

Tesis de Posgrado

Participación de factores de crecimiento y fibronectina en la regulación del desarrollo folicular en mamíferos

Colman Lerner, Alejandro Ariel

1997

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

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

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

Cita tipo APA:

Colman Lerner, Alejandro Ariel. (1997). Participación de factores de crecimiento y fibronectina en la regulación del desarrollo folicular en mamíferos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2920_ColmanLerner.pdf

Cita tipo Chicago:

Colman Lerner, Alejandro Ariel. "Participación de factores de crecimiento y fibronectina en la regulación del desarrollo folicular en mamíferos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2920_ColmanLerner.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Tesis Doctoral

**“Participación de Factores de Crecimiento y Fibronectina en
la Regulación del Desarrollo Folicular en Mamíferos”**

Autor: Alejandro Ariel Colman Lerner

Director: J.Lino Baraño

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental

-1997-

1997

L. G.

Resumen

Esta tesis está dirigida al estudio de factores regulatorios, de producción y acción local, que controlan el desarrollo del folículo ovárico en mamíferos. El modelo que se escogió es el bovino, del cual se obtuvo fluido folicular de folículos en diversos estadios de desarrollo así como también células de la granulosa con las que se establecieron cultivos primarios. Alternativamente se utilizó la línea celular BGC-1, obtenida a partir de cultivos primarios de granulosa bovina, la cual fue validada en términos de su respuesta proliferativa y productos de secreción característicos de los estadios inmaduros de desarrollo folicular. Se determinó que la actividad mitogénica presente en medios condicionados de células BGC-1 es debida a la presencia de fibronectina (FN). La expresión de ésta fue estimulada por la acción del factor de crecimiento transformante β (IGF- β), el cual a su vez alteró el patrón de “splicing” del ARNm de FN, estimulando la inclusión del exón ED-I (FN-ED-I^{*}). Posteriormente, se determinó por Western blot que existen importantes cambios en la expresión de FN-ED-I^{*} a lo largo del desarrollo folicular, los cuales están correlacionados inversamente con la actividad gonadotrófica en cada folículo, evaluada a través de los niveles de estradiol en fluido folicular. Asimismo, el tratamiento de cultivos primarios con AMPc, mediador de la acción de gonadotrofinas, reduce sensiblemente la expresión de FN-ED-I^{*}. Finalmente se determinó que el dominio ED-I confiere propiedades de factor de crecimiento a la FN, ya que un péptido recombinante de esta región promovió la proliferación de cultivos de células BGC-1.

Estos resultados indican que la FN juega un papel importante en el desarrollo folicular, regulando la proliferación de las células de la granulosa en las primeras etapas del desarrollo folicular.

Palabras clave

Células de la Granulosa

Factores de Crecimiento

Desarrollo folicular

Fibronectina

TGF- β

Ovario

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Doctoral Thesis

**“Role of Growth Factors and Fibronectins as Local Regulators
of Follicular Development in Mammals”**

Author: Alejandro Ariel Colman Lerner

Director: J.Lino Baraño

Laboratory: Instituto de Biología y Medicina Experimental

-1997-

Abstract

This thesis is aimed at studying the production and action of local regulatory factors that control ovarian follicular development in mammals. The experimental system chosen was the bovine. Therefore, follicular fluid and granulosa cells were collected from follicles at different developmental stages. Alternatively, a bovine granulosa cell line, obtained from primary cultures, was used. This cell line was validated in terms of its proliferative response and the characteristic secretion products, typical from immature stages of follicular development. It was determined that the mitogenic activity present in BGC-1 conditioned medium can be ascribed to the presence of fibronectin (FN). The expression of this extracellular matrix protein was stimulated in culture by the addition of transforming growth factor β (TGF- β), which also altered the pattern of alternative splicing, stimulating the inclusion of the ED-I exon. Then, it was determined that by Western blot that there are important changes in the expression of ED-I*FN during follicular development. This changes are inversely correlated with FHS activity, estimated by the levels of estradiol in follicular fluid. Moreover, the treatment of primary cultures with cAMP, that mediates the action of gonadotropins, reduced the expression of ED-I*FN. Finally, it was determined that the ED-I region confers growth factor like properties to the FN molecule, since a recombinant peptide of this region promoted BGC-1 cells proliferation.

These results indicate that FN plays an important role in the ovary, regulating the proliferation of granulosa cells in the early stages of follicular development.

Key Words

Granulosa cell

Growth Factors

Follicular development

Fibronectin

Alternative splicing

TGF- β

Ovary

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
Desarrollo del folículo ovárico	2
Fase preantral. Crecimiento	2
Fase antral. Selección del folículo dominante	3
Biosíntesis de esteroides ováricos. Teoría de las dos células	5
Factores locales en el control del desarrollo folicular	7
El sistema intraovárico del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina I (IGF-I)	8
El sistema intraovárico del Factor de Crecimiento transformante β (TGF- β)	8
La Fibronectina	10
El TGF- β y la Fibronectina	13
Las células BGC-1 y los cultivos primarios	13
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Materiales	18
Establecimiento de cultivos primarios	18
Cultivo de las células BGC-1	18
Marcación metabólica, electroforesis en geles de poliacrilamida y fluorografía	19
Determinación de actividad 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^{5,4}$ isomerasa (3β HSD) en células BGC-1	19
Metabolismo de esteroides y análisis en cromatografía en capa delgada	20
Clonado de las células BGC-1	21
Preparado y caracterización del medio condicionado (MC) de células BGC-1	22
Microconcentradores	22
Tripsina	22
Cromatografía de afinidad en columnas de Heparina	22
Obtención de células de la granulosa de rata	23
Diferenciación celular	23

Colecta de fluido folicular y purificación de la FN	23
Radioinmunoensayos	24
Ensayo de síntesis de ADN	24
Péptidos recombinantes	25
Anticuerpos	25
FN total	25
FN-ED-I ⁺	25
Inmunoprecipitación de FN	26
Western blots cuantitativos	26
Preparado de la muestras	26
Western blot	26
Cuantificación	28
Extracción de ARN y Northern blots	28
Experimentos de adhesión celular	28
Análisis estadístico	29
RESULTADOS	30
1.Comparación entre cultivos primarios de células de la granulosa y la línea celular BGC-1	31
1.1Secreción de proteínas	31
1.2Metabolismo de esteroides	31
2. Regulación autocrina de la proliferación	36
2.1 Clonado de las células BGC-1	36
2.2 Caracterización del medio condicionado	39
2.3 Efecto del MC sobre cultivos primarios de rata	46
3. Efecto del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) sobre células BGC-1	51
3.1 Síntesis de ADN	51
3.2 Regulación de la expresión de fibronectina	51
3.2.1 Secreción de FN	51
4. Papel de la variante ED-I ⁺ de fibronectina en el desarrollo folicular	54
4.1 Expresión de FN-ED-I ⁺ en el fluido folicular	54

4.2 Concentración de FN-ED-I ⁺ y el estado fisiológico del folículo	54
4.3 Regulación del “splicing” alternativo de la fibronectina en cultivos primarios de células de la granulosa bovina	58
4.4 Regulación del “splicing” alternativo en células BGC-1	58
4.5 El dominio ED-I de fibronectina estimula la proliferación de células de la granulosa	60
4.6 El dominio ED-I de FN bloquea la adhesión de las células de la granulosa al sustrato	63
DISCUSIÓN	66
Las células BGC-1 y los cultivos primarios	67
El medio condicionado	69
Papel de la variante ED-I ⁺ de fibronectina en el desarrollo folicular	71
El dominio ED-I durante el desarrollo folicular	71
La función del dominio ED-I	73
Regulación de la expresión de FN y del “splicing” alternativo	74
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	78

INTRODUCCIÓN

Desarrollo del Folículo Ovárico

El folículo es la unidad funcional del ovario. Su función primaria es la liberación de un ovocito capaz de ser fertilizado. Este proceso involucra el crecimiento y la maduración del folículo, así como también, el crecimiento, meiosis y ovulación del ovocito. Cada folículo está constituido por un ovocito rodeado por células de la granulosa, un tipo celular de origen epitelial. Este complejo ovocito-granulosa está envuelto por una membrana denominada lámina basal. Según el estadio de desarrollo en que se encuentre el folículo, es posible distinguir por fuera de la lámina basal un tipo celular mesenquimático denominado teca.

Fase preantral. Crecimiento

El folículo es una estructura esencialmente dinámica, que a lo largo de cada ciclo estral pasa por diversas etapas. Cada ovario contiene una reserva de unos cientos de miles de folículos primordiales que están constituidos por un ovocito en arresto meiótico (profase I), denominado ovocito primario, y una capa simple de células pregranulosa encerradas por la lámina basal. La fase de crecimiento preantral comprende la conversión del folículo primordial (de alrededor de 30 μm de diámetro) a folículo secundario maduro (con un diámetro de 120 μm). Este proceso se considera independiente de gonadotropinas y está caracterizado por la transformación de las células pregranulosa de aspecto achatado en verdaderas células de la granulosa epiteliales cuboides. Este es ahora un folículo primario. En esta etapa las células de la granulosa secretan mucopolisacáridos hasta formar alrededor del ovocito la denominada zona pelúcida (21). También en esta etapa se establecen las uniones estrechas entre las células de la granulosa y entre ellas y el ovocito dando como resultado una estructura sincicial. Generalmente se asume que estas uniones pueden ser importantes en el transporte de pequeñas moléculas entre las células de la granulosa cercanas y el ovocito. Además, este sistema sería el responsable del control del arresto meiótico en los ovocitos. Simultáneamente, las células de la granulosa comienzan un proceso de proliferación, aumentando el número de capas intrafoliculares y se diferencian las células de la teca a partir de células del estroma ovárico, alcanzándose de esta forma el estadio de folículo secundario. Así, las células de la granulosa presentan, por primera vez, receptores para FSH, estrógenos y andrógenos, y las células de la teca expresan receptores para LH. Al formarse la capa tecal se adquieren vasos sanguíneos con un par de arteriolas adyacentes a la lámina basal.

De entre estos folículos se reclutan aquellos folículos que seguirán las siguientes etapas de maduración que los transformarán de folículos secundarios preantrales (entre 0,1 y 0,2 mm) en folículos antrales (con un diámetro de más de 2 mm). Este incremento de 15 veces en el diámetro total del folículo es el resultado de un aumento de 600 veces en el número de células de la granulosa y de la aparición una nueva cavidad, el antro, en donde se vuelcan los productos de secreción de las células foliculares. En este momento el ovocito toma una posición excéntrica y es rodeado por 2 o 3 capas de células de la granulosa que se denominan “cúmulus oophorus”. El fluido antral, o folicular, contiene hormonas esteroideas libres y unidas a proteínas ligadoras, proteínas del plasma menores del peso molecular límite que permite la lámina basal (97), proteínas de producción local, proteoglicanos y electrolitos (27).

A partir de esta etapa, paulatinamente se van a diferenciar 3 poblaciones de células de la granulosa: las células murales, las antrales y las del cúmulus. Las células murales, más cercanas a la lámina basal y por consiguiente a la teca, son esteroidogénicamente más activas por lo que poseen altos niveles de la enzima 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa- Δ^{5-4} isomerasa (126). Las células antrales mantienen un estado menos diferenciado y retienen una mayor capacidad proliferativa. Estas 2 poblaciones serán incorporadas en el cuerpo lúteo luego de la ovulación. Otro es el destino de las células del cúmulus, que son liberadas junto con el ovocito en el momento de la ovulación.

Fase antral. Selección del folículo dominante. El ciclo estral de la vaca es de 21 días. A diferencia de otras especies, en el bovino se pueden detectar 2 o 3 cohortes de folículos (son las llamadas ondas foliculares) que se desarrollan sucesivamente en un mismo ciclo estral. El comienzo de la primera onda folicular se puede detectar sonográficamente como un grupo de pequeños folículos antrales de 4 mm de diámetro justo antes del día de la ovulación. A los pocos días, uno de los folículos se hace “dominante” mientras que el resto se transforma en “subordinados”. A los 10 días postovulación, una segunda onda folicular emerge y, para las vacas que presentan 3 ondas, a los 16 días emerge otra. El folículo ovulatorio se origina de la última onda (36). El destino de los folículos subordinados es sufrir la atresia, un proceso degenerativo caracterizado por masiva apoptosis de todos los componentes celulares (44). Típicamente, un folículo, el folículo dominante, (pueden ser más dependiendo de la especie) escapa a la atresia, continúa creciendo y madurando para eventualmente ovular.

El mecanismo responsable del fenómeno de selección folicular aún no ha sido plenamente establecido. El momento en que ocurre la selección es aquel en que comienza a observarse una gran diferencia en la

tasa de crecimiento entre el futuro folículo dominante y el folículo subordinado más grande. Este momento se denomina tiempo de desviación y en la vaca ocurre alrededor de 3 días después de que el futuro folículo dominante alcanzara los 4 mm de diámetro (36). El resto de los folículos subordinados comienza la regresión atrética aproximadamente en el mismo momento que el folículo subordinado más grande.

Todos los folículos en crecimiento son potencialmente capaces de ser dominantes, como lo indican las siguientes observaciones: 1) el tratamiento con FSH durante los primeros días de la onda folicular estimula a muchos folículos a lograr diámetros normalmente privativos de folículos dominantes; 2) un folículo elegido al azar de entre un grupo de folículos de 5 mm al comienzo de la onda puede ser dirigido a ser dominante destruyendo todos los otros folículos de 5 mm; y 3) aún luego de la desviación en la tasa de crecimiento entre los 2 folículos más grandes, el folículo subordinado es viable por uno o dos días y puede asumir la dominancia, si el folículo originalmente dominante es destruido (36,52).

Así como cada pico en los niveles circulantes de FSH es el responsable de la emergencia de cada onda folicular (1), la posterior disminución de su concentración está directamente asociada al momento de la desviación y la consiguiente atresia de todos los folículos subordinados; el folículo dominante continúa creciendo debido, posiblemente, a que es el único folículo que adquiere receptores para LH, cuyos niveles se mantienen relativamente constantes a lo largo de esta etapa. La caída en los niveles sanguíneos de FSH parece ser causada por el propio folículo dominante. Esto está apoyado en la siguiente evidencia: la remoción del folículo dominante en el momento de la desviación resulta en un inmediato pico de FSH (1), el retraso de 2 días en la caída de los niveles de FSH mediante la inyección de FSH por ese lapso, retrasa también 2 días el momento de la desviación (36). Si bien la naturaleza de las moléculas responsables de estos efectos no ha sido aún establecida, la inhibina y el estradiol son los mejores candidatos. Por otro lado, se ha demostrado la influencia local del folículo dominante sobre el resto de los folículos subordinados. La inyección de fluido folicular sin inhibina, es decir, sin afectar los niveles de FSH, produce inhibición en el crecimiento folicular.

Los mecanismos fisiológicos involucrados en la diferenciación celular dentro del folículo elegido son todavía especulativos. Muchos aspectos de la diferenciación de las células foliculares están probablemente mediados por factores de producción local, tales como péptidos, factores de crecimiento y sus proteínas ligadoras.

Biosíntesis de esteroides ováricos

Teoría de las “dos células”. La síntesis de los esteroides en el ovario es un proceso que requiere la cooperación de al menos 2 tipos celulares foliculares: las células de la granulosa y las células de la teca (5,15,28,63,64,69). Si bien las células de la granulosa sintetizan progesterona y son capaces de convertir andrógenos como la testosterona y la androstenodiona en estradiol, no pueden sintetizar andrógenos. Por otro lado, las células tecales sintetizan andrógenos a partir de progesterona o pregnenolona que son provistos como sustrato de aromatización para las células de la granulosa.

La teoría de las dos células está apoyada por evidencia bioquímica y molecular que demuestra que estos dos tipos celulares expresan un complemento distinto de enzimas esteroidogénicas: mientras que las células de la granulosa expresan la aromatasa, enzima P450 que convierte andrógenos en estrógenos, las células tecales expresan la 17 hidroxilasa/17-21 liasa, que permite convertir esteroides de 21 carbonos, como la progesterona y la pregnenolona en compuestos de 19 carbonos, como la androstenodiona y la dihidroepiandrostenodiona. Por otro lado estos dos tipos celulares expresan receptores a gonadotropinas distintos, las células de la granulosa son el blanco de la FSH, mientras que las tecales lo son de la LH. En ambos casos, la estimulación gonadotrófica induce un aumento en la expresión de las enzimas claves para la síntesis de estradiol: un aumento en la aromatasa y en la 17 hidroxilasa/17-21 liasa. Así se logra una mayor provisión de andrógenos para la aromatización. El aumento en los niveles de estradiol es esencial para la correcta maduración del folículo dominante.

Si bien el estradiol, la progesterona y algunos andrógenos son los principales esteroides sintetizados en el folículo antral no atrésico, los folículos inmaduros que tienen baja expresión de aromatasa, sintetizan principalmente progestinas reducidas, de menor actividad progestágena (79). Las enzimas presentes en las células de la granulosa de estos folículos están esquematizadas en la Figura 1.

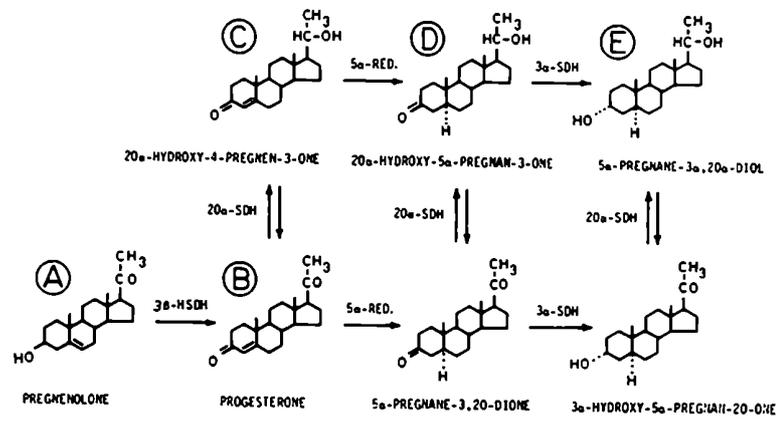


Figura 1. Esquema de las principales rutas del metabolismo de esteroides en las células de la granulosa inmaduras. La pregnenolona se convierte a progesterona y parte de esta sufre una reducción en el carbonilo ubicado en C20 mediante la acción de la enzima 20α -esteroide deshidrogenasa (20α -SHD). Ambas moléculas, ahora pueden sufrir la reducción de su doble enlace por parte de la 5α -reductasa, entrando dos protones de forma de que el anillo A, el primero de la izquierda, queda en posición α . Estos compuestos 5α reducidos pueden ser reducidos aún más, por acción de la 3α -SHD, que reduce el otro carbonilo, ubicado en C3.

Factores locales en el control del desarrollo folicular

Los estadios más tempranos del crecimiento folicular son aparentemente independientes de las gonadotrofinas circulantes (84). Por ello, se asume que la iniciación del crecimiento folicular está regulada por factores ováricos autocrinos y paracrinos. Aún después de la formación del antro, cuando el desarrollo folicular depende de las gonadotrofinas y de los estrógenos, es poco probable que todos los aspectos del crecimiento y la selección folicular dependan exclusivamente de estas hormonas.

Un factor ovárico de acción paracrina o autocrina debe ser producido en la gónada, en ella deben existir receptores para él y debe tener una acción biológica en la misma. Hasta el presente, la mayoría de los factores no esteroideos considerados reguladores paracrinos o autocrinos de la función ovárica no resisten una evaluación rigurosa según estos tres criterios. El punto crítico, salvados los escollos referentes a la producción local y a la presencia de receptores, es el de la función biológica intragonadal. En la mayoría de los casos, ésta se ha deducido de modelos "in vitro", que no necesariamente representan la situación fisiológica. Localmente, son producidos en muy pequeñas cantidades y en algunos casos están sujetos a una rápida degradación. Aparentemente actuarían en conjunción con las gonadotrofinas y esteroides, asumiendo un papel modulador. De esta manera, su acción dependería estrechamente del estado fisiológico del folículo y estarían involucrados en el ajuste fino de la acción de los macrorreguladores, las gonadotrofinas y los esteroides. Su naturaleza química es de lo más diversa: aminas, neuropéptidos, péptidos, eicosanoides y proteoglicanos.

Se ha demostrado, a través de experiencias en modelos "in vitro", que las células foliculares, son susceptibles a una amplia variedad de factores de crecimiento y citoquinas, tales como el TGF- α /EGF, el IGF-I, la insulina, el TGF- β , TNF- α , FGFs, PDGFs e interleuquinas. En general, estos factores modulan tanto la proliferación de las células de la granulosa y teca como la esteroidogénesis y la expresión de receptores a gonadotrofinas de las mismas. En general siguen el paradigma según el cual, la proliferación y la diferenciación son procesos opuestos. Así, si un factor de crecimiento determinado estimula la proliferación, también disminuye la aparición de caracteres diferenciados; sin embargo, este no parece ser el caso del IGF-I. Los factores más estudiados son el IGF-I, el TGF- α /EGF y el TGF- β . En el caso de estos dos últimos, la información es muy confusa, debido a una enorme variabilidad entre especies y entre los distintos modelos experimentales utilizados por los distintos grupos de investigación. A esto también se suma el hecho de que los efectos suelen ser muy sensibles a la concentración de gonadotrofinas. En general, podemos decir que el sistema TGF- α /EGF estimula la proliferación de las

células foliculares y reduce la síntesis de progesterona y estradiol. El sistema del IGF-I y del TGF- β serán abordados separadamente.

El sistema intraovárico del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina I (IGF-I). Una gran cantidad de evidencia actualmente sugiere la existencia de un sistema intraovárico completo, con ligandos, receptores y proteínas ligadoras. Más aún, se ha demostrado que los IGF's son capaces de provocar efectos significativos en células ováricas somáticas en una amplia variedad de especies, lo que induce a pensar que este sistema juega un papel importante "in vivo". Sin embargo, no existe hasta el momento una evidencia directa de que los IGF's sean indispensables para la función ovárica. El blanco del IGF-I en el ovario son las células de la granulosa. En células de rata, pero no en porcinas, su efecto parece dependiente de su habilidad de sinergizar con las gonadotropinas. Los efectos reportados en todos los casos muestran que el IGF-I a la vez que estimula la proliferación celular, induce la aparición de caracteres más diferenciados en las células de la granulosa, aumentando la biosíntesis de progesterona, estradiol y proteoglicanos, induciendo la expresión de receptores para LH y estimulando la síntesis de inhibina. (2). Recientemente se ha descrito en bovinos que los niveles de IGF-I intrafoliculares y la cantidad de receptores de tipo I son relativamente constantes en folículos en distintos estadios de maduración. Sin embargo, se observan significativas alteraciones en la expresión de sus proteínas ligadoras, las IGF-BPs. Estas proteínas, al unir IGF-I, impiden que éste interactúe con su receptor. Así, en folículos preovulatorios, ciertas IGF-BPs están ausentes, mientras que en los folículos subordinados, destinados a la atresia, éstas mismas moléculas son fácilmente detectables (109). La hipótesis es, pues, que los folículos mantienen la dominancia merced a una concentración efectiva de IGF-I mayor, lo que se logra mediante la represión de la expresión de algunas de sus proteínas ligadoras. Cuál es la señal que desencadena este proceso, es algo que está actualmente en intensa investigación.

El sistema intraovárico del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β).

El factor de crecimiento transformante β , originalmente aislado de medios condicionados de células transformadas por infección viral, fue descrito como la molécula capaz de inducir la proliferación de fibroblastos de riñón de rata en agar blando en presencia de EGF (86). Posteriormente se entendió que los TGF- β s constituyen una familia de péptidos multifuncionales de expresión verdaderamente ubicua, cuyos efectos pueden ser observados sobre casi todos los tejidos del cuerpo, debido a que sus receptores están ampliamente distribuidos en los distintos tipos celulares. Hace unos pocos años se determinó que, a diferencia de los principales grupos de receptores a hormonas y factores de crecimiento, los receptores

de membrana del TGF- β son kinasas de serina y treonina. El TGF- β requiere de la unión simultánea a dos receptores transmembrana conocidos como receptores de tipo I y II. Ambos receptores son indispensables para la señalización tanto en mamíferos como en insectos. Una familia de proteínas citoplasmáticas denominada Mad parecen ser el sustrato de estos receptores. Así las proteínas Mad activadas se traslocan al núcleo donde regulan la expresión de los genes que responden a TGF- β por un mecanismo aún no dilucidado (65).

Una de las claves para entender el funcionamiento de este sistema es que el TGF- β se sintetiza y secreta como una molécula precursora inactiva. Ésta está constituida por dos subunidades de alrededor de 400 aminoácidos (aa) unidas por tres puentes disulfuro en una configuración denominada “nudo de cisteínas”. De esta molécula, sólo los 112 aa C-terminales de cada subunidad corresponden a la forma activa, un dímero de 25 kDa, la cual se genera “in vivo” por corte proteolítico por una amplia diversidad de proteasas. Incluso, una vez activado, el TGF- β puede permanecer en forma latente, uniéndose a las proteínas que impiden la interacción del TGF- β con su receptor, como las proteínas ligadoras del TGF- β latente (LTBPs), la α_2 -macroglobulina o bien permaneciendo unido a la matriz extracelular o a la membrana plasmática, a través de ciertos proteoglicanos. Por esto, es muy complicado determinar inequívocamente para una determinada situaciones fisiológica, si el TGF- β está en su forma activada o no. Igualmente, una vasta cantidad de información sugiere que la familia de citoquinas del grupo de los TGF- β s regula la proliferación, diferenciación, reconocimiento y muerte celular y es un regulador del desarrollo, reciclaje y reparación de tejidos.

En el caso del ovario, se ha determinado, mediante Northern blot y RT-PCR de ARNm de células en cultivo y por inmunolocalización en cortes de ovario de varias especies que el TGF- β_1 y el TGF- β_2 se expresan tanto en las células somáticas foliculares como en el ovocito (75). Si bien existen excepciones, tales como las células de la granulosa porcinas, por ejemplo, que no expresan TGF- β_2 (73). No existe información acerca del grado de activación en que se encuentra el TGF- β detectado en el ovario. El papel que juega el TGF- β en el desarrollo folicular es un tema sobre el cual no existe acuerdo. El hecho de que su expresión en el ovario sea regulable por gonadotrofinas, estrógenos y factores de crecimiento (62,72,74,89) sugiere su participación en el desarrollo folicular.

Experimentos con células de la granulosa y tecaes en cultivo de diferentes especies demostraron que el TGF- β “in vitro” modula la proliferación, la síntesis de estrógenos y progesterona y la expresión de los

receptores para gonadotropinas (75). Sin embargo, el efecto del TGF- β varía considerablemente según la especie, por lo que es posible especular que su función fisiológica también sea especie específica. Por ejemplo, en cultivos de células de la granulosa de ratas inmaduras tratadas con DES, el TGF- β estimula la proliferación por sí sólo y sinergiza considerablemente con la FSH (25,26). En cuanto a la diferenciación, el TGF- β potencia la acción de bajas dosis de FSH, tanto en la inducción de receptores para LH como en la síntesis de progesterona. Sin embargo, su efecto es inhibitorio cuando se lo ensaya conjuntamente con dosis máximas de FSH (51). Los datos aportados por este modelo experimental inducen a pensar que el TGF- β promueve el desarrollo folicular durante los estadios tempranos, cuando los niveles de FSH son bajos, mientras que limita la diferenciación terminal del folículo, normalmente gatillada por un pico de FSH. Un efecto prácticamente opuesto es el que se observa cuando se ensaya este factor de crecimiento en células foliculares porcinas o bovinas. El TGF- β es moderadamente inhibitorio de la proliferación de estas especies (34,68,88,103). Además, en células de la granulosa y tecaes porcinas, el TGF- β consistentemente inhibe la esteroidogénesis (68,112). En conclusión, según los resultados obtenidos en estas especies, el TGF- β actuaría impidiendo la maduración del folículo.

La Fibronectina

El proceso de adhesión celular en los organismos multicelulares involucra a un grupo de proteínas caracterizadas por tener múltiples dominios, los que les confieren un amplio rango de actividades de unión. Éstas macromoléculas son secretadas y depositadas en la vecindad de las células formando una red organizada conocida como matriz extracelular (MEC) (46). De entre las proteínas de la MEC, la glicoproteína de alto peso molecular fibronectina (FN) es la más ampliamente distribuida y mejor caracterizada. Aparte de estar presente en los tejidos conectivos y en las membranas basales, la FN se encuentra en alta concentración en el plasma. La FN juega un papel clave en el comportamiento adhesivo y migratorio de las células en procesos fundamentales tales como la embriogénesis, la transformación maligna, la hemostasis, la cicatrización de heridas, la defensa inmunológica y el mantenimiento de la integridad de los tejidos. La importancia de la FN queda concluyentemente ilustrada por el efecto letal que produce la disrupción de ambos alelos del gen de FN en el ratón (35).

Existen 2 formas principales de FN: una forma dimérica soluble que es sintetizada por los hepatocitos y secretada al torrente sanguíneo (FN plasmática, FNp), y una forma dimérica o multimérica estabilizada

por uniones covalentes, hecha por fibroblastos, células epiteliales y otros tipos celulares, que es depositada como fibrillas en la MEC (FN celular, FNc). Ambas formas están constituidas por polipéptidos similares pero no idénticos que comparten una organización modular (Figura 2) que consiste en una sucesión de unidades de homología de 40, 60 y 90 aminoácidos, denominadas homologías de tipo I, II y III, respectivamente (82). El gen de la FN presenta una longitud aproximada de 75 kb, conteniendo 50 exones. En el gen de la rata, todas, excepto una de las 12 homologías de tipo I y las 2 homologías de tipo II están codificadas por un único exón cada una, mientras que 14 de las 17 homologías de tipo III están codificadas por 2 exones cada una. Las otras repeticiones de tipo III (ED-I, ED-II y III-9) están codificadas por un único exón más largo (probablemente resultado de una fusión de 2 exones independientes ancestrales) (46).

Las distintas variantes polipeptídicas que presentan la FN son el resultado de un complejo patrón de maduración (“splicing”) alternativa en 3 sitios del único transcripto primario: de 3’ a 5’, IIICS, ED-I y ED-II (Figura A). ED-I y ED-II (también conocidos como ED-A o EIIIA y ED-B o EIIB, respectivamente) son incluidos o excluidos por “splicing” alternativo. Sin embargo, la región IIICS da origen a 2 variantes en el pollo, 3 en la rata y 5 en humanos por “splicing” dentro de la región codificante (53). Como consecuencia de todas las posibles combinaciones, el máximo número de variantes en humanos es de 20.

Existen en la FN al menos 2 dominios que median la adhesión a células. Uno es el dominio ubicado en la repetición III-10, que contiene a la secuencia RGD (Arg-Gli-Asp) y que es reconocido por una amplia variedad de células a través de la integrina α_5/β_1 . La región IIICS contiene al segundo dominio, involucrando a la secuencia LDV (Leu-Asp-Val) ubicada en la región 5’ de esta repetición. Este dominio interactúa con la integrina α_4/β_1 presente en la membrana de células linfoides (41). Esto indica que el “splicing” alternativo en la región IIICS juega un papel importante en la adhesión selectiva de diferentes tipos celulares a específicas formas de FN.

El “splicing” alternativo de ED-I y ED-II está bajo un estricto control espacio-temporal. Los exones ED-I y ED-II están presentes en la FN embrionaria mientras que en la vida adulta están prácticamente ausentes (76,114). La FNp carece de estos exones, los cuales son detectables,

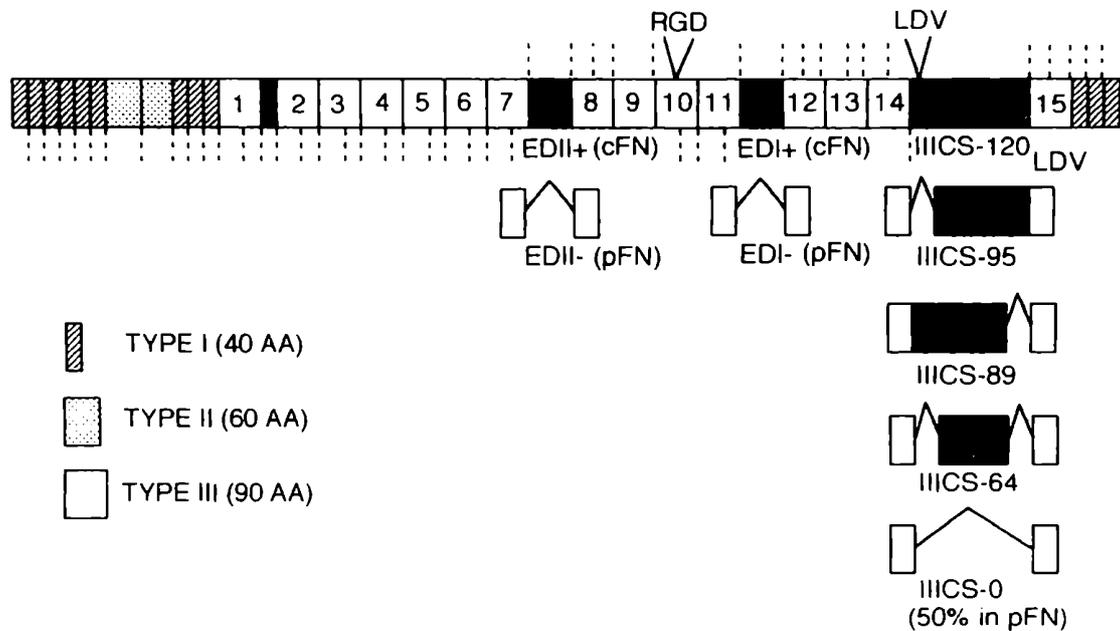


Figura 2. Variaciones en la estructura primaria de la fibronectina. El gráfico superior representa al polipéptido de FN más largo posible, mostrando las homología interna. Se indican sitios de unión a célula constitutivo (RGD) y de "splicing" alternativo (LDV). Las líneas punteadas verticales indican la posición aproximada de los intrones en el gen de la rata. Las repeticiones de tipo III se numeran del 1 al 15 y la numeración excluye a ED-I y ED-II.

aunque en pequeñas cantidades en las MEC del resto de los tejidos. Sin embargo, en ciertas condiciones fisiopatológicas, la FN-ED-I⁺ reaparece. En general, la reexpresión de esta variante ocurre en tejidos proliferantes, como en ciertos tumores (78) o durante la cicatrización (30), sugiriendo que la FN-ED-I⁺ juega un papel en la proliferación celular.

Las células de la granulosa “inmaduras” secretan en cultivo grandes cantidades de FN (6,14,40,102), siendo ésta una de las principales glicoproteínas presentes en el fluido folicular (81,113). Si bien se ha demostrado que la FN (7) o la activación de su receptor celular (40) es capaz de inducir la diferenciación de las células de la granulosa en cultivo, el papel de esta proteína en el desarrollo folicular permanece desconocido.

El TGF- β y la Fibronectina

Cuando el TGF- β interactúa con su receptor, generalmente desencadena señales intracelulares que regulan dos aspectos críticos en la fisiología celular: el ciclo celular (8,71,92) y la síntesis de componentes de la MEC (85). Es interesante notar que ambos efectos son gatillados por dominios independientes del mismo receptor, y pueden ser disecados por mutagénesis dirigida (91). En cuanto a la síntesis de moléculas de la MEC, el papel del TGF- β en la inducción del gen de la FN está ampliamente documentado para una gran variedad de tipos celulares (85). Además, el TGF- β tiene afinidad por matrices de FN, tanto en su forma activa (70) como en su forma latente (111). Incluso, gran parte de los efectos fisiológicos del TGF- β pueden ser adscriptos a la FN, como lo prueba la reversión, mediante la inyección de péptidos derivados de la FN, del fenotipo altamente inflamatorio característico de los ratones null (-/-) para ambos alelos del gen de TGF- β_1 (43).

Hasta el presente no se ha estudiado en el ovario el papel del TGF- β en la síntesis de las distintas formas de FN.

Las células BGC-1 y los cultivos primarios

Los cultivos primarios y secundarios de células de la granulosa bovina vienen siendo estudiados desde hace dos décadas, a partir de los trabajos de Gospodarowicz et al. (38) que determinaron la respuesta de éstas células a EGF y FGFb. De ahí a esta parte, se han publicado una extensa cantidad de trabajos describiendo distintos aspectos funcionales de éstas células, tales como la respuesta proliferativa y esteroidogénica a factores de crecimiento (37,95,103,107,115), interleuquinas (3,106), GnRH (100,101),

GHRH (108), GH (55). Una de las funciones principales de las células de la granulosa, especialmente de las células del cumulus es controlar la maduración del ovocito. Así se ha determinado que las células de la granulosa bovinas en cultivo son capaces de regular el arresto meiótico de ovocitos homólogos (98,99).

Si bien todos estos estudios han contribuido a la comprensión de la fisiología folicular en bovinos, los cultivos primarios de células de la granulosa no son un buen modelo para el estudio de funciones de proliferación y diferenciación propias de folículos inmaduros, no preovulatorios. Esto se debe fundamentalmente a que a los pocos días de establecido el cultivo primario, las células de la granulosa sufren un proceso de luteinización espontánea, caracterizado por un abrupto descenso de la síntesis de estradiol, tanto basal como estimulada por FSH. Este fenómeno, sumado al ya de por sí artificial entorno de cultivo, aumenta la distancia respecto de los fenómenos que ocurren "in vivo".

Las células de la granulosa preantrales producen bajas concentraciones de esteroides activos. Savion y Gosporadowicz (94) han propuesto que, sumada a la ya conocida alta tasa proliferativa, una característica de las células de la granulosa de este estadio es la activa secreción de factores proteicos. La diferenciación de las células de la granulosa que acompaña a la maduración folicular se evidencia en el progresivo cambio desde una célula secretora de proteínas a una célula altamente esteroidogénica.

En nuestro laboratorio se ha obtenido, por inmortalización espontánea, la línea de células de la granulosa bovina BGC-1 que fue originalmente seleccionada por el mantenimiento de la expresión, regulada hormonalmente, de FN (14). A diferencia de los cultivos primarios, las células BGC-1 tienen bajos requerimientos de factores de crecimiento y han sido cultivadas por más de 300 generaciones con el sólo agregado de 5 % de suero de ternero neonato (NCS) al medio de cultivo.

Una línea celular ofrece la ventaja de una mayor reproducibilidad y homogeneidad en la población celular. Este aspecto es particularmente inquietante, dado que se ha demostrado que los resultados obtenidos con preparaciones celulares impuras deben ser considerados con precaución, dada la interferencia potencial resultante de la interacción célula-célula entre tipos celulares distintos (18). Una comparación entre los requerimientos y las acciones de los factores de crecimiento entre las células BGC-1 y los cultivos primarios puede ofrecer ciertas claves concernientes a los mecanismos moleculares responsables del control de la proliferación celular en tejidos normales.

OBJETIVOS

En esta tesis se propusieron los siguientes objetivos:

- Realizar una comparación funcional entre las células BGC-1 y los cultivos primarios para determinar hasta qué punto, la línea celular BGC-1 es útil como modelo para el estudio del desarrollo folicular.

Demostrar las siguientes hipótesis:

- Dado que las células BGC-1 presentan bajo requerimiento de suplementos para su crecimiento:
Entonces, **las células BGC-1 secretan factores de acción autocrina**, los cuales pueden tener relevancia fisiológica. Si esto es así se intentará caracterizar dicha actividad.
- Dado que
 - a) FN-ED-I⁺ se expresa en tejidos proliferantes
 - b) Durante el desarrollo folicular hay una intensa proliferación de las células de la granulosa

Entonces,

- a) **las células de la granulosa expresan FN-ED-I⁺**,
- b) **el fluido folicular contiene FN-ED-I⁺**, que proviene de las células de la granulosa, y esta variante de FN juega algún papel durante el desarrollo folicular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El IGF-I fue provisto por Bachem California (Torrance, CA); el TGF- β recombinante por R&D systems (Minneapolis, MN); el suero de ternero neonato (NCS), el medio de cultivo, los antibióticos y el sistema de marcación de sondas por “primers al azar”, por Gibco BRL Products (Gaithersburg, MD); todos los compuestos radioactivos y el sistema de detección de Western blots por quimioluminiscencia fueron adquiridos a DuPont NEN Research Products (Boston, MA); las membranas para Northern blots, a Bio-Rad Laboratories Inc., (Hercules, CA); la resina de Heparina-Ultrogel, a IBI² biotechnics; la Gelatina-Sepharosa, por Pharmacia Fine Chemicals AB (Suecia); la FN plasmática humana (FNph), a Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania); todo el material de plástico para cultivo de células fue provisto por Nunc A/S (Roskilde, Denmark); la hormona folículo estimulante ovina (oFSH), por NIH (Bethesda, VI); el resto de los reactivos, incluyendo el EGF, el PDGF, la tripsina, los reactivos de electroforesis para geles de poliacrilamida y agarosa, fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El colágeno tipo I fue preparado a partir de colas de rata según se ha descripto previamente (18).

Establecimiento de cultivos primarios

Los cultivos primarios de células de la granulosa bovina fueron establecidos de la siguiente manera: las células de la granulosa fueron colectadas por centrifugación del fluido folicular obtenido de folículos pequeños (entre 2 y 8 mm de diámetro), por aspiración utilizando una aguja (18 gauge) y jeringa (5 ml). Los glóbulos rojos fueron eliminados exponiendo a las células a un breve tratamiento hipotónico (resuspensión de 20 segundos en agua destilada). Luego, las células de la granulosa fueron sembradas a una densidad de 6×10^4 células/cm² en medio DMEM:F12 (1:1) suplementado con bicarbonato de Na⁺ (2,2 g/l) en presencia de 10 % NCS y antibióticos. Luego de 2 días de incubación a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, las células alcanzan confluencia. Posteriormente el medio se lava 2 veces con PBS y se agrega medio de cultivo fresco sin suero en presencia o ausencia de las drogas indicadas en cada caso.

Cultivo de las células BGC-1

Las células BGC-1 fueron obtenidas por inmortalización espontánea a partir de cultivos de células de la granulosa (14). Las células BGC-1 se crecieron en placas de cultivo de 10 cm de diámetro en DMEM:F12 (1:1) suplementado con bicarbonato de Na⁺ (2,2 g/l) en presencia de 5 % de NCS y antibióticos. Una vez que se llega a confluencia las células se despegan por tripsinización (0,5 % tripsina y 0,2 % EDTA) y se siembran 5 x 10⁵ células/placa. Para todos los experimentos excepto los de síntesis de ADN, las células fueron crecidas con 5 % de NCS hasta alcanzar confluencia. Luego, los cultivos se lavan 3 veces con PBS y se agrega medio de cultivo sin suero en presencia de las drogas indicadas en cada caso.

Marcación metabólica, electroforesis en geles de poliacrilamida y fluorografía

Los cultivos primarios y de células BGC-1, crecidos como se indica más arriba, se lavaron tres veces con medio de cultivo DMEM libre de metionina, y se le agregó 150 µCi/ml de metionina-[³⁵S]. Luego de incubar a 37 °C por 5 horas, el medio fue colectado, suplementado con 2 mM PMSF y guardado a -20 °C hasta el momento de ser analizado. Para esto, alícuotas de estos medios se diluyeron al medio con buffer de muestra 2X (0,125 M tris-HCl pH=6,8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 10 % β-mercaptoetanol), se hirvieron 2 minutos para finalmente ser aplicados a geles de poliacrilamida en gradiente continuo (8-12 %) (54). Al finalizar la electroforesis, las proteínas incluidas en el gel fueron fijadas por incubación por 30 minutos en una mezcla de ácido acético y metanol (40 % y 10 %, respectivamente). Luego de ser eliminada esta mezcla por agitación en agua, el gel se lavó en salicilato de Na⁺ al 1 % en 2 % de glicerol. El gel así preparado fue secado y fluorografiado en películas Kodak X-OMAT AR-5 por 24 horas.

Determinación de actividad 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/Δ⁵⁻⁴ isomerasa (3β-HSD) en células BGC-1

Las células BGC-1 fueron sembradas a una densidad de 10⁵ células en celdas placas de 24 pocillos y fueron incubadas por 3 horas en presencia de 5 % de NCS para permitir una adhesión completa. Luego de lavar al cultivo tres veces con medio sin suero, se agregó pregnenolona (10 ng/ml) hasta un volumen final de 500 µl. A diferentes tiempos, el medio fue colectado y los niveles de progesterona sintetizados fueron evaluados por radioinmunoensayo según se explica

más abajo. Los coeficientes de CV intra e interensayo fueron de 12 y 16.9 %, respectivamente. La producción de progesterona fue expresada como ng/ml. La concentración de pregnenolona utilizada no produce reacción cruzada en estos ensayos.

Metabolismo de esteroides y análisis en cromatografía en capa delgada.

Los cultivos primarios y de células BGC-1, crecidos como se indica más arriba, se lavaron tres veces con medio de cultivo DMEM:F12, luego de lo cual se agregaron diferentes esteroides radioactivos (2×10^5 cpm/pocillo de placa de 24 celdas de pregnenolona- ^3H], progesterona- ^3H] o testosterona- ^3H]). Luego de 6 horas (24 horas cuando se utilizó testosterona- ^3H) como sustrato, el medio fue colectado, extraído con éter y los distintos metabolitos fueron separados en cromatografía en capa delgada, utilizando como solvente una mezcla de ciclohexano, cloroformo y éter (2:2:1). Las placas de sílica luego fueron rociadas con un intensificador de la señal de tritio (DuPont NEN Research Products) y autorradiografiadas en con película Kodak X-OMAT AR-5 por 4 días.

El valor de R_{p4} (la movilidad relativa a la progesterona) de varios esteroides fue calculada como el cociente entre los valores de R_f de cada esteroide y el de la progesterona. Los resultados se presentan en la Tabla I. Los metabolitos producidos por las células de la granulosa fueron determinados de la siguiente forma: primero, la comparación de la movilidad de los metabolitos producidos con respecto a la de esteroides conocidos corridos en paralelo, en al menos 2 sistemas de solventes diferentes, produjo una lista de productos putativos; segundo, teniendo en cuenta el sustrato agregado a los cultivos y las rutas metabólicas conocidas, los productos posibles fueron restringidos aún más; finalmente, la identidad de los mismos fue confirmada por la desaparición de dicho metabolito radioactivo luego del agregado de un gran exceso de sustratos competitivos de las correspondientes enzimas (ej., dehidroepiandrosterona y testosterona para competir por la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^{5-4} isomerasa y la 5α -reductasa, respectivamente). Este método permitió la identificación de todos los principales metabolitos, con la única excepción de los isómeros 20α -hidroxi y 20β -hidroxiprogesterona, que se forman en cantidades comparativamente bajas y no pudieron ser resueltos en la cromatografía utilizada.

Tabla I. Movilidad relativa a la Progesterona (R_{p4}) de varios esteroides¹

Esteroides	R_{p4}
5 α -pregnano-3,20-diona (5 α P ₄)	1,29 \pm 0,018
5 α -androstane-3,17-diona	1,1 \pm 0,019
Progesterona (P ₄)	1
5 α -pregnano-3 α -ol-20-one (5 α 3 α P)	0,89 \pm 0,019
Pregnenolona (P ₃)	0,82 \pm 0,020
5 α -pregnano-20 α -ol-3-ona (5 α 20 α P)	0,80 \pm 0,020
4-androsteno-3,17-diona (Δ 4)	0,77 \pm 0,020
Dihidrotosterona (DHT)	0,69 \pm 0,027
17 β -estradiol (E ₂)	0,63 \pm 0,033
Androsterona (A)	0,57 \pm 0,027
20 α -dihidroprogesterona (20DHP)	0,48 \pm 0,030
Testosterona (T)	0,41 \pm 0,022
5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (Adiol)	0,35 \pm 0,016
5 α -pregnano-3 α -20 α -diol (Pdiol)	0,33 \pm 0,020
17-hidroxiprogesterona	0,31 \pm 0,022

¹El valor de R_{p4} se define como el cociente entre el R_f de cada esteroide y el R_f de la progesterona. Los valores de R_{p4} fueron determinados realizando tres corridas de cada uno de los esteroides indicados en el sistema descripto. La placa de sílica fue rociada con una mezcla de etanol, ácido sulfúrico y vainillina. Los compuestos fueron visualizados calentando la placa seca.

Clonado de las células BGC-1

El clonado de las células BGC-1 se realizó por el método de diluciones seriadas. En una placa de 96 celdas se sembraron diluciones al medio de células, partiendo de 1.000 células/celda en un volumen de 50 μ l en medio DMEM:F12 suplementado con 25 % NCS y antibiótico hasta una dilución de 3,9 células/celda, por octuplicado. A las 8 horas, se observó al microscopio y se determinó cuáles de las celdas contenían aparentemente una única célula. Estas celdas fueron controladas en los días sucesivos para confirmar la presencia de una única colonia. Cuando alcanzaron confluencia, los cultivos de los pocillos seleccionados fueron despegados por tratamiento con tripsina y amplificados en medio de cultivo con 10 % NCS. Los clones así obtenidos fueron reclonados para asegurar el estado clonal. De esta forma se obtuvieron varios clones, de los cuales los clones bautizados A4 y A10 fueron utilizados en los experimentos descriptos en la tesis.

Preparado y caracterización del medio condicionado (MC) de células BGC-1

Cultivos confluentes de células BGC-1 o de los clones correspondientes fueron lavados tres veces con PBS para eliminar restos de suero, luego de lo cual se agregó DMEM:F12 sin suero. Luego de dos días de incubación, el medio fue colectado y almacenado a 4 °C.

Como parte de la caracterización, el MC de las células BGC-A4 fue sometido a distintos tratamientos, tales como calentamiento a 60 °C, congelamiento a -20 °C y los que se detallan a continuación:

Microconcentradores: 2 ml de MC fueron sembrados en microconcentradores (AMICON) con un límite de exclusión de 30 kDa. Posteriormente se lo sometió a centrifugación a 2,500 x g por 90 minutos. El volumen colectado en la fase superior (concentrado en moléculas de más de 30 kDa de PM) fue de 200 µl. Este MC concentrado, fue diluido 10 veces antes de ser ensayado en los cultivos.

Tripsina: 1 ml de MC fue incubado por 1 hora a temperatura ambiente en presencia de 1 µg/ml de tripsina. La reacción fue detenida por el agregado de 1 µg/ml de inhibidor de tripsina de poroto de soja. Como control se ensayó la misma reacción pero con el agregado del inhibidor desde el comienzo.

Cromatografía de afinidad en columnas de Heparina. Se utilizaron 10 ml de MC por las células BGC-A4. Este MC, fue aplicado a una columna de 1 ml de lecho de Heparina-Ultrogel previamente lavada con PBS y equilibrada con medio de cultivo. La elución de los componentes se realizó con 1 ml de soluciones de creciente fuerza iónica: 0,2, 0,35, 0,5, 0,8, 1,2 y 3 M en NaCl y posteriormente una solución de glicina 100mM pH=3. Cada una de las fracciones se dializó contra PBS 0.1X por 24 hs. y luego contra medio de cultivo DMEM-F12.

Para las columnas de heparina realizadas con MCs con proteínas marcadas metabólicamente se procedió de la siguiente forma: la marcación se realizó como se indica más arriba, excepto que se incubó toda la noche en vez de 5 horas. El MC marcado se aplicó a columnas de heparina como se describe más arriba y se eluyeron las muestras correspondientes. Las fracciones así obtenidas, fueron dializadas contra H₂O y fueron posteriormente llevadas a sequedad por evaporación en vacío. Cada fracción fue resuspendida en 100 µl de buffer de muestra 1X por cada ml de MC

original, hervida por 2 minutos, centrifugada 10 min. a 10.000 x g y posteriormente aplicada a geles de 10 % de poliacrilamida. La fluorografía se realizó según se explica más arriba.

Obtención de células de la granulosa de rata

Ratas inmaduras (21 a 23 días) fueron tratadas con implantes de dietilestilbestrol (5 mg DES/implante) por 5 días (17). Los ovarios fueron liberados de tejido conectivo y adiposo y se trataron secuencialmente con una solución de EGTA 6,8 mM y sacarosa 0,5 M en medio de cultivo. Las células fueron obtenidas por extrusión a través de una malla de nytex, resuspendidas en medio de cultivo conteniendo HEPES 10mM, pH:7,4 y purificadas por colchón de Percoll (40%). La viabilidad se evaluó por exclusión de azul de tripán.

Las células fueron cultivadas en medio DMEM:F12 (1:1), suplementado con bicarbonato de Na⁺ (2,2 g/l) conteniendo gentamicina (40 µg/ml), en placas de cultivo cubiertas con colágeno purificado de tendones de cola de rata. El medio se suplementó con hormonas y factores según el diseño experimental.

Diferenciación celular

El efecto de los distintos tratamientos en la diferenciación de células de granulosa de rata en cultivo se evaluó por radioinmunoensayo específico de progesterona y estradiol. En ambos casos se analizó la producción basal y estimulada por FSH (oFSH 20 ng/ml); para la determinación de estradiol se añadió al cultivo androstenodiona como sustrato aromatizable (10).

Colecta de fluido folicular y purificación de la FN.

Los ovarios bovinos fueron obtenidos de un frigorífico cercano a partir de vacas justo luego del muertas. Luego del transporte al laboratorio a 30°C los ovarios fueron lavados 3 veces con solución fisiológica previamente entibiada. El fluido folicular fue colectado por aspiración de foliculos de diferentes tamaños y se les agregó 2mM fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF). El fluido folicular de foliculos con diámetros entre 2 y 5 mm y entre 5 y 8 mm fueron reunidos en dos grupos separados; el resto de los foliculos fueron procesados individualmente. El volumen de fluido fue tomado con un indicador del tamaño del foliculo. Las células fueron substraídas por

centrifugación a 3.000 x g por 2 minutos, luego cada muestra fue recentrifugada por 10 minutos a 10.000 x g para descartar detritos celulares.

La FN fue purificada siguiendo el siguiente protocolo: 200 µl de cada muestra se diluyeron en un volumen igual de PTE (PBS, 0,02 % Tween-20 y 2mM EDTA) y medio volumen extra de Gelatina-Sepharosa 4B. La muestra fue mantenida a temperatura ambiente toda la noche con suave pero constante agitación. Las interacciones de baja afinidad fueron lavadas con 3M NaCl y la FN fue recuperada con 8M urea. Luego, la muestra fue dializada contra 0,01X PBS toda la noche a 4 °C. Finalmente, cada muestra fue liofilizada, resuspendida en 100 µl de buffer de muestra 1X y hervida por 2 minutos.

Para la cuantificación relativa de los niveles de FN total y la FN-ED-I⁺ por Western blot, se utilizó 10 µl de una dilución 1/100 y 10 µl de muestra no diluida de cada muestra, respectivamente.

Radioinmunoensayos

Los niveles de progesterona y estradiol en el fluido folicular fueron determinados por radioinmunoensayo luego de una extracción con éter, según ha sido descrito previamente (10). Las determinaciones de progesterona y estradiol en medios condicionados de células en cultivo fueron determinados de la misma forma, exceptuando el paso de extracción etérea, ya que el medio condicionado no contiene suero.

Ensayo de síntesis de ADN

Las células BGC-1 se siembran en placas de 96 pocillos previamente cubiertas con colágeno a una densidad de 5 x 10³ células/pocillo en medio DMEM:F12 en ausencia de suero. Luego de 2 horas, los estímulos indicados junto con la [³H]-timidina (concentración final: 10 µCi/ml). Veinticuatro horas más tarde, las células fueron cosechadas sobre filtro de vidrio en un cosechador de células (Nunc, A/S, Roskilde, Denmark) y la radioactividad incorporada en el ADN fue determinada en un contador de centelleo líquido.

Para obtener placas cubiertas con colágeno, una solución ácida de colágeno tipo I de rata (aproximadamente 100 µg/ml in ácido acético 0,1%) se agregó en alícuotas de 25 µl a los pocillos correspondientes. Luego de que la solución cubriera totalmente la superficie el exceso fue aspirado y la placa fue secada bajo una corriente de aire estéril.

Las células de granulosa de rata se cultivaron en placas de 96 celdas en las condiciones anteriormente descritas a una densidad de 100.000 células/celda. Luego de 24 hs se agregó la timidina tritiada (4 µCi/ml) y los cultivos se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio, usando un cosechador automático (Nunc) a las 48 hs de sembradas. La radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido.

Las células CCL-64 fueron cultivadas como se ha descrito previamente (23). Brevemente, los cultivos fueron mantenidos en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS). Para los ensayos de incorporación de timidina, las células se plaquearon en placas de 96 pocillos a una densidad de $7,5 \times 10^3$ células/pocillo en medio DMEM suplementado con 0,2 % de FBS. Luego de 2 horas, los estímulos indicados fueron agregados. Veintidós horas más tarde, se agregó la [³H]-timidina (concentración final: 10 µCi/ml) y luego de dos horas las células fueron cosechadas. La radioactividad incorporada en el ADN se determinó en un contador de centelleo líquido.

Péptidos recombinantes

Los péptidos recombinantes correspondientes al dominio ED-I de rata (ED-Irr) o a los dominios adyacentes 11 y 11 (11-12rr) fueron preparados como se describió previamente (48)

Anticuerpos

FN total. Para reconocer todas las variantes de FN se utilizó un anticuerpo policlonal contra FNph (Sigma Chemical Co.), desarrollado utilizando FN plasmática humana purificada como inmunógeno. En Western blots, este anticuerpo se utilizó en una dilución 1/1.000.

FN-ED-I⁺. Para detectar la variante ED-I⁺ de FN se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la FN celular (clon FN-3E2, Sigma Chemical Co.). Este anticuerpo reconoce la FN celular pero no la plasmática, como se muestra en la Figura 3. Más aún, este anticuerpo reconoce

específicamente el segmento ED-I contenido en la FN por Western blot (13). En Western blots, este anticuerpo se utilizó en una dilución 1/10.000.

Inmunoprecipitación de FN.

La FN presente en MC de células BGC-A4 fue inmunoprecipitada según se ha descrito anteriormente (46). Brevemente, se agregó al MC el anticuerpo policlonal contra FN hasta una dilución de 1/100 y se incubó la muestra por 90 min. a 37 °C, luego de lo cual se agregó un segundo anticuerpo contra IgG de cabra, en una concentración tal que se formó una red precipitante y se incubó por 45 min. más a 37 °C. Pasado este período, se eliminó el precipitado por 10 min. de centrifugación a 10.000 x g. El sobrenadante fue considerado MC depletado de FN. Como control se realizó la inmunoprecipitación reemplazando el primer anticuerpo por suero de cabra no inmune en la misma dilución.

Western blots cuantitativos.

Preparado de las muestras. Al final de cada experimento, el medio condicionado fue colectado y se le agregó inmediatamente 2 mM PMSF. Los extractos celulares se prepararon agregando 150 µl de buffer de muestra 1X por pocillo de placa de 35 mm de diámetro. Posteriormente, se hirvió la muestra por 5 minutos. Tanto los medios condicionados como los extractos celulares fueron conservados a -20 °C hasta que se realizaron los Western blots correspondientes.

Western blot. La electroforesis en geles se realizó en condiciones reductoras en geles de 6% de poliacrilamida, según se detalla más arriba. Posteriormente, las proteínas fueron

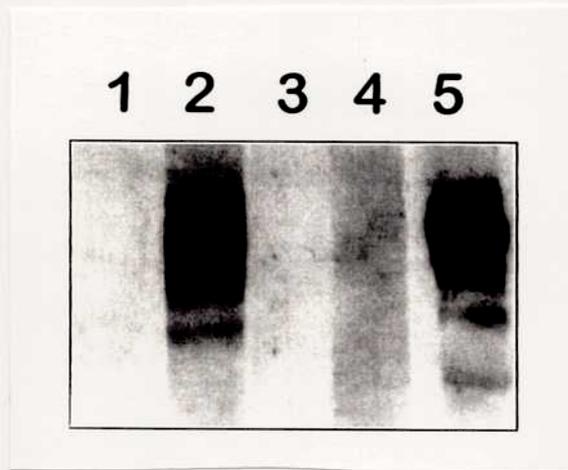


Figura 3. Western blot mostrando la especificidad de los anticuerpos utilizados en la tesis para las distintas variantes de FN. El anticuerpo monoclonal contra FN-ED-I⁺ no reconoce a la FN plasmática.

Los carriles 1 a 3 fueron sembrados con 1 μ g de FN plasmática humana y los carriles 4 y 5 con una muestra conteniendo FN-ED-I⁺ (2 μ g de proteína correspondiente a un medio condicionado de células BGC-1 tratadas con 5 ng/ml de TGF- β por 2 días). Carril 1, suero de cabra normal; carril 2, anticuerpo contra FN plasmática (1:1.000); carriles 3 a 5, anticuerpo monoclonal contra FN-ED-I⁺ (1:10.000); y carril 4, sin primer anticuerpo (se utilizó el mismo segundo anticuerpo que en 3 y 5).

electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa, sobre las que se hicieron los siguientes ensayos. Los niveles de FN y de FN-ED-I⁺ acumulada en los sobrenadantes de los cultivos, en los extractos celulares o en las muestras de fluido folicular fueron determinados por Western blot utilizando los anticuerpos descritos más arriba. Estos primeros anticuerpos fueron detectados mediante sendos segundos anticuerpos biotinilados, seguidos del agregado de Extravidin (avidina acoplada a peroxidasa, Sigma Chemical Co.). El sustrato de la peroxidasa fue provisto por un "kit" de detección por quimioluminiscencia (Dupont NEN Research Products, Boston MA).

Cuantificación. Los análisis densitométricos se realizaron mediante un densitómetro LKB. Cada Western blot se cuantificó utilizando una curva standard que consistía en diluciones seriales de una de las muestras incluida en el ensayo. Las unidades densitométricas fueron transformadas así en unidades de concentración relativa de proteína.

Extracción de ARN y Northern blots

El ARN total de los cultivos fue extraído como se ha descrito previamente (22), y luego fue separado según su peso molecular a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1 % conteniendo formaldehído. Luego el ARN fue transferido a membranas sintéticas Zeta-Probe, y fue hibridizado según las especificaciones del fabricante. El ARNm de FN fue detectado utilizando una sonda correspondiente a un 5865 pb comprendido entre un sitio Sal I y Hind III (ED-I - ED-II - IIICS89⁺), mientras que para el ARNm de la FN-ED-I⁺ se utilizó sonda M13ED1 (un fragmento de 160 pb Pst I /Sau IIIAI del exón ED-I) (116). Los resultados fueron normalizados con una sonda que reconoce al ARNm de la enzima constitutiva gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Las sondas para detectar ARNm de FN y G3PDH fueron marcadas radioactivamente mediante el un "kit" de marcación basado en el método de "primers" al azar (Gibco BRL, Life technologies). La sonda de ED-I fue marcada por extensión con nucleótidos marcados a partir de un "primer".

Experimentos de adhesión celular

Las placas de cultivo plásticas fueron cubiertas con una solución de 10 µg/ml de colágeno tipo I de cola de rata, FNph, ED-Irr, 11-12rr o diferentes combinaciones de ellos. Una gota de 50 µl,

sembrada en el centro de pocillos de una placa de 24 celdas, se dejó evaporar toda la noche a temperatura ambiente. Luego las células BGC-1 se sembraron a una densidad de 2×10^4 células/pocillo en medio DMEM:F12 en ausencia de suero. A distintos tiempos, las células fueron fotografiadas en un microscopio invertido.

Análisis estadístico

Los datos presentados, corresponden a las medias \pm ESM de mediciones realizadas por triplicado. Para evaluar la significación estadística de los tratamientos, se realizó el correspondiente ANOVA seguida de la prueba de Scheffé para comparaciones múltiples.

Los Western blots y los Northern blots fueron cuantificados por análisis densitométrico. En el caso de los Northern blots, la densitometría fue validada mediante el conteo directo de la radioactividad presente en cada banda.

Todos los experimentos que se presentan en la tesis fueron realizados al menos en tres oportunidades.

RESULTADOS

1. COMPARACIÓN ENTRE CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA Y LA LÍNEA CELULAR BGC-1

1.1 Secreción de proteínas

Para evaluar en forma cualitativa la presencia de alteraciones significativas en la línea celular BGC-1 con respecto a los cultivos primarios, se estudió el perfil electroforético de las proteínas secretadas marcadas radiactivamente. Para esto se sembraron células BGC-1 y células de la granulosa bovina obtenidas a partir de folículos antrales pequeños (de entre 2 y 8 mm de diámetro), en presencia de 5% NCS y posteriormente ambos cultivos se marcaron por 5 horas en ausencia de suero con 150 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ de metionina- ^{35}S . El patrón de proteínas secretadas por las células BGC-1 es similar al de los cultivos primarios, aunque se observan algunas diferencias (Figura 4). Una banda intensa de PM aparente de 220 kDa producida por las células BGC-1 ha sido previamente identificada como fibronectina (14). Puede observarse que la secreción de FN está incrementada considerablemente en las células inmortalizadas. Otras proteínas no identificadas hasta el momento, con PM aparentes que van desde 73kDa hasta 50 kDa son también más abundantes en la células BGC-1. Sin embargo, la secreción de otras proteínas por parte de las células BGC-1 está disminuida en comparación con los cultivos primarios (por ejemplo, las bandas de 92 kDa, 45 kDa y 42 kDa).

1.2 Metabolismo de esteroides

Para examinar otras funciones específicas de células de la granulosa, se investigó la capacidad esteroidogénica de las células BGC-1. El primer parámetro funcional examinado fue la habilidad de los cultivos de células BGC-1 para sintetizar progesterona (P4) en medio libre de suero. Tanto células BGC-1 no estimuladas como aquellas que fueron tratadas con análogos permeables del cAMP fueron incapaces de producir cantidades detectables de este esteroide. Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio habían confirmado la presencia de la actividad Δ^5 -isomerasa/ 3β -hidroxi-esteroide-deshidrogenasa ($3\beta\text{HSD}$) en las células BGC-1 (Figura 5).

Para evaluar la presencia de otras enzimas involucradas en el metabolismo esteroideo, células BGC-1 y cultivos primarios fueron incubados con distintos esteroides radiactivos y sus

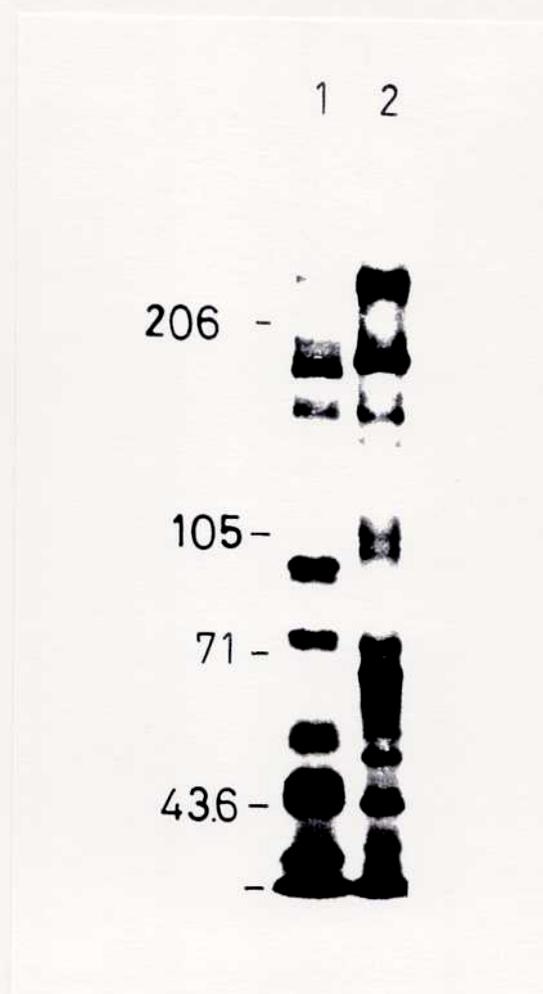


Figura 4. Secreción de proteínas por las células de la granulosa. Cultivos confluentes fueron marcados con 150 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^{35}S]metionina por 5 horas en medio DMEM libre de metionina, en ausencia de suero. Las proteínas secretadas por los cultivos primarios (carril 1) o por las células BGC-1 (carril 2) fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % que posteriormente fue fluorografiado. Los números a la izquierda indican el peso molecular (en kDa) correspondiente a los patrones corridos en paralelo. Esta autorradiografía es representativa de 4 experimentos con resultados equivalentes.

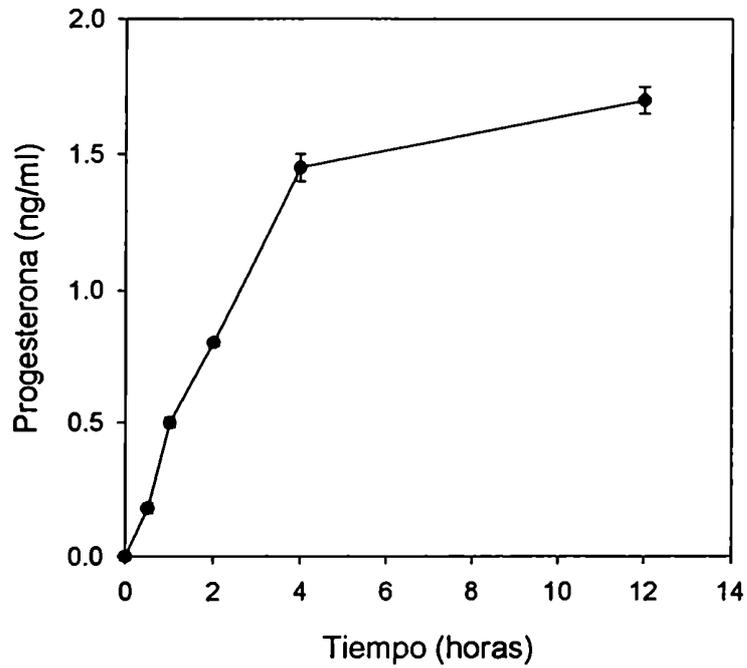


Figura 5. Actividad 3β HSD en células BGC-1. Curso temporal de la acumulación de progesterona en sobrenadantes de cultivos de células BGC-1. 10^5 células fueron incubadas en $500 \mu\text{l}$ de medio en ausencia de suero en presencia de 10 ng/ml de pregnenolona. El medio fue colectado en los tiempos indicados y los niveles de progesterona fueron determinados por RIA. Los valores son medias \pm ESM de cultivos realizados por triplicado de un experimento representativo ($n=4$).

metabolitos fueron separados por cromatografía en capa delgada (Figura 6). La conversión de pregnenolona (P5) a P4 fue mayor en cultivos primarios, indicando una mayor actividad 3β HSD (Figura 6A, panel izquierdo). En cambio, la actividad 5α -reductasa, estimada como la suma de los metabolitos 5α -reducidos formados a partir de $P4\text{-}[^3\text{H}]$ parecía estar incrementada en las células BGC-1 (Figure 6, panel central).

La diferencia cualitativa más importante, en términos de metabolismo esteroideo, entre ambos cultivos, fue la habilidad de los cultivos primarios de sintetizar 17-hidroxi-progesterona, utilizando como sustrato a la P5 (Figura 6, panel izquierdo, línea 2) o a la P4 (Figura 6, panel central, línea 2).

En las condiciones de cultivos utilizadas tanto las células BGC-1 como los cultivos primarios fueron incapaces de convertir testosterona- $[^3\text{H}]$ a E2 (Figura 6, panel derecho). De hecho, la mayor parte de la testosterona en células BGC-1 fue convertida a los metabolitos 5α -reducidos dihidrotestosterona (DHT) y 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol, si bien pequeñas cantidades de androstenodiona, androstanodiona y androsterona también fueron detectadas. Los cultivos primarios, sin embargo, mostraron muy poca metabolización de la testosterona, y produjeron sólo mínimas cantidades de metabolitos 5α -reducidos.

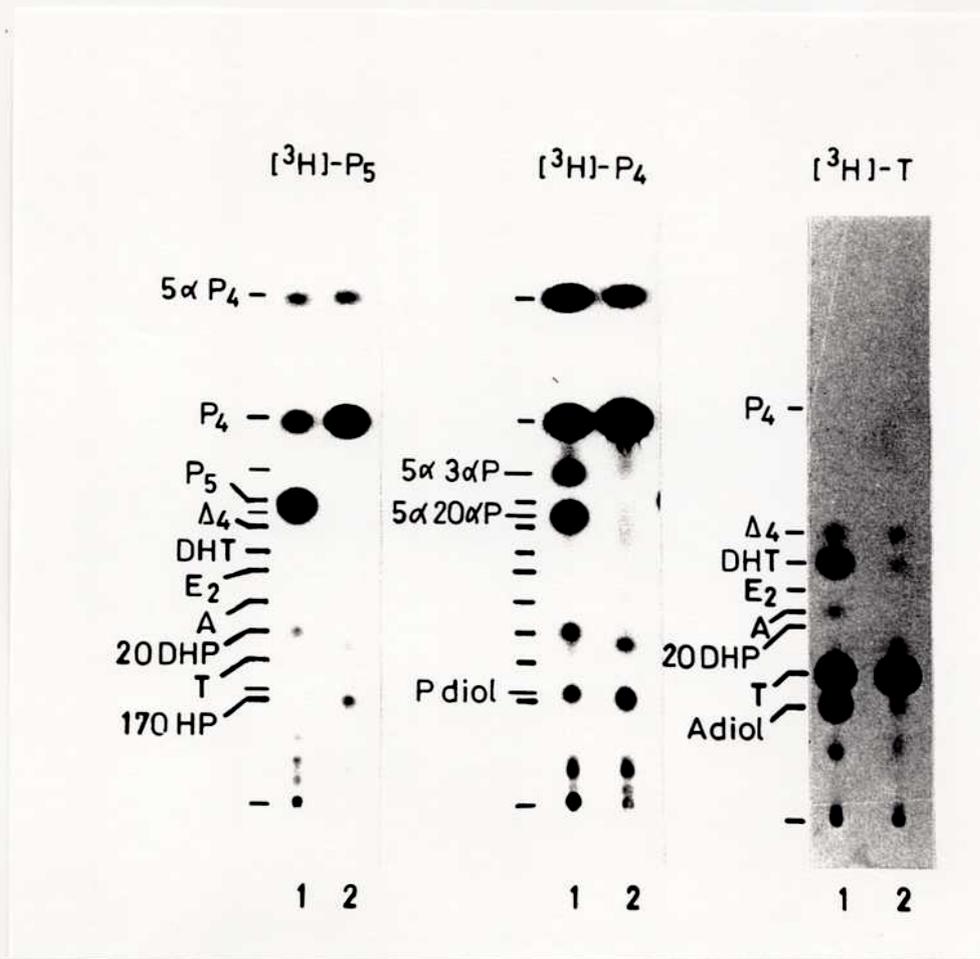


Figura 6. Metabolismo de esteroides por las células de la granulosa bovinas. Cultivos confluentes de células BGC-1 (carriles 1) o cultivos primarios de células de la granulosa (carriles 2) fueron incubados con [^3H]-pregnenolona (izquierda), [^3H]-progesterona (centro) o [^3H]-testosterona (derecha) en medio de cultivo en ausencia de suero por 6, 6 y 24 horas, respectivamente. Las muestras fueron extraídas con éter y aplicadas a una placa de sílica para desarrollar una cromatografía en capa delgada. El solvente utilizado fue una mezcla de ciclohexano, cloroformo y éter (2:2:1). A la izquierda de cada panel se indica la movilidad de esteroides patrón: 5 α -pregnano-3,20-diona (5 α P₄); progesterona (P₄); 5 α -pregnano-3 α -ol-20-one (5 α 3 α P); pregnenolona (P₅); 5 α -pregnano-20 α -ol-3-ona (5 α 20 α P); 4-androsteno-3,17-diona (Δ ₄); dihidrotestosterona (DHT); 17 β -estradiol (E₂); androsterona (A); 20 α -dihidroprogesterona (20DHP); testosterona (T); 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (Adiol); 5 α -pregnano-3 α -20 α -diol (Pdiol); 17-hidroxiprogesterona (17OHP). n=3.

2. REGULACIÓN AUTOCRINA DE LA PROLIFERACIÓN

Como parte de los cambios ocurridos en la línea celular BGC-1 que llevaron al establecimiento de la línea, es posible que la síntesis de ciertos factores de crecimiento haya aumentado, de forma tal que ahora sirvan para la estimulación de la proliferación y/o supervivencia de los cultivos.

Para evaluar la hipótesis de que las células BGC-1 producen sustancias con actividad estimuladora de la proliferación, se prepararon medios condicionados (MC) incubando cultivos confluentes de células BGC-1 en medio de cultivo en ausencia de suero, por un período de 48 horas. Posteriormente, células BGC-1 fueron incubadas con concentraciones crecientes de este MC en presencia de timidina-[³H]. Como se observa en la Figura 7, el MC produjo un efecto estimulador en una forma dependiente de la dosis.

2.1 Clonado de las células BGC-1

La heterogeneidad inicial de la línea celular presentaba ciertos inconvenientes. Existía el riesgo de que con los sucesivos pasajes, uno o algunos clones con tasa de crecimiento más elevada, finalmente reemplace a la totalidad del cultivo. Por otro lado, se hacía evidente la posibilidad de que las respuestas observadas por las células BGC-1 no fueran homogéneas, es decir, que sólo una proporción de las células sea la que responda a los estímulos, por lo cual se estaría realizando un análisis erróneo de la magnitud de las respuestas observadas. Por estas razones, se procedió a la obtención de clones de las células BGC-1 mediante la técnica de diluciones seriadas.

Una vez obtenidos, estos clones fueron evaluados por su capacidad de producir un medio condicionado con actividad autocrina. Dicho parámetro fue ensayado sobre células BGC-1. En experimentos de síntesis de ADN como los detallados más arriba, los MCs de dos clones representativos, BGC-A4 y BGC-A10, mostraron actividad estimuladora (Figura 8). El hecho de que el MC proveniente del clon A4 fuera más potente que el del clon A10, confirmaba la naturaleza heterogénea de las células originales.

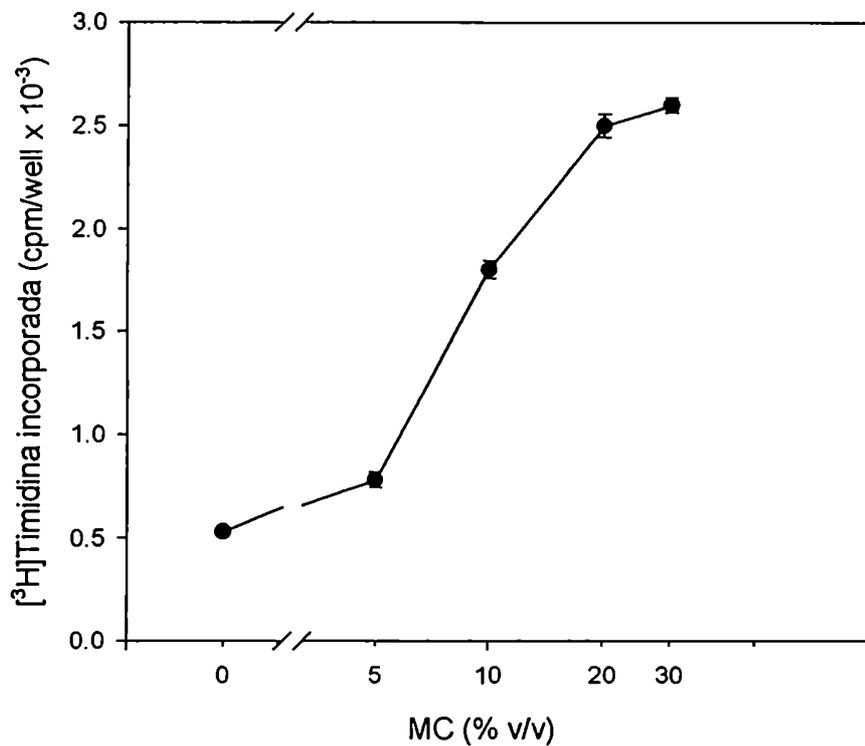


Figura 7. El medio condicionado (MC) de las células BGC-1 estimula la proliferación de las propias células BGC-1. Las células BGC-1 fueron sembradas a una densidad de 5×10^3 células/pocillo en placas de 96 celdas precubiertas con colágeno. A las 2 horas se les agregó concentraciones crecientes de MC por las células BGC-1 junto con $4 \mu\text{Ci/ml}$ de [³H]timidina. Luego de 24 horas de incubación a 37°C , las células fueron cosechadas y la radioactividad incorporada al ADN fue determinada en un contado de centelleo líquido. $n=3$.

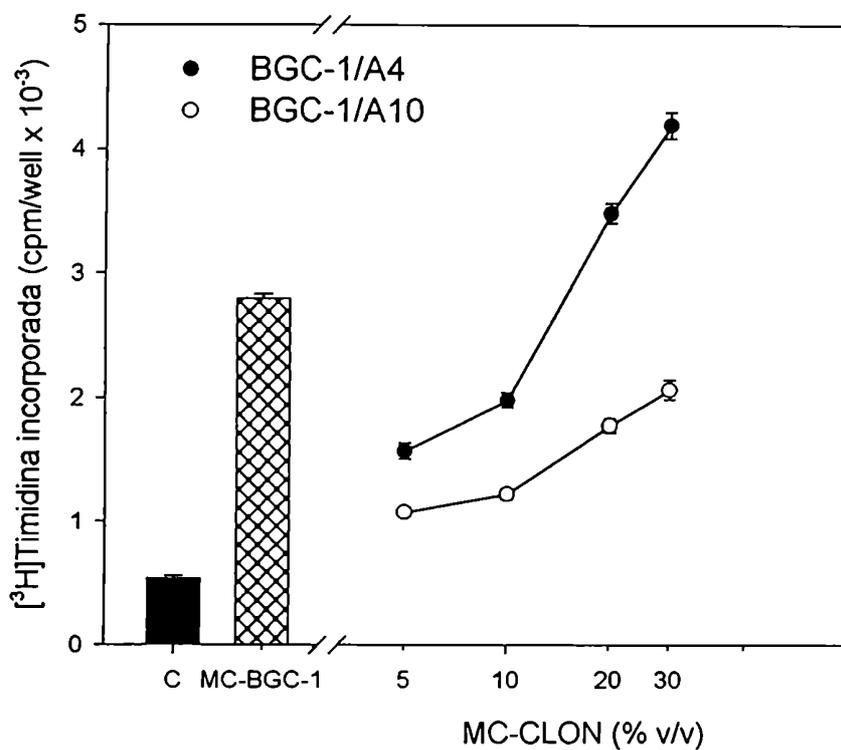


Figura 8. El MC de dos clones obtenido a partir de la línea BGC-1 presenta distinta potencia estimuladora. Los clones A4 y A10 fueron obtenidos por el método de diluciones seriadas de las células BGC-1. El ensayo de la actividad estimuladora de los MCs fue realizado sobre células BGC-1, en la misma forma que se explica en la leyenda de la Figura 7. En la Figura se muestra la incorporación de [3H]timidina basal (barra llena), en presencia de 30 % de MC de células BGC-1 (barra rayada) y de distintas concentraciones de MC del clon A4 (●) o del clon A10 (○). n=3.

2.2 Caracterización del medio condicionado

La caracterización inicial del MC de las células BGC-A4 se presenta en la Tabla II. La actividad fue completamente suprimida por el tratamiento con tripsina, revelando la naturaleza proteica del factor estimulador. La centrifugación en microconcentradores mostró que se trataba de una molécula de PM aparente mayor a 30 kDa. La actividad presente en el MC fue resistente a un

Tabla II: Sensibilidad del MC por células BGC-A4 a distintos tratamientos. La actividad fue evaluada midiendo el efecto de 30 % (v/v) de MC sobre la incorporación de timidina-[³H] al ADN en cultivos de células BGC-A4.

Tratamiento		% estimulación
Ninguno		100
Conservación a 4 °C		estable
Congelamiento (2 veces a -20°C)		60
Calentamiento (15 minutos a 60°C)		92
Microconcentradores	Retenido	80
(límite de exclusión 30 kDa)	Filtrado	8,5
Tripsina (1 µg/ml 60 min. t.amb.)		2,5(*)

*El porcentaje de estimulación fue calculado respecto del control en que se agregó inhibidor de tripsina al comienzo de la reacción.

tratamiento moderado con calor (15 minutos a 60 °C).

Posteriormente se determinó la cinética de producción de actividad mitogénica. Para esto se retiraron alícuotas a distintos tiempos y se ensayaron sobre células BGC-A4. La Figura 9 muestra que a partir de 5 horas de cultivo es posible detectar actividad mitogénica. La potencia relativa del MC va aumentando con el tiempo de condicionamiento, lo cual es coherente con el hecho de que las células estén secretando activamente al medio de cultivo algún factor proteico.

En nuestro laboratorio hemos determinado que el EGF y el IGF-I son capaces de inducir la síntesis de ADN en células BGC-1. Para descartar la posibilidad de que la actividad presente en el MC sea debida a la producción local de estos factores, células BGC-A4 fueron estimuladas con 30 % (v/v) de MC en presencia de ambos factores de crecimiento. En la Figura 10 se puede observar que el MC fue capaz de provocar un aumento en la incorporación de timidina aún en presencia de concentraciones saturantes de ambos factores.

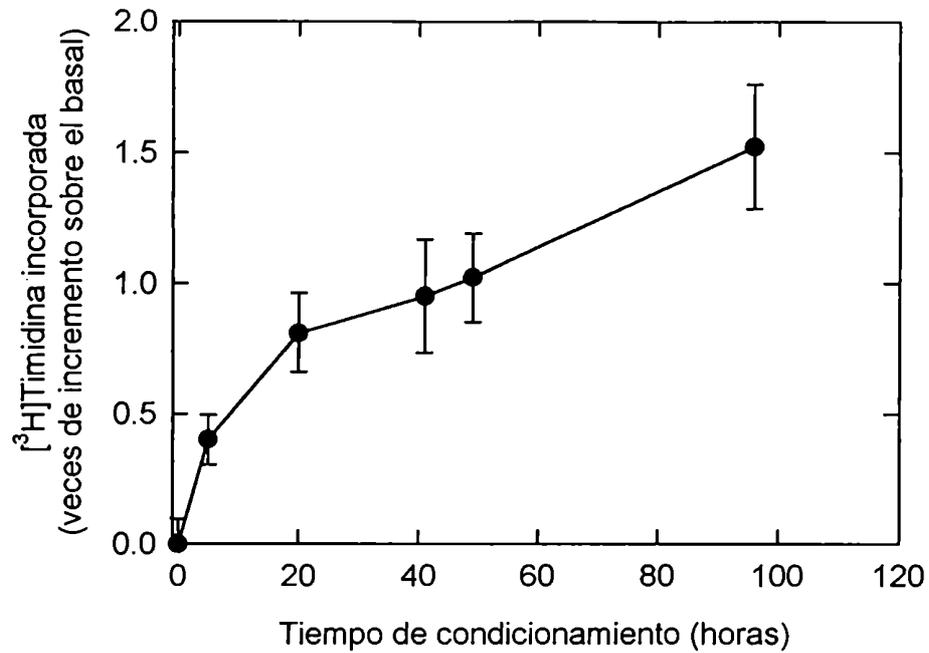


Figura 9. Cinética de producción de actividad mitogénica por parte de las células BGC-A4. Cultivos confluentes de células BGC-A4 fueron lavados tres veces con PBS, y fueron mantenidos por una hora más en presencia de medio de cultivo sin suero. Luego, el medio fue reemplazado por medio de cultivo fresco. A los tiempos indicados en la Figura, el medio fue colectado y ensayado en una concentración de 30 % v/v sobre células BGC-A4 en la forma detallada en la Figura 7. n=3.

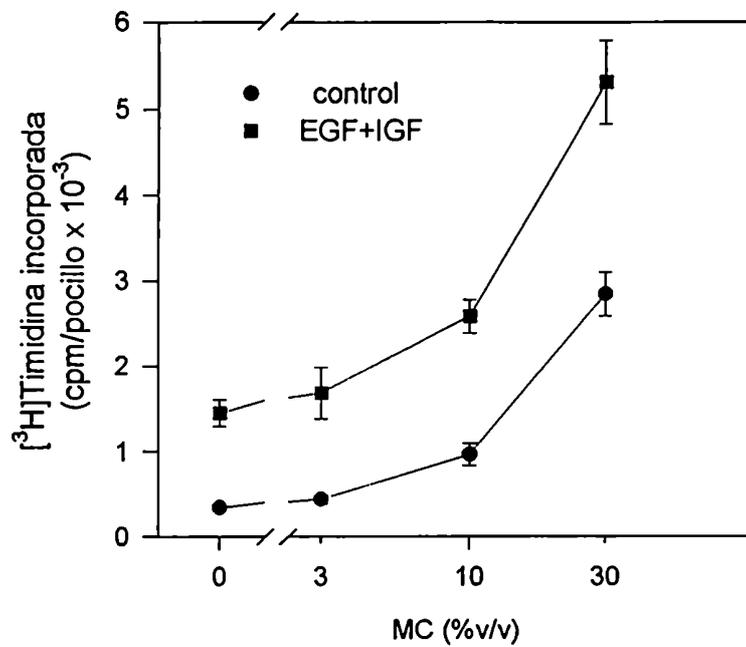


Figura 10. La actividad mitogénica del MC de células BGC-A4 no es debida a la presencia de EGF o IGF-I. Células BGC-A4 fueron estimuladas como se indica en la Figura 7, con concentraciones crecientes de MC de células BGC-A4 en ausencia (●) o presencia (■) de una combinación de EGF e IGF-I (10ng/ml y 100 ng/ml, respectivamente). n=3.

Dado que varios factores de crecimiento presentan afinidad relativamente elevada por proteoglicanos tales como la heparina, se comenzó la separación de la actividad presente en los MCs, utilizando columnas de heparina-ultrogel. Así, el MC de las células BGC-A4 presentó 2 picos de actividad cuando se lo ensayó sobre células BGC-1 (Figura 11 A), uno que eluye entre 0,3 y 0,5 M de NaCl y el otro que recién eluye al lavar la columna con 100 mM Glicina a pH=3.

Para visualizar las proteínas presentes en estas fracciones, cultivos de células BGC-A4 fueron marcados metabólicamente con metionina-[³⁵S]. Los sobrenadantes luego fueron fraccionados en las columnas de Heparina-Ultrogel y las proteínas presentes en cada una de las fracciones fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10%. La Figura 12 muestra una autorradiografía donde puede observarse una amplia variedad de proteínas marcadas. Las fracciones eluidas entre 300 y 500 mM, que habían presentado actividad biológica, resultaron ser las más abundantes, descontando la fracción correspondiente a las proteínas que pasaron de largo en la columna.

El hecho de que las células BGC-1 sintetizaran FN, y que esta glicoproteína presenta afinidad por heparina, la cual se inhibe con 0,5 M NaCl (46), sugería que una de las moléculas responsables de la acción biológica del MC fuera la FN. Además, la figura 12 muestra la presencia de proteínas de alto PM en la fracción eluida con 0,5 M NaCl, así como también en las fracciones circundantes.

Por lo tanto, se realizaron los siguientes experimentos de síntesis de ADN en células BGC-A4: por un lado se estudió el efecto del agregado de FN plasmática y paralelamente se ensayó en el MC previamente depletado de FN por inmunoprecipitación. La Figura 13 muestra que si bien el agregado exógeno de FN plasmática comercial no ejerce un efecto estimulador significativo, el MC depletado de FN carece de actividad mitogénica. Aunque no se muestra en la Figura 13, la combinación de FN plasmática y MC depletado no recuperó la actividad. La especificidad del tratamiento inmunológico queda confirmada por el hecho de que la incubación con IgG de animal no inmunizado no reduce la actividad del MC. Estos resultados en principio parecen contradictorios, ya que si la eliminación de la FN del MC, suprime su efecto, sería de esperar que el agregado de FN exógena tuviera un efecto estimulador de la proliferación. Para reconciliar estos datos, proponemos la siguiente hipótesis: o bien la inmunodepleción del MC arrastra a otros factores que presentan afinidad

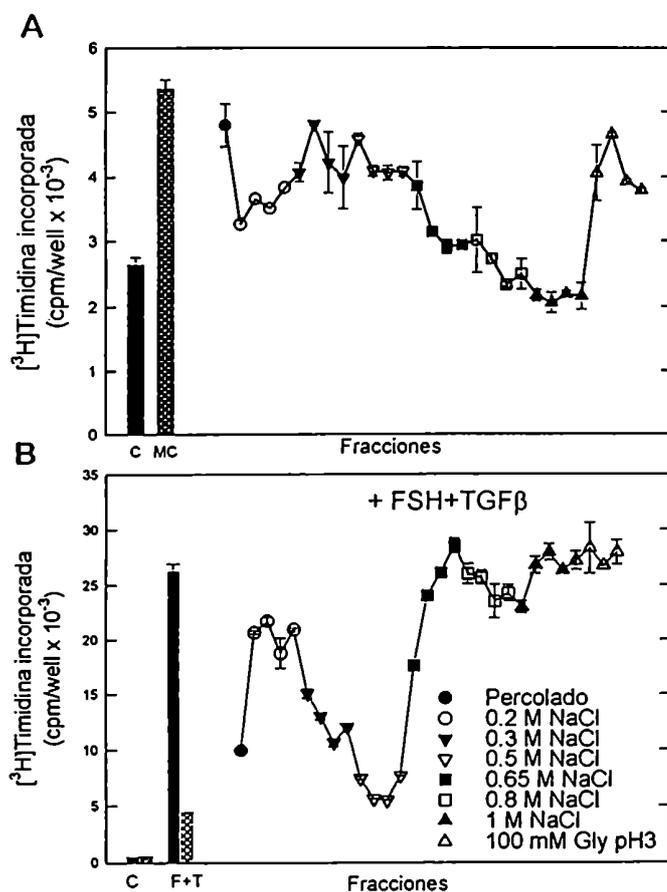


Figura 11. Separación de la actividad biológica presente en el MC mediante una columna de afinidad de heparina. El medio condicionado de células BGC-A4 fue aplicado a una columna de heparina-ultrogel, la cual fue posteriormente lavada con PBS. Luego distintas fracciones fueron eluidas con concentraciones crecientes de NaCl desde 0,2 M hasta 1 M. Finalmente, la columna fue lavada con una solución de 100 mM Glicina pH=3. Las fracciones así obtenidas fueron procesadas como se explica en Materiales y Métodos y luego fueron ensayadas tanto sobre células BGC-A4 (A) como sobre cultivos primarios de células de la granulosa de rata (B).

Panel A. Las células BGC-A4 fueron estimuladas como se indica en la Figura 7; se muestra la incorporación de [³H]timidina basal (barra llena), el efecto de 30 % v/v de MC de células BGC-A4 (barra rayada) y el efecto de las distintas fracciones de la columna de heparina. Se puede observar que la actividad mitogénica eluye en 2 picos, uno entre 0,3 y 0,5 M de NaCl y el otro recién aparece cuando la columna se lava con Glicina.

Panel B. Las células de granulosa de rata se cultivaron en placas de 96 celdas en las condiciones descritas en Materiales y Métodos a una densidad de 100.000 células/celda. Los estímulos fueron agregados 2 horas después del plaqueo. Luego de 24 hs se agregó la timidina tritiada (4 μCi/ml) y los cultivos se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio, usando un cosechador automático (Nunc) a las 48 hs de sembradas. La radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido. Las barras de la izquierda muestran la incorporación de [³H]timidina de los controles: células cultivadas en ausencia (C) o presencia (F+T) de una combinación de FSH y TGF-β (20ng/ml y 2,5 ng/ml, respectivamente) y en ausencia (barra llena) o presencia (barra rayada) de 30 % de MC de células A4. La actividad inhibitoria del MC aparece en el percolado (P) y en las fracciones que eluyen entre 0,3 y 0,5 M de NaCl. Percolado (●), 0,2 M NaCl (○), 0,3 M (▼), 0,5 M (▽), 0,65 M (■), 0,8 M (□), 1 M (▲) y 100 mM Glicina pH=3 (Δ). n=3.

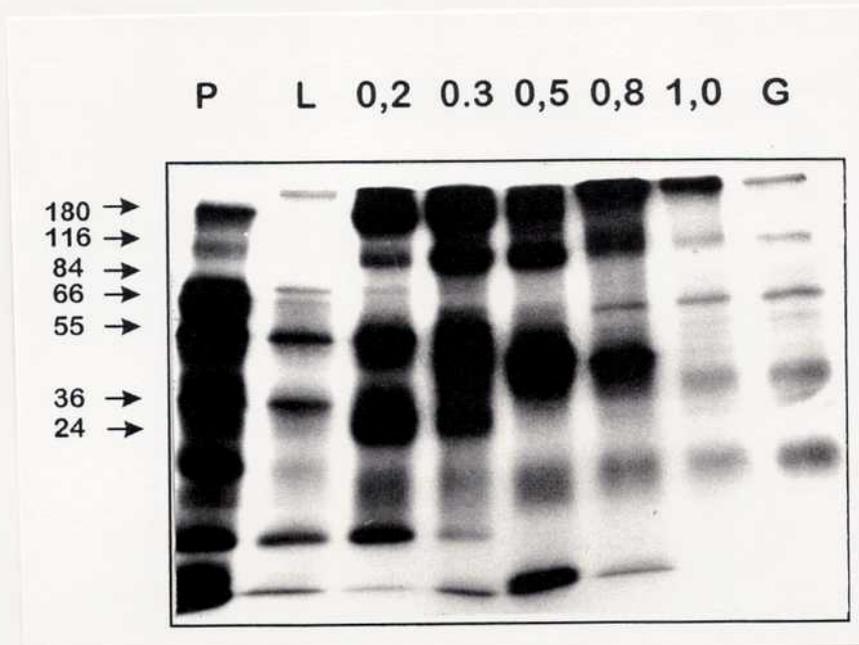


Figura 12. Autorradiografía mostrando las proteínas presentes en cada una de las fracciones de la columna de heparina. Las células fueron incubadas toda la noche en presencia de $150 \mu\text{Ci/ml}$ de $[^{35}\text{S}]$ metionina en medio libre de metionina en ausencia de suero. Los sobrenadantes de estos cultivos fueron aplicados a una columna de heparina, las fracciones obtenidas por elución con concentraciones crecientes de NaCl fueron procesadas como se indica en Materiales y Métodos. Las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 10 % que luego fue fluorografiado. P, percolado; L, lavado con PBS; carriles 0,2 a 1, concentración M de NaCl utilizada en la elución de la respectiva fracción; G, 100 mM glicina pH=3. Los números a la izquierda indican el PM y la posición de los marcadores de peso molecular correspondientes. $n=3$.

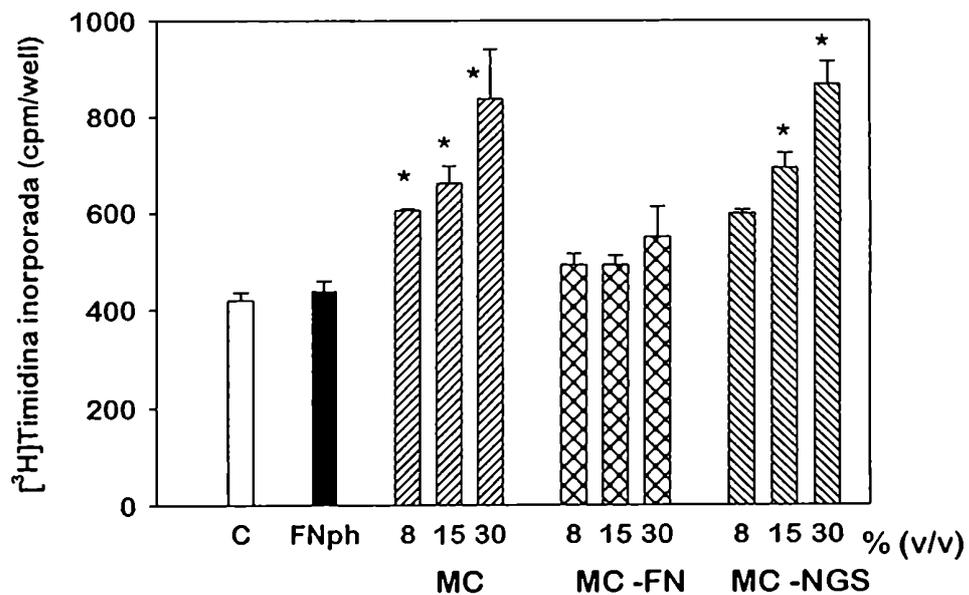


Figura 13. La fibronectina secretada por las células BGC-A4 está implicada en la acción mitogénica del MC. El MC de las células BGC-A4 fue preparado como se indica en Materiales y Métodos. Luego, éste fue sometido a un tratamiento con anticuerpos para lograr la depleción de la FN presente. Una alícuota del MC fue incubada con anticuerpos contra la FN plasmática (1/100), los cuales fueron posteriormente removidos del MC utilizando un segundo anticuerpo en una dilución tal que formaba una red precipitante, la cual fue separada por centrifugación (ver Materiales y Métodos). El sobrenadante (MC -FN) fue utilizado en experimentos de síntesis de ADN sobre células BGC-A4 según se explica en Materiales y Métodos y en la Figura 7. Como control se utilizó un MC que fue expuesto a suero de cabra no inmune (MC -NGS). En la Figura se muestra la incorporación de [³H]timidina basal (C), o estimulada con 30 µg/ml de FN plasmática humana (barra llena), con concentraciones crecientes de MC (MC), de MC depletado de FN (MC-FN) o MC depletado con suero control (MC-NGS). “*” indica diferencias significativas (p < 0.05) respecto del control sin MC, n=3.

por FN, o bien existen diferencias cualitativas entre la FN plasmática y la FN secretada por las células BGC-A4. Como se muestra más abajo, sección 4.5, los datos sugieren que esta última opción es la correcta.

2.3 Efecto del MC sobre cultivos primarios de rata

Las células de la granulosa bovina en cultivo presentan una limitada respuesta a FSH, tanto a nivel de proliferación como en su capacidad esteroidogénica. En cambio las células de rata son un excelente modelo para estudiar la modulación de la respuesta gonadotrófica. Por este motivo, resultó interesante estudiar el efecto del MC sobre células de la granulosa de rata. En nuestro laboratorio se ha caracterizado la respuesta de estos cultivos a FSH y su interacción con diversos agentes como el E2 y el TGF- β (11,17,18,56).

Si bien el MC posee leve pero significativo efecto mitogénico ensayado sólo, no fue capaz de modificar la estimulación promovida por TGF- β (Figura 14 A). Por otro lado el potente estímulo logrado por el tratamiento con 20 ng/ml de FSH y 2.5 ng/ml de TGF- β (11,26) (aproximadamente de 100 veces de estimulación sobre el control), fue bloqueado por el agregado de MC en una forma dependiente de la dosis (Figura 14 B).

Además, la respuesta sinérgica de FSH y E2 (20 ng/ml y 100 ng/ml, respectivamente), que promueve un aumento de aproximadamente 10 veces en la incorporación de timidina (16,18), también fue inhibida por el MC (Figura 15 A).

El MC parecía estar bloqueando la ruta de transducción de señales de la FSH. El primer paso en esta ruta consiste en la activación de la enzima adenilciclase vía una proteína G, con el consiguiente aumento de los niveles de AMPc. Por esto, se decidió analizar si el efecto inhibitorio se mantenía reemplazando el estímulo de la FSH por un análogo permeable del AMPc, el dibutil AMPc (Bt₂AMPc). Las células fueron tratadas con una combinación de 800 μ M Bt₂AMPc y 100 ng/ml de E2 en presencia o ausencia de 10 % (v/v) de MC. Se observó una inhibición de la síntesis de ADN provocada similar a la obtenida cuando se había utilizado FSH en vez de Bt₂AMPc (Figura 15 B). Este resultado sugería que los factores presentes en el MC que actúan sobre las células de la granulosa de rata bloquean el la estimulación gonadotrófica en un paso posterior a la síntesis de AMPc.

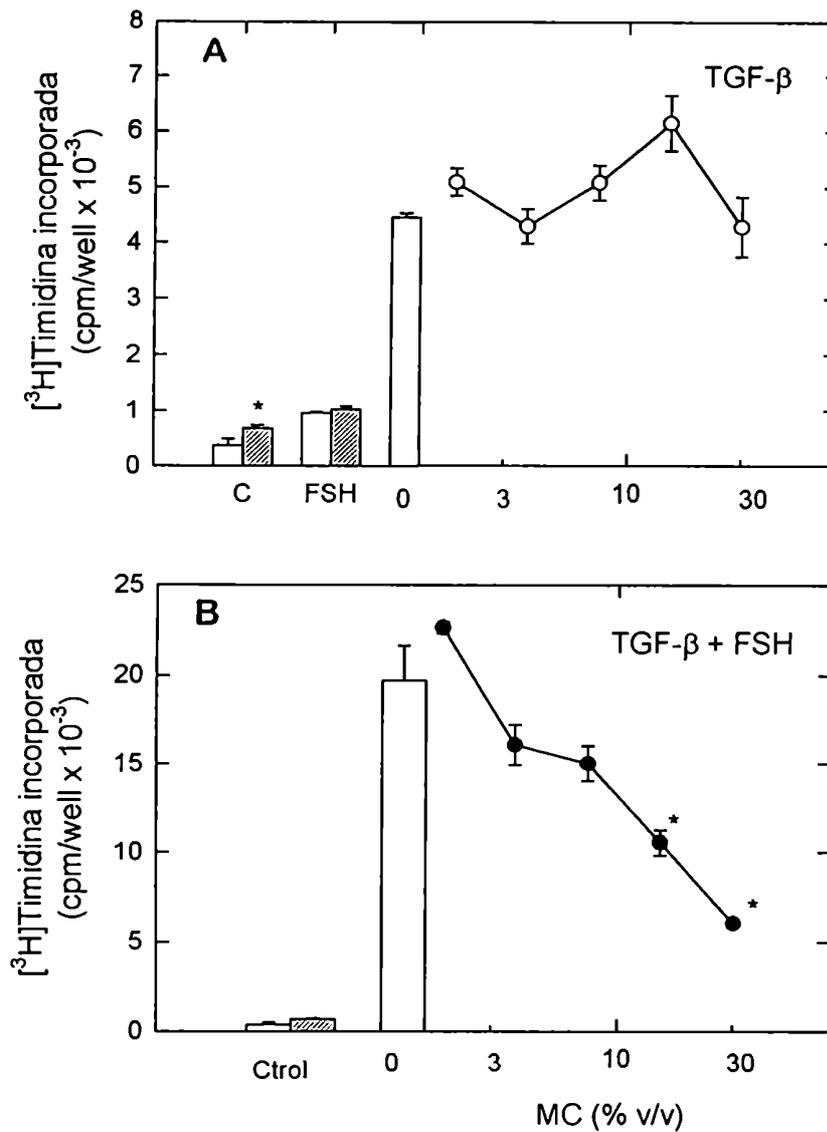


Figura 14. El MC de las células BGC-A4 es inhibitorio de la proliferación en cultivos primarios de células de la granulosa de rata tratados con FSH y TGF- β . Estos cultivos fueron realizados como se indica en la leyenda de la Figura 11 B. Los siguientes paneles indican la incorporación de [³H]timidina obtenida con los tratamientos que se detallan:

Panel A. Las células fueron cultivadas en ausencia (barras vacías) o presencia (barras llenas) de 30 % v/v de MC en ausencia de otros estímulos (C) o en presencia de 20 ng/ml de FSH (FSH). Además, se realizó una curva con concentraciones crecientes de MC (○) en presencia de 2,5 ng/ml de TGF- β . La barra vacía sobre el "0" corresponde a la respuesta obtenida por el sólo agregado de TGF- β .

Panel B. En un experimento similar al del panel A, las células fueron cultivadas en ausencia de todo estímulo (barras vacías en Ctrol), con el agregado de 30 % v/v de MC (barras rayadas en Ctrol). Además, se realizó una curva con concentraciones crecientes de MC (●) en presencia de FSH y TGF- β (20 ng/ml y 2,5 ng/ml, respectivamente). La barra vacía sobre el "0" corresponde a la respuesta obtenida por el sólo agregado de FSH + TGF- β .

"*" indica diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto del mismo tratamiento pero sin el agregado de MC, $n=3$.

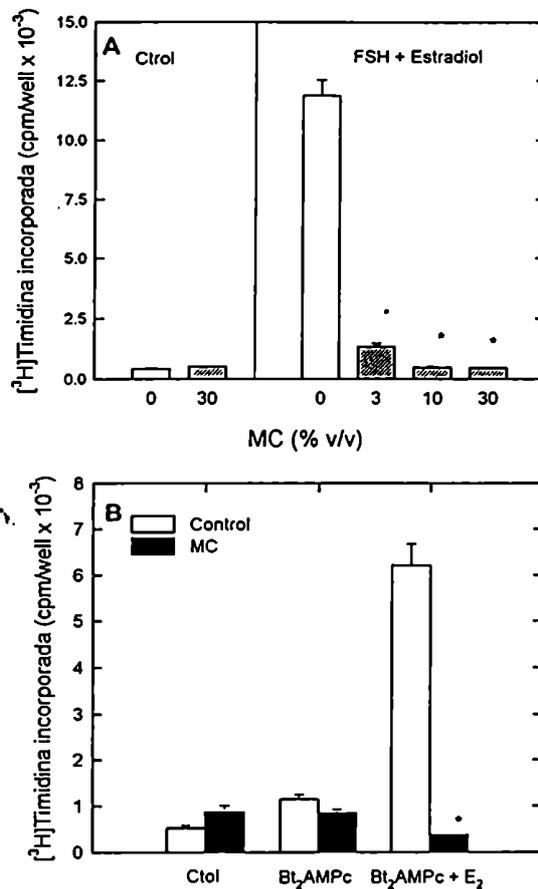


Figura 15. El MC de las células BGC-A4 es inhibitorio de la proliferación en cultivos primarios de células de la granulosa de rata tratados con FSH o dibutilil AMPc (Bt₂AMPc) en conjunto con estradiol. Los cultivos se realizaron con se indica en la leyenda de la Figura 11 B. Los siguientes paneles indican la incorporación de [³H]timidina obtenida con los tratamientos que se detallan:

Panel A. A la derecha se muestran los datos de cultivos que fueron incubados con una combinación de FSH y estradiol (20 ng/ml y 100 ng/ml, respectivamente) en ausencia (barra vacía) o presencia (barras rayadas) de concentraciones crecientes de MC. A la izquierda se muestran los controles: cultivos que fueron incubados solamente con medio de cultivo (barra vacía) o con 30 % v/v de MC (barra rayada).

Panel B. Los cultivos fueron cultivados en presencia (barras llenas) o ausencia (barras vacías) de 30 % v/v de MC, sin ningún otro agregado (Ctol), en presencia de 800 μM Bt₂AMPc (Bt₂AMPc) o con una combinación de Bt₂AMPc y estradiol (800 μM y 100 ng/ml, respectivamente).

“*” indica diferencias significativas (p < 0.05) respecto del mismo tratamiento pero sin el agregado de MC, n=3.

Las fracciones obtenidas por la columna de heparina (sección 2.2) también fueron ensayadas en este modelo experimental. Como estímulo se escogió la combinación de FSH y TGF- β , dado que es la evoca la máxima estimulación. Como puede observarse en la Figura 11 B, se obtuvieron 2 picos con actividad inhibitoria, uno que no presentó afinidad por heparina, y que por lo tanto apareció en el percolado de la columna y otro que eluye a 0,5 M NaCl.

3. EFECTO DEL FACTOR TRANSFORMANTE DE TIPO β (TGF- β) SOBRE CÉLULAS BGC-1

3.1 Síntesis de ADN

Experimentos de dosis respuesta (Figura 16 A) mostraron que el TGF- β fue incapaz de promover la síntesis de ADN cuando se lo ensayó en medio libre de suero. Sin embargo, TGF- β potenció significativamente la estimulación provocada por el factor de crecimiento epidermal (EGF). Este efecto fue dependiente de la dosis de TGF- β , mostrando una ED₅₀ de 200 pg/ml, siendo 1 ng/ml la mínima dosis requerida para lograr un efecto máximo.

Para determinar si la interacción entre el TGF- β y el EGF era específica de este factor de crecimiento o si por el contrario, el TGF- β proveía de una señal que podía amplificar el efecto de otros mitógenos, se lo ensayó en combinación con otros factores. Como se muestra en la Figura 16 B, no se observó interacción alguna entre el TGF- β y el IGF-I, o el PDGF-AA.

La interacción de las células con la matriz extracelular a través de la activación de determinadas integrinas desencadena señales intracelulares que interactúan con las rutas de señalización de varios factores de crecimiento (24). Por este motivo, se determinó si la interacción sinérgica del TGF- β y el EGF dependía del sustrato al que las células BGC-1 se adherían. En la Figura 16 C se puede observar que cuando las células se siembran directamente sobre plástico el TGF- β provoca un efecto menor sobre la respuesta a EGF. Esto indica que se requieren ciertas señales provistas por la matriz de colágeno para que la interacción entre estos 2 factores.

3.2 Regulación de la expresión de fibronectina

3.2.1 Secreción de FN

Para estudiar el efecto del TGF- β sobre la secreción de FN, se colectó el MC de células BGC-1 incubadas en presencia o ausencia de 5 ng/ml de TGF- β durante diferentes intervalos de tiempo. La secreción de FN fue evaluada en estas muestras por Western blot. La Figura 17

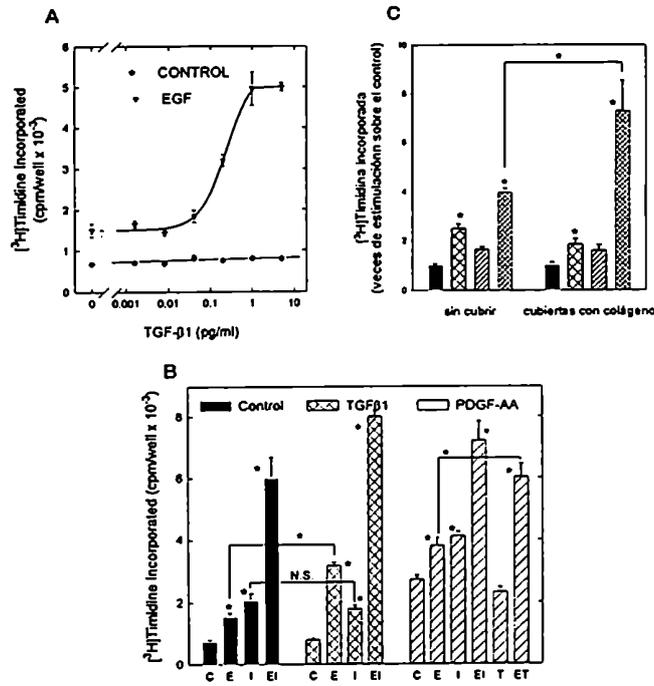


Figura 16. El TGF-β ejerce un efecto sinérgico en combinación con el EGF sobre la síntesis de ADN en células BGC-1. Las células BGC-1 fueron cultivadas como se indica en la leyenda de la Figura 7. Los siguientes paneles muestran los resultados de incorporación de $[^3\text{H}]$ timidina obtenida con los tratamientos que se detallan:

Panel A. Las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de TGF-β en ausencia (●) o presencia (▲) de 10 ng/ml de EGF. La ED₅₀ para el efecto sinérgico del TGF-β fue de 200 pg/ml y la mínima dosis que evocó el máximo efecto fue de 1 ng/ml.

Panel B. Las células fueron estimuladas con distintas combinaciones de factores de crecimiento. C, control; E, 10 ng/ml de EGF; I, 100 ng/ml de IGF-I; EI, EGF + IGF-I; T, 5 ng/ml de TGF-β; ET, EGF + TGF-β. "Control" (■), sólo se agregó lo que se indica debajo de cada barra; "TGF-β₁" (⊠), además de lo indicado debajo de cada barra, se adicionaron 5 ng/ml de TGF-β; "PDGF-AA" (⊡), además de lo indicado debajo de cada barra, se adicionaron 10 ng/ml de PDGF-AA.

Panel C. Las células fueron incubadas en ausencia (■) o presencia de 10 ng/ml de EGF (⊠), 5 ng/ml de TGF-β (⊡) o una combinación de ambos (⊞). A la derecha se muestran los resultados obtenidos luego de sembrar las células directamente sobre el plástico y la izquierda se puede comparar con lo obtenido cuando las placas fueron precubiertas con colágeno. Dado que los basales eran significativamente diferentes entre sí, y para facilitar la interpretación de los resultados, en este caso los datos se expresan como veces de estimulación por sobre el control respectivo.

"N.S." indica que no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos unidos por líneas. "*" indica diferencias significativas ($p < 0.05$). Cuando "*" está directamente sobre una barra, dicho tratamiento se compara con el control del grupo, cuando "*" está sobre una línea, se comparan los tratamientos unidos por ella, $n=3$.

muestra un experimento representativo en donde se puede ver que el TGF- β aumenta la cantidad de FN acumulada en el medio de cultivo. Este efecto es evidente a partir de las 48 horas de cultivo. Aunque las mayores diferencias se observaron a los 3 días de cultivo, los cultivos controles a este tiempo mostraban ciertos signos de viabilidad disminuída. Por tal motivo, para los siguientes experimentos se decidió utilizar un tratamiento de 2 días.

Cuando las células BGC-1 son expuestas a TGF- β por un largo período de tiempo, los Western blots para FN muestran una banda extra que presenta un PM aparente de 190 kDa (Figura 17, carriles 5 y 6). Esta banda no es observada en los cultivos controles aún cuando se siembra un gran exceso de proteína (datos no mostrados). Esto sugiere que la FN sufre un procesamiento proteolítico en los cultivos tratados con TGF- β .

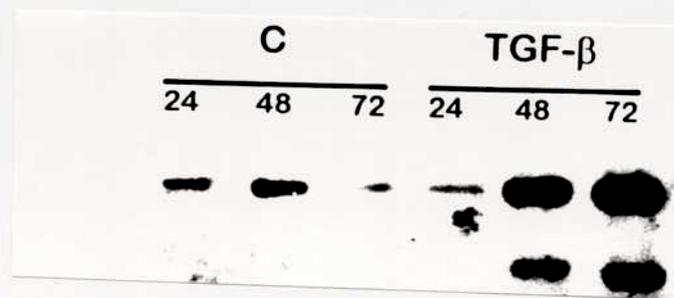


Figura 17. El TGF- β estimula la secreción de fibronectina en las células BGC-1.

Western blot fue revelado con anticuerpos contra FN plasmática de MCs obtenidos de células incubadas en ausencia (Control) o presencia (TGF- β) de 5 ng/ml de TGF- β por 24, 48 y 72 horas. La banda superior corresponde a una molécula de PM aparente de 220 kDa, mientras que la banda inferior, sólo presente en los cultivos tratados con TGF- β , presenta un PM de 190 kDa.

4. PAPEL DE LA VARIANTE ED-I⁺ DE FIBRONECTINA EN LE DESARROLLO FOLICULAR

4.1 Expresión de FN-ED-I⁺ en el fluido folicular

Para determinar si el crecimiento del folículo estaba de alguna manera asociado con cambios en la expresión de la variante ED-I⁺ de FN, se midieron las concentraciones de FN total y de FN-ED-I⁺ en el fluido folicular de folículos en distintas fases de desarrollo. En un análisis inicial los folículos fueron clasificados en 2 categorías, mayores y menores a 8 mm de diámetro. La figura 18 muestra los resultados obtenidos en un Western blot realizado con 17 muestras de fluido folicular utilizando el anticuerpo policlonal anti-FN_p, que detecta todas las formas de FN (Figura 18 panel superior), y el anticuerpo monoclonal anti-FN_e, que sólo reacciona con el dominio ED-I (Figura 18, panel inferior). Dado que FN-ED-I⁺ se expresa en bajos niveles en tejidos adultos, fue sorprendente el hecho de que no sólo 16 de las 17 muestras resultaran positivas para ED-I⁺ sino que era evidente que existían importantes cambios tanto en la concentración como en la proporción relativa de FN-ED-I⁺ respecto de la FN total. Las muestras 1 a 4, que corresponden a los folículos pequeños, mostraron las concentraciones más altas de FN-ED-I⁺.

4.2 Concentración de FN-ED-I⁺ y el estado fisiológico del folículo

Para contar con un parámetro que indicara en qué estadio de desarrollo se encontraba cada uno de los folículos analizados, se determinó la concentración de estradiol y de progesterona. Con estos datos se estableció que los niveles de estradiol presentaban una correlación inversa significativa tanto con la concentración de FN-ED-I⁺ (Figura 19 B, $r = -0.787$ $p < 0.002$), como con el cociente FN-ED-I⁺/FN total, una medida del “splicing” alternativo (Figura 19 A, $r = -0.697$ $p < 0.01$). No se observó correlación significativa entre estradiol y el nivel de FN total (Figura 19 C). Por otro lado, la FN total, la FN-ED-I⁺ o el cociente FN-ED-I⁺/FN total no mostraron correlación con la concentración de progesterona o el tamaño del folículo (Figura 20).

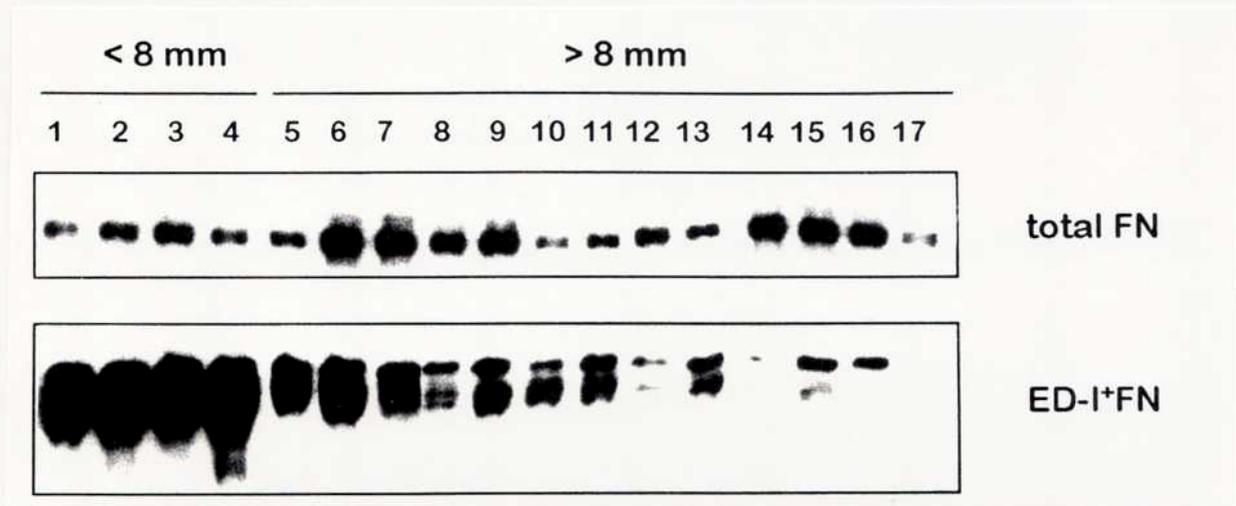


Figura 18. Expresión de la variante ED-I de fibronectina (FN-ED-I⁺) en el fluido folicular. Western blot de FN total (panel superior) y FN-ED-I⁺ (panel inferior) purificada de un grupo de folículos de 2 a 5 mm de diámetro (carriles 1 y 2, 20 folículos cada uno), de folículos de 5 a 8 mm (carriles 3 y 4, 10 folículos cada uno) o de folículos individuales mayores a 8 mm en diámetro (carriles 5 a 17). La FN-ED-I⁺ fue detectada en todas las muestras con excepción de la muestra 17.

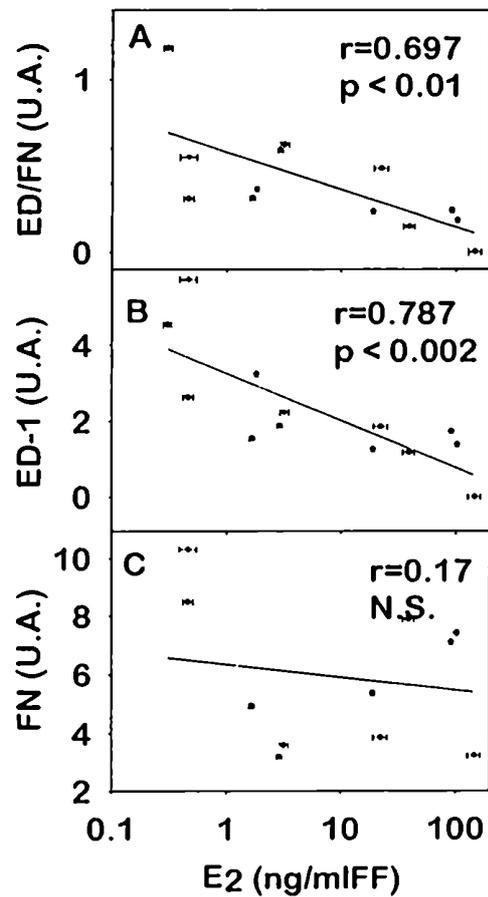


Figura 19. Correlación entre FN-ED-I*, FN-ED-I*/FN total o FN total y la concentración de estradiol en el fluido folicular.

Los niveles de FN-ED-I* y de FN total de los folículos individuales mayores a 8 mm en diámetro total fueron cuantificados y correlacionadas con la concentración de estradiol en cada muestra. Tanto la FN-ED-I* (panel B) y el cociente FN-ED-I*/FN total (panel A), pero no los niveles de FN total (panel C) correlacionaron significativamente con la concentración de estradiol ($r = -0,787$ $p < 0,002$, $r = -0,697$ $p < 0,01$ y $r = -0,17$ N.S., respectivamente).

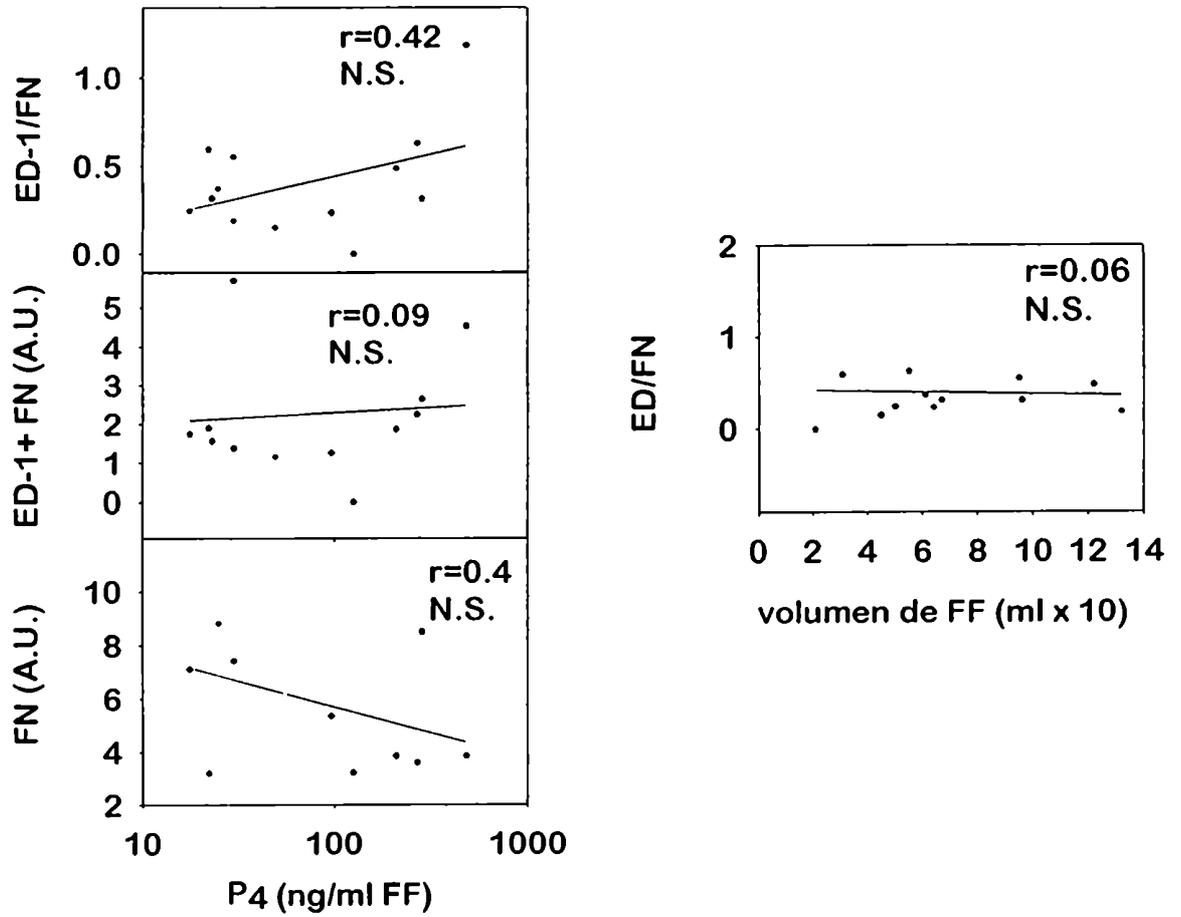


Figura 20. Correlación entre FN-ED-I*, FN-ED-I*/FN total o FN total y la concentración de progesterona en el fluido folicular.

Los niveles de FN-ED-I* y de FN total de los folículos individuales mayores a 8 mm en diámetro total fueron cuantificados y correlacionadas con la concentración de progesterona y con el volumen de fluido folicular en cada muestra. En ningún caso se observó correlación significativa.

4.3 Regulación del “splicing” alternativo de la fibronectina en cultivos primarios de células de la granulosa bovina

Los resultados presentados en la Figura 18 indican que existen cambios marcados en la concentración de FN-ED-I⁺ durante el desarrollo folicular que probablemente resultan de cambios en el “splicing” alternativo del ARNm de FN. Por esto, el siguiente objetivo fue identificar los factores hormonales o intraováricos capaces de regular este proceso. Para esto se utilizaron cultivos primarios de células de la granulosa bovina. La observación de una fuerte correlación negativa entre las concentraciones de FN-ED-I⁺ y estradiol sugería que este esteroide podría actuar directamente sobre este proceso. La FSH, actuando a través del AMPc, es el factor regulatorio principal para el desarrollo folicular y se ha demostrado que modula la expresión de FN en células de la granulosa (14). Por otro lado, el TGF- β , que es sintetizado en el ovario (75), afecta el “splicing” del ARNm de FN en ciertas líneas celulares, estimulando la inclusión del exón ED-I (53). Por lo tanto, los cultivos celulares fueron estimulados por 2 días con 1 mM dibutilil AMPc o con 5 ng/ml de TGF- β , en presencia o ausencia de 100 ng/ml de estradiol. Se determinó los niveles de FN-ED-I⁺ en los extractos celulares por Western blot y los resultados se muestran en la Figura 21. Mientras que el AMPc produjo una reducción del 50 % en la síntesis total de FN y una disminución de 20 veces en la expresión de la variante ED-I⁺ (Figura 21, calle 1 vs. 2), el TGF- β provocó un aumento de 2 y 4 veces en la síntesis de FN total y FN-ED-I⁺, respectivamente (Figura 21, calle 1 vs. 3). El tratamiento con estradiol no alteró ni la síntesis total de FN ni la de FN-ED-I⁺ (Figura 21, calles 1, 2 y 3 vs. 4, 5 y 6, respectivamente).

4.4 Regulación del “splicing” alternativo en células BGC-1

La máxima concentración de FN-ED-I⁺ fue observada en los folículos pequeños, que contienen células de la granulosa comparativamente menos diferenciadas. Cuando se cultivan en monocapa, las células de la granulosa se diferencian espontáneamente a células luteales (57). Por esta razón, los cultivos primarios podrían ser inadecuados para el estudio de los estadios más iniciales del desarrollo folicular. Por este motivo, se eligió continuar los experimentos utilizando una línea de células de la granulosa bovina, BGC-1, que constituye un modelo de células de la granulosa inmaduras (60).

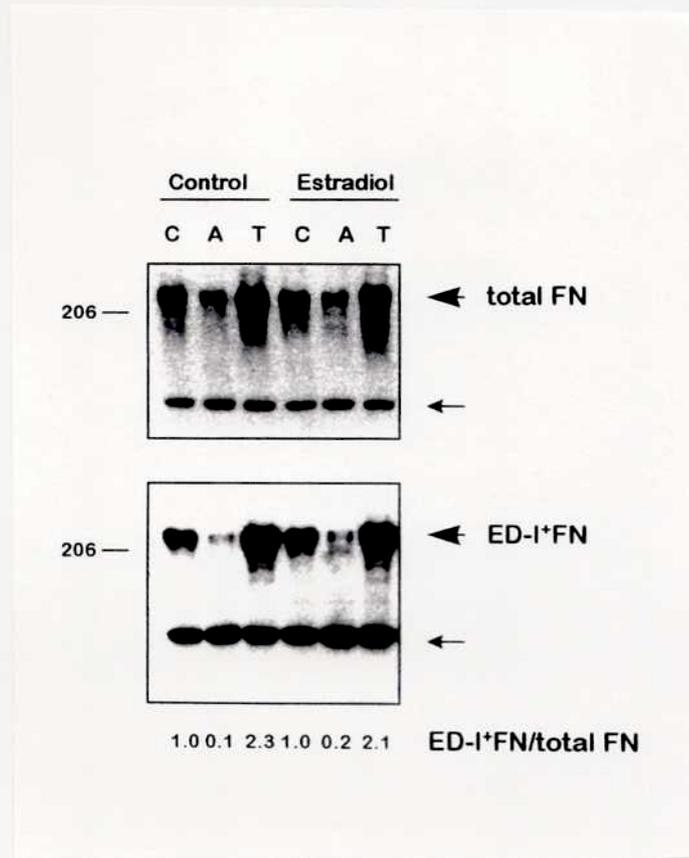


Figura 21. Regulación de la expresión de FN y de FN-ED-I⁺ en cultivos primarios de células de la granulosa bovina. Western blot de FN total (panel superior) y de FN-ED-I⁺ (panel inferior) presente en extractos celulares obtenidos de cultivos primarios de células de la granulosa, mostrando que mientras que el TGF- β incrementa y el AMPc disminuye la inclusión del dominio ED-I en la molécula de FN, el estradiol no tuvo un efecto significativo.

Cultivos confluentes fueron tratados por 48 horas con 1 mM Bt₂AMPc (A) o 5 ng/ml de TGF- β (T), en presencia (estradiol) o ausencia (control) de 100 ng/ml de estradiol. Las células controles no recibieron ningún estímulo. Las flechas grandes indican la posición de las FNs. Las flechas pequeñas, muestran un polipéptido no relacionado, que reacciona con la Extravidina. Los números a la derecha indican la posición del marcador de peso molecular de 206 kDa. Los números que se muestran abajo del panel inferior corresponden a los cocientes entre FN-ED-I⁺ y FN total (los valores fueron normalizados respecto del cultivo control en ausencia de estradiol). n=3.

Si el TGF- β actúa como un regulador local del “splicing” alternativo del ARNm de FN en este estadio de desarrollo folicular, su efecto debería ser evidente en las células BGC-1. De esta manera, los cultivos de células BGC-1 fueron estimulados con 5 ng/ml de TGF- β por 2 días. Al final de este período, se determinó la presencia de ARNm de FN y de FN-ED-I⁺ por Northern blot. Estos experimentos demostraron que el TGF- β incrementa 3 veces la cantidad de ARNm para FN y que incrementa 6 veces los ARNm de FN que contienen al exón ED-I (Figura 22, b). Como control, se determinó el efecto del TGF- β sobre la secreción de FN (Figura 22 a). Este factor de crecimiento incrementó en 100 % la relación FN-ED-I⁺/FN total.

4.5 El dominio ED-I de fibronectina estimula la proliferación de células de la granulosa

Uno de los rasgos fundamentales de las células de la granulosa de pequeños folículos antrales es su alta tasa de proliferación. El hecho de que estos folículos presenten una alta concentración de FN-ED-I⁺ sugiere que esta molécula podría jugar algún papel en la regulación del crecimiento celular. Para estudiar una posible función de la variante ED-I⁺ de FN como un regulador de la proliferación, se realizaron experimentos para evaluar el efecto sobre la síntesis de ADN de un péptido recombinante codificando la región ED-I humana (ED-Irr). La Figura 23 A muestra que el agregado de ED-Irr al medio de cultivo estimula la incorporación de timidina-[³H] al ADN de cultivos de células BGC-1 en una forma dependiente de la dosis. Ni el agregado del péptido recombinante control, 11-12rr, ni de FN plasmática humana (FNph), que carece del dominio ED-I, tuvieron efecto alguno (Figura 23 A).

Estos resultados son consistentes con la evidencia presentada en la Figura 14 de la sección 2.2, en donde se demuestra que la eliminación de la FN presente en el MC de células BGC-1 suprime la actividad mitogénica del mismo. Esta actividad no se recupera con el agregado exógeno de FNp, lo que indicaría que es la FN-ED-I⁺ presente en el MC la responsable de la acción mitogénica.

Este efecto parece ser específico del tipo celular, ya que otros tipos celulares no mostraron sensibilidad al tratamiento con ED-Irr. De hecho, 1 μ M de ED-Irr no estimuló la síntesis de ADN ni en fibroblastos Swiss 3T3 ni en las células epiteliales CCL-64 (datos no mostrados y Figura 23 B, respectivamente).

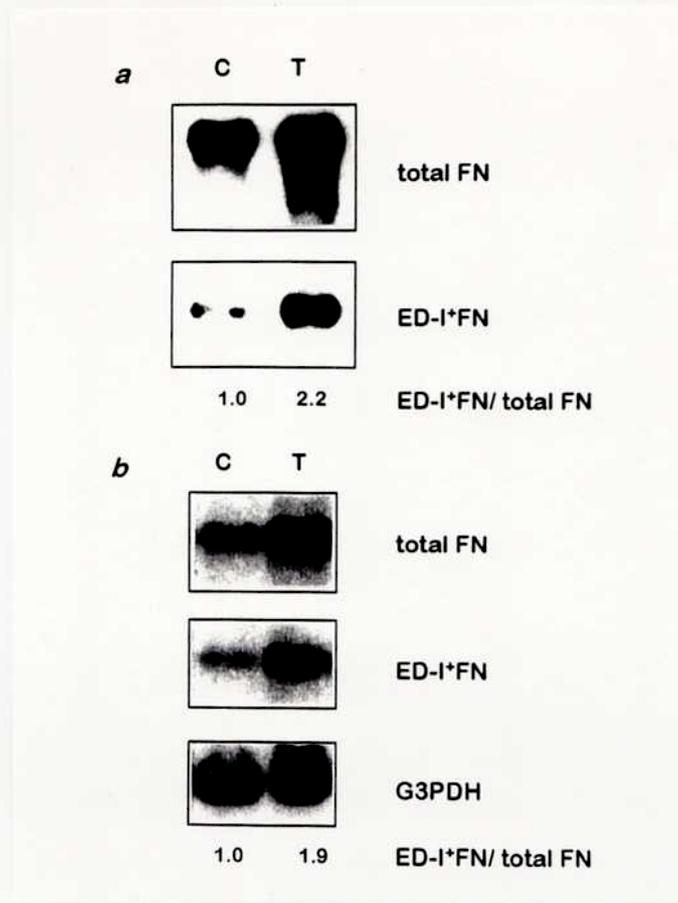


Figura 22. Regulación de la expresión de FN y de FN-ED-I⁺ en la línea de células de la granulosa BGC-1. El TGF- β modula el "splicing" alternativo del ARNm de FN, aumentando la inclusión del exón ED-I (panel b), efecto que es evidente también a nivel proteico (panel a).

Panel a. Western blot de FN total (panel superior) y de FN-ED-I⁺ (panel inferior) de MCs de células BGC-1. Cultivos confluentes fueron tratados por 48 horas en ausencia (C) o presencia (T) de 5 ng/ml de TGF- β . Los sobrenadantes fueron colectados y sometidos a electroforesis en un gel de 6 % de poliacrilamida en condiciones reductoras. La FN total y la FN-ED-I⁺ fueron detectadas utilizando los anticuerpos contra FNph y contra ED-I, respectivamente.

Panel b. Northern blot de ARNm de FN total (panel superior), FN-ED-I⁺ (panel central) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH, panel inferior) extraído de células BGC-1. Cultivos confluentes fueron tratados por 48 horas en ausencia (C) o presencia (T) de 5 ng/ml de TGF- β . El ARN fue extraído y las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de 1 % de agarosa en condiciones desnaturalizantes.

Los números abajo de los paneles a y b corresponden a los cocientes FN-ED-I⁺ y FN total (los valores fueron normalizados con respecto a los cultivos controles)

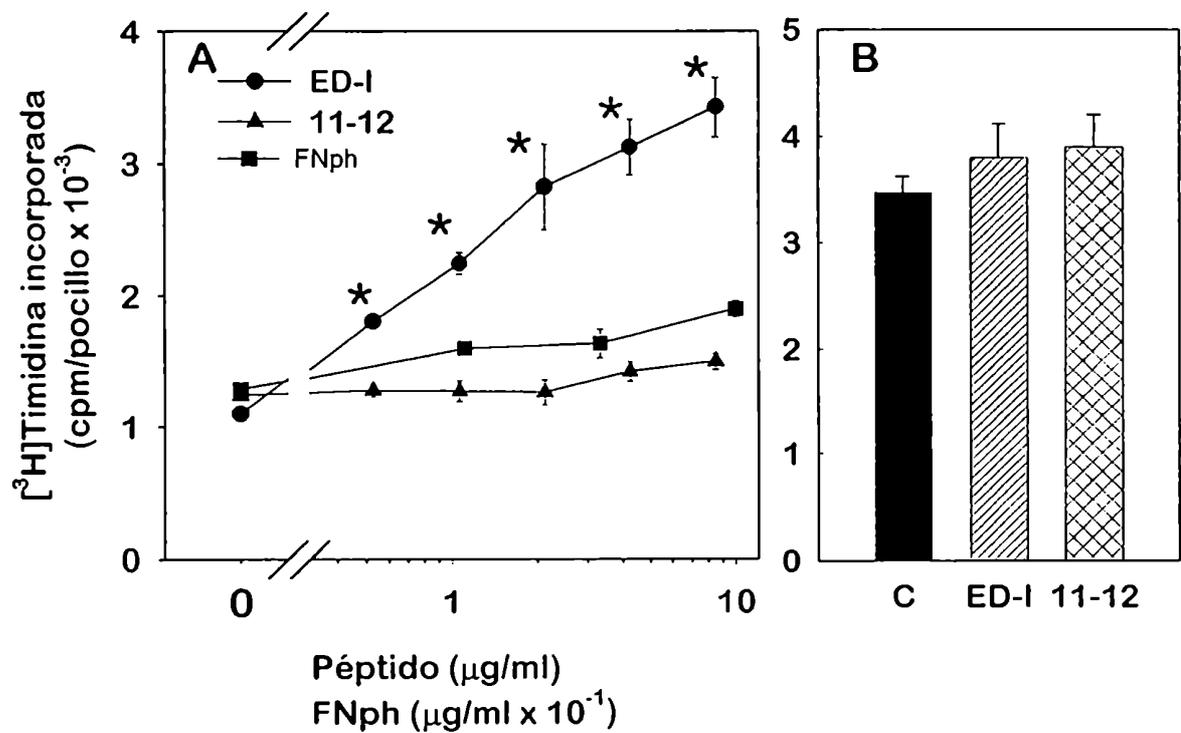


Figura 23. Regulación de la síntesis de ADN por el péptido ED-Irr.

Panel a. El péptido recombinante ED-Irr estimula la síntesis de ADN en células BGC-1. Las células BGC-1 fueron estimuladas como se indica en la Figura 7. Los cultivos fueron incubados con concentraciones crecientes de ED-Irr (●), 11-12r (▲) o FNph (■). n=3.

Panel b. El péptido ED-Irr no estimula la síntesis de ADN en las células de pulmón de vizón CCL-64. Las células CCL-64 fueron sembradas en placas de 96 pocillos en medio DMEM suplementado con 0,2% de suero fetal bovino. Dos horas más tarde, se les agregó 10 µg/ml de ED-Irr (ED-I) o 20 µg/ml de 11-12r. Veintidós horas más tarde, la [³H]timidina (concentración final = 10 µCi/ml) fue agregada y las células fueron cosechadas 2 horas más tarde. La radioactividad incorporada al ADN fue determinada en un contador de centelleo líquido. n=3.

“*” indica diferencias significativas (p < 0.05) respecto del control sin péptido, n=3.

4.6 El dominio ED-I de FN bloquea la adhesión de las células de la granulosa al sustrato

Para investigar si la variante ED-1⁺ de FN modula la adhesión celular a la MEC de una forma diferente a la FN plasmática, se sembraron células BGC-1 en placas de cultivo de plástico previamente cubiertas con diferentes combinaciones de moléculas. En cultivos de 5 días sobre estas matrices, las células plaqueadas sobre ED-Irr sólo (Figura 24 H) o sobre una combinación de ED-Irr y FNph (Figura 24 F) aparecían despegadas y flotando.

Las células plaqueadas sobre colágeno mostraban una organización ahusada (Figura 24 A), la cual estaba completamente ausente en las células sembradas sobre una combinación de colágeno y ED-Irr (Figura 24 B). De hecho, en estos cultivos la mayoría de las células estaban flotando. El péptido control 11-12rr no ejerció un efecto evidente tanto cuando se lo ensayó sólo (Figura 24 I) como cuando se lo combinó con colágeno (Figura 24 C) o con FNph (Figura 24 F).

En contraste con los datos obtenidos en cultivos de 5 días, cuando se observaron los cultivos luego de 3 horas de sembrados sobre distintas matrices, el péptido ED-Irr no mostró ningún efecto cuando se lo ensayó combinado con colágeno (no se muestra). A este tiempo las células sembradas sobre FNph o directamente sobre plástico exhibían una adhesión marcada (Figura 25 A y D). sin embargo, ED-Irr bloqueó completamente la adhesión de las células BGC-I (Figura 25 E). La combinación de ED-Irr y FNph resultó en un efecto intermedio: mientras que las células se adhirieron al sustrato, el “spreading” aparecía reducido (Figura 25 B). Aunque el péptido control 11-12rr no interfirió con la adhesión celular, sí alteró la morfología de las células con respecto a las células sembradas sobre plástico (compara la Figura 25 D con la F).

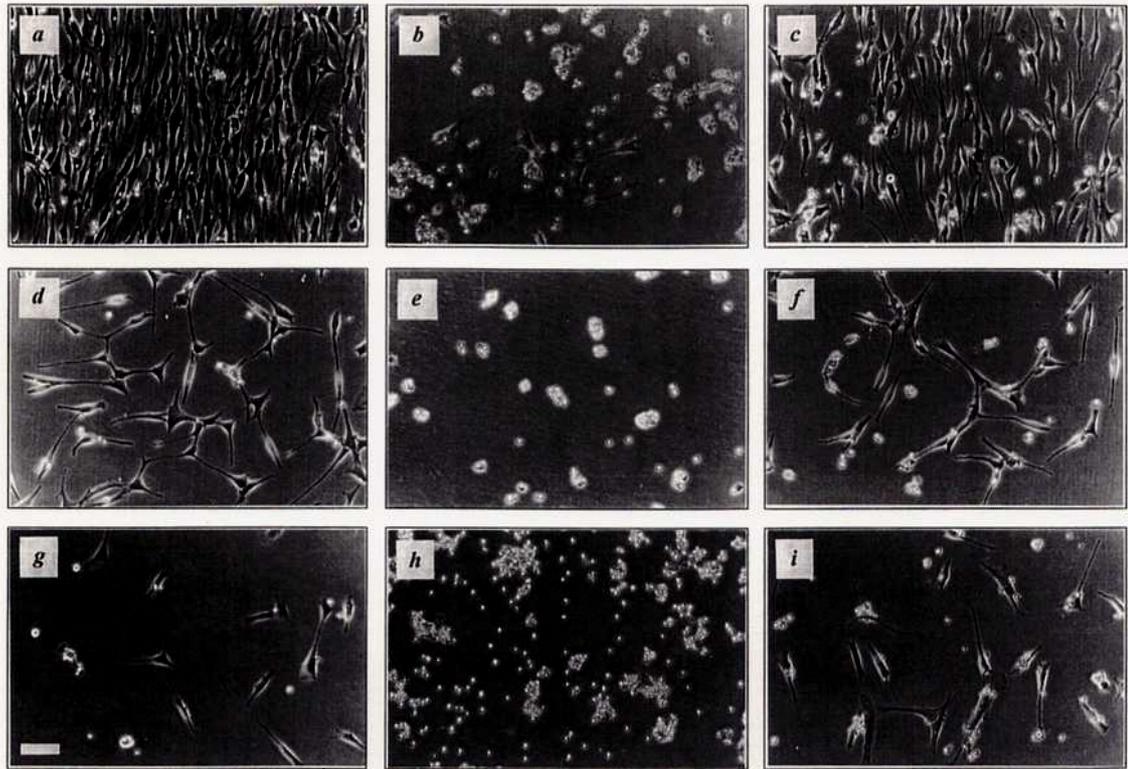


Figura 24. Regulación de la adhesión celular por ED-Irr en cultivos a largo plazo de células BGC-1. Placas de 24 celdas fueron cubiertas con ED-Irr (B,E y H) o con 11-12rr (C,F e I) sólo (H e I) o en combinación con colágeno de tipo I (B y C) o con FNph (E y F). Además, algunos pocillos se dejaron sin cubrir (G) o fueron cubiertos sólo con colágeno (A) o con FNph (D). Las células BGC-1 fueron sembradas a una densidad de 2×10^4 células/celda en medio de cultivo sin suero y luego se mantuvieron en cultivo por espacio de días.

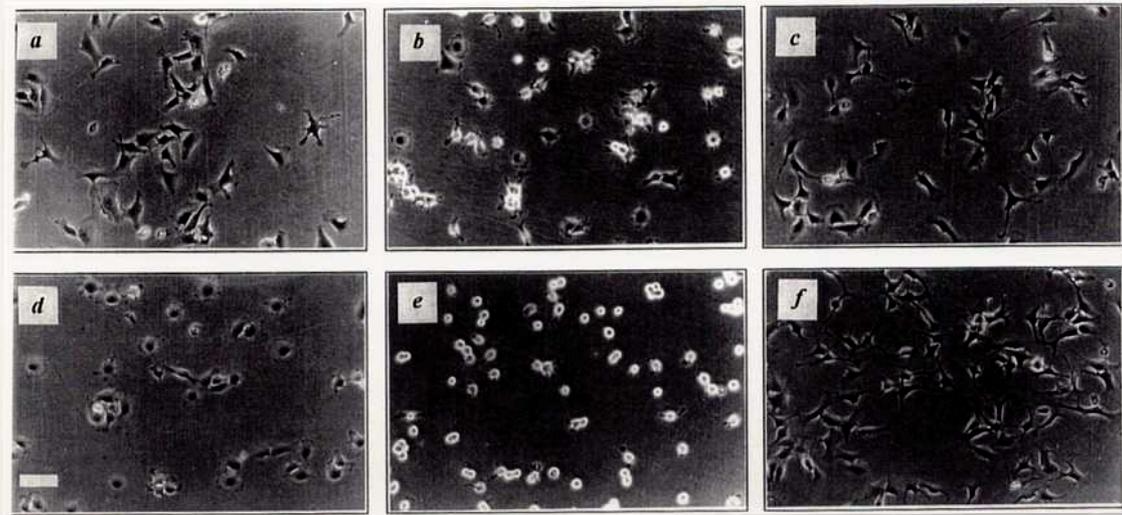


Figura 25. Regulación de la adhesión celular por ED-Irr en cultivos cortos.

Placas de 24 celdas fueron cubiertas con ED-Irr (B y E) o 11-12rr (E y F), sólo (E y F) o en combinación con FNph (B y C). Además, algunos pocillos se dejaron sin cubrir (D) o fueron cubiertos sólo con FNph (A). Las células BGC-1 fueron sembradas a una densidad de 2×10^4 células/celda en medio de cultivo sin suero y luego se mantuvieron en cultivo por 3 horas. Pasado este tiempo, se tomaron micrografías de contraste de fase en un microscopio invertido. Los patrones internos representan $80 \mu\text{m}$.

DISCUSIÓN

Las células BGC-1 y los cultivos primarios

Las células BGC-1 constituyen la primera línea de células de la granulosa bovina (14). A diferencia de otras líneas reportadas (4,58,83), con la excepción de la desarrollada por Chapekar y Malik (20), la línea BGC-1 fue obtenida por inmortalización espontánea sin la ayuda de la transformación viral o de la transfección de oncogenes. Las líneas de células de la granulosa de rata han sido utilizadas con éxito como modelo para el estudio de la regulación de la esteroidogénesis (49,83,110). Sin embargo, estas líneas no son adecuadas para el estudio del crecimiento de las células de la granulosa, dado que su proliferación ha sido afectada substancialmente por la inmortalización inducida por virus u oncogenes.

Las células BGC-1 se asemejan bastante a los cultivos primarios, células de las cuales derivan. Dos características apoyan esta afirmación: el perfil de proteínas secretadas y el metabolismo de esteroides. La proteínas secretadas por un determinado tipo celular son una medida cualitativa de una gran variedad de funciones celulares y ha sido utilizado previamente como marcador funcional en las células de la granulosa (104). En nuestro caso en particular, una comparación entre los perfiles secretorios de ambos tipos celulares mostró que si bien existen importantes diferencias en la abundancia relativa de algunas proteínas, sólo se observan menores diferencias cualitativas (Figura 3). Esto es particularmente evidente en el caso de la FN, donde se puede observar que si bien ambos tipos celulares secretan FN, las células BGC-1 lo hacen en mayor cantidad. Esto es consistente con el hecho de que esta línea fue originalmente seleccionada debido a su habilidad de sintetizar esta proteína de matriz extracelular (14).

La biosíntesis de esteroides es un parámetro funcional central para las células de la granulosa. En el momento en que la línea fue establecida, era posible estimular la síntesis de estradiol en respuesta a estímulos que elevaran los niveles intracelulares de AMPc (14). Esta característica se perdió con los pasajes sucesivos, en donde sólo se ensayó la producción de FN. Como el cultivo original de BGC-1 era algo heterogéneo, es posible que la actividad de aromatasas se expresara en sólo una subpoblación celular con menor tasa proliferativa.

Es interesante notar que en nuestros cultivos primarios de células de la granulosa bovinas, la aromatasas se pierde dentro de los tres primeros días de cultivo. Esta rápida caída en la actividad de la aromatasas en cultivos primarios bovinos ya había sido reportada por Skinner y Osteen (104) quienes mostraron que sólo es posible medir esta actividad en el primer día de cultivo.

Otros autores, sin embargo, han podido mantener por más tiempo la síntesis de estradiol en cultivo, mediante una estimulación continua con bajas dosis de FSH e insulina (93,107) o reduciendo la concentración de oxígeno (87).

Aunque no fue posible detectar biosíntesis de progesterona en las células BGC-1, la presencia de actividad 3β HSD que se muestra en la Figura 4 y el patrón virtualmente idéntico observado en los ensayos de metabolismo de esteroides (Figura 5) entre los cultivos primarios y las células BGC-1, confirman que la línea celular mantiene la expresión de la mayoría de las actividades enzimáticas presentes en las células parentales (3β HSD, 20α HSD y 5α -reductasa). Sin embargo, las células BGC-1 parecen haber perdido la actividad de la enzima P_{450} que escinde la cadena lateral del colesterol (P_{450sc}).

La actividad 5α -reductasa juega un papel clave en la activación de los andrógenos (90). Sin embargo, el papel fisiológico de la 5α -reducción de otros esteroides no es claro. A este respecto, se ha demostrado que algunos pregnanos 5α reducidos son capaces de producir una rápida modulación de la excitabilidad neuronal mediante una interacción de tipo alostérica con el receptor para el neurotransmisor ácido γ -amino butírico ($GABA_A$) (96).

Sólo una de las dos isoenzimas de la 5α -reductasa parece estar presente en el ovario. Los sustratos más habituales de esta enzima son la progesterona y la testosterona. Se sabe que los compuestos 5α -reducidos derivados de la progesterona presentan reducida actividad progestágena. Además, la testosterona es sustrato de la aromatasas, mientras que la DHT (la testosterona 5α -reducida) no. Por esto, altos niveles de 5α -reductasa en el ovario generalmente se asocian a un estado de menor diferenciación folicular. Por esto, no sorprendió cuando hace algunos años se demostró que esta enzima es inhibida por FSH en células de la granulosa de rata (79). Esto sugiere que la inhibición de la actividad 5α -reductasa por gonadotrofinas es parte de la transición que ocurre durante el desarrollo folicular. La inhibición de la 5α -reductasa, de esta forma, contribuye al aumento en la producción de progesterona provocado por la estimulación con FSH. Aunque no se han llevado a cabo estudios similares en bovinos, altos niveles de 5α -reductasa en las células BGC-1, hacen pensar en un patrón de metabolismo esteroideogénico asociado a células de la granulosa de folículos inmaduros.

Ya hemos demostrado previamente que las células BGC-1 presentan una respuesta a factores de crecimiento similar a los cultivos primarios. Al igual que éstos (39,95), las células BGC-1, proliferan en presencia de EGF e IGF-I (60). Sin embargo, la más sorprendente diferencia respecto de los cultivos primarios, es la respuesta a TGF- β . Mientras que el TGF- β inhibe la estimulación de la síntesis de ADN evocada por EGF en los cultivos primarios (60,103), estimula sinérgicamente con el EGF la proliferación en las células BGC-1 (Figura 16A). Estos datos sugieren que el proceso de inmortalización de las células BGC-1 puede estar asociado a un cambio (de inhibitorio a estimulador) en la respuesta a TGF- β . Un fenómeno similar de “escape” de una regulación negativa se ha observado en fibroblastos de ratón luego de la crisis de inmortalización (105) y durante la inducción de la carcinogénesis colorectal (42). Los mecanismos responsables de este cambio en la acción regulatoria del TGF- β no han sido aclarados.

Por otro lado, Win et al. (119) han propuesto que los efectos estimuladores del TGF- β podrían estar mediados por la producción local de PDGF. Esta posibilidad no parece ser aplicable a nuestros resultados, ya que el PDGF no es capaz de amplificar la respuesta al EGF en las células BGC-1. También es posible que las diferencias observadas entre cultivos primarios y BGC-1 se deban a factores adicionales liberados por las células en cultivo. Schomberg y colaboradores han demostrado que en cultivos primarios de células de la granulosa porcina, el TGF- β puede pasar de ser estimulador a inhibitorio dependiendo de la concentración de suero derivado de plasma pobre en plaquetas (66).

Basados en el bajo potencial esteroideogénico, la alta actividad 5 α -reductasa, el perfil secretorio y la capacidad de proliferación estimulada por factores de crecimiento, la línea BGC-1 puede ser considerada como una línea que representa a una célula de la granulosa inmadura. Por consiguiente, puede ser utilizada para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de los factores de crecimiento que controlan la proliferación de las células de la granulosa en etapas anteriores al estadio de folículo antral preovulatorio. Además, esta línea celular puede ser una fuente adecuada de la cual aislar nuevos factores regulatorios intraováricos.

El medio condicionado

Los experimentos de inmunoprecipitación presentados en este trabajo (Figura 13), sugieren que la molécula estimuladora para las células BGC-1 es alguna forma de FN. Dado que no se trata de la variante plasmática, podría tratarse de la forma ED-I⁺ de FN, para lo cual se presentan evidencias que se discuten más abajo. Alternativamente, la actividad estimuladora podría atribuirse a fragmentos de la FN resultantes de una proteólisis limitada en el medio de cultivo. El hecho de que el tratamiento con TGF- β de los cultivos de BGC-1 induzca la aparición de formas de FN proteolizada (Figura 17), sugiere la posibilidad de que constantemente, aún en cultivos controles, se estén generando fragmentos de FN en concentraciones suficientes para evocar una respuesta biológica. Está ampliamente documentado que la FN puede ser procesada proteolíticamente, dando lugar a fragmentos para los que se postulan nuevas y diversas funciones, dependiendo de los fragmentos generados (12,32,33,45,77,80,120,123,124). Algunas de estas actividades incluyen la promoción de la proliferación celular. Otros factores tales como el EGF, el IGF-I y el PDGF, quedan descartados, dado que el MC fue capaz de estimular la incorporación de timidina aún en presencia de dosis saturantes de estos factores de crecimiento.

El MC de las células BGC-1 es mitogénico para las propias células BGC-1, pero es altamente inhibitorio de la proliferación cuando se lo ensaya en células de rata. Si bien los datos obtenidos con la columna de heparina muestran una fuerza iónica de 0,5 M NaCl despega de la columna tanto uno de los picos que inhibe la proliferación en células de rata, como uno de los picos que estimula la síntesis de ADN en células BGC-1, no hay evidencias que indiquen que se trata de la/s misma/s molécula/s. Para manifestarse, la actividad inhibitoria requiere que las células estén bajo una estimulación gonadotrófica y su mecanismo de acción es posterior a la síntesis de AMPc. Así, el hecho de que no se observe ningún efecto inhibitorio en células BGC-1 podría deberse a que en estas células la FSH no induce la síntesis de ADN.

Aunque no se muestra en esta tesis, hay evidencias preliminares que indican que el MC de BGC-1 inhibe también la biosíntesis de progesterona estimulada por hCG en las células tumorales de Leydig MA-10 y la incorporación, estimulada por TSH, de I¹²⁵ en células foliculares de tiroides. Esto sugiere que esta actividad inhibitoria no es específica de las células de la granulosa sino que su efecto inhibitorio podría extenderse a varios sistemas que naturalmente dependen de trofinas cuyo segundo mensajero es el AMPc. Según esto, una hipótesis razonable sería que el MC de BGC-1 debería inhibir la síntesis de glucocorticoides estimulada por ACTH en células suprarrenales de la zona fascicular.

Papel de la variante ED-I⁺ de fibronectina en el desarrollo folicular

Los resultados referentes a esta sección demuestran que hay variaciones significativas en la expresión de la variante ED-I⁺ de FN durante el desarrollo folicular. Este es el primer reporte mostrando cambios significativos en la expresión de FN-ED-I⁺ a lo largo de un proceso normal no patológico en un organismo adulto. Más aún, los datos sugieren que la FN-ED-I⁺ cumple un papel fisiológico, actuando como factor de crecimiento para las células de la granulosa. Se muestra también que además del TGF- β , el AMPc puede alterar el “splicing” alternativo del ARNm de la FN, modulando así la producción de esta variante de FN dentro del folículo.

El dominio ED-I durante el desarrollo folicular

La hipótesis de que la FN-ED-I⁺ juega un papel fisiológico en el desarrollo folicular se basa en datos obtenidos “in vivo” e “in vitro”. La correlación inversa entre los niveles de FN-ED-I⁺ y la concentración de estradiol (Figura 19) sugiere que la expresión del dominio ED-I está sujeta un control hormonal.

Los datos concernientes al efecto de diferentes estímulos sobre el “splicing” alternativo “in vitro” tanto utilizando cultivos primarios como cultivos de células BGC-1 (Figuras 21 y 22), provee de algunos indicios acerca del mecanismo que estaría operando para regular las concentraciones de FN-ED-I⁺ “in vivo”. En folículos pequeños, que presentan una baja respuesta FSH, el TGF- β o una molécula similar, estaría activo, estimulando la expresión de la variante ED-I⁺ de FN. A medida que el folículo madura y adquiere la capacidad de responder a FSH, su segundo mensajero, el AMPc, se incrementaría, inhibiendo así la síntesis de FN-ED-I⁺ e independientemente elevando la producción de estradiol (31). De esta manera se explicaría la relación inversa observada entre FN-ED-I⁺ y el estradiol (Figura 26).

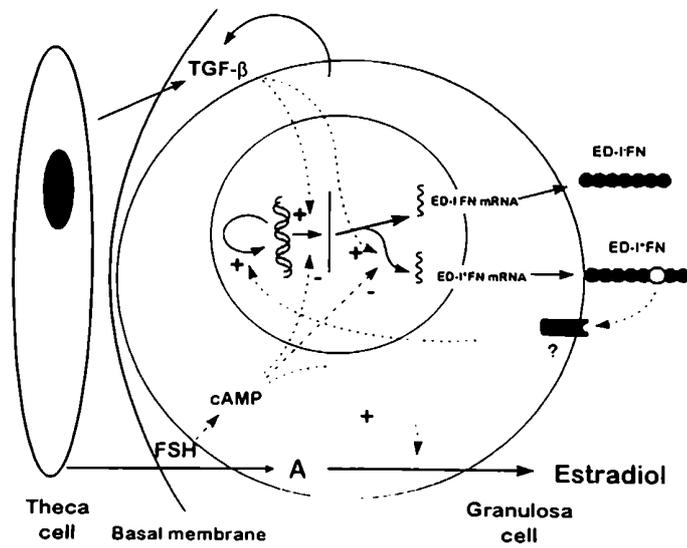


Figura 26. Esquema mostrando un modelo posible para explicar la fisiología de la FN-ED-I* en el folículo ovárico. El TGF- β , expresado tanto por las células de la granulosa como por las células de teca, induce la expresión y estimula la inclusión del exón ED-I. La FSH, a través de su segundo mensajero el AMPc, reprime al gen de la FN, inhibe la inclusión del exón ED-I e independientemente estimula el metabolismo de andrógenos (A) provenientes de la teca a estradiol. En folículos pequeños, que son bajos respondedores a FSH, la concentración de FN-ED-I* es alta. Esta variante de FN, a través de un receptor aún no identificado, estimularía la proliferación de las células de la granulosa.

La función del dominio ED-I

Poco se sabe acerca de la función de la región ED-I. Hasta el presente, la evidencia más fuerte que apoya un papel “in vivo” para este dominio ha sido proporcionada por Jamagin et al. (48), quienes mostraron que la región ED-I de la FN es responsable de la inducción de la diferenciación de lipocitos hepáticos a miofibroblastos, en un modelo experimental de fibrosis inducida la ligar el ducto biliar.

Aunque no se han caracterizado los receptores para FN en las células de la granulosa, nuestros datos sobre la acción mitogénica del péptido sintético ED-I sugieren la existencia de receptores específicos para este dominio de la FN en la membrana plasmática. Este putativo receptor debería ser diferente de aquellos reportados para la FN (29), dado que la FNph, que carece de la región ED-I, fue incapaz de evocar una respuesta estimuladora. La estimulación de la síntesis de ADN por el ED-I parece ser específica del tipo celular, ya que ni los fibroblastos Swiss 3T3 (datos no mostrados) ni las células epiteliales de pulmón de visón CCL64 (Figura 23 B) fueron capaces de responder al agregado de ED-Irr.

La posibilidad de que el dominio ED-I confiera a la FN la propiedad de actuar como factor de crecimiento abre nuevas perspectivas en cuanto a la función de la FN en el folículo ovárico. En folículos pequeños, donde la concentración de FN-ED-I⁺ es elevada, esta forma de FN puede contribuir al proceso de proliferación celular. En los folículos grandes, ocurre el proceso de selección folicular, donde sólo uno de los folículos, el folículo dominante, escapará a la atresia. En este folículo en particular, la concentración de estradiol es máxima y en forma opuesta, la concentración de FN-ED-I⁺ debe ser mínima. Si bien no se ha aclarado plenamente el fenómeno de selección folicular, los datos presentados aquí sugieren que la disminución en la concentración de FN-ED-I⁺ es una consecuencia de haber adquirido una alta respuesta a gonadotrofinas. De esta forma, los bajos niveles de FN-ED-I⁺ pueden contribuir a la transición de al fase proliferativa a la etapa esteroideogénica del desarrollo folicular.

Además, en este trabajo se aporta evidencia que sugiere que la FN-ED-I⁺ podría participar en la atresia folicular alterando la adhesión de las células foliculares a la MEC. FN-ED-I⁺ disminuyó la adhesión de las células BGC-1 tanto en presencia de FNph como de colágeno. Estos datos concuerdan con los resultados presentados por Xia and Culp (121), quienes mostraron que fibroblastos transformados con el oncogen viral v-src exhiben una reducida adherencia a placas

plásticas cubiertas con ED-I recombinante. Sin embargo, en estos fibroblastos, una combinación de FNp y ED-I resulta en una adhesión aumentada (122). Si bien estas discrepancias pueden deberse a diferentes condiciones experimentales, es probable que se traten de diferencias intrínsecas entre fibroblastos y células de la granulosa.

Regulación de la expresión de FN y del “splicing” alternativo

Aunque el TGF- β induce la expresión del gen de la FN en muchos tipos celulares (47,50,59,67,118), la regulación de la transcripción del ARNm de FN en células de la granulosa no ha sido explorada previamente. El aumento de los niveles de ARNm de FN reportados en este trabajo probablemente reflejan la inducción de su gen. Se ha descrito también que el TGF- β es capaz de modular el “splicing” alternativo de la FN, aumentando la inclusión del exón ED-I en el ARNm (9,19,61). La magnitud de la estimulación lograda en cada caso con el tratamiento con TGF- β es variable y parece estar relacionada, al menos en parte, con la inclusión basal del exón ED-I en el ARNm. Así, Borsi et al. (19) reportaron un aumento del 150 % en cultivos de fibroblastos (desde un 10 % del total de los ARNm de FN en cultivos no estimulados a un 25 % luego del tratamiento con TGF- β) mientras que Zhang et al. (125) mostraron un 40 % de estimulación en cultivos primarios de condrocitos caninos, aumentando la proporción de FN-ED-I⁺ de 25 a un 35 %. Por otro lado, Magnuson et al. (61) demostraron que el TGF- β incrementa la inclusión de ED-I en células del osteosarcoma MG65 y en la línea de fibroblastos IMR-90. La magnitud del efecto es cercano al 20 % en ambos casos (de 55 a 65 % del total de ARNm de FN). Es decir, cuanto más alta es la expresión basal del ARNm de FN-ED-I⁺, menor es la estimulación lograda. En este trabajo, se presentan datos que extienden estos hallazgos a las células de la granulosa, mostrando una estimulación del 100 % en la inclusión de ED-I al mensajero maduro luego del tratamiento con TGF- β .

Además del efecto sobre el “splicing” alternativo del ARNm de FN, se muestra por primera vez que este incremento se refleja a nivel de proteína. Un reporte previo de Wang et al. (117) mostraba que el TGF- β induce la secreción polarizada de la FN en células del epitelio aéreo. Aunque este intrigante trabajo demostraba claramente que la FN-ED-I⁺ se expresaba y preferentemente se secretaba a través de la superficie apical sólo cuando el TGF- β era aplicado

en esa misma cara de la célula, no se proveía de datos concluyentes acerca de que hubiera un efecto sobre el “splicing” alternativo.

Si el TGF- β juega algún papel en la regulación del “splicing” alternativo de la FN durante el desarrollo folicular, la concentración de la forma activada del TGF- β debería ser elevada en los folículos pequeños para luego descender a medida que el folículo adquiere capacidad de respuesta gonadotrófica y aumenta la síntesis de estradiol. Recientemente, se ha demostrado que la producción de TGF- β es inhibida por gonadotrofinas en las células de la granulosa (72) por gonadotrofinas y estradiol en células de la teca (62).

En nuestro laboratorio se ha demostrado previamente que la FSH inhibe la expresión de FN en células de la granulosa bovina mediante un mecanismo mediado por AMPc (14). En este trabajo estas observaciones se extienden, mostrando que el AMPc es un regulador negativo de la inclusión de ED-I en el ARNm de FN. A nuestro entender, esta es la primera evidencia que involucra la ruta de transducción de señales del AMPc en el control del mecanismo del “splicing” alternativo. Fosforilaciones dependientes de AMPc podrían afectar a la maquinaria de “splicing” en una forma directa o a través de la inducción de genes relevantes que a su vez regularían el “splicing” alternativo de la FN.

De esta manera, los datos presentados aquí sugieren una nueva forma de regulación en la cual cambios en la estructura primaria de la FN pueden mediar algunos de los efectos de las gonadotrofinas y de algunos factores intraováricos durante el desarrollo folicular.

CONCLUSIONES

- Las células BGC-1 constituyen un buen modelo para el estudio de la fisiología de las células de la granulosa en estadios inmaduros, cuando la respuesta a FSH es baja. En esta etapa del desarrollo folicular, los principales factores reguladores son los factores de crecimiento cuyo origen es principalmente local.
- Las células BGC-1 sintetizan y secretan factores mitogénicos de acción autocrina. Uno de ellos sería una variante de FN celular. Por otro lado, existen factores en los medios condicionados que regulan negativamente la proliferación estimulada por FSH en un modelo de células de la granulosa de rata. Este factor posee un sitio de acción distal a la síntesis de AMPc.
- El TGF- β modula positivamente la proliferación en células de la granulosa BGC-1. Su efecto consiste en potenciar la estimulación evocada por el EGF.
- El TGF- β es un regulador central de la expresión de FN en las células de la granulosa, tanto en las células BGC-1 como en los cultivos primarios bovinos. Este factor de crecimiento induce la transcripción, aumenta la inclusión del exón ED-I en el ARNm e induce la aparición de fragmentos resultantes de una proteólisis limitada de la FN.
- El AMPc también regula la expresión de FN, pero en forma opuesta al TGF- β . Reprime la transcripción, e inhibe la inclusión del exón ED-I en el ARNm.
- La variante ED-I⁺ de FN se expresa en el folículo ovárico, y se observan importantes variaciones en su concentración a lo largo del desarrollo folicular. Su expresión se correlaciona inversamente con la concentración de estradiol en el folículo. Los resultados obtenidos mediante experiencias de cultivo, sugieren que la síntesis de FN-ED-I⁺ está controlada “in vivo” por la FSH y por una molécula similar al TGF- β .
- FN-ED-I⁺ jugaría un papel inductor de la proliferación de las células de la granulosa en los folículos inmaduros, ya que un péptido recombinante codificando para el dominio ED-I fue capaz de evocar una respuesta mitogénica en células de la granulosa bovina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, G. P., R. L. Matteri, J. P. Kastelic, J. C. H. Ko, and O. J. Ginther. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 94:177-188.
2. Adashi, E.Y. 1993. The Intraovarian Insulin-Like Growth Factor System. In 'The Ovary. E.Y. Adashi and P.C.K. Leung, editors. Raven Press, Ltd. New York. 319-335.
3. Alpizar, E. and L. J. Spicer. 1994. Effects of interleukin-6 on proliferation and follicle-stimulating hormone-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: Dependence on size of follicle. *Biol. Reprod.* 50:38-43.
4. Amsterdam, A., A. Zauberman, G. Meir, O. Pinhasi-Kimhi, B. S. Suh, and M. Oren. 1988. Cotransfection of granulosa cells with simian virus 40 and Ha-RAS oncogene generates stable lines capable of induced steroidogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7582-7586.
5. Armstrong, D. T. and J. H. Dorrington. 1977. Estrogen biosynthesis in ovaries and testes. *Adv. Sex Horm. Res.* 3:217-235.
6. Asem, E. K., J. A. Carnegie, and B. K. Tsang. 1992. Fibronectin production by chicken granulosa cells in vitro: Effect of follicular development. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 127:466-470.
7. Aten, R. F., T. R. Kolodecik, and H. R. Behrman. 1995. A cell adhesion receptor antiserum abolishes, whereas laminin and fibronectin glycoprotein components of extracellular matrix promote, luteinization of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 136:1753-1758.
8. Attisano, L., J. L. Wrana, F. López-Casillas, and J. Massagué. 1994. TGF- β receptors and actions. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1222:71-80.
9. Balza, E., L. Borsi, G. Allemanni, and L. Zardi. 1988. Transforming growth factor beta regulates the level of different fibronectin isoforms in normal human cultured fibroblasts. *FEBS Lett.* 228:42-44.
10. Barañao, J. L., M. A. Bley, F. D. Batista, and G. C. Glikin. 1991. A DNA topoisomerase I inhibitor blocks the differentiation of rat granulosa cells induced by follicle-stimulating hormone. *Biochem. J.* 277:557-560.
11. Barañao, J. L., P. E. Saragüeta, and A. Colman Lerner. 1993. Effect of transforming growth factor beta (TGF- β) on granulosa cell DNA synthesis: modulation by hormones, growth factors and GnRH. *Endoc. Soc. 75Ann.Meet. Abs1762:491*(Abstr.)
12. Barlati, S. 1994. Plasminogen activators and fibronectin fragments in tumour growth and signal transduction. *Bull. Inst. Pasteur* 92:269-275.

13. Barnes, J. L., E. S. Torres, R. J. Mitchell, and J. H. Peters. 1995. Expression of alternatively spliced fibronectin variants during remodeling in proliferative glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* 147:1361-1371.
14. Bernath, V. A., A. F. Muro, A. D. Vitullo, M. A. Bley, J. L. Barañao, and A. R. Kornblihtt. 1990. Cyclic AMP inhibit fibronectin gene expression in a newly developed granulosa cell line by a mechanism that suppresses cAMP-responsive element-dependent transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 265:18219-18226.
15. Bjersing, L. 1978. Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. In *The Vertebrate Ovary*. R.E. Jones, editor. Plenum, New York. 181-214.
16. Bley, M. A., P. E. Saragüeta, and J. L. Barañao. 1996. Concerted Stimulation of Rat Granulosa Cell Deoxyribonucleic Acid Synthesis by Sex Steroids and Follicle-Stimulating Hormone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* In press:
17. Bley, M. A., J. C. Simón, A. G. Estévez, L. Jiménez de Asúa, and J. L. Barañao. 1992. Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 131:1223-1229.
18. Bley, M. A., J. C. Simón, P. E. Saragüeta, and J. L. Barañao. 1991. Hormonal regulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis: Effects of estrogens. *Biol. Reprod.* 44:880-888.
19. Borsi, L., P. Castellani, A. M. Risso, A. Lepini, and L. Zardi. 1990. Transforming growth factor-b regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Lett.* 261:175-178.
20. Chapekar, T. N. and A. K. Malik. 1991. 'Spontaneous' transformation of hormonally induced primary cells derived from goat ovarian granulosa. *Pathobiology* 59:345-350.
21. Chiquoine, H. D. 1960. The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. *Am. J. Anat.* 106:149-153.
22. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
23. Danielpour, D., L. I. Dart, K. C. Flanders, A. B. Roberts, and M. B. Sporn. 1989. Immunodetection and quantitation of the two forms of transforming growth factor-beta (b1 and b2) secreted by cells in cultures. *J. Cell. Physiol.* 138:79-86.
24. Dedhar, S. and G. E. Hannigan. 1996. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:657-669.

25. Dorrington, J. H., J. J. Bendell, and S. A. Khan. 1993. Interactions between FSH, estradiol-17 β and transforming growth factor- β regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44:441-447.
26. Dorrington, J. H., A. V. Chuma, and J. J. Bendell. 1988. Transforming growth factor β and follicle stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology* 123:353-359.
27. Edwards, R. G. 1974. Follicular Fluid. *J. Reprod. Fertil.* 37:189-219.
28. Erickson, G. F. and A. J. W. Hsueh. 1978. Stimulation of aromatase activity by follicle stimulating hormone in rat granulosa cells *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 102:1275-1282.
29. Fässler, R., E. N. Georges-Labousse, and E. Hirsch. 1996. Genetic analysis of integrin function in mice. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:641-646.
30. French-Constant, C., L. Van de Water, H. F. Dvorak, and R. O. Hynes. 1989. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J. Cell Biol.* 109:903-914.
31. Fortune, J. E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50:225-232.
32. Fukai, F., T. Iso, K. Sekiguchi, N. Miyatake, A. Tsugita, and T. Katayama. 1993. An amino-terminal fibronectin fragment stimulates the differentiation of ST-13 preadipocytes. *Biochemistry* 32:5746-5751.
33. Fukai, F., M. Ohtaki, N. Fujii, H. Yajima, T. Ishii, Y. Nishizawa, K. Miyazaki, and T. Katayama. 1995. Release of biological activities from quiescent fibronectin by a conformational change and limited proteolysis by matrix metalloproteinases. *Biochemistry* 34:11453-11459.
34. Gangrade, B. K. and J. V. May. 1990. The production of transforming growth factor- β in the porcine ovary and its secretion *in vitro*. *Endocrinology* 127:2372-2380.
35. George, E. L., E. N. Georges-Labousse, R. S. Patel-King, H. Rayburn, and R. O. Hynes. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119:1079-1091.
36. Ginther, O. J., M. C. Wiltbank, P. M. Fricke, J. R. Gibbons, and K. Kot. 1996. Selection of the Dominant Follicle in Cattle. *Biol. Reprod.* 55:1187-1194.
37. Gong, J. G., D. McBride, T. A. Bramley, and R. Webb. 1993. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* 139:67-75.

38. Gospodarowicz, D., C. R. Ill, and C. R. Birdwell. 1977. Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro: I. Characterization of the response of granulosa cells to FGF and EGF. *Endocrinology* 100:1108-1111.
39. Gospodarowicz, D., C. R. Ill, and C. R. Birdwell. 1977. Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. I. characterization of the response of granulosa cells to cells to FGF and EGF. *Journal Name Lost* 13360-14641.
40. Goxe, B., J. E. Flechon, S. Delasalle, and R. Salesse. 1995. RGD-mediated adhesion of porcine granulosa cells modulates their differentiation response to FSH *in vitro*. *Biol. Cell* 83:169-177.
41. Guan, J.-L. and R. O. Hynes. 1990. Lymphoid cells recognize an alternative spliced segment of fibronectin via the integrin receptor α_4/β_1 . *Cell* 60:53-61.
42. Hague, A., A. M. Manning, J. W. J. van der Stappen, and C. Paraskeva. 1993. Escape from negative regulation of growth by transforming growth factor b and from the induction of apoptosis by the dietary agent sodium butyrate may be important in colorectal carcinogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews* 12:227-237.
43. Hines, K. L., A. B. Kulkarni, J. B. McCarthy, H. Tian, J. M. Ward, M. Christ, N. L. McCartney-Francis, L. T. Furcht, S. Karlsson, and S. M. Wahl. 1994. Synthetic fibronectin peptides interrupt inflammatory cell infiltration in transforming growth factor b1 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5187-5191.
44. Hsueh, A. J. W., H. Billig, and A. Tsafiriri. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* 15:707-724.
45. Humphries, M. J. and S. R. Ayad. 1983. Stimulation of DNA synthesis by cathepsin D digests of fibronectin. *Nature* 305:811-813.
46. Hynes, R. O. 1990. *Fibronectins*. Springer-Verlag, New York. 1 pp.
47. Ignatz, R. A. and J. Massague. 1986. Transforming growth factor-b stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 261:4337-4345.
48. Jamagin, W. R., D. C. Rockey, V. E. Koteliansky, S. Wang, and D. M. Bissell. 1994. Expression of variant fibronectins in wound healing: Cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J. Cell Biol.* 127:2037-2048 ---.
49. Keren-Tal, I., A. Dantes, R. Sprengel, and A. Amsterdam. 1993. Establishment of steroidogenic granulosa cell lines expressing follicle stimulating hormone receptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 95:R1-R10.
50. Keski-Oja, J., R. Raghov, M. Sawdey, D. J. Loskutoff, A. E. Postlethwaite, A. H. Kang, and H. L. Moses. 1988. Regulation of mRNAs for type-1 plasminogen activator inhibitor,

fibronectin, and type I procollagen by transforming growth factor-beta. Divergent responses in lung fibroblasts and carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 263:3111-3115.

51. Knecht, M., P. Feng, and K. J. Catt. 1987. Bifunctional role of transforming growth factor-beta during granulosa cell development. *Endocrinology* 120:1243-1249.
52. Ko, J. C. H., J. P. Kastelic, M. R. Del Campo, and O. J. Ginther. 1991. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 91:511-519.
53. Kornblihtt, A. R., C. G. Pesce, C. R. Alonso, P. Cramer, A. Srebrow, S. Werbajh, and A. F. Muro. 1996. The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J.* 10:248-257.
54. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heads of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
55. Langhout, D. J., L. J. Spicer, and R. D. Geisert. 1991. Development of a culture system for bovine granulosa cells: Effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J. Anim. Sci.* 69:3321-3334.
56. Lanuza, G., P. Saragüeta, and J. L. Barañao. 1996. Effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α) on rat granulosa cell DNA synthesis: interaction with FSH and transforming growth factor- β 1. *Endocrine Soc 77th Annual Meeting*:145(Abstr.)
57. Lavranos, T. C., H. F. Rodgers, I. Bertoncetto, and R. J. Rodgers. 1994. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: The effects of basic fibroblast growth factor and dibutyl cAMP on cell division and differentiation. *Exp. Cell Res.* 211:245-251.
58. Leighton, J. K., R. W. Grimes, S. Canning, and J. M. Hammond. 1993. Expression of the IGF system in primary and immortalized porcine ovarian granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 97:29-35.
59. Leonard, C. M., H. M. Fuld, D. A. Frenz, S. A. Downie, J. Massagué, and S. A. Newman. 1991. Role of transforming growth factor- β in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: Stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF- β and evidence for endogenous TGF- β -like activity. *Dev. Biol.* 145:99-109.
60. Lerner, A. A. C., D. F. Salamone, M. E. Chiappe, and J. L. Barañao. 1995. Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: Protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors. *J. Cell. Physiol.* 164:395-403.
61. Magnuson, V. L., M. Young, D. G. Schattenberg, M. A. Mancini, D. Chen, B. Steffensen, and R. J. Klebe. 1991. The alternative splicing of fibronectin pre-mRNA is altered during aging and in response to growth factors. *J. Biol. Chem.* 266:14654-14662.

62. Magoffin, D. A., D. Hubert-Leslie, and R. J. Zachow. 1995. Estradiol-17 β , insulin-like growth factor-I, and luteinizing hormone inhibit secretion of transforming growth factor b by rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol. Reprod.* 53:627-635.
63. Makris, A. and K. J. Ryan. 1975. Progesterone, androstenedione, testosterone, estrone and estradiol synthesis in hamster ovarian follicle cells. *Endocrinology* 96:694-701.
64. Makris, A. and K. J. Ryan. 1977. Aromatase activity of isolated and recombined hamster granulosa cells and theca. *Steroids* 29:65-72.
65. Massagué, J. 1996. TGF- β : Receptors, Transducers, and Mad Proteins. *Cell* 85:947-950.
66. May, J. V., J. P. Frost, and D. W. Schomberg. 1988. Differential effects of epidermal growth factor, somatomedin-C/insulin-like growth factor I, and transforming growth factor- β on porcine granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation. *Endocrinology* 123:168-179.
67. McKay, N. G., T. F. Khong, N. E. Haites, and D. A. Power. 1993. The effect of transforming growth factor β_1 on mesangial cell fibronectin synthesis: Increased incorporation into the extracellular matrix and reduced pI but no effect on alternative splicing. *Exp. Mol. Pathol.* 59:211-224.
68. Mondschein, J. S., S. F. Canning, and J. M. Hammond. 1988. Effects of transforming growth factor- β on the production of immunoreactive insulin-like growth factor I and progesterone and on (3 H)-Thymidine incorporation in porcine granulosa cell cultures. *Endocrinology* 123:1970-1976.
69. Moor, R. M. 1977. Sites of steroid production in ovine Graafian follicles in culture. *J. Endocrinol.* 73:143-150.
70. Mooradian, D. L., R. C. Lucas, J. A. Weatherbee, and L. T. Furcht. 1989. Transforming growth factor- β_1 binds to immobilized fibronectin. *J. Cell. Biochem.* 41:189-200.
71. Moses, H. L., E. Y. Yang, and J. A. Pietenpol. 1990. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights. *Cell* 63:245-247.
72. Mulheron, G. W., D. Danielpour, and D. W. Schomberg. 1991. Rat thecal/interstitial cells express transforming growth factor- β type 1 and 2, but only type 2 is regulated by gonadotropin *in vitro*. *Endocrinology* 129:368-374.
73. Mulheron, G. W., J. G. Mulheron, D. Danielpour, and D. W. Schomberg. 1992. Porcine granulosa cells do not express transforming growth factor- β_2 (TGF- β_2) messenger ribonucleic acid: molecular basis for their inability to produce TGF- β activity comparable to that of rat granulosa cells. *Endocrinology* 131:2609-2614.

74. Mulheron, G. W. and D. W. Schomberg. 1990. Rat granulosa cells express transforming growth factor- β type 2 messenger ribonucleic acid which is regulatable by follicle-stimulating hormone *in vitro*. *Endocrinology* 126:1777-1779.
75. Mulheron, G.W. and D.W. Schomberg. 1993. The Intraovarian Transforming Growth Factor System. In *The Ovary*. E.Y. Adashi and P.C.K. Leung, editors. Raven Press, Ltd. New York. 337-361.
76. Norton, P. A. and R. O. Hynes. 1987. Alternative splicing of chicken fibronectin in embryos and in normal and transformed cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:4297-4307.
77. Ouiaissi, A. e. 1994. Fibronectin cleavage fragments provide a growth factor-like activity for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to amastigotes. *Eur. J. Cell Biol.* 59:68-79.
78. Oyama, F., S. Hirohashi, Y. Shimosato, K. Titani, and K. Sekiguchi. 1989. Deregulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors. *J. Biol. Chem.* 264:10331-10334.
79. Payne, D. W., J. N. Packman, and E. Y. Adashi. 1992. Follicle-stimulating hormone inhibits granulosa cell 5 α -reductase activity. Possible role of 5 α -reductase as a steroidogenic pubertal switch. *J. Biol. Chem.* 267:13348-13355.
80. Penc, S. F., F. A. Blumenstock, and J. E. Kaplan. 1995. A role for a 70-kDa amino-terminal fibronectin fragment in supporting soluble gelatin interactions with rat peritoneal macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 58:501-509.
81. Peter, A. T., M. S. Perrone, and E. K. Asem. 1995. Bovine ovarian follicular fluid vitronectin content is influenced by the follicle size. *Theriogenology* 43:1239-1247.
82. Petersen, T. E., H. C. Thogersen, K. Skostengaard, K. Vibe-Pedersen, P. Sahl, L. Sottrup-Jensen, and S. Magnuson. 1983. Partial Primary Structure of Plasma Fibronectin. Three Types of Internal Homology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:137-141.
83. Rao, I. M., P. F. Gadson, Jr., E. Anderson, P. J. Hornsby, and V. B. Mahesh. 1993. Characterization of progesterone biosynthesis in a transformed granulosa cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 94:121-128.
84. Richards, J. S. 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Phys. Rev.* 60:51-89.
85. Roberts, A. B., U. I. Heine, K. C. Flanders, and M. B. Sporn. 1990. Transforming growth factor- β : Major role in regulation of extracellular matrix. *Ann. NY Acad. Sci.* 580:225-232.

86. Roberts, A. B., I. C. Lamb, D. I. Newton, M. B. Sporn, J. E. De Larco, and G. J. Todaro. 1980. Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:3494-3498.
87. Roberts, A. J. and S. E. Echtenkamp. 1994. In Vitro Production of Estradiol by Bovine Granulosa Cells: Evaluation of Culture Condition, Stage of Follicular Development, and Location of Cells within Follicles. *Biol. Reprod.* 51:273-282.
88. Roberts, A. J. and M. K. Skinner. 1991. Transforming growth factor- α and - β differentially regulate growth and steroidogenesis of bovine thecal cells during antral follicle development. *Endocrinology* 129:2041-2048.
89. Roy, S. K., C. Ogren, C. Roy, and B. Lu. 1992. Cell-type-specific localization of transforming growth factor- β 2 and transforming growth factor- β 1 in the hamster ovary: Differential regulation by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 46:595-606.
90. Russell, D. W. and J. D. Wilson. 1994. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 63:25-61.
91. Saitoh, M., H. Nishitoh, T. Amagasa, K. Miyazono, M. Takagi, and H. Ichijo. 1996. Identification of important regions in the cytoplasmic juxtamembrane domain of type I receptor that separate signaling pathways of transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 271:2769-2775.
92. Saltis, J. 1996. TGF- β : Receptors and cell cycle arrest. *Mol. Cell. Endocr.* 116:227-232.
93. Saumande, J. 1991. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium, the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *J. Steroid Biochem.* 38:189-196.
94. Savion, N. and D. Gospodarowicz. 1980. Patterns of cellular peptide synthesis by cultured bovine granulosa cells. *Endocrinology* 107:1798-1807.
95. Savion, N., G. Lui, R. Laherty, and D. Gospodarowicz. 1981. Factors controlling proliferation and progesterone production by bovine granulosa cells in serum-free medium. *Endocrinology* 109:416-413.
96. Schumacher, M. 1990. Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci.* 13:359-362.
97. Shalgi, R., P. Kraicer, A. Rimon, and et al. 1973. Proteins of human follicular fluid: the blood-follicle barrier. *Fertil. Steril.* 24:429-434.
98. Sirard, M. A. and S. Bilodeau. 1990. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. *Biol. Reprod.* 43:777-783.

99. Sirard, M. A. and S. Bilodeau. 1990. Effects of granulosa cell co-culture on in-vitro meiotic resumption of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 89:459-465.
100. Sirotkin, A. V., J. Nitray, S. V. Nikolajev, and S. V. Burov. 1993. The action of LH-releasing hormone and five analogues on oestradiol, oxytocin and vasopressin secretion by bovine granulosa cells in culture. *J. Endocrinol.* 136:491-496.
101. Sirotkin, A. V., L. V. Tarasenko, J. Nitray, and J. Bulla. 1994. Direct action of LHRH and its antagonist on isolated bovine granulosa cells steroidogenesis. *J. Endocrinol. Invest.* 17:723-728.
102. Skinner, M. K. and J. H. Dorrington. 1984. Control of fibronectin synthesis by rat granulosa cells in culture. *Endocrinology* 115:2029-2031.
103. Skinner, M. K., J. Keski-Oja, K. G. Osteen, and H. L. Moses. 1987. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor b which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* 121:786-792.
104. Skinner, M. K. and K. G. Osteen. 1988. Developmental and hormonal regulation of bovine granulosa cell function in the preovulatory follicle. *Endocrinology* 123:1668-1675.
105. Sorrentino, V. and S. Bandyopadhyay. 1989. TGF β inhibits G0/S-phase transition in primary fibroblasts. Loss of response to the antigrowth effect of TGF β is observed after immortalization. *Oncogene* 4:569-574.
106. Spicer, L. J. and E. Alpizar. 1994. Effects of cytokines on FSH-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: Dependence on size of follicle. *Domes. Anim. Endocrinol.* 11:25-34.
107. Spicer, L. J., E. Alpizar, and S. E. Echternkamp. 1993. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim. Sci.* 71:1232-1241.
108. Spicer, L. J., D. J. Langhout, E. Alpizar, S. K. Williams, R. M. Campbell, T. F. Mowles, and W. J. Enright. 1992. Effects of growth hormone-releasing factor and vasoactive intestinal peptide on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 83:73-78.
109. Stewart, R. E., L. J. Spicer, T. D. Hamilton, B. E. Keefer, L. J. Dawson, G. L. Morgan, and S. E. Echternkamp. 1996. Levels of Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Proteins, Luteinizing Hormone and IGF-I Receptors, and Steroids in Dominant Follicles during the First Follicular Wave in Cattle Exhibiting Regular Estrous Cycles. *Endocrinology* 137:2842-2850.

110. Suh, B. S., R. Sprengel, I. Keren-Tal, S. Himmelhoch, and A. Amsterdam. 1992. Introduction of a gonadotropin receptor expression plasmid into immortalized granulosa cells leads to reconstitution of hormone-dependent steroidogenesis. *J. Cell Biol.* 119:439-450.
111. Taipale, J., J. Saharinen, K. Hedman, and J. Keski-Oja. 1996. Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J. Histochem. Cytochem.* 44:875-889.
112. Tonetta, S. A. and G. S. DiZerega. 1989. Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr. Rev.* 10:205-229.
113. Tsuiki, A., J. Preyer, and T. T. Hung. 1988. Fibronectin and glycosaminoglycans in human preovulatory follicular fluid and their correlation to follicular maturation. *Hum. Reprod.* 3:425-429.
114. Vartio, T., L. Laitinen, O. Narvanen, M. Cutolo, L.-E. Thornell, L. Zardi, and I. Virtanen. 1987. Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult tissue. *J. Cell Sci.* 88:419-430.
115. Vernon, R. K. and L. J. Spicer. 1994. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J. Anim. Sci.* 72:2696-2702.
116. Vibe-Pedersen, K., A. R. Kornblihtt, and F. E. Baralle. 1984. Expression of a human alpha-globin/fibronectin gene hybrid generates two mRNA by alternative splicing. *EMBO J.* 3:2511-2516.
117. Wang, A., D. S. Cohen, E. Palmer, and D. Sheppard. 1991. Polarized regulation of fibronectin secretion and alternative splicing by transforming growth factor beta. *J. Biol. Chem.* 266:15598-15601.
118. Williams, C. A. and B. L. Allen-Hoffmann. 1990. Transforming growth factor-beta 1 stimulates fibronectin production in bovine adrenocortical cells in culture. *J. Biol. Chem.* 265:6467-6472.
119. Win, K. M., F. Charlotte, A. Mallat, D. Cherqui, N. Martin, P. Mavier, A. M. Preaux, D. Dhumeaux, and J. Rosenbaum. 1993. Mitogenic effect of transforming growth factor-beta 1 on human Ito cells in culture: evidence for mediation by endogenous platelet-derived growth factor. *Hepatology* 18:137-145.
120. Woods, A., J. R. Couchman, S. Johansson, and M. Hook. 1986. Adhesion and cytoskeletal organization of fibroblasts in response to fibronectin fragments. *EMBO J.* 5:665-670.
121. Xia, P. and L. A. Culp. 1994. Adhesion activity in fibronectin's alternatively spliced domain ED_a (EIIIA) and its neighboring type III repeats: Oncogene-dependent regulation. *Exp. Cell Res.* 213:253-265.

122. Xia, P. and L. A. Culp. 1995. Adhesion activity in fibronectin's alternatively spliced domain ED_a (EIIIA): Complementarity to plasma fibronectin functions. *Exp. Cell Res.* 217:517-527.
123. Xie, D., F. Hui, and G. A. Homandberg. 1993. Fibronectin fragments alter matrix protein synthesis in cartilage tissue cultured in vitro. *Arch. Biochem. Biophys.* 307:110-118.
124. Xie, D. L., F. Hui, R. Meyers, and G. A. Homandberg. 1994. Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments is associated with release of several proteinases: stromelysin plays a major role in chondrolysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 311:205-212.
125. Zhang, D., N. Burton-Wurster, and G. Lust. 1995. Alternative splicing of ED-A and ED-B sequences of fibronectin pre-mRNA differs in chondrocytes from different cartilaginous tissues and can be modulated by biological factors. *J. Biol. Chem.* 270:1817-1822.
126. Zoller, L. C. and J. Weisz. 1979. A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and (delta)5b-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the membrana granulosa of the ovulable type of follicle of the rat. *Histochemistry* 62:125-134.