

Cuando se quiso determinar la presencia de ARNm proveniente de oncogenes en los extractos de adenomas tumorales nos encontramos con una limitación similar a la referida al discutir anteriormente los resultados con extractos citoplasmáticos de APG de rata .

Por estas razones, y para proseguir los estudios en tejidos de rata así como en las muestras adenohipofisarias humanas, se intentó mejorar las condiciones del análisis de hibridación por medio de la purificación de ARN total .El manipuleo de tejidos para la obtención de ARN impone numerosas precauciones con el fin de evitar la acción degradadora de ARNasas provenientes del tejido o de fuentes externas de contaminación. A pesar de haber adoptado las máximas precauciones, no pudimos obtener muestras en buen estado mediante el método de extracción con detergentes y fenol. Probablemente esto fue debido al requerimiento de agentes desnaturalizantes de ARNasas más potentes y de una más eficaz eliminación de dichas enzimas que la ejercida por la extracción fenólica. Se adoptó un método tal que el tejido estuviese en presencia de un potente agente desnaturalizante desde el comienzo de la purificación como es el isotiocianato de guanidinio y en el que la extracción de proteínas se realiza con una mezcla de solventes orgánicos en lugar del fenol. Este último método permitió una mejor preservación de las macromoléculas de ARN. No obstante cuando los tejidos iniciales fueron adenomas humanos se obtuvieron preparaciones de ARN total con cierto grado de degradación intrínseca evidenciada por la presencia de bandas de ARN ribosomal más difusas en geles de agarosa .Esto puede deberse al manipuleo al que se someten las muestras desde la obtención hasta su adecuada conservación a -70°C. En el caso de APG de rata no existe dicho manipuleo ya que las glándulas fueron removidas e inmediatamente congeladas.

Una vez mejoradas las condiciones de purificación de ARN total se repitió el estudio de expresión de c-onc's en ratas estrogenizadas realizado anteriormente usando extractos citoplasmáticos.

La concentración de ARNm de c-myc es aproximadamente 230 % mayor luego de la estrogenización por siete días respecto de la encontrada en los animales control. Para el ARNm proveniente de c-fos el aumento fue de aproximadamente 280 %. Cuando se hizo el mismo análisis utilizando ARN adenohipofisario, la magnitud de los incrementos fue entre cuatro y siete veces mayor que cuando se determinaron utilizando extractos citoplasmáticos. Tal como se mencionó anteriormente, esto puede deberse a una limitación en la metodología en cuanto a que la misma permite detectar solo una fracción de la especie de ARNm buscada.

Aun así, las variaciones en la expresión de c-onc's obtenidas luego de la estrogenización fueron menores que la mayor parte de las variaciones reportadas en estudios similares en otros tejidos (Billestrup et al, 1987; Weisman et al, 1987; Hall et al, 1988; Murphy et al, 1988; Murphy et al, 1987a; Loose Mitchell et al, 1988; Travers y Knowler, 1987). Entre las causas posibles de esta discordancia, podemos mencionar que nuestro sistema consiste en un tejido de gran heterogeneidad, a diferencia de muchos de los analizados, más aun en los casos de líneas celulares.

Esto podría sugerir que luego del cambio metodológico mencionado se obtuvieron resultados más cercanos a la situación real debido a la mayor sensibilidad introducida en el sistema de hibridización. Por otra parte se observa que los aumentos en la concentración de ARNm correspondientes a ambos c-onc's fueron prácticamente revertidos luego del tratamiento con Bromocriptina (Bc) hasta alcanzar aproximadamente los valores previos a la estrogenización. Ante dicha reversión, cabe interpretar que los incrementos observados en la concentración de ambos c-onc's fueron debidos a una acción estrogénica. Esto sería así comparable con la reversión en otros efectos biológicos evaluados en la APG de la rata tales como el número de células prolactínicas, el índice mitótico, la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina y los niveles de liberación de prolactina.

Por otra parte, nosotros obtuvimos una reversión prácticamente total en los niveles de ARNm correspondiente a prolactina luego del mismo tratamiento con el agonista dopaminérgico, un resultado consistente con el obtenido por otros autores aun en tratamientos estrogénicos más prolongados. Ratas hembra fueron implantadas con 10 mg de dietilstilboestrol (DES) durante siete semanas. El tratamiento con Bc luego de la remoción del esteroide indujo una disminución de los niveles de ARNm hasta valores

prácticamente iguales a los encontrados en los animales control (Vrontakis et al, 1986).

Es posible que el aumento en la expresión de c-onc's observado luego de la estrogenización y revertido como consecuencia de la administración de Bc, se trate de un efecto directo de los estrógenos. Alternativamente, éste podría ser un hecho secundario al fenómeno de amplificación que ocurre en dicha subpoblación celular. Para discernir entre ambas posibilidades se analizaron las variaciones de dichos c-onc's en la APG de animales estrogenizados y sacrificados a tiempos cortos ya que en estas condiciones el número de células prolácticas no alcanza a modificarse de un modo significativo.

Para determinar el periodo de tiempo más conveniente para este estudio nos basamos en resultados obtenidos previamente por nuestro grupo (Alonso et al, 1983):

-Con una única dosis de 17- $\beta$ -estradiol, el nivel más elevado del esteroide en suero se observó dentro de las dos primeras horas de la inyección

-Del estudio de la distribución subcelular de receptores a Estrógenos luego de la administración de estradiol se concluyó que luego de dos horas disminuye significativamente la unión de  $^3\text{H}$ -estradiol a sus receptores en la fracción citosólica. En la fracción nuclear, el  $^3\text{H}$ -estradiol unido a receptores aumentó dentro de los 30' de la inyección del esteroide y alcanzó un valor máximo a las dos horas.

El periodo de tiempo abarcado en nuestro estudio fueron las dos primeras horas luego de la estrogenización. Así, luego de 15' de la inyección del esteroide se observó un aumento transitorio del 50 % en la concentración de c-fos respecto de los valores determinados en los animales control. En el caso del ARNm proveniente de c-myc, se observó un aumento gradual a partir de los 30' con un máximo del 100 % en su concentración luego de dos horas de estrogenización. Con este tipo de análisis no se puede discernir si el efecto observado es transcripcional o post-transcripcional. En cualquiera de los dos casos se trataría de un fenómeno que ocurre tempranamente en las células prolácticas luego del estímulo estrogénico "in vivo". De un modo similar, fueron descritos otros efectos transcripcionales de los estrógenos en el mismo tipo de células. Los efectos estimulatorios sobre la transcripción del gen de la prolactina pueden ser detectados dentro de los 30' de la estrogenización (Schull y

Gorski,1985). Un efecto supresivo de los estrógenos sobre la transcripción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las gonadotropinas en las células LH se detecta dentro de las 4 hs de dicho tratamiento(Shupnik et al,1988).

Como se menciona en la "Introducción" se han descrito efectos estrogénicos tempranos y transitorios a nivel de transcripción de los c-onc's c-myc,c-fos,N-myc y Ha-ras en útero de rata (Murphy et al,1987a,Loose Mitchell et al,1988,Travers y Knowler,1987).Sin embargo en todos estos casos la magnitud de los aumentos fue de cuatro a diez veces sobre los valores basales mientras que nosotros encontramos variaciones de a lo sumo dos veces a tiempos cortos luego de la estrogenización.En las líneas celulares GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> y GH<sub>3</sub> provenientes de tumores pituitarios de rata,la síntesis de ARNm's relacionados con la proliferación celular ocurre a concentraciones de estrógenos diez veces mayores que las que determinan la máxima acumulación del ARNm de la prolactina (Amara et.al,1987).De este modo es posible dissociar efectos estrogénicos in vivo por medio del tratamiento con las diferentes dosis que los generan.En nuestro caso,si bien utilizamos dosis muy altas de estrógenos,éstos eran de acción prolongada y de liberación gradual.Es posible que un análisis de la expresión de c-onc's ante diferentes dosis de estrógenos hubiese arrojado variaciones más importantes que las halladas .Si ésto fuese cierto,los resultados que obtuvimos estarían representando solo parcialmente los efectos estrogénicos a nivel de la expresión de c-onc's en la APG.También en este caso debe mencionarse nuevamente la heterogeneidad celular que caracteriza a la APG.Si las modificaciones en la concentración de un determinado c-onc provienen de las células prolactinicas,este efecto sería minimizado ante la presencia de los restantes tipos celulares.

En conclusión,las variaciones en la expresión de c-onc's luego de la estrogenización por tiempos cortos ,a diferencia de las variaciones encontradas luego de siete días ,si podrían indicar un efecto estrogénico directo sobre las células prolactinicas .Otros efectos biológicos de los estrógenos tales como la estimulación de la síntesis de receptores a Progesterona o de la liberación de prolactina se detectan luego de un período de tiempo mayor posterior a la estrogenización.

En la "Introducción" nos referimos a los mecanismos regulatorios de la proliferación adenohipofisaria. Se postuló un mecanismo de control de la proliferación de las células prolactínicas dependiente de la liberación de prolactina. Según este esquema, la acción estimuladora de los estrógenos sobre la síntesis de ADN y la proliferación celular se ejercería solo si la glándula es capaz de liberar dicha hormona. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la dopamina puede regular los efectos biológicos del estradiol en la APG de la rata disminuyendo la unión de esta hormona a sus receptores en células prolactínicas. Así, la administración de inhibidores de la síntesis de dopamina como la  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-tirosina aumentaron la unión del <sup>3</sup>H-estradiol a sus receptores nucleares y paralelamente produjeron un aumento en la liberación de prolactina. La administración de Bromocriptina impidió el aumento en dicha unión inducido por la  $\alpha$ -CH<sub>3</sub>-tirosina (Szijan et al, 1985).

Para estudiar los fenómenos intracelulares que pudiesen estar involucrados en este mecanismo regulatorio de la proliferación en las células prolactínicas, realizamos el análisis de la expresión de c-onc's luego de la administración del antagonista dopaminérgico haloperidol. Cuando utilizamos ratas no estrogenizadas para dicho análisis, no observamos modificaciones en las concentraciones de c-myc o c-fos en los periodos de tiempo estudiados, luego de la administración de haloperidol. Esto puede deberse a que las células prolactínicas, a pesar de constituir una de las poblaciones mayoritarias en la APG, no están presentes en número suficiente para la detección de cambios en la expresión de especies de ARNm de baja expresión.

Los resultados obtenidos cuando se trabaja con animales previamente estrogenizados durante siete días están a favor de esta última hipótesis. En este caso la concentración de ARNm correspondiente a c-myc alcanzó a los 90' un valor de 1,8 veces por encima del valor previo al tratamiento con haloperidol. La concentración del ARNm correspondiente a c-fos resultó 2,2 veces mayor que el valor basal luego de 30' del inicio de dicho tratamiento.

Treinta minutos después de la administración de haloperidol hay un marcado aumento en la prolactinemia mientras que 20 h<sub>24</sub> después hay un aumento significativo en la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina al ADN. Así, en este análisis se evidencia que la expresión de c-onc's coincide

temporalmente con las variaciones en la liberación hormonal y por lo tanto preceden a la activación de la síntesis de ADN.

Tanto los resultados obtenidos luego de la estrogenización por tiempos cortos como los obtenidos luego del tratamiento con haloperidol en ratas estrogenizadas sugieren que el mecanismo de regulación de la proliferación en las células prolactínicas involucra la participación de c-myc y de c-fos.

En otra serie de experimentos se quiso evaluar la expresión de c-onc's en las células gonadotropas. Como se menciona en la Introducción, la castración de ratas macho adultas produce un incremento en la liberación de gonadotropinas que se acompaña de un aumento en la síntesis de ADN, en el índice mitótico, en el número de células LH y en el peso de la APG.

Nosotros observamos que en la APG de animales castrados, la concentración de ARNm correspondiente a c-myc luego de 15 días es un 15 % menor que la encontrada en los animales intactos. La señal de hibridización que se detecta luego de la castración durante 15 días podría provenir de alguno o varios de los restantes tipos celulares.

Tal como se menciona en la "Introducción", las células somatotrofas así como las tirotrofas expresan ARNm's de c-onc's bajo determinadas condiciones experimentales. Por otra parte, en este mismo estudio se menciona que existe una alta concentración de ARNm de c-myc en adenomas somatotróficos humanos. Las mencionadas constituyen algunas de las evidencias a favor de un origen distinto que las células gonadotropas para el ARNm de c-onc's.

En base a estos resultados podemos plantear diferentes alternativas.

En primer lugar es posible que en las células gonadotropas no se sintetice activamente ARNm a partir del protooncogen c-myc. En este caso, la expresión de dicho ARNm no estaría involucrada en la proliferación de las células gonadotropas, estableciéndose así una diferencia con lo que ocurre en las células prolactínicas. Esta consideración está basada en que a pesar del aumento significativo en el número de células LH que se verifica luego de 15 días de la castración, nosotros no observamos mayores concentraciones de dicho ARNm.

En segundo lugar, es posible que no se hayan podido evidenciar todos los efectos de la castración a nivel de expresión genética en las células gonadotropas, debido a un parcial enmascaramiento de los mismos. Luego de la

castración hay un marcado aumento en la concentración de LHRH en sangre portal hipofisaria. Las células gonadotropas poseen receptores de membrana específicos para LHRH (Grant et al, 1973; Clayton et al, 1979) y como consecuencia de la interacción con sus receptores, el LHRH induce una nueva síntesis de los mismos (Clayton and Catt, 1981). Sin embargo se demostró que la administración crónica de altas dosis de LHRH o de sus análogos reducen la respuesta de la adenohipofisis a dicha neurohormona disminuyendo la liberación de LH (Clayton, 1982) y la síntesis de ADN (Machiavelli, 1985). Esto se debe a la pérdida o "down-regulación" de los receptores a LHRH en las células gonadotropas.

A su vez, por esta misma razón se descartó la posibilidad de administrar LHRH a los animales luego de 15 días de su castración para homologar la situación que se obtiene luego de la administración de un antagonista dopaminérgico a animales previamente estrogenizados.

Finalmente, consideraremos los resultados obtenidos en los animales luego de 24 hs de su castración. Aunque no observamos variaciones en la concentración de ARNm correspondiente a c-myc en la APG, la liberación de LH está significativamente aumentada en ese momento, no así la síntesis de ADN. En este caso, el factor limitante en nuestro estudio de expresión de c-onc's puede estar constituido por el número de células gonadotropas presente.

Previamente mencionamos que cuando se administró un antagonista dopaminérgico a ratas estrogenizadas se detectaron aumentos en la expresión de c-onc's que coincidieron con los cambios en la liberación de prolactina y precedieron temporalmente la inducción de la síntesis de ADN. En el caso de los animales castrados, la liberación de gonadotropinas no se acompañaría de un aumento en la expresión de c-onc's. Sin embargo, como ya se menciona, podría ser que el número de células gonadotropas 24 hs después de la castración fuese insuficiente para la detección del ARNm buscado aun en el caso de que éste estuviera presente.

Los efectos del tratamiento con DHT son debidos a un reemplazo de los esteroides gonadales, ausentes en los animales castrados. Se ejercen sobre el hipotálamo reduciendo la liberación de LHRH, y sobre las células gonadotropas, disminuyendo la liberación de LH. Por otra parte, no se espera un efecto sobre las células prolactinicas debido a que este esteroide no se convierte en estrógenos por aromatización.



La administracion de DHT indujo una disminucion en la liberacion de gonadotrofinas asi como en la sintesis de ADN adenohipofisario, dos parametros previamente aumentados como consecuencia de la castracion. Sin embargo, no se observo una reversión en cuanto a la disminucion de la concentracion de ARNm de c-myc encontrada en animales castrados respecto de la concentracion en animales intactos.

Este ultimo resultado estaria a favor de la hipotesis de que las células gonadotropas no son productoras del ARNm de c-myc ya que como mencionamos, los efectos de la DHT se ejercen sobre dichas células .

Alternativamente el enmascaramiento de las respuestas a la castracion, dado por el efecto de "down-regulacion" de receptores de LHRH en células gonadotropas previamente mencionado, podria evidenciarse a nivel de la expresion genetica más que a nivel de los restantes parametros analizados. Segun esta hipotesis, la administracion de DHT revertiria algunos de los efectos remanentes de la castracion pero no seria posible detectar la reversión de un probable efecto de la castracion a nivel de la expresion de c-myc.

Los tipos celulares analizados, las células prolactinicas y las gonadotropas , poseen diferente tendencia al desarrollo de tumores, siendo los de origen prolactinico los más frecuentes. En base a los resultados obtenidos sugerimos que la expresion de c-myc estaria asociada con la regulacion de la proliferacion en células prolactinicas. Esto no sucederia aparentemente con la regulacion en las células gonadotropas o al menos nosotros no lo podemos determinar debido a las limitaciones que ofrece el sistema en estudio. Esta diferencia a nivel de expresion genetica podria constituir un aspecto diferencial entre ambos tipos celulares. Para asegurar la existencia de una correlacion entre mayor tendencia al desarrollo de tumores y mayor expresion de c-onc's se requiere un análisis más profundo, fuera del alcance del presente estudio.

POSIBLES NEXOS ENTRE FENOMENOS DE MEMBRANA Y FENOMENOS NUCLEARES  
EN LAS CELULAS ADENOHIPOFISARIAS

Se intentará a continuación interpretar globalmente los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de c-onc's en diferentes subpoblaciones celulares.

En primer lugar en este estudio se observó que en la APG de animales estrogenizados durante siete días hay una mayor concentración de ARNm correspondiente a los c-onc's c-myc y c-fos. Los estrógenos ejercen efectos sobre la APG estimulando la transcripción del gen de la prolactina (Maurer, 1982; Schull y Gorski, 1984) y disminuyendo la respuesta de las células lactotrofas a la acción inhibitoria de la dopamina (Heiman y Ben-Jonathan, 1982; André et al, 1982). A nivel hipotalámico inducen una disminución en la liberación de dopamina (Franks, 1983).

La interacción de la dopamina con sus receptores a nivel de las células prolactinicas resulta en una disminución del metabolismo de los compuestos fosfolipídicos derivados del fosfatidil inositol (PI) (Canónico et al, 1982). Luego de la estrogenización por siete días, los niveles séricos de estrógenos permanecen elevados (Alonso et al, 1983). Los estrógenos tendrían un efecto antidopaminérgico y a través del mismo aumentarían la hidrólisis del fosfatidil inositol trifosfato ( $PIP_3$ ). Uno de los productos de esta hidrólisis es el diacilglicerol (DAG), potente activador de la proteína kinasa C -  $Ca^{++}$  y fosfolípidos-dependiente (PKC) (Nishizuka, 1984).

Como se describió en la "Introducción", en linfocitos y fibroblastos de diversas especies, la activación de la PKC ejerce una regulación sobre la transcripción de c-myc y de c-fos, involucrada en la subsiguiente activación de la síntesis de ADN. Por otra parte, también se mencionó que la acción estrogénica en tejido mamario humano está mediada por la liberación de factores de crecimiento. A través de una acción autocrina éstos inducen la hidrólisis de fosfolípidos y en último término la activación probablemente transcripcional de c-myc y de c-fos.

Así, en los lactotrofos la mayor concentración de dichos c-onc's encontrada podría ocurrir vía la activación del metabolismo del PI y la activación de la PKC. El ácido fosfatídico es uno de los metabolitos que se produce rápidamente durante la ruptura de fosfoinosítidos estimulada por diversas interacciones receptor-ligando. Cuando se lo

suministra exógenamente estimula la entrada de  $Ca^{++}$  extracelular y la liberación a partir de reservorios intracelulares en los diferentes tipos celulares estudiados. Sus múltiples efectos evocan la acción de factores de crecimiento ya que inducen aumentos en el pH intracelular, en la transcripción de c-myc y de c-fos y promueve la síntesis de ADN (Moolenaar et al, 1986).

Luego de la administración de BC, la concentración de ARNm de los c-onc's retorna a los valores previos a la estrogenización. Esto podría deberse a una acción directa de la BC sobre la transcripción de dichos genes. Alternativamente esto podría ser consecuencia de la inhibición de la hidrólisis del PI, de la secreción de prolactina y de la proliferación de lactotrofos. Estos efectos estarían encadenados y actuarían secuencialmente (Landolt et al, 1986).

Esto último apoyaría la hipótesis enunciada anteriormente acerca de que la regulación de la proliferación en las células prolactínicas involucra la participación de c-myc y de c-fos. A su vez sugeriría que los c-onc's estudiados están involucrados de alguna manera en el mecanismo de acción estrogénica en lactotrofos, tal como se describió para otros tejidos blanco de estrógenos.

En las células gonadotropas de la rata, la liberación de LH/FSH está condicionada a un efecto estimulador del factor liberador de gonadotropinas (LHRH). Este proceso de liberación es dependiente de  $Ca^{++}$  y también está mediado por la activación de la PKC vía hidrólisis del PI (Chang et al, 1986).

En el caso de las células prolactínicas discutido anteriormente, nosotros postulamos una probable participación de ciertos transductores de señales extracelulares como el  $Ca^{++}$  y la proteína Kinasa C en las modificaciones observadas a nivel de c-onc's.

En las células gonadotropas nuevamente consideraremos las diversas alternativas ya referidas. El LHRH aumenta la hidrólisis del PI. Sin embargo un aumento prolongado de LHRH produciría una "down-regulación" de sus propios receptores, una disminución en la hidrólisis del PI y en la subsiguiente activación de la PKC. Esto impediría el aumento de la transcripción de c-myc. Por otro lado, podría ser válida la hipótesis de que la expresión de c-myc no está involucrada en el mecanismo de proliferación de las células gonadotropas. En este caso, no resultaría sorprendente que el

## Discusión

mismo gen estuviese sometido a diversos mecanismos de regulación, inclusive opuestos, en diferentes tipos celulares.

Esta afirmación se basa en la particularmente compleja regulación de la expresión de ambos c-onc's y fundamentalmente de c-fos, lo cual fue ampliamente discutido en la "Introducción". Dicha característica de los c-onc's los coloca en un punto de convergencia de diferentes vías metabólicas en cuanto a la influencia de variados mediadores intracelulares.





INDICE GENERAL

	<u>PAGINA</u>
<u>INTRODUCCION</u>	
Características Anatómicas, Histológicas y funcionales de la hipófisis	1
Tipos Celulares de la adenohipofisis	2
Ciclo Celular	3
Regulación de la Proliferación adenohipofisaria	6
Conceptos y definiciones preliminares	11
Funciones de los proto-oncogenes celulares :Clasificación	12
Mecanismos de "Activación" de proto-oncogenes celulares	15
Retrovirus	17
Origen de los v-onc's .Hipótesis Transductiva	18
Características Estructurales de los v-onc's	21
Funciones de los v-onc's	21
Estructura y Función del proto-oncogen c-myc	24
Regulación de la Expresión del proto-oncogen c-myc	28
Activación del proto-oncogen c-myc	31
Estructura del proto-oncogen c-fos	33
Regulación de la Expresión del proto-oncogen c-fos	34
Mecanismo de Acción del proto-oncogen c-fos :Factor Transcripcional AP-1	36
Funciones del proto-oncogen c-fos	37
Regulación Hormonal de la expresión de oncogenes	40
Adenomas Hipofisarios Humanos	47
Objetivos del presente Estudio	50

MATERIALES Y METODOS

1- MATERIALES

1-1 Reactivos, Enzimas y Productos Radiactivos	52
1-2 Cepas bacterianas, Medios de cultivo y antibioticos selectivos	52
1-3 Construcciones plasmidicas utilizadas para marcado radiactivo	53
1-4 Animales y drogas para tratamientos farmacológicos	54

2- METODOLOGIA

2-1 <u>Técnicas corrientes de purificación y concentración de ácidos nucleicos</u>	55
2-1-1 Precipitación con etanol	55
2-1-2 Extracción con solventes orgánicos	55
2-2 <u>Caracterización de secuencias de ADN por análisis de Restricción</u>	55
2-3 <u>Purificación de ADN plasmidico</u>	56
2-3-1 Purificación en pequeña escala (minipreparación)	56
2-3-2 Purificación en gran escala (maxipreparación)	56
2-3-3 Cuantificación de ADN	57
2-3-3-1 Cuantificación por absorbancia	57
2-3-3-2 Cuantificación por comparación con ADN de masa conocida	57
2-4 <u>Transformación Bacteriana</u>	57
2-4-1 Preparación de células competentes	58
2-4-2 Transformación de células competentes	58
2-5 <u>Purificación de ARNtotal</u>	58
2-5-1 Extracción de ARN total por uso de detergentes y fenol	
2-5-2 Purificación de ARNtotal por un unico paso de extracción	59
2-5-3 Cuantificación de ARN	59
2-5-3-1 Cuantificación por Absorbancia	59
2-5-3-2 Cuantificación por reacción con orcinol	60
2-6 <u>Metodos electroforéticos</u>	60
2-6-1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	60
2-6-2 Purificación de fragmentos de ADN por electroforesis preparativa	60
2-6-3 Electrorroresis de ARN en gel de agarosa	61
2-6-3-1 Electrorroresis analítica	61
2-6-3-2 Electroforesis preparativa. Transferencia a membranas	61
2-7 <u>Dot Blots de Acidos Nucleicos</u>	62
2-7-1 ADN plasmidico	62
2-7-2 ARN total	62
2-8 <u>Extractos Citoplasmáticos crudos:Dot Blots</u>	62
2-9 <u>Preparación de Sondas Radiactivas</u>	63
2-9-1 Marcado de ADN doblecatenario por "Random Priming"	63
2-9-2 Marcado de ADN doblecatenario por "Nick-Translation"	63
2-10 <u>Hibridización con Sondas Radiactivas</u>	64
2-10-1 Prehibridización	64

2-10-2 Condiciones de hibridación y lavado	64
2-10-3 Autorradiografía y Densitometria	65
2-10-4 Cálculo de coeficientes de corrección	65
2-11 <u>Otros Parámetros bioquímicos determinados</u>	66
2-11-1 Incorporación de <sup>3</sup> H-Timidina	66
2-11-2 Dosajes hormonales	66
2-11-3 Evaluación estadística de los resultados	67
2-12 <u>Inmunohistoquímica y Determinación del número de mitosis</u>	67

### RESULTADOS

Utilización de extractos citoplasmáticos provenientes de adenohipofisis de rata para estudios de expresión genética	68
Análisis de la expresión de los proto-oncogenes c-myc y c-fos luego de la estrogenización	74
-Efectos de la estrogenización por tiempos cortos	74
-Efectos de la estrogenización crónica y de la administración de agonistas dopaminérgicos	75
Análisis de la expresión de los proto-oncogenes c-myc y c-fos luego de la administración del antagonista dopaminérgico haloperidol	78
Análisis de la expresión de los proto-oncogenes c-myc y c-fos luego de la orquidectomía bilateral en las ratas macho adultas	80
Adenomas hipofisarios humanos	81

### DISCUSION

Consideraciones generales	87
Posibles nexos entre fenómenos de membrana y fenómenos nucleares en las células adenohipofisarias	100



APENDICE 1: BIBLIOGRAFIA

Alitalo, K., Smith, D., Chen, E., Colby, W. y Levinson, A. (1983)  
Nucleotide sequence of the v-myc oncogene of avian retrovirus  
MC29  
P.N.A.S. 80 , 100-104

Alonso, G., Weiss, C., Burdman, J., Romano, M. and Szijan, I. (1985) The  
Influence of Estrogen administration on the subcellular receptors  
distribution and its biological effect in the rat anterior  
pituitary gland  
J. Steroid Biochem. 18 :5 , 613-618

Amara, J., Itallie, V., Dannies, P. (1987) Regulation of prolactin  
production and cell growth by estradiol : difference in  
sensitivity to estradiol occurs at level of messenger  
ribonucleic acid accumulation  
Endocrin. 112 :1 , 264-271

Anderson, A and Young, B. (1987) Nucleic Acid Hybridization. A  
practical approach  
Ed. by B.D. Hames and J. Higgings

Andre, J., Marchisio, A., Morel, Y., Dollu, R. (1982) Dopamine  
receptors on the rat pituitary and the transplantable pituitary  
tumour MtTF4 : Effect of chronic treatment with estradiol  
Biochem. Biophys. Res. Commun 106 :229-235

Andres, A., Van der Valk, M., Schonenberger, C., Fluckiger F., Le  
Meur, M., Gerlinger, P. and Groner, B. (1988) Ha-ras and c-myc  
oncogene expression interferes with morphological and functional  
differentiation of mammary epithelial cells in single and double  
transgenic mouse  
Genes & Development 2 , 1486-1495

Astier, H., De Fesi, C., Surks, M. (1980) Kinetics of deoxyribonucleic  
acid synthesis and replication on thyrotrophs and somatotrophs  
during development of hypothyroidism and L-triiodothyronine  
treatment of hypothyroid rats  
Endocrin. 106 :1537-1548

Auricchio, F., Migliaccio, A., DiDomencio, M. and Nola, E. (1987)  
Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation and hormone  
binding activity of its own receptor in a cell-free system  
EMBO Journal 6 :2923-2929

Bader, J., (1965) The Requirement for DNA synthesis in growth of  
Rous Sarcoma and Rous-associated virus  
Virology 26, 253-261

Baltimore, D., (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of  
RNA tumor viruses  
Nature 226 , 1209-1211

activation of the neu oncogene by a Point mutation altering the transmembrane Domain of p185  
Cell 45 ,649-657

Baserga,R.,Rovera,J.,Farber,J (1971) Control of celular proliferation in human diploid fibroblasts  
In vitro 7 ,80-87

Battley,J.,Moulding,C.,Taub,R.,Murphy,W.,Stewart,T.,Potter,H.,Lender,G. and Leder,Ph. (1983) The human c-myc oncogene : structural consequences of translocation onto the IgH locus in Burkitt lymphoma  
Cell 34 ,779-787

Behringer,R.,Mathews,L.,Palmiter,R and Brister,R. (1988) Warf mice produced by genetic ablation of growth-hormone expressing cells  
Genes & Development 2,453-461

Bentley,D. and Groudine,M. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells  
Nature 321 ,702-706

Berglan,R.,Page,R. (1979) :Pituitary-brain vascular relations :A new paradigm  
Science 204 :18-24

Billestrup,N.,Mitchell,R.,Vale,W. and Verma,I. Growth hormone-releasing factor induces c-fos expression in cultured primary pituitary cells  
Mol. Endocr. 1 : 4 ,300-305

Birboim,J. and Dolly (1979) Microscale preparation of plasmid DNA  
Nucleic Acid Res. 7 (6) :1513-1519

Bishop,J (1986) Oncogenes as hormone receptors  
Nature 321 ,112-113

Bishop,J. (1983) Cellular oncogenes and retrovirus  
Ann.Rev.Biochem, 52 :301-354

Bishop,J. (1987) The Molecular Genetics of Cancer  
Science 235 ,305-311

Bishop,M. (1981) Enemies between :The genesis of retrovirus oncogenes  
Cell 23 :5-6

Blomhoff, H., Smeland, E., Baigaa, K., Blomhoff, R., Raud, E., Bjord, T., Pfeiffer-Ohlson, S., Watt, R., Funderud, S., Godal, T. and Ohlson, R. (1987) Cyclic AMP - mediated suppression of normal and neoplastic B-cell proliferation is associated with regulation of c-myc and Ha-ras proto-oncogenes

**Journal of Cell Physiol 131 :426-433**

Bodner, M., Castrillo, J., Theill, L., Deerinck, Th., Ellisman, M. and Karin, M. (1988) The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein

**Cell 55 ,505-518**

Bonner, T., Oppermann, H., Seeburg, P., Kerby, S., Gunnell, M., Young, A. and Rapp, U. (1986) The complete coding sequence of the raf oncogene and the corresponding structure of the c-raf-1 gene

**Nucleic Acid Res. 14 ,1009-1015**

Boyer, D. and Roulland-Dussoux (1969)

**Mol. Biol. 41 :459-472**

Bravo, R., Burckhardt, J., Curran, T. and Muller, R. (1986) Expression of c-fos in NIH3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle

**The EMBO Journal 5 :695-700**

Brodeur, G., Seeger, C., Schwartz, M., Varmus, H. and Bishop, M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage

**FALTA CITA**

Burdman, J., Szijan, I., Jahn, G., Alonso, G. and Kalberman, L. (1980) Control of cell proliferation and tumorigenesis in the pituitary gland

**Neuro Endocrinology Letters 2 ,315-320**

Burdman, J., Calabrese, M., Marcus, C., MacLeod, R. (1982) Lisuride, a dopamine agonist inhibits DNA synthesis in the pituitary gland

**Neuroendocrinology 35 :282-286**

Burdman, J., Szijan, I., Macchiavelli, G. and Kalberman, L. (1979) DNA synthesis in the pituitary gland of the rat :effect of sulpiride and clomiphene.

**Experientia 35 :1258-1259**

Campisi, J. and Pardee, A. (1984) Post transcriptional control of the onset of DNA synthesis by an insulin-growth factor

**Mol. Cell. Biol. 4 ,1807-1814**

Campisi, J., Medrano, E., Morreo, G. and Pardee, A. (1982) Restriction point control of cell growth by a labile protein : Evidence for increased stability in transformed cells

**P.N.A.S. 79 ,436-440**

Canonica, P., Valdenegro, C., MacLeod, R. (1982) Dopamine inhibits <sup>32</sup>Pi incorporation into phosphatidylinositol in the anterior pituitary gland of the rat  
**Endocrinology 111 :347-349**

Carmier, J and Samarut, J. (1986) Chicken myeloid stem cells injected by retroviruses carrying the v-fps oncogene do not require exogenous growth factors to differentiate in vivo  
**Cell 44 ,159-165**

Carrillo, A., Pool, T. and Sharp, Z. (1985) Vasoactive intestinal peptide (VIP) increases prolactin mRNA content in GH3 cells  
**Endocrinology 116 ,202-206**

Chang, E., Gonda, M., Ellis, R., Scholnick, E., Lowy, D. (1982) Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses  
**P.N.A.S. 79 :4848-4852**

Chang, J., McCoy, E., Graerer, J., Tasaka, K and Caat, K. (1986) Participation of Voltage-dependent calcium channels in the action of gonadotropin-releasing hormone  
**J. of Biol. Chem. 261 ,9105-9108**

Chen, G. and Pollora, J. (1986) c-ras Ha and ornithine decarboxylase are induced by oestradiol 17- $\beta$  on the mouse uterine epithelium independently of the proliferative state of the cell  
**Febs Letters 196 ,309-314**

Chi, D. and Lee, W. (1988) Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal  
**Mol. and Cell. Biol. 8 :10 ,4048-4054**

Childs, G., Ellison, D., Foster, L., Ramley, J. (1981) Post natal maturation of gonadotropes in the male rat pituitary.  
**Endocrin. 109 :1683-1692**

Chiu, R., Angel, P., Karin, M. (1989) Jun B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of, c-jun  
**Cell 59 ,979-986**

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step Method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate-phenol-chloroform extraction  
**Analytical biochem. 162,156-159**

Clayton, R. (1982) Gonadotropin-releasing hormone modulation of its own pituitary receptors :evidence for biphasic regulation  
**Endocr. 111 :152-160**

Clayton, R., Catt, K. (1981) Regulation of pituitary gonadotrophin releasing hormone receptors by gonadal hormones  
**Endocrin. 108 :887-895**

- Clayton, R., Shakespear, R., Duncan, J., Marshall, J. (1979)  
Radioiodinated nondegradable gonadotropin releasing hormone  
analogs : new probes for the investigation of pituitary  
gonadotropin releasing hormone receptors  
**Endocr. 105 ,1369-1376**
- Clemens, M. (1986) Interferons and oncogenes  
**Nature 322 ,14-19**
- Clifton, K., Meyer, R. (1956) Mechanism of anterior pituitary tumor  
induction by estrogen  
**Anat. Res. 125 :65-81**
- Cohrs, R., Goswami, B. and Sharma, O. (1988) Down-regulation of c-myc  
c-fos and erb B during estrogen induced proliferation of the  
chick oviduct  
**Bioch. and Biophys. Res. Commun. 150 :1 ,82-88**
- Cooke, N., Coit, D., Shine, J. Baxter, J. and Martial, J. (1981) Human  
Prolactin  
**The Journal of Biol. Chem. 256 :8,4007-4016**
- Cooper, C., Park, M., Blair, D., Tainsky, M., Huebner, K., Croce, C. y Vande  
Woude, G (1984) Molecular Cloning of a new transforming gene from  
a chemically transformed human cell line  
**Nature 311 ,29-33**
- Cooper, G. (1982) Cellular transforming genes  
**Science, 218 :801-806**
- Cooper, G., Okenquist, S., Silverman, L. (1980) Transforming activity  
of DNA of chemically transforming and normal cells  
**Nature 284 ,418-421**
- Cooper, S (1977) A unifying model for the G1 period in prokaryotes  
and eukaryotes  
**Nature 280 :17-19**
- Coppola, J. and Cole, M. (1986) Constitutive c-myc oncogene  
expression blocks mouse erythroleukaemia cell differentiation  
but not commitment  
**Nature 320 ,760-763**
- Crane, W., Loomes, R. (1967) Effect of age, sex and hormonal state  
on tritiated thymidine uptake by rat pituitary  
**Eur. J. of Cancer 21 :787-792**
- Cronin, M., Cheung, C., Welson, C. (1980) [3H]piperone binding to  
human pituitaries and pituitary adenomas secreting  
prolactin, growth hormone and adrenocorticotrophic hormone  
**J. Clin. Endocrinol. Metabol. 50 :387-391**

- Curran, T. and Franza, R. (1988) Fos and Jun : The AP-1 connection  
*Cell* 55, 395-397
- Curran, T., Miller, A., Zokas, L. and Verma, I. (1984) Viral and cellular fos proteins : A comparative analysis  
*Cell* 36 : 259-268
- Dacheux, F., Dubois, M. (1976) Ultrastructural localization of prolactin, growth hormone and luteinizing hormone by immunocytochemical techniques on the bovine pituitary  
*Cell Tissue Res.* : 174 , 245-257
- Dada, M., Campbell, G., Blake, C. (1983) A quantitative immunocytochemical study of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone cells in the adenohypophysis of adult male rats and adult female rats throughout the estrous cycle  
*Endocrinol.* 113 : 970-984
- Dagert, M. and Singer, D. (1985) Effect of mouse interferon on the expression of a porcine Major histocompatibility gene introduced into mouse L cells  
*The Journal of Immunology* 132 : 1,496-501
- Dalla-Favera, R., Gellman, E., Martinati, S., Franchini, G., Papas, T. (1982) Cloning and characterization of different human sequences related to the onc-gene (v-myc) of Avian Myelocytomatosis virus (MC29)  
*P.N.A.S.* 79 : 6497-6501
- Damm, K., Thompson, C., and Evans, R. (1989) Protein encoded by v-erb A functions as a thyroid-hormone receptor antagonist  
*Nature* 339 , 593-597
- Dang, Ch., Mc.Guire, M., Buckmire, M. and Lee, W. (1989) Involvement of the "leucine-zipper" region in the oligomerization and transforming activity of human c-myc protein  
*Nature* 337 , 664-666
- Darveau, D., Pelletier, J. and Sonnenberg, N. (1985) Differential efficiencies of in vitro translation of mouse c-myc transcripts differing in the 5' untranslated region  
*P.N.A.S.* 82 , 2315-2319
- Dean, M., Park, M., Le Beau, M., Robbins, T., Diaz, M., Rowley, J., Blair, D y Vande Woude, G. (1985) The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes  
*Nature* 318 , 385-388
- DeGreve, J., Battey, J., Fedorko, J., Birrer, M., Evan, G., Kaye, F., Sausville, E. and Minna, J. (1988) The human L-myc gene encodes multiple nuclear phosphoproteins from alternatively processed mRNAs  
*Mol. and Cell. Biol.* 8 : 4381-4388

- DeLarco, J. and Todaro, G. (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells  
P.N.A.S. 75 :4001-4005
- Denhardt, D., Edward, D. and Parfett, C. (1986) Gene expression during the mammalian cell cycle  
Biochimia et Biophysica Acta 865,83-125
- Dickson, R., Bates, R., Mc.Manaway, M. and Lippman, M. (1986) Characterization of Estrogen responsive Transforming activity in human breast cancer cell lines  
Cancer Res 46 ,1707-1713
- Dickson, R., Kasid, A., Huff, S., Bates, C., Knabbe, D., Bronzert, E., Gelmann, S. and Lippman, M. (1987) Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17- $\beta$ -estradiol or v-Ha-ras oncogene  
P.N.A.S 84 ,837-841
- Distel, R., Hyo-Sung Ro, Rosen, B., Groves, D. and Spiegelman, B. (1987) Nucleoprotein complexes that regulate gene expression in adipocyte differentiation :direct participation of c-fos  
Cell 49 ,835-844
- Dony, C and Gruss, P. (1988) Expression of a murine homeobox gene precedes the induction of c-fos during mesodermal differentiation of P19 Teratocarcinoma cells  
Differentiation 37 :115-122
- Dony, C., Kessel, M., Gruss, P (1985) Post transcriptional control of myc and p53 expression during differentiation of the embrional carcinoma cell line F9  
Nature 317 ,636-639
- Downward, J., Yarden, Y., Mayes, E., Scrace, G., Totty, N., Stockwell, P., Ulrich, A., Schlessinger, J. and Watterfield, M (1984) Close similarity of Epidermal Growth Factor receptor and c-erb-B oncogene protein sequences  
Nature 307 ,521-527
- Dubick, D., Dembinski, T., Shiu, R (1987) Stimulation of c-myc oncogene expression associated with estrogen -induced proliferation of breast cancer cells  
Cancer Res. 47,6517-6521
- Dubik, D. and Shiu, R. (1988) Transcription Regulation of c-myc oncogene expression by Estrogen in hormone responsive human breast cancer cells  
J.Biol.Chem. 263 :25 ,12705-12708
- Ellis, R., DeFeo, D., Furth, M., Scolnick, E. (1983) Mouse cells contain two distinct ras gene mRNA species that can be translated into a p21 onc protein  
Moll.Cell.Biol. 2 : 1339-1345

Ellis,R.,DeFeo,D.,Shin,T.,Gonda,M.Young,H. (1981) The p21 src gene of Harvey and Kirsten Sarcoma Virus originate from divergent numbers of a family of normal vertebrate genes  
**Nature 292 :506-510**

Evan,G. and Hancock,D. (1985) Studies on the interaction of the human c-myc protein with cell nuclei p62c-myc as a member of a discrete subset of nuclear proteins  
**Cell 43 :253-261**

Fand,S.,Messineo,L.,Ehmann,C.,Buscaglia,A. (1967) DNA in human pituitary glands  
**Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 125 :192-194**

Finkel,M.,Biskis,N. and Green,I. (1966) Viral induction of osteosarcoma in mice  
**Science 151 ,698-670**

Finkel,M.,Reilly,C.,Biskis,N. and Green,I. (1973)  
**Colston Res. Soc. Proc. Symposium 24 ,353-363**

Fink,K.,Wieben,E.,Woloschak,G. and Spelberg,Th. (1988) Rapid regulation of c-myc proto-oncogene expression by progesterone in the avian oviduct  
**P.N.A.S. 85 ,1796-1800**

Finnegan,D., (1983) Retrovirus and Transposable elements,which came first ?  
**Nature 304 ,686-692**

Fleming,W.,Murphy,P.,Murphy,L.,Hatton,I.,Matusik,R. and Friesen,H. (1985) Human growth hormone induces and mantains c-myc gene expression in Nb2 lymphoma cells  
**Endocrinology 117 :6 ,2547-2549**

Forthoetyl,A. and Thompson,A. (1987) Glucocorticoid regulation of transcription of the c-myc cellular protooncogene in P1798 cells  
**Mol. Endocrinol. 1 : 12 ,899-907**

Franks,S. (1983) Regulation of prolactin secretion by oestrogens:Physiological and pathological significance  
**Clin.Sci. 65 :457-463**

Fung,Y.,Lewis,W.,Kung,H.Crittenden,L (1983) Activation of the cellular oncogene c-erb B by LTR insertion:Molecular basis for induction of erythroblastosis by avian leukosis virus  
**Cell 33 ,357-368**

Furth,J. (1953) Condicionated and autonomous neoplasms.A review  
**Cancer Res. 13 :477-492**

Furth,J.,Clifton,K. (1966) Experimental pituitary tumors. The Pituitary gland.Harris G. Donovan,B.Eds.Vol 2 chap. 15,Londres,Butterworth



Ellis, R., DeFeo, D., Shin, T., Gonda, M., Young, H. (1981) The p21 src gene of Harvey and Kirsten Sarcoma Virus originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes  
**Nature 292 :506-510**

Evan, G. and Hancock, D. (1985) Studies on the interaction of the human c-myc protein with cell nuclei p62c-myc as a member of a discrete subset of nuclear proteins  
**Cell 43 :253-261**

Fand, S., Messineo, L., Ehmann, C., Buscaglia, A. (1967) DNA in human pituitary glands  
**Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125 :192-194**

Finkel, M., Biskis, N. and Green, I. (1966) Viral induction of osteosarcoma in mice  
**Science 151 ,698-670**

Finkel, M., Reilly, C., Biskis, N. and Green, I. (1973)  
**Colston Res. Soc. Proc. Symposium 24 ,353-363**

Fink, K., Wieben, E., Woloschak, G. and Spelberg, Th. (1988) Rapid regulation of c-myc proto-oncogene expression by progesterone in the avian oviduct  
**P.N.A.S. 85 ,1796-1800**

Finnegan, D., (1983) Retrovirus and Transposable elements, which came first ?  
**Nature 304 ,686-692**

Fleming, W., Murphy, P., Murphy, L., Hatton, I., Matusik, R. and Friesen, H. (1985) Human growth hormone induces and maintains c-myc gene expression in Nb2 lymphoma cells  
**Endocrinology 117 :6 ,2547-2549**

Forthoetyl, A. and Thompson, A. (1987) Glucocorticoid regulation of transcription of the c-myc cellular protooncogene in P1798 cells  
**Mol. Endocrinol. 1 : 12 ,899-907**

Franks, S. (1983) Regulation of prolactin secretion by oestrogens: Physiological and pathological significance  
**Clin. Sci. 65 :457-463**

Fung, Y., Lewis, W., Kung, H., Crittenden, L. (1983) Activation of the cellular oncogene c-erb B by LTR insertion: Molecular basis for induction of erythroblastosis by avian leukosis virus  
**Cell 33 ,357-368**

Furth, J. (1953) Conditioned and autonomous neoplasms. A review  
**Cancer Res. 13 :477-492**

Furth, J., Clifton, K. (1966) Experimental pituitary tumors. The Pituitary gland. Harris G. Donovan, B. Eds. Vol 2 chap. 15, Londres, Butterworth

Gazin, C., Rigolet, M., Briano, J., Van Rorenmortel, M and Galbert, F.  
(1986) Immunochemical detection of protein related to the human  
c-myc exon 1

**Embo Journal 5 :9 ,2241-50**

Gehring, U. (1987) Steroid hormone receptor :Genetics, Biochemistry  
and Molecular Biology

**T.I.B.S. ,339-402**

Gersten, B., Baker, B. (1970) Local action of intrahipophyseal  
implants of estrogens as revealed by staining with peroxidase-  
labeled antibodies

**Am.J.Anat. 128 :1-9**

Gick, C., Zeytin, F., Brazcau, P., Ling, N., Esch, F. and Bancroft, C.  
(1984) Growth hormone-releasing factor regulates growth hormone  
mRNA in primary culture of rat pituitary cells

**P.N.A.S. 81 ,1553-1555**

Goff, S., Gilboa, E., Witte, O., Baltimore, D.. (1980) Structure of the  
Abelson Murine Virus genome and the homologous cellular  
gene: studies with clonal virus DNA

**Cell 22 :777-785**

Gonda, T., Sheiness, D., Bishop, M (1982) Transcripts from the  
cellular homologs of retroviral oncogenes :Distribution among  
chicken tissues

**Moll.Cell.Bio. 2 :617-624**

Grant, G., Vale, W., Rivier, J. (1973) Pituitary binding sites for 3H-  
labeled luteinizing hormone releasing factor (LRF)

**Biochem. Biophys. Res. Commun. 50 :771-778**

Greenberg, M., Greene, L. and Ziff, E. (1985) Nerve growth factor  
and Epidermal growth factor induce rapid transient changes in  
proto-oncogene transcription in PC12 cells

**Journal of Biol. Chem. 260 :26 ,14101-14110**

Greene, G., (1986) Sequence and expression of human estrogen  
receptor complementary DNA

**Science 231 ,1150-1156**

Green, S. and Chambon, P. (1986) A superfamily of potentially  
oncogenic hormone receptors

**Nature 324 ,615-6117**

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Bornert, J. and Chambon, P. (1986)  
Human oestrogen receptor cDNA sequence, expression and homology to  
v-erb-A

**Nature 320 ,134-139**

- Gubbins, E., Maurer, R., Lagrimini, M., Erwin, Ch. and Donelson, J. (1980) Structure of the rat prolactin gene  
**The Journal of Biol.Chem.** 255:18,8655-8662
- Guerrero, I., Calzada, P., Mayer, A. and Pellicer, A. (1984) A Molecular approach to leukemogenesis : Mouse lymphomas contains an activated c-ras oncogene  
**P.N.A.S.** 81 ,202-205
- Hall, S., French, J. and Conti, M. (1988) Follicle-stimulating hormone induces transient expression of the proto-oncogene c-fos in primary Sertoli cells cultures  
**Mol.Endocr.** 2 :1 ,55-61
- Hann, S., Thompson, C., and Eisenman, R. (1985) c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells  
**Nature** 314 ,366-369
- Harmon, J., Normal, M., Foulks, B., Thompson, E. (1979) Dexamethasone induces irreversible G1 arrest and death of a human lymphoid cell line  
**Journal of Cell Physiol.** 98 :267-278
- Harris, A., Christianson, D., Smith, M., Fang, S., Braverman, L., Vagenakis, A (1978) The physiological role of thyrotropin releasing hormone in the regulation of thyroid stimulating hormone and prolactin secretion in the rat  
**J.Clin.Investigation** 61 :441-448
- Hayashi, K., Makino, R., Kawamura, H., Arisawa, A. and Yoneda, K. (1987) Characterization of rat c-myc and adjacent regions  
**Nucleic Acid Res.** 15 :16 ,6419-6431
- Hayward, W., Neel, B and Astrin, S. (1981) Activation of a cellular oncogene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia  
**Nature** 290 ,475-479
- Heiman, M., Ben-Jonathan, N. (1982) Rat anterior pituitary dopaminergic receptors are regulated by estradiol and during lactation  
**Endocrinology** 111 :1057-1064
- Heinke, C., Andersen, L., Hagan, S and Guise, K. (1987) Tissue specific methylation of c-myc in adult chickens  
**Biochem. and Biophys.Res.Comm.** 149 :1 ,313-317
- Herlant, M. (1960) Etude critique de deux techniques nouvelles designees a mettre en evidence les differentes categories presentes dans la gland pituitaire  
**Bull.Microscop. Appl.** 10 :37-44

- Herlant, M. (1964) The cells of the adenohypophysis and their functional significance  
*Int.Rev.Cytol.* 17 :299-382
- Hoefflorn, A., Bookfor, F. and Frawley, L. (1985)  
*Endocr.* 117 ,187-195
- Hoi Sang, V., Kelley, P. and Wen-Hwa Lee (1988) Abnormalities of the human growth hormone gene and protooncogenes in some human pituitary adenomas.  
*Mol.Endocr.* 2 :1,85-89
- Houssay, B., Biassatti, A., Sanmartino, R. (1935) :Modificaciones producidas en las lesiones infundibulo-tuberianas en el sapo  
*Rev.Soc.Arg. Biol.* 11 :318-330
- Hunter, T., (1985) Oncogenes and growth control  
*T.I.B.S.* ,275-280
- Hunter, T., Sefton, B. (1980) Transforming gene product of Rous Sarcoma Virus phosphorylates tyrosine  
*P.N.A.S.* 77 :1311-1315
- Hunt, T., (1943) Mitotic activity in the anterior hypophysis of female rat of different age groups and at different times of the day  
*Endocrinol.* 32 :334-339
- Hunt, T. and Hunt, E. (1966) A radioautographic study of the proliferative activity of adrenocortical and hypophyseal cells of the rat at different periods of the estrous cycle  
*Anat.Res.* 156,361-368
- Hunt, T., (1949) Mitotic activity on the adenohypophysis of the rat during pregnancy and lactation  
*Anal.Res.* 1205 :361-373
- Hymer, W, Mastro, A., Griswold, E. (1970) DNA synthesis in the anterior pituitary of the male rat :effect of castration and photoperiod  
*Science* 167 :1629-1631
- Ingraham, H., Chen, R., Mangalam, H., Elsholtz, H., Flynn, S. Chjen, L., Simmons, D., Swanson, L. rossenfeld, M. (1988) A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype  
*Cell* 55 ,505-518
- Jackesz, R., Smith, A., Aitken, S., Huff, K., Shackney, S. and Lippman, M. Influence of cell proliferation and cell cycle phase on expression of estrogen receptor in MCF-7 breast cancer cells  
*Cancer Res.* 44 :619-625

Jahn,G.,Kalberman,L.,Macchiavelli,G.,Szijan,I and Burdman,J.  
(1980) DNA polymerases in the rat pituitary gland.Effect of  
estrogens and sulpiride  
**Mol.Cell.Endocrinol. 18 ,241-248**

Jahn,G.,Macchiavelli,G.,Kalberman,L.,Szijan,I.,Alonso,G. and  
Burdman,J. (1982) Relationships between release of  
prolactin,synthesis of DNA and growth of the anterior pituitary  
gland of the rat :effect of estrogen and sulpiride  
**J.Endocrinol. 94 ,1-10**

Kakkis,E and Calame,K. (1987) A plasmacitoma specific factor  
binds the c-myc promoter region  
**P.N.A.S. 84 ,7031-7035**

Kalberman,L.,Szijan,I.,Jahn,G. and Burdman,J. (1979b) Cell  
proliferation of the rat pituitary gland of the rat.Effect of  
Sulpiride and postnatal maturation  
**Neurophysiology 29 ,42-48**

Kalberman,L.,Szijan.I. and Burdman,J. (1979b) Cell proliferation  
in the rat pituitary gland.A mechanism of control in prolactin  
cells  
**Experientia 35 :689-690**

Kaplan,S.De Nicola,A. (1976) Protein and RNA synthesis in  
pituitary tumours from F344 rats given implants of estrogen  
**J.Natl.Cancer Inst. 56 :37-41**

Kasid,A.,Knabbe,C. and Lippman,M. (1987) Effect of v-Ha-ras  
oncogene transfection on estrogen-independent tumorigenicity of  
estrogen-dependent human breast cancer cells  
**Cancer Res 47 ,5733-5738**

Kasik,J.,Wan,I. and Ozato,K. (1987) A burst of c-fos gene  
expression on the mouse occurs at birth  
**Mol Cell. Biol. 7 :9 ,3349-3352**

Kelly,K. Cochran,B.,Stiles,C (1984) Cell specific regulation of  
the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth  
factor  
**Cell 35 ,603-610**

Kingston,R.,Baldwin,A. and Sharp,Ph. (1985) Transcription control  
by oncogenes  
**Cell 41 ,3-5**

Klein,G. and Klein,E. (1985) Evolution of tumors and the impact  
of molecular oncology  
**Nature 315,190-195**

Klotzer, W., Maxwell, S., Arlinghaus, R. (1983) p85 gag-mos encoded by ts 110 Moloney murine sarcoma virus has an associated protein-kinase activity  
P.N.A.S. 80 ,412-416

Kofler, R. (1982) Immunofluorescence localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary gland using monoclonal antibodies and polyclonal antisera  
The J. of Histochem. and cytochem. 30 :7 ,645-649

Kovacs, K. and Horvath, E. (1987) Pathology of Pituitary Tumors  
Endocrinology and Metabolism Clinics of North America  
Vol. 16 :3, 529-551

Krasilnikov, M., Bogdanova, N., Adler, V. and Burenin, I. (1988) Effect of glucocorticoid hormones on DNA synthesis and expression of ras-proto-oncogenes in proliferating rat liver cells  
Biokhimiia 52 :7 ,1226-1229

Krujler, W., Schubert, D. and Verma, I. (1985) Induction of the proto-oncogene fos by nerve-growth factor  
P.N.A.S. 82 ,7330-7334

Lacy, J., Sarkar, S. and Summers, W. (1986) Induction of c-myc expression in human B lymphocytes by B cell growth factor and anti-immunoglobulin  
P.N.A.S. 83 ,1458-1462

Land, H., Parada, F., Weinberg, R. (1983)  
Science 222 ,771-777

Land, H., Parada, L. and Weinberg, R. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes  
Nature 304 ,596-602

Land, H., Parada, L. and Weinberg, R. (1983) Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis  
Science 222 ,771-777

Landolt, A., Oesterwalder, V. and Landolt, T. (1986) Storage and release of secretory granules in human prolactinomas : modification by bromocriptine  
J. Endocr. 113 ,495-499

Lan, N. (1984) The effects of 5-azacytidine on the expression of the rat growth hormone gene  
J. Biol. Chem. 259 :11601-11606

Lars-Gunnar Larsson, G., Totterman Th., Pettersson V., Nilsson, K. (1987) Drastically increased expression of myc and fos protooncogenes during in vitro differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells  
P.N.A.S. 84 :223-227

Lara-Gunnar Larsson, G., Totterman Th., Pettersson V., Nilsson, K. (1987) Drastically increased expression of myc and fos protooncogenes during in vitro differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells  
P.N.A.S. 84 :223-227

Leblond, ., Walker, B. (1956) Renewal of cell population  
Physiol.Rev.36,255-276

Leiba, S., Landau, B., Ber, A. (1960) Target gland insufficiency and pituitary tumors  
Acta Endocrin. 60 :112-120

Leof, E., Warton, W., Vanwyk, J. and Pledger, W. (1982) Epidermal Growth Factor (EGF) and somatomedin C regulate G1 progression in competent BALB/c-3T3 cells  
Exp.Cell. Res. 141 ,107-115

Lavy, B. and Lightman, L. (1988) Quantitative in situ hybridization histochemistry of anterior pituitary hormone mRNA species in human pituitary adenomas  
Acta Endocr. 119 :397-404

Lingham, R., Stancel, G., and Loose-Mitchell, A. (1988) Estrogen regulation of Epidermal Growth Factor Receptor messenger ribonucleic acid  
Mol.Endocrinology, 230-234

Lippman, M., Dickson, R., Gelmann, E., Rosen, N/, Knabbe, C., Bates, S., Bonzert, D., Huff, K and Kasid, A. (1987) Growth regulation of human breast carcinoma occurs through regulated growth factor secretion  
Journal of Cell.Biochem. 35 :1-16

Little, L., Nau, M., Carney, D., Gazdar, N. and Minna, J. (1983) Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines  
Nature 306 ,194-196

Lloyd, H., Meares, J. and Jacobi, S. (1973b) Early effects of stilboestrol on growth hormone and prolactin secretion and on pituitary mitotic activity in the male rat  
J.Endocrinol.58 :227-231

Lloyd, H., Meares, J. and Jacobi, S (1973a) Secretory and mitotic response of the male pituitary gland to repeated doses of estrogen.  
Intl.J.Cancer 11 :90-94

Loose-Mitchell, A., Chiappcha, C., Stancel, G. (1989) Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid  
Mol.Endocr. 2 :10 ,946-951

- Lowry, O., Rosenbrough, M., Farr, A., Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent  
*The Journal of Biol. Chem.* 193 :265-275
- MaartenVanLohuizen, Verbeek, S., Krimpenfort, P., Domen, J., Saris, Ch., Rad aszkiewicz, T. and Berns, A. (1989) Predisposition to lymphomagenesis in pim-1 Transgenic mice : cooperation with c-myc and N-myc in murine leukemia virus  
*Cell* 56 ,673-682
- Machiavelli, G., Jahn, G., Szijan, I., Kalberman, L., Alonso, G. and Burdman, J. (1982) Effect of haloperidol in the synthesis of DNA in the anterior pituitary gland of the rat  
*Hormone Metab. Res.* 14 ,150-153
- Machiavelli, G., Jahn, G., Kalberman, L., Szijan, I., Alonso, G. and Burdman, J. (1982) Effect of Haloperidol on the synthesis of DNA in the pituitary gland of the rat  
*Horm. and Metabol. Res* 14 :150-153
- Machiavelli, G., Romano, M and Burdman, J. (1985) Relationship between release of LH and incorporation of tritiated thymidine in the Anterior Pituitary Gland of castrated female rat  
*Hormone and Metabol. Res.* 17,298-300
- Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning .A Laboratory Manual.*  
Cold Spring Harbor Laboratory
- Marshall, J., (1951) Localization of adrenocorticotropic hormone by histochemical and immunochemical methods  
*J. Exptl. Med.* 94 :21-30
- Martial, J., Hallewell, R., Baxter, J. and Goodman, H. (1979) Human Growth Hormone : cDNA cloning and expression in bacteria  
*Science* 205 :602-607
- Mastro, A. and Himrer, W. (1973) The effects of age and oestrone treatment on DNA polymerase activities in the anterior pituitary gland of male rats  
*J. Endocrin.* 59 :107-119
- Matsushime, H., Wang, L. and Shibuya, M (1986) Human c-ros 1 Gene homologous to the v-ros sequence of VR2 sarcoma viruses encodes for a Transmembrane receptor-like molecule  
*Moll. Cell. Bio.* 6 :3000-3004
- Maurer, R (1982) Estradiol regulates transcription of the prolactin gene  
*J. Biol. Chem.* 275 ,2133-2136



- Mc. Nerney, R., Darling, D. and Johnstone, A. (1987) Differential control of proto-oncogene c-myc and c-fos expression in lymphocytes and fibroblasts  
**Biochem. J. 245 ,605-608**
- Melnik, S., Greer, M (1965) Functional pituitary tumor in an adult possible secondary to long standing myxoderma  
**J.Clin.Endocrin.Metab. 25 :761-766**
- Metcalf, J., Hesketh, T., Smith, G., Morris, D., Corps, A. and Moore, J. (1985) Early response pattern analysis of the mitogenic pathway in lymphocytes and fibroblasts  
**J.Cell Sci. Suppl. 3 ,199-228**
- Michell, B., (1984) Oncogenes and inositol lipids  
**Nature 308 ,770**
- Miller, D., Curran, T. and Verma, I. (1984) c-fos protein can induce cellular transformation : A novel mechanism of activation of a cellular oncogene  
**Cell 36 ,51-60**
- Missing, J. (1979)  
**Recombinant Technical Bulletin 2 :43-48**
- Mitchell, P. and Tjian, R (1989) Transcriptional Regulation in Mammalian cells of sequence-specific DNA binding proteins  
**Science 245 ,371-385**
- Mitchell, R., Henning-Chubb, C., Hubluman, E. and Verma, I. (1986) C-fos expression is neither sufficient nor obligatory for differentiation of monomyelocytes to macrophages  
**Cell 45 ,497-504**
- Mitchell, R., Zokas, L., Schreiber, R. and Verma, I. (1985) Rapid induction of the expression of proto-oncogene c-fos during human monocytic differentiation  
**Cell 40 ,209-217**
- Molitch, M. (1987) Pituitary Tumors : diagnoses and management  
**Endocrinology and Metabolism Clinics of North America Vol.16 :3,503-523**
- Moolenaar, W., Kruijer, W., Tilly, B., Verlaan, I., Bierman, A. and Laat, S. (1986) Growth factor-like action of phosphatidic acid (1986)  
**Nature 323 ,171-173**
- Mukku, V., and Stancel, G. (1985) Regulation of Growth Factor Receptor by estrogen  
**Journal of Biol.Chem. 9820-9824**

Muller, R. (1986) Proto-oncogenes and differentiation  
**T.I.B.S. 11 ,129-132**

Muller, R., Curran, T., Burckardt, J., Ruther, U., Wagner, E and Bravo, R.  
(1984) Cancer cells  
**Growth Factors and Transformation ,289-300**  
Ed, By Cold Spring Harbor Laboratory

Muller, R., Curran, T., Muller, D. and Guilbert, L. (1985) Induction  
of c-fos during myelomonocytic differentiation and macrophage  
proliferation  
**Nature 314 ,546-549**

Muller, R., Verma, I., Adamson, E. (1983) Expression of c-onc genes :  
c-fos transcripts accumulate to high levels during development of  
mouse placenta, yolk-sack and amnion  
**The EMBO Journal 2 : 679-685**

Murphy, L.J., Murphy, L.C., Friesen, H. (1987a) Estrogen induction  
of N-myc proto-oncogene expression in the rat uterus  
**Endocrinology 120 :5 ,1882-1888**

Murphy, L.J., Murphy, L.C. and Friessen, H. (1987b) Estrogen induces  
insuline-like growth factor-1 in the rat uterus  
**Mol.Endocrinology 1 :445-450**

Murphy, P., DiMattia, G. and Friesen, H. (1988) Role of Calcium in  
prolactin-stimulated c-myc gene expression and mitogenesis in Nb2  
lymphoma cells  
**Endocrinology 122 :6 ,2476-2485**

Nagaya, T., Seo, H., Kuwayama, A., Sakurai, T., Tsukamoto, A., Sugita, K.  
and Matsui, N. (1990) Prolactin gene expression in human growth  
hormone-secreting pituitary adenomas  
**J.Neurosurg. 72 :879-882**

Nakane, P. (1970) Classification of anterior pituitary cell types  
with immunoenzyme histochemistry  
**J.Histochem. Cytochem. 18 :19-20**

Nakane, P., Sepalo, G., Mazurkiewicz, J. (1977) The origin of ACTH  
cells in the rat anterior pituitary  
**Annals New York Academy of Sciences 297:201-204**

Nau, M., Brooks, B., Carney, D., Gazdar, A., Battey, J., Sausville, E. and  
Minna, J. (1986) Human small-cell lung cancers show amplification  
and expression of the N-myc gene  
**P.N.A.S. 83 ,1092-1096**

Nelson, C., Crenshaw, E., Franco, R., Lira, S. Evans, R. and Rosenfeld, M.  
(1986) Discrete cis-active genomic sequences dictate the  
pituitary cell type-specific expression in rat prolactin and  
growth hormone genes  
**Nature 322 ,557-562**

Nelson, D., Meakin, J., Thorn, G. (1960) CTH producing pituitary tumors following adrenalectomy for Cushing syndrome  
**Ann. Int. Med. 52 :560-569**

Nelson, C., Albert, V., Elseroliz, H., Lu, L. and Rosenfeld, R. (1988) Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin cells genes by a common transcription factor  
**Science 239 ,1400-1405**

Nishikura, K., Abbas Ar-Rushdi, Erikson, J., Watt, R., Rovera, G and Croce, C. (1985) Differential expression of the normal and translocated human c-myc oncogenes in B cells  
**P.N.A.S. 80 ,4822-4826**

Nishimura, S. and Sekiya, Y. (1987) Human Cancer and cellular oncogenes  
**Biochem. Journal 243 ,313-327**

Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion  
**Nature 308 ,693-698**

Nogami, H., Yoshimura, F., Carrillo, A., Sharp, D. and Sherridan, P. (1985)  
**Endocrinol. Japan. 32 :5,625-634**

Norman, C., Ronswick, M., Pollock, R. and Treisman, R. (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element  
**Cell 55 ,989-1003**

Novet, J., Kujas, M. (1975) Variations of mitotic activity in the adenohypophysis of the male rat during a 24 hour cycle  
**Cell and Tissue Res. 164 :193-200**

Perez, R., Macchiavelli, G., Romano, M, and Burdman, J. (1986) Prolactin release oestrogens and proliferation of prolactin secreting cells in the anterior pituitary gland of adult male rats  
**Journal of Endocrinology**

Perez, R., Machiavelli, G., Romano, M., Burdman, J (1985) Prolactin release oestrogens and proliferation of prolactin secreting cells in the Anterior Pituitary gland of adult male rats  
**J. Endocr 108 :339-345**

Pomerat, G. (1941) Mitotic activity in the pituitary of the male white rat following castration  
**Am. J. Anat. 65 :88-91**

Pompidou, A., Corral, M., Michel, P., Defer, N. and Curran, T. (1987) The effects of phorbol ester and ionophores on c-fos and c-myc expression on DNA synthesis in human lymphocytes are not directly related  
**Biochem. Biophys. Res. Comm.** 148 :1 ,435-442

Prochownik, E. and Kukowska, J. (1986) Deregulated expression of c-myc by murine erytroleukaemia cells prevents differentiation  
**Nature** 322 ,848-850

Prywes, R. and Roeder, R. (1987) Purification of the c-fos enhancer-binding protein  
**Mol. Cell. Biol.** 8 ,3482-3489

Quarby, U., Beckman, W., Wilson, E. and French, F. (1987) Androgen regulation of c-myc messenger ribonucleic acid levels in rat ventral prostate  
**Mol. Endocrinol.** 1 :12 ,865-873

Ramsay, G., Evan, I., Bishop, M. (1984) The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc  
**P.N.A.S.** 81 ,7742-7746

Rao, C., Igarashi, H., Chiu, I., Robbins, K. and Aaronson, S (1986) Structure and Sequence of the human c-sis/Platelet-derived growth factor 2 (c-sis/PDGF2) transcriptional unit  
**P.N.A.S.** 83 2392-2396

Rauscher, A. (1988) Fos-associated p39 is the product of the jun proto-oncogene  
**Science** 240 ,1010-1016

Reed, J., Alpers, J., Nowell, P., Hoover, R. (1986) Sequential expression of proto-oncogenes during lectin-stimulated mitogenesis of normal human lymphocytes  
**P.N.A.S.** 83 ,3982-3986

Reedy, E. (1983) Nucleotide sequence analysis of the T24 human bladder carcinoma oncogene  
**Science** 220 ,1061-1063

Rettenmier, C., Chen, J., Roussel, M. and Scherr, C (1985) The product of the c-fms proto-oncogene: A glycoprotein with associated tyrosine-kinase activity  
**Science** 228 ,320-322

Reubi, J., Landolt, A. (1984) High density of somatostatin receptors in pituitary tumors from acromegalic patients.  
**J. Clin. Endocrinol. Metabol.** 59 :1148-1151

Reymond, Ch., Gomer, R., Nellen, W., Theibert, A., Devreotes, P. and Firtel, R. (1986) Phenotypic changes induced by a mutated ras gene during the development of Dictyostelium transformants

**Nature 323 ,340-343**

Roebroek, A., Schalken, J., Verbeek, J. Van der Ouweland, A. (1985) The structure of the c-fps/fes proto-oncogene  
**EMBO Journal 4 ,2897-2903**

Rollins, B. and Stiles, Ch. (1988) Regulation of c-myc and c-fos proto-oncogene expression by animal cell growth factors  
**In Vitro cellular & Developmental biol. 24 :2 ,81-83**

Romano, M., Macchiavelli, G., Perez, R., Carricarte, V and Burdman, J. (1984) Correlation between LH secretion in castrated rats with cellular proliferation of DNA in the APG  
**J. Endocrinol. 102,13-19**

Romano, M., Machiavelli, G., Perez, R., Carricarte, V. and Burdman, J. (1984) Relationship among release of luteinizing hormone, synthesis of DNA and cell proliferation in the anterior pituitary gland of the castrated male rat  
**Journal of Endocr. 102 :12**

Rosson, P., Riddle, V. and Pardee, A. (1979) Synthesis of a labile, serum-dependent protein in early G1 controls animal cell growth  
**P.N.A.S. 76 ,4446-4450**

Roussel, M., Downing, J., Rettenmier, C. and Scherr, Ch. (1988) A point mutation in the extracellular domain of the human CSF-1 receptor (c-fms protooncogene product) activates its transforming potential  
**Cell 55 ,979-988**

Ruppert, C., Goldowitz, D. and Wille, W. (1986) Autocrine  $\beta$ -related interferon controls c-myc supression and growth arrest during hematopoietic cell differentiation  
**The Embo Journal 5 :8 ,1897-1901**

Santos, G., Scott, G., Lee, W., Liu, E. and Benz, Ch. (1988) Estrogen-induced post transcriptional modulation of c-myc proto-oncogene expression in human breast cancer cells  
**J. Biol. Chem. 263 :20 ,9565-9568**

Schechter, A., Stern, D., Vaidyanathan, L., Decker, S., Drebin, J., Greene, M and Weinberg, R (1984) The neu oncogene :an erb-B related gene encoding a 185000 Mr tumour antigen  
**Nature 312 ,513-516**

Scher, C., Stone, M and Stiles, Ch. (1979) Platelet-derived growth factor prevents Go growth arrest  
**Nature 281 ,390-392**

Scherr, C., Rettenmier, C., Sacca, R., Roussel, M., Look, A. and Stanley, E. (1985) The c-fms Proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1  
**Cell 41 ,665-676**

Schull, J. and Gorski, J. (1985) Estrogen regulates the transcription of the rat prolactin gene in vivo through at least two independent mechanisms  
*J. Endocrinol.* 116 :6 ,2456-2462

Schupnick, M., Soheyla, G. and Chin, W. (1988) Estrogen suppresses rat gonadotropin gene transcription in vivo  
*Endocrinology* 122 :5 ,1842-1846

Scott, R., Florine, D., Wide, J., Yein, K. (1982) Coupling of growth arrest and differentiation at a distinct state in the G1 phase of the cell cycle :Go  
*P.N.A.S.* 79 :845-849

Shaw, P., Shroter, H. and Nordheim, A (1989) The ability of a ternary complex to form over the serum response element correlates with serum inducibility of the human c-fos promoter  
*Cell* 56 ,563-572

Sheiness, D., Hughes, S., Varmus, H., Stubblefield, E, and Bishop, M. (1980) The vertebrate homolog of Avian Myelocytomatosis virus: characteristics of the DNA locus and its RNA transcript  
*Virology* 105 :415-424

Shibuya, M. and Hanafusa, H. (1982b) Nucleotide sequence of Fujinamk Sarcoma Virus :Evolutionary relationship of its transforming gene with transforming genes of other Sarcoma Viruses  
*Cell* 30 :787-795

Shibuya, M., Hanafusa, T., Stephenson, J. (1980) Homology exists among the transforming sequences of avian and feline sarcoma viruses  
*P.N.A.S.* 77 :6536-6540

Shibuya, M., Wang, L., Hanafusa, H. (1982a) Molecular cloning of the Fujinami Sarcoma Virus genome and its comparison with sequences of other related Transforming viruses  
*Journal of Virol* 42 :1007-1016

Sinn, E., Muller, W., Pattengale, P, Tepler, I., Wallace, R and Leder, Ph. (1987) Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in Transgenic Mice : synergistic action of oncogenes in vivo  
*Cell* 49 ,465-475

Slamon, D., Boone, T., Murdock, D, Keith, D., Press, M., Larson, R. and Souza, L. (1986b) Studies of the human c-myc gene and its product in human acute leukemias  
*Science* 233 ,347-351

Slamon, D., Boone, T., Seeger, R., Keith, D., Chazin, U., Lee, H. and Souza, L. (1986a) Identification and Characterization of the protein encoded by the Human N-myc oncogene  
**Science** 232 ,768-772

Spector, D., Varmus, H., Bishop, M. (1978) Nucleotide sequences related to the transforming genes of avian sarcoma viruses are present in DNA of uninfected vertebrates  
**P.N.A.S.** 75 :9,4102-4106

Stehelin, D., Varmus, H., Bishop, M., Vogt, P. (1976) DNA related to the transforming genes of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA  
**Nature** 260 :170-176

Stehelin, D., Varmus, H., Bishop, M., Vogt, P. (1976)  
**Nature** 266 :170-173

Stepien, H., Karasek, E., Pawlikowski, M. (1981) Effects of adrenalectomy and hydrocortisone on DNA synthesis on the anterior Pituitary Gland  
**Biochem, Biophys. Res. Comm** 100 :1531-1536

Stepien, H., Karasek, K., Pawlikowski, M. (1981) Effects of adrenalectomy and Hydrocortisone on DNA synthesis on the anterior pituitary gland  
**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 100 :1531-1536

Stevens, E., Helfenstein, J. (1966) Some effects of certain naturally occurring oestrogens on the anterior pituitary gland of rats  
**Nature** 211,879-880

Stiles, Ch. (1985) (1985) The biological Role of Oncogenes .Insights from Platelet-derived growth factor : Rhoads tumoral award lecture  
**Cancer Res.** 45,5215-5218

Stone, J., Lange, T., Ramsay, G., Jakobouts, E., Bishop, M., Varmus, H. and Lee, W. (1988) Definition of regions in human c-myc protein nuclear translocation signal  
**Mol. and Cell. Biol** 7 :5 ,1697-1709

Strattman, I., Ezrin, C. and Soellers, E. (1974) Estrogen-induced transformation of somatotrophs into mammotrophs in the rat  
**Cell Tissue Res.** 152 ,229-238

Sukumar, S., Carney, W and Barbacid, M. (1988) Independent molecular pathways in initiation and loss of hormone responsiveness of breast carcinomas  
**Science** 240 ,524-526

Rukumar, B., Notario, U., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. (1983) Induction of mammary carcinoma in rats by nitroso-methylurea involves malignant activation of Harvey-ras-1 locus by single point mutation  
**Nature 306 ,658-661**

Surks, M. Oppenheimer, J. (1976) Incomplete suppression of thyrotropin secretion after single injection of L-triiodothyronine doses into hypothyroid rats  
**Endocrinol. 99 :1432-1441**

Sveringhaus, A. (1937) Cellular changes in the anterior hypophysis with special reference to its secretory activity  
**Physiol.Rev. 17 :556-558**

Szijan, I., Burman, J., Alonso, G., (1985) Effect of dopamine agonists on the binding of [3H]-estradiol to its receptors in the anterior pituitary gland of male rats  
**Endocrinol. 117 ,1742-1748**

Takahashi, S., Kawashima, S. (1982) Age related changes in prolactin cell percentage and serum prolactin levels in intact and neonatally gonadectomized male and female rats  
**Acta Anatomica 113 :211-217**

Taub, R., Moulang, Ch., Battey, J., Murphy, W., Vasicek, Th., Lendir, G. and Leder, Ph. Activation of somatic mutation of the translocated c-myc gene in Burkitt Lymphoma cells  
**Cell 36 ,339-348**

Teich, N., Wyke, J., Mak, T., Bernstein, A and Hardy, W (1982) Pathogenesis of retrovirus-induced disease in Molecular Biology of Tumor Viruses, Ed. R. Weiss, N. Teich, H. Varmus J. Coffin. Cold Spring Harbor Press, New York

Temin, H., (1980) Origin of Retroviruses from cellular moveable genetic elements  
**Cell 21 :599-605**

Thomas, P., (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose  
**P.N.A.S. 77:9,5201-5205**

Thompson, C., Challoner, P., Neiman, P., Groudine, M. (1985) Levels of c-myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle  
**Nature 314 ,363-366**

Thompson, T., Soughate, J., Kitchener, G and Land, H. (1989) Multistage carcinogenesis induced by ras and myc oncogenes in a reconstituted organ  
**Cell 56 ,917-930**



- Tippets, T., Varnum, B., Lim, R and Herschman, H. (1988) Tumor Promoter-inducible genes are differentially expressed in Developing mouse  
**Mol. Cell. Biol. 8 :10 ,4570-4572**
- Toshinsky, R. and Warner, J. (1982) Ribosomal proteins are synthesized preferentially in cells commencing growth  
**J. Cell Physiol. 112 ,128-135**
- Travers, M. and Knowler, J. (1987) Oestrogen-induced expression of oncogenes in the immature rat uterus  
**Febs Letters 211 :1 ,27-30**
- Treisman, R. (1985) Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences  
**Cell 42 ,889-902**
- Treisman, R. (1987) Identification and Purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element  
**Embo Journal 6 :9 ,2711-2717**
- Valdenbunder, B. (1986) Oncogenes and the control of cell growth :fitting together the pieces of the puzzle  
**Biochemie 68 ,1149-1152**
- Van Straaten, F., Muller, R., Curran, T., Van Beveren, Ch. and Verma, I. (1983) Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene:deduced amino acid sequence of the human c-fos protein  
**P.N.A.S. 80 ,3183-3187**
- Varmus H. (1982) Recent evidence for oncogenesis by insertion mutagenesis and gene activation  
**Cancer Surveys 2:302-319**
- Varmus, H. (1984) The Molecular Genetics of cellular oncogenes  
**Ann. Rev. Genet. 18 ,553-612**
- Vennstrom, B., Bishop, M., (1982) Isolation and characterization of chicken DNA homologous to the two putative oncogenes of Avian Erithroblastosis virus  
**Cell, 28 :135-143**
- Vrontakis, Y., Thliveris, J. and Friessen, H. (1987) Influence of bromocriptine and oestrogen on prolactin synthesis, secretion and tumour growth in vivo in rats  
**J. endocrinol. 113 :383-388**
- Wark, G. and Tashjian, A. (1983) Regulation of prolactin mRNA by 1-2-dihydroxy-vitamin D3 in GH4C1 cells  
**J. Biol. Chem. 258 ,121188-12121**
- Watt, R., Nishikura, K., Sorrentino, G., Ar-Rushdi, A., Croce, C. and Rovera, G. (1983b) The structure and nucleotide sequence of the 5'

end of the human c-myc oncogene  
P.N.A.S. 80 ,6307-6311

Watt,R.,Stantos,L.,Marcu,K.,Gallo,R.,Croce,C and Rovera,G  
(1983a)Nucleotide sequence of cloned human c-myc oncogene  
Nature 303 ,725-728

Weisman,A.,Tixier-Vidal,A. and Gourdji,D. (1987)  
Thyrotropin-releasing hormone increases the levels of c-fos and  
 $\beta$ -actin mRNA in GH3/B6 pituitary tumor cells  
In Vitro Cellular & Developmental Biology 23 :8 ,585-589

Weinberger,C.,Hollenberg,S.,Rosenfeld,M and Evans,R. (1985)  
Nature 318 ,670 -673

Weiss,R.,Teich,N.,Varmus,H/.Coffin,J eds (1982)RNA Tumor Viruses  
Cold Spring Harbor,New York

Weisz,A. and Bresciani,F. (1988) Estrogen induces expression of  
c-fos and c-myc proto-oncogenes in rat uterus  
Mol. Endocrin. 2 : 9 ,816-824

White,B. and Bancroft,C.(1982) Citoplasmic Dot Hibridization.  
The Journal of Biol.Chemistry 257 :15,8569-8572

Wilding,G.,Lippman,M. and Gelmann,E. (1988) Effects of steroid  
hormons and peptide growth factors on protooncogene c-fos  
expression in human breast cancer cells  
Cancer Res. 48 ,802-805

Wingler,M.,Pellicer,A.,Silverstein,S.,Axel,R. (1978) Biochemical  
transfer of single-copy eucariotic genes using total cellular DNA  
as donor  
Cell 14 ,725-732

Wolfe,J.(1935) Reaction of anterior pituitaries of mature female  
rats to injections of large amounts of oestrin  
Proc.Soc.Exp.Biol.Med 32 :1192-1195

Worland,P.,Bronzert,D.,Dickson,R.,Lippman,M.,Hampton,L.,Thorgeirson,S  
and Wirth,P. (1989) Secreted and cellular polypeptide  
patterns of MCF-7 human breast cancer cells following either  
estrogen stimulation or v-Ha-ras Transfection  
Cancer Res. 49 ,51-57

Yamaguchi,A.,Yanai,M.,Tomiyaama,N. and Sawai,T. (1986) Involment  
of three intracellular messenger systems,protein kinase C,calcium  
and cyclic AMP in the regulation of c-fos gene expression in  
Swiss 3T3 cells  
FEBS Letters 208 :1 ,39-42

APENDICE 2: ABREVIATURAS

aa:aminoacidos  
ADN:acido desoxiribonucleico  
AMPc:5'-3'adenosina monofosfato ciclico  
APG:adenohipofisis  
ARN:acido ribonucleico  
ARNt:ARN de transferencia  
ARNtot:ARN total  
Bc:bromocriptina  
BrEt:bromuro de etidio  
c-onc:protooncogen celular  
cADN:copy-ADN  
Ci/mmol:Curies/milimol  
cpm:cuentas por minuto  
dATP:3'-deoxy-adenosina-5'trifosfato  
dCTP:3'-deoxy-citidina-5'trifosfato  
dGTP:3'-deoxy-guanosina-5'trifosfato  
DHT:dihidrotestosterona  
dNTP:3'-deoxi-nucleotidos-5'trifosfato  
dTTP:3'-deoxy-timidina-5'trifosfato  
Eg:estrogenos  
FSH:hormona foliculo estimulante  
GH:hormona de crecimiento  
KDa:kilodaltons  
Kpb:kilopares de bases  
LH:hormona luteinizante  
mg:miligramos  
ml:mililitros  
NC:nitrocelulosa  
ng:nanogramos  
ON:overnight  
pg:picogramos  
pKC:proteina kinasa C  
PM:peso molecular  
PRL:prolactina  
RIA:radioinmunoensayo  
RNAasas:ribonucleotidasas  
TRH:tirotropic releasing hormone  
TSH:tiroid stimulating hormone  
ug:microgramos  
ul:microlitros  
UV:ultravioleta  
v-onc:oncogen viral