



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE TIPO BETA
Y SUS RECEPTORES DURANTE LA ORGANOGENESIS
MURINA

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

BRENDA NOEMI MARQUINA CASTILLO



DIRECTOR DE TESIS: MIBB DIANA ELODIA AGUILAR LEON

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Factor de Crecimiento Transformante tipo beta y sus receptores durante la organogénesis murina".

realizado por Brenda Noemí Marquina Castillo con número de cuenta 89357967

quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario MIBB. Diana Elodia Aguilar León 

Propietario Dr. Erasmo Martínez Cordero

Propietario QFB. José Luis Silencio Barrita

Suplente M. en C. José Luis Busto Sánchez

Suplente M. en C. Patricia Guadalupe Orozco Soto 



Consejo Departamental de Biología


M. en C. Juan Manuel Rodríguez-Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



A Emma Castillo Lara
y Gilberto Marquina Domínguez.

Agradecimientos.

- ◆ A mis padres Emma y Gilberto por darme la oportunidad de formarme, por creer que este largo camino algún día llegaría a su fin.
- ◆ A mis hermanos Gilberto, Berenice, Denise y Luis por las largas horas de paciencia y apoyo, pero sobre todo por seguir confiando en mi.
- ◆ A Denise por la gran ayuda y consejos en darle forma de este trabajo.
- ◆ A Diana y Erasmo por la paciencia, apoyo, consejos, enseñanzas y sobre todo por la amistad incondicional que siempre me han brindado.
- ◆ A la familia García Ortiz por su apoyo y presión para terminar lo interminable.
- ◆ A mis revisores por su tiempo y paciencia en la revisión y corrección de este trabajo.

INDICE

Factor de Crecimiento Transformante Beta

Generalidades	3
Estructura y acciones biológicas de TGF- β	4
Receptores de TGF- β	7
Desarrollo embrionario	10
Períodos de desarrollo	11
Organización embrionaria	12

Estudio de TGF- β en el desarrollo embrionario

Inmunohistoquímica	19
Hibridación in situ	22

Justificación

Planteamiento del Problema

Objetivos

Material y Método

Material biológico	28
Inmunohistoquímica	28
Extracción de RNA	29
Transcripción del RNAm	31
RT-PCR in situ	34

Resultados

PCR de TGF β en homogenizado embrionario	37
Inmunohistoquímica de TGF- β	40
PCR in situ de TGF- β	46

Discusión

Conclusiones

Referencias

Anexo I

RT – PCR Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa	69
RT – PCR is Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa in situ	71
Inmunohistoquímica	73

Anexo II

Reactivos y Soluciones	74
------------------------	----

Factor de Crecimiento Transformante Beta

Generalidades

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) es representante de una familia de polipéptidos diméricos que tienen un gran número de funciones autócrinas y parácrinas (Lehnert, and Akhurst, 1988; Lopez-Casillas, 1998). El TGF- β tiene la capacidad de inducir la síntesis de tejido conectivo, participar en los procesos de diferenciación, proliferación, inmunosupresión e influir en algunas funciones celulares que están relacionadas con la morfogénesis durante el desarrollo embrionario (Massagué, 1990).

El TGF- β fue caracterizado en primer lugar por su capacidad de inhibir el crecimiento de fibroblastos normales de riñón de rata y actualmente se reconoce como un miembro de una superfamilia de factores de crecimiento y diferenciación, que se ha dividido en cuatro grupos: Los TGF- β s, inhibinas y activinas, sustancia inhibidora del conducto Mulleriano (MIS) y producto decapentaplégico (DPP), este último caracterizado en *Drosophila*. Los miembros de esta superfamilia comparten características tanto en sus mecanismos de síntesis, como en la señalización (Massagué, 1990).

La familia del TGF- β está integrada por varios miembros: Las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, las cuales están presentes en mamíferos; la isoforma TGF- β 5, que fue descrita en *Xenopus*; y el TGF- β 4 que está presente en las aves y la cual es homóloga a TGF- β 1. En general esta familia comparte características estructurales similares respecto a sus secuencias de aminoácidos (Derynck and Xin-Hua, 1988; Ten Dijke ed al, 1998; Attisano ed al, 1994). En humanos, bovinos y porcinos la secuencia de aminoácidos de TGF- β se encuentra

altamente conservada, lo que ha indicado que el control de TGF- β puede ser crítico en diferentes organismos (Massagué, 1990). Respecto a la conservación estructural, se ha reportado que el grado de identidad entre las secuencias de los TGF- β s maduros es del 64% al 82%, además, individualmente los TGF- β s son altamente conservados en humanos y en aves (Massagué, 1990).

Estructura y acciones biológicas de TGF- β .

La estructura prototipo de esta superfamilia de genes fue reportada por vez primera en plaquetas humanas (Assoian et al., 1983). Posteriormente se logró clonar el gen a partir de una biblioteca de cDNA humano (Derynck et al., 1985). El TGF- β es un homodímero de dos polipéptidos de 112 aminoácidos unidos por un puente disulfuro. Se secreta al medio extracelular como un producto inactivo, a partir del cual se originan las formas maduras activas. La isoforma TGF- β 1 presenta 390 aminoácidos, la TGF- β 2 414 y la TGF- β 3 está constituida por 412 residuos. Los 112 residuos presentes en el extremo carboxilo terminal constituyen la forma madura, mientras que los residuos restantes, localizados en el extremo amino terminal, definen al péptido asociado de latencia (LAP). Para que se lleve a cabo la maduración de este factor de crecimiento es necesario un corte proteolítico, el cual depende de la presencia de 3 a 5 aminoácidos cuya localización indica el sitio de corte donde se rompe el enlace peptídico y el péptido asociado de latencia (LAP). El péptido maduro y el LAP permanecen asociados de forma no covalente, constituyendo un complejo inactivo. Este complejo a su vez se asocia covalentemente por medio del LAP, a una proteína

fibrilar denominada proteína latente de unión o LTBP, formando un complejo latente grande (LLC). Para que se lleve a cabo la activación completa de TGF- β es necesario que el factor maduro se disocie del LAP, lo cual puede realizarse *in vitro* cambiando el pH, añadiendo agentes caotrópicos o mediante otras manipulaciones físicas. La activación *in vivo* del TGF- β aún no se ha comprendido del todo, pero se propone la participación de proteínas de matriz extracelular como la trombospondina y de algunas proteasas, como la plasmina (Derynck et al, 1985; Massagué, 1990; Lopez-Casillas, 1998).

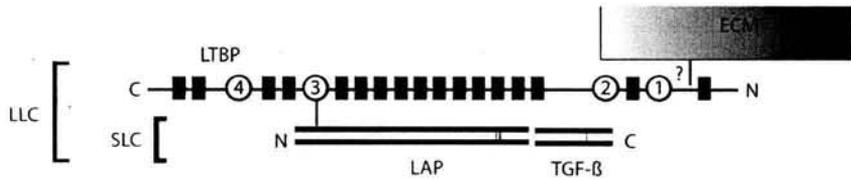


Fig. 1 TGF - β activo. LLC, complejo latente grande; LAP, péptido asociado de latencia; LTBP, proteína latente de unión TGF β , factor de crecimiento transformante tipo β ; N, extremo amino terminal; C, extremo carboxilo terminal., ECM, matriz extracelular

Las acciones biológicas, del TGF- β se han descrito en un amplio rango de efectos frecuentemente opuestos, por ser un factor multifuncional que participa en muchos procesos celulares, como diferenciación, proliferación, inmunosupresión y también influye en muchas funciones celulares que están relacionadas con la organogénesis y morfogénesis durante el desarrollo embrionario (Massagué, 1990).

En la embriogénesis, el TGF- β se expresa principalmente en zonas que experimentan morfogénesis rápidas, tales como los sitios de condrogénesis y osteogénesis (Attisano et al, 1994). El TGF- β regula diferentes procesos biológicos tales como el bloqueo del ciclo

celular en la fase G1, diferenciación y proliferación celular (Sporn et al, 1986; Roberts and Sporn,1993). Muchos de los efectos celulares de TGF- β son resultado de alteraciones en los niveles de expresión de diferentes proteínas incluyendo componentes de matriz extracelular, receptores de adhesión celular, factores de transcripción y factores de crecimiento. Aunque los eventos postranscripcionales, tales como cambios en la estabilidad del RNAm y transcripción influyen en los niveles de proteínas, el TGF- β frecuentemente controla los niveles de proteínas mediante regulación de la expresión génica (Attisano et al, 1994).

El TGF- β parece estar involucrado en la regulación de mecanismos de adhesión celular y composición de matriz extracelular en muchos tipos celulares, además de la interacción entre distintas células (Massagué, 1990). TGF- β controla la producción y remodelación de matriz extracelular regulando la producción de los componentes de este tejido. La síntesis y depósito de fibronectina y algunas formas de colágena se ven incrementadas por acción de TGF- β (Igotz and Massagué, 1986).

El TGF- β también tiene función inmunomoduladora y se ha reportado que suprime la proliferación y diferenciación de células B y T *in vitro*, inhibe la actividad de células asesinas naturales (NK) y de macrófagos, bloqueando la producción de superóxido y óxido nítrico. Regula la producción de citocinas por células del sistema inmune, además de inhibir la adhesión de neutrófilos y células T al endotelio, por lo que limita el reclutamiento de células inflamatorias. (Massagué, 1990; Attisano et al, 1994).

Las plaquetas constituyen un sitio importante de almacenamiento de TGF- β y en algunas condiciones de lesión tisular ocurre la liberación de este factor por degranulación de las plaquetas

iniciándose una cascada de eventos que incluyen reclutamiento celular, formación de vasos sanguíneos y síntesis de colágeno dando soporte al proceso de reparación tisular. Cuando existe una desregulación en la producción y activación de TGF- β , se produce un exceso en la producción de tejido conectivo por activación de fibroblastos, lo que puede relacionarse a una variedad de desordenes patológicos o autoinmunes (Robert and Sporn, 1993; Kulkarni et al, 1993).

Receptores de TGF- β .

Para poder ejercer su actividad el TGF- β se une con una alta afinidad a tres proteínas de superficie celular que tienen actividad de cinasa con especificidad para serinas y treoninas. Estas proteínas se han denominado receptores tipo I (RI), II (RII) y tipo III (RIII) o betaglicano. (Massagué, 1990; Attisano et al. 1994).

Los receptores tipo I y II son glicoproteínas transmembranales de 53 y 75 kDa respectivamente, presentan una secuencia de 500 a 570 aminoácidos que incluyen una secuencia señal, además de un dominio extracelular relativamente corto (150 aminoácidos) rico en cisteínas, una región transmembranal y una región citoplasmática de la que depende la actividad de cinasa para serinas y treoninas. El receptor tipo I presenta una región altamente conservada de 30 aminoácidos, rica en serinas denominada dominio GS (por su secuencia característica SGSGSG). El dominio GS es una región reguladora que puede controlar la actividad catalítica del receptor o sus interacciones con otros sustratos. El receptor tipo II tiene una porción rica en serinas y treoninas en el extremo carboxilo terminal. (Massagué, 1990)

Los receptores de TGF- β están involucrados directamente en la

transducción de señales de este mediador. El receptor tipo I es una proteína transmembranal que requiere la presencia del receptor tipo II para unir al TGF- β y formar un complejo oligomérico. En esta interacción la fosforilación del dominio GS del receptor tipo I que es catalizada por la cinasa del receptor tipo II, es necesaria para que actúe sobre los sustratos intracelulares que sirven de segundos mensajeros durante la vía de señalización de TGF- β . Una vez que se une el ligando al receptor la cinasa del receptor tipo I fosforila a la Smad, la cual formará un complejo con la Smad 4 que migra hacia el núcleo. Este complejo, activa genes mediante su unión a promotores específicos (Massagué, 1990; 1996; 2000). En la figura 2 se ilustra el mecanismo de señalización TGF- β , debido a la importancia que tiene en los diferentes procesos celulares, incluyendo la embriogenesis, y morfogenesis.

8

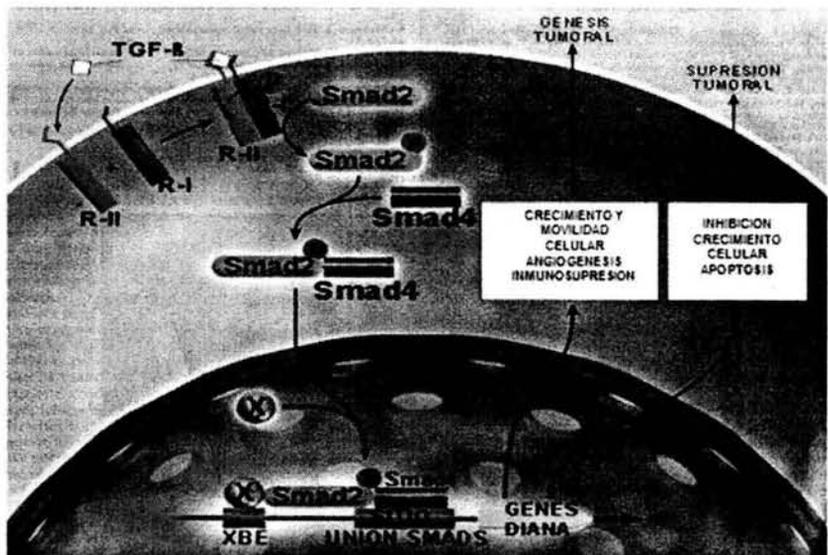


Fig. 2. SEÑALIZACION DE TGF β .

El receptor tipo III o betaglicano es un proteoglicano transmembranal que une al TGF- β con una alta afinidad. El betaglicano une a las tres isoformas de TGF- β con una alta afinidad y facilita la unión de TGF- β al R II formando un complejo β -glicano/TGF- β /R II (Massagué, 1990). El betaglicano se sintetiza a partir de un precursor de 853 aminoácidos, presenta un dominio extracelular, una región transmembranal y una porción citoplásmica de 43 aminoácidos rica en serinas y treoninas. A esta proteína se encuentran unidas las cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) de heparan sulfato y condroitin sulfato (Massagué, 1998). Aunque el TGF- β puede unirse a este receptor sin la interacción de los glicosaminoglicanos, las cadenas de heparan sulfato pueden unirse al factor de crecimiento para fibroblastos (Lopez-Casillas, 1998). La forma membranal del betaglicano sirve de precursor de una forma insoluble, que corresponde al ectodominio de la forma membranal y el cual se genera a partir de un corte proteolítico cerca de la región transmembranal. El betaglicano en su forma membranal funciona como un potenciador de los efectos del TGF- β , presentándolo al receptor tipo II, mientras que su forma soluble antagoniza sus efectos secuestrando al TGF- β (Attisano et al, 1994).

El betaglicano se encuentra expresado en células epiteliales y mesenquimales tanto en tejido fetal como en el adulto. En cambio no se ha encontrado en algunas estirpes celulares, como mioblastos, endotelios y células hematopoyéticas todas las cuales tienen la capacidad de responder al TGF- β . Esto ha sugerido que el betaglicano no participa directamente en la transducción de señales (Massagué, 1990).

-Desarrollo embrionario

El desarrollo embrionario de los mamíferos ha sido motivo de estudio desde hace varios años y uno de los mejores modelos utilizados ha sido el del ratón y la rata (modelo murino), en ellos el proceso de desarrollo inicia con la fertilización de un óvulo por un espermatozoide, cuando éste último atraviesa la corona radiada y la zona pelúcida, fusionando las membranas celulares y posteriormente pronúcleos, lo que da como resultado un cigoto diploide.

El desarrollo posterior del cigoto se caracteriza por ser lento en comparación con otros organismos como el erizo marino, *Drosophila* y *Xenopus*. La razón de este lento desarrollo, es que el útero requiere de algún tiempo para prepararse para la implantación del cigoto, por lo que el embrión se mantiene en la etapa de dos células, y continuará dividiéndose pausadamente (segmentación) sin incrementar su masa, hasta formar una compacta masa celular (mórula).

A lo largo del oviducto y durante la etapa de blástula se desarrolla una cavidad central llamada blastocele. El blastocito alcanza al útero alrededor de los 4 a 4.5 días después de la fertilización y una vez que se lleva a cabo la implantación ocurre un rápido crecimiento de un grupo de células totipotenciales embrionarias, llamadas epiblasto o ectodermo primitivo, a partir del cual se desarrollará el embrión. Hay otro grupo de células que da origen al trofoectodermo a partir del cual se originaran las membranas extraembrionarias (Wolpert, 1998).

Después de la segmentación y formación de la blástula el embrión inicia un período de reorganización, la gastrorulación. En esta

etapa se inicia la transición genómica, de la madre al embrión, es decir, la fase en la cual el embrión toma el control genómico de su desarrollo. Los movimientos morfogenéticos dirigidos, como: epibolia, invaginación, involución, ingresión, evaginación y delaminación, producen una reorganización o rearrreglo en el embrión, que da como resultado la formación de tres capas germinales: El ectodermo, mesodermo y endodermo, a partir de las cuales se constituyen los principales sistemas de órganos. A este período se le conoce con el nombre de organogénesis (Gilbert, 1991). El inicio de la interacción entre el mesodermo dorsal y el ectodermo, por movimientos morfogenéticos da lugar a la formación de la placa neural. Las crestas neurales por su parte, dan lugar al llamado surco neural y posteriormente con el cierre de éstas al tubo neural. La capa mesodérmica se divide longitudinalmente. La división del notocordio da lugar a las somitas, que generan un patrón de segmentación característico. La placa neural se pliega en el tubo neural, el cual se subdivide en cerebro anterior, medio, posterior y cordón espinal (Gilbert, 1991).

Períodos de desarrollo.

La gestación se ha dividido en tres principales períodos:

1. La implantación del blastocito, en la cual hay formación y establecimiento de las membranas extraembrionarias y formación de las capas germinativas.
2. Período embrionario, durante el cual hay un rápido crecimiento y diferenciación, resultando en la formación de los diferentes sistemas y órganos, así como de las principales características externas del cuerpo.

3. Período fetal, el cual termina con el nacimiento. En esta fase se incrementa el tamaño asociado con cambios casi imperceptibles en la forma del cuerpo. Este es también un período de diferenciación histológica y de inicio de funciones.

La edad gestacional tanto en rata como en ratón, no indica necesariamente los estados de desarrollo del embrión ya que el principal error que se comete, consiste en considerar el tiempo de apareamiento como inicio del desarrollo embrionario. De hecho algunos autores consideran esta fase como el día cero o día uno de la gestación, mientras que otros investigadores esperan a encontrar espermatozoides o un tapón mucoso en la vagina, para tomar el día uno de gestación.

Organización embrionaria.

12

La organización embrionaria es un término que se usa para definir o estandarizar las diferentes etapas del desarrollo embrionario. Estas etapas son segmentos arbitrariamente definidos de un proceso continuo de desarrollo. Se ha señalado que estas etapas embrionarias están basadas en cambios evidentes en los estados de desarrollo morfológico y no dependen directamente de la edad cronológica o del tamaño del embrión (*O'Rahilly and Müller, 1996*). Una de las clasificaciones más utilizadas en el desarrollo embrionario es la de Carnegie, con la cual es posible ordenar a los embriones en base al número de somitas y características internas, características externas, longitud y tiempo de incubación.

- Las etapas 1 a 8 de Carnegie son equivalentes para el embrión de rata a los primeros días de gestación para el ratón (*Butler and Juurlink, 1987*) y pueden resumirse en la Tabla 1.

Etapas de Carnegie en el embrión del ratón

E t a p a , Carnegie	Edad (días)	Características
1	1	Fertilización Activación del genoma del cigoto (2 células)
	2	Segmentación (4, 8, 16 células)
2	3	Mórula (compactación)
	4	Formación del blastocito
3 / 4	5	Implantación
5	6	Formación de la cavidad pre-amniótica y determinación del eje embrionario
6	7	Comienza la gastrulación
7	8	Formación de membranas extraembrionarias y primordios de células germinales, comienza la neurulación
8	9	Primeros somitas, comienza el proceso de "torción", aparece el primer arco aórtico, primordios de corazón, pulmón y páncreas. Cierre del neuroporo anterior.

Tabla 1. Las etapas 1 a 4 agrupan la segmentación y formación de la blástula; las etapas 5, 6, 7 y 8 agrupan la implantación gastrulación y organogénesis temprana

Hasta este momento (etapa 8, 9 días de gestación) el embrión que antes era plano y trilaminar, se transforma en una serie de tubos a partir de varios capilares cardiogénicos que se fusionan entre sí para constituir un tubo endocárdico. Esta estructura tubular presenta un engrosamiento celular en su región lateroventral llamado miocardio primitivo, a partir del cual se desarrollarán el miocardio y epicardio. Este proceso ocurre cuando el embrión tiene 4 somitas, alrededor de los 9 días de gestación.

En las etapas 9 y 10 de Carnegie (9- 9.5 días dg) ocurren algunos cambios específicos. En la etapa 9, el embrión presenta la placa neural abierta y de uno a tres pares de somitas, mientras que en la etapa 10 de Carnegie el embrión tiene de 4 a 12 pares de somitas y se inicia la fusión de las crestas neurales en la futura región cervical y placa ótica. El embrión tiene en promedio una edad postcopulatoria de 9,5 días. En la etapa 9 y principios de la 10 el embrión muestra una marcada "lordosis" que llega a ser una concavidad ventral cuando el embrión sufre una rotación, visto

desde la porción caudal hacia la cual el proceso de rotación sigue el sentido de las manecillas del reloj a lo largo del eje del cuerpo (Gilbert, 1991; Buttler and Juurlink 1987; Kaufmann, 1995).

En la etapa 11 de Carnegie (10 días dg), el embrión alcanza una longitud de 1.2 a 2.5 mm. El embrión presenta de 13 a 20 pares de somitas y una curvatura ventral muy marcada, el proceso de rotación ha terminado y el tubo neural es el principal determinante de su forma. El neuroporo craneal está cerrado durante esta etapa; las placas olfatorias y ópticas aparecen, y la placa óptica se invagina. Además, una a dos barras branquiales están presentes.

Durante la etapa 12 de Carnegie (10.5 días dg), el embrión alcanza una longitud entre 1.8 a 3.3 mm y presenta de 21 a 29 pares de somitas. Este estado se caracteriza por la presencia de apéndices anteriores frente a los somitas 8 al 12 y por la ausencia de apéndices posteriores, además la tercera barra branquial está presente. En los miembros más grandes las vesículas óticas están cerradas. El neuroporo está ocluido en su porción craneal a partir del cual se formarán las tres vesículas cerebrales, distinguiéndose cerebro anterior, medio y posterior, pero en la región más caudal aún está abierto. Las placas olfatorias y ópticas aparecen como engrosamientos en la superficie del epitelio. Aparece un primordio de pulmón, en el que comienzan a formarse los bronquios primarios y empieza la actividad cardíaca con contracciones irregulares del corazón primitivo (Gilbert, 1991; Buttler and Juurlink 1987; Kaufmann, 1995).

En la etapa 13 de Carnegie (11 días dg) la longitud que alcanza el embrión es entre 3.1 a 3.9 mm. Presenta de 30 a 34 pares de somitas y los apéndices caudales son ahora visibles como una pequeña protuberancia frente a los somitas 23 a 28. Se empieza a formar la cola como un pequeño muñón. El seno cervical aparece

y el hueco del ojo se empieza a formar en las especies más grandes. La placa olfatoria se inicia con una muesca, la vesícula ótica esta siempre cerrada y el neuroporo caudal se cierra.

La etapa 14 de Carnegie (11.5 días dg) se caracteriza por la longitud del embrión, la cual varía entre 3.5 y 4.9 mm y presenta de 35 a 39 pares de somitas. Los apéndices se curvan hacia adelante y medialmente. En los embriones jóvenes las vesículas óticas forman bolsas profundas, pero tienen poros abiertos en los más grandes. La primera barra branquial se divide en el maxilar y en el proceso mandibular. Los somitas craneales se vuelven indistintos. Las vesículas cerebrales se ven ahora diferentes entre sí, empiezan a diferenciarse los nervios craneales. Hay un importante grado de diferenciación en el sistema vascular para formar los principales vasos sanguíneos y arterias. Las arterias pulmonares empiezan a hacerse evidentes (Gilbert, 1991; Butler and Juurlink 1987; Kaufmann, 1995).

15

El embrión que alcanza la etapa 15 de Carnegie (12 días pc) tiene una longitud entre 5 y 6 mm y alrededor de 12 días poscopulatorios. Caracterizan a esta etapa la separación de la tráquea del esófago, una elongación del ducto endolinfático, así como el crecimiento del primordio endocardial o corazón primitivo, el uréter, las crestas bulbares y el divertículo pancreático ventral. Además el embrión presenta distintas vesículas cerebrales.

En la etapa 16 de Carnegie (12.5 días dg) el embrión presenta una longitud de 6 a 7 mm. Internamente se caracteriza por el extenso desarrollo del corazón, pulmones, riñones y sistema nervioso central. En la región cefálica el cerebro medio se diferencia para formar posteriormente hipotálamo y talamo. El pulmón continúa el proceso de diferenciación formando bronquios y haciéndose evidentes los lóbulos pulmonares. Externamente el proceso de

remodelación se ha iniciado en los apéndices anteriores, que presentan una constricción, que los divide en una región proximal y otra distal en forma de paleta donde se lleva a cabo muerte celular programada (apoptosis). Los apéndices caudales aún no se han dividido. El hueco olfatorio es profundo, dando como resultado los orificios nasales.

Durante la etapa 17 de Carnegie (13 - 13.5 días dg) los embriones tienen una longitud de 7 a 8 mm. Los miembros anteriores con forma de paleta presentan rayos, pero no están crenados (dentados) en el margen. Los apéndices posteriores son ahora delimitados y mientras que los somitas sacrolumbares son diferenciados no ocurre lo mismo con los torácicos.

En la etapa 18 de Carnegie los embriones presentan una edad postcopulatoria de 13.5 días y alcanzan una longitud de 8 a 9 mm. Los rayos de los dedos en los apéndices posteriores ya son distinguibles, se inicia la crenación o formación de los dedos. Los somitas lumbosacrales son ahora indistintos.

Las etapas 19 y 20 de Carnegie (14 - 14.5 días dg) tienen por característica una longitud de 9 a 10 mm de los embriones. En esta etapa los somitas solo son visibles en la cola, los párpados son pequeños pliegues ectodermales, los cuales no cubren aún el globo ocular. La protuberancia auricular se fusiona para formar la pinna. y la base de los miembros anteriores esta crenada. Por el contrario en la base de los miembros posteriores empiezan a aparecer los rayos de los dedos pero estos no están crenados o dentados.

En la etapa 20 los embriones presentan una edad poscopulatoria de 14.5 días y un rango de longitud de 10 a 11 mm. Se distinguen de los embriones de la etapa 19 porque presentan grandes párpados que cubren todo el globo ocular en su porción superior e inferior

y presentan primordios foliculares por encima de los ojos. Además se inician la separación de los dedos y principia la crenación de la base de los miembros posteriores. En el corazón el proceso de septación ha finalizado y los ventrículos ya están separados en ventrículo izquierdo y derecho, todos los componentes cardiacos ya son fácilmente reconocibles. En el pulmón se distinguen ya los bronquios y bronquiolos. En la región cefálica hay un primordio cerebelar y los lóbulos olfatorios muestran mayor diferenciación.

Las etapas 21 y 22 de Carnegie (15 - 15.5 días dg) se caracterizan por un paladar secundario no fusionado, la separación de los dígitos de los miembros anteriores y el inicio de la separación de los dígitos de los miembros posteriores. El embrión muestra numerosos folículos pilosos en la piel, excepto en la región de la cabeza. Los somitas son apenas reconocibles en la parte distal de la cola y la osificación se ha iniciado en el húmero.

17

La etapa 21 presenta una edad postcopulatoria de 15 días y un rango de longitud de 10.5 a 11.5 mm. Se caracteriza principalmente por la separación de los dedos de los miembros anteriores y profundas muescas en los miembros posteriores.

La etapa 22 presenta una edad postcopulatoria de 15.5 días y una longitud de 11 a 12 mm. Se distingue de la etapa 21 principalmente por la separación de las falanges de los dedos de los miembros posteriores.

Durante la etapa 23 de Carnegie (16 días dg) el rango de longitud varia de 12 a 14 mm. En este estadio se presenta una completa separación de los dedos en ambos miembros, la flexión del codo y rodilla, y los párpados están ahora bien definidos. Internamente las membranas cerebrales (aracnoides, pia) están bien definidas y la osificación ya se ha iniciado. Este proceso continúa en la escápula,

húmero, radio, cúbito, tibia, arco zigomático así como en las regiones del temporal escamoso, áreas del palatino, frontal y hueso supra-occipital. La característica principal que define a este estado es la fusión del paladar secundario (*Gilbert, 1991; Butler and Juurlink 1987; Kaufmann, 1995*).

Estudio de TGF- β en el desarrollo embrionario

Al estudiar el desarrollo embrionario de mamíferos se ha descrito la participación de diferentes factores de crecimiento en los procesos de morfogénesis y organogénesis. Algunos reportes han sugerido que dichos factores son importantes en la regulación de la diferenciación celular y en la formación apropiada de diferentes tejidos (*Twardzik et al, 1982; Ellingsworth et al, 1986; Sporn and Roberts, 1986; Wilcox and Derynck, 1988; Lehnert and Akhurst, 1988; Pelton et al, 1989; Millan et al, 1991; Cheng et al, 1993; Letterio et al, 1994; Blewett et al, 1995; Sanford et al, 1997*).

Se ha descrito que el TGF- β tiene funciones celulares que están relacionadas de manera relevante con la morfogénesis durante el desarrollo embrionario (*Massagué, 1990; Heine et al, 1987*). En particular es capaz de inducir la síntesis de tejido conectivo, así como la diferenciación y proliferación celular debido a sus efectos 19 autócrino y parácrino (*Lehnert and Akhurst, 1988; Massagué, 1990; López-Casillas, 1998*). Evidencias recientes han señalado que la participación de TGF- β puede ser más amplia que la descrita en trabajos previos.

Inmunohistoquímica.

Los primeros estudios que involucraron directamente al TGF- β en el desarrollo embrionario fueron realizados utilizando métodos inmunohistoquímicos. Este factor fue detectado en megacariocitos, células mononucleares de médula ósea, células hematopoyéticas hepáticas, epitelio renal y timo al analizar tejido embrionario bovino (*Ellingsworth et al, 1986*). Otros estudios revelaron la presencia del TGF- β 1 en tejidos de origen mesodérmico, como tejido conectivo, cartílago y hueso. Además se detectó que las áreas cercanas a la cresta neural, tales como paladar, laringe, mésequina facial,

senos nasales, meninges y dientes también eran positivas para TGF- β 1. De acuerdo a estos autores la característica esencial del TGF- β 1 fue su alta expresión durante las fases de histogénesis y morfogénesis activa en embriones murinos de 11 a 18 meses de gestación (Heine et al, 1987).

Los datos derivados del estudio en embrión sugirieron en un principio que el TGF- β 1 era importante durante las interacciones entre el epitelio y tejido mesenquimatoso (Thompson et al, 1989). Además, Potts y colaboradores, propusieron que no solamente TGF- β 1, sino también TGF- β 2 podrían intervenir en la transformación epitelio-mesénquima (Potts and Runyan, 1989).

En otros estudios se ha encontrado que TGF- β 1 y TGF- β 2 pueden estar presentes en sistema nervioso central, con una alta expresión en zonas donde ocurre la diferenciación neuronal y menor expresión en zonas de proliferación activa, y en sistema nervioso periférico principalmente en fibras nerviosas y cuerpos neuronales: Estos datos sugieren que TGF- β 2 y 3, intervienen en la diferenciación y regulación de la migración neuronal, así como, en la proliferación y diferenciación de células gliales (Flanders et al, 1991).

Al avanzar en el estudio de las isoformas de TGF- β , se apreciaron diferencias importantes en la expresión de esta proteína. Se encontró que TGF- β 1 y 3, pero no TGF- β 2, podían inhibir el crecimiento del endotelio de grandes vasos y que TGF- β 2 y 3, pero no TGF- β 1, inhibían la sobrevivencia de neuronas en cultivo del embrión de pollo. Con base a estos trabajos, se ha propuesto que las isoformas de TGF- β , podían tener una distribución diferente durante el desarrollo, la regeneración de tejidos, y en respuestas patológicas (Roberts and Sporn, 1992).

Pinar y colaboradores en 1992, realizaron estudios

inmunohistoquímicos de TGF- β 1, 2 y sus precursores en el embrión humano bilaminar de dos semanas y encontraron que el precursor de TGF- β estaba localizado en todo el embrión; el péptido maduro estaba presente en hipoblasto y solo había una débil tinción en epiblasto. En cambio, el TGF- β 2 fue localizado tanto en hipoblasto como en epiblasto (Pinar et al, 1992).

Estudios posteriores en embriones de pollo revelaron inmunoreactividad para TGF- β 2 y TGF- β 3 en la notocorda, así como en la pared de la aorta y en los dermatomas durante el día 3 de gestación. Durante los días 5 y 7, las isoformas 2 y 3 se expresaron fuertemente en el ganglio radial del cordón espinal y en el cerebro medio. Unsicker y colaboradores, proponen la misma localización para TGF- β 2 y TGF- β 3 en el desarrollo del sistema nervioso de pollos y mamíferos, resaltando así la importancia del TGF- β , durante los eventos fundamentales del desarrollo neural (Unsicker et al, 1996).²¹ Mediante la inmunohistoquímica Zhao y colaboradores, localizaron al receptor tipo II del TGF- β en el epitelio de vías aéreas y alrededor de mesénquima, sugiriendo que este receptor es un regulador importante de la interacción mesenquima-epitelio (Zhao and Young, 1995; Zhao et al, 1996). De la misma manera, se ha descrito que la forma latente del TGF- β está presente en matriz extracelular de tejido cardíaco y que se requiere de su activación durante el desarrollo (Ghosh and Brauer, 1996).

En otros estudios inmunohistoquímicos se ha detectado que mientras los niveles del receptor I se elevan al inicio de la organogénesis, durante la fase tardía de este proceso predomina el incremento del receptor II, sobre todo en estructuras neuronales. Los receptores I y II de TGF- β presentan además un patrón de expresión complejo en tejidos en los cuales se lleva a cabo la interacción epitelio-

mesénquima. La regulación del receptor I y II concurren de manera espacial y temporal durante la embriogénesis, lo que permite el control de la transducción de la señales del TGF- β durante el desarrollo (Mariano et al, 1998).

Además se han encontrado diferencias en la expresión de TGF- β 1, en el desarrollo de órganos en los cuales se establece una interacción epitelio-mesénquima. Montuenga y colaboradores, encontraron que el corazón es uno de los primeros órganos en presentar alta expresión de TGF- β 1, así como el sistema nervioso y esquelético durante el desarrollo embrionario en roedores (Montuenga et al, 1998).

Hibridación *in situ*

En estudios en los que se ha utilizado hibridación *in situ* como método de detección del transcrito de TGF- β , se ha registrado que la presencia de RNAm de TGF- β 1 es positivo en capilares, islotes sanguíneos y células de origen eritroide, así como en los principales órganos hematopoyéticos (Wilcox and Derynck, 1988). También se detectó el RNAm de TGF- β 1 en el epitelio de diferentes órganos como tiroides y timo, los cuales tienen una relación estrecha con el mesénquima durante la diferenciación y morfogénesis. 22.

Durante la organogénesis el transcrito de TGF- β 1 fue positivo en estructuras dentarias, glándulas submandibulares en formación y folículos pilosos, así como en la morfogénesis cardíaca. El RNAm de este factor también estuvo presente en algunas zonas en las que no se habían reportado con anterioridad, como la submucosa intestinal y el tejido conectivo de riñón y pulmón. Con base en estos datos Lehnert y su grupo propusieron que el TGF- β poseía un efecto autócrino sobre el epitelio y otro parácrino en mesénquima

(Lehnert and Akhurst, 1988).

En otros estudios en los que se analizó la expresión de varios tipos de colágena (colágena tipo I, III y IV), TGF- β 1 y c-fos durante el desarrollo óseo en el humano, se encontró que el TGF- β 1 tenía una distribución parecida a la colágena tipo I, la cual se expresaba en fibroblastos de periostio, piel y osteoclastos. De esta manera se consideró que la producción de TGF- β 1 por los osteoclastos y su activación por un ambiente ácido, podría estimular la producción de colágena tipo I, así como la reabsorción y formación de hueso (Sandberg et al, 1988; Sandberg et al, 1988).

Pelton y colaboradores, estudiaron la expresión temporal y espacial del RNAm de TGF- β 2 en embriones de 10.5 días *post coitum* a 3 días *post partum* por hibridación *in situ* y encontraron presencia positiva de éste mensajero en el mesénquima de tejidos como hueso, cartílago, tendón, intestino, vasos sanguíneos y piel. Al comparar el TGF- β 1 y 2 apreciaron que sólo este último estaba presente en hueso endocondral en formación, condroblastos y fibroblastos de tendón, así como en dermis y epidermis. La señal de RNAm de TGF- β 2 fue positiva en la capa adventicia e íntima de los vasos sanguíneos, en pulmón, riñón y placenta. Aunque el TGF- β 1 se expresó en la submucosa digestiva, el TGF- β 2 se localizó en la submucosa respiratoria en desarrollo, conductos arteriales y árbol bronquial (Pelton et al, 1989).

A diferencia de lo descrito por Lenhert y colaboradores, (Lenhert and Akhurst, 1988) se consideró que las isoformas de TGF- β , podrían regular diferencialmente la organogénesis y se propuso un nuevo modelo de interacción entre mesénquima y epitelio (Pelton et al, 1989) que podría ser aplicable a sistema digestivo, respiratorio y piel. Pelton y colaboradores, señalaron la posibilidad de que el TGF- β 2 participara durante la morfogénesis, en la síntesis de

matriz extracelular y la angiogénesis. En su propuesta la síntesis de TGF- β 2 dependía de las células del mesénquima y tenía una función autócrina estimulando el crecimiento y diferenciación. Por su parte, estas células podían producir factores reguladores de la proliferación y diferenciación epitelial (Pelton et al, 1989).

Miller y colaboradores, analizaron la expresión del RNA de TGF- β 2 por hibridación *in situ* en tejido embrionario, sugiriendo que esta isoforma puede jugar un papel importante en el desarrollo embrionario como en el mantenimiento de los tejidos (Miller et al, 1989).

Al comparar la expresión de las isoformas de TGF- β 1, 2 y 3 durante la embriogénesis se ha observado que su patrón de expresión mediante hibridación *in situ* difiere en el ratón de 9.5 a 16.5 días *post coitum*, indicando una posible función *in vivo*. Las tres isoformas parecen estar involucradas en la condro-osificación. 24 Además, la expresión epitelial del RNAm de TGF- β 1, 2 y 3 ha sustentado su participación en la morfogénesis activa que involucra la interacción epitelio-mesénquima. Los transcritos de TGF- β 1 y 2 en regiones que sufrían septación cardiaca y formación de valvas, sugirió una interacción de las isoformas de TGF- β en los procesos de desarrollo y morfogénesis (Millan et al, 1991).

Recientemente se ha propuesto que además de las isoformas de TGF- β , sus receptores intervienen en los procesos de desarrollo. El receptor III tiene la capacidad de presentar el TGF- β al receptor II, incrementando así su efecto biológico (Sankar et al, 1995).

Finalmente, algunos trabajos enfatizan que el TGF- β puede tener un papel regulador especial en algunos órganos. Al realizar hibridación *in situ*, northern blot e inmunohistoquímica se ha descrito que la presencia de RNAm de TGF- β 4 es positivo durante

la formación de tubo neural, notocorda, ectodermo, endodermo, esclerotomos y miotomos en embriones de 16 días de gestación (Jakowlew, 1992). El estudio de TGF- β 2 y 3 en el desarrollo de el corazón de pollo ha revelado que el TGF- β 2 se encuentra localizado en endotelio y miocardio antes y después de la transformación epitelio-mesénquima. En contraste, el TGF- β 3 se encontró solo en el miocardio en la fase anterior de la transformación epitelio-mesénquima. Boyer y colaboradores, han sugerido que TGF- β 2 y 3 están involucrados en este proceso de transformación epitelial de manera separada y secuencial. Es posible que el TGF- β 2 participe en el inicio de la separación endotelial, mientras que TGF- β 3 sea esencial durante el cambio morfológico que hacen posible la migración de las células (Boyer et al, 1999).

Finalmente, es necesario señalar que otros estudios han incorporado algunas técnicas como la de northern blot y RT-PCR (Transcripción Inversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la detección de los receptores de TGF- β (RI y RII) durante la embriogenesis, aunque solo se ha determinado su expresión en homogenizados totales y no su localización *in situ* (Mariano et al, 1998).

Caminesch y su grupo de investigación en otros estudios durante el desarrollo del corazón encontraron que TGF- β 2 y TGF- β 3 son necesarios para la transformación epitelio-mesénquima en las aves, pero solamente TGF- β 2 fué expresada obligatoriamente en la transformación del cojinete cardíaco en los mamíferos (Caminesch et al, 2002).

Más recientemente en otros trabajos se ha empleado RT-PCR semicuantitativa, identificado factores involucrados en el desarrollo del páncreas, encontrando altos niveles de expresión de TGF- β 1

y $\beta 2$; TGF- $\beta 3$ y los receptores se encontraban expresándose de manera constitutiva en páncreas de embriones de ratón de 0 a 12 días postnatal (*Dichmann et al, 2003*).

JUSTIFICACION

Teniendo en consideración los antecedentes descritos, el análisis temporal y espacial del TGF- β y sus receptores en el desarrollo embrionario han sido motivo de estudio constante debido a sus implicaciones en los procesos de organogénesis y morfogénesis. Este objetivo requiere del uso de técnicas altamente sensibles y específicas, en particular cuando se precisa definir si alguna isoforma del TGF- β es de origen materno y participa como regulador esencial en el desarrollo embrionario.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Este trabajo plantea que la aplicación simultánea de inmunohistoquímica, RT-PCR y la PCR *in situ* será de utilidad para 27 tratar de definir si los cambios en la expresión de las isoformas de TGF- β y sus receptores están relacionados con las fases de desarrollo embrionario.

OBJETIVOS

Evaluar la presencia proteína y de RNAm de TGF- β 1,2 y 3 así como de sus receptores (RI y RII) mediante inmunohistoquímica y RT-PCR *in situ* durante la organogénesis del desarrollo embrionario (día 10, 12 y 14 días de gestación) murino.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Material biológico

Se incluyeron ratas Wistar de 250 a 300 gr. de peso, en las cuales se realizó un registro del ciclo sexual o estral de la hembra; mediante un exudado vaginal se determinó en que etapa del ciclo se encontraban: estro, metaestro, diestro o proestro. Las hembras que se encontraban en la etapa de estro o previas a iniciarla, se colocaron con el macho y se verificó la posibilidad de gestación mediante la observación del tapón mucoso y/o presencia de espermatozoides en el exudado vaginal.

Se sacrificaron los embriones a los 10, 12 y 14 días de gestación. Para la fijación del tejido se utilizó etanol absoluto y la deshidratación se llevo a cabo usando diferentes concentraciones de etanol (J.T. Baker), así como con dos baños de xileno (J.T. Baker). Al término de este proceso se incluyeron los bloques de tejido en parafina de uso histológico (Paraplast), para obtener mediante microtomo, cortes de 3 y 5 μm para la inmunohistoquímica y RT-PCR *is*.

Para incrementar la adhesión del tejido a la laminilla, se trataron las laminillas con β -metacriloxipropil-trimetoxilano o amino-silano (SIGMA) al 2% en acetona.

Inmunohistoquímica.

A partir de los tejidos embrionarios fijados en etanol (J.T. Baker), se hicieron cortes de 5 μm y se extendieron en las laminillas tratadas con amino-silano (SIGMA), se desparafinaron en una placa de calentamiento a 60°C y en baños sucesivos de xileno (J.T. Baker). Después de hidratar el tejido con etanol absoluto, etanol 96%

(J.T. Baker) y agua destilada, se bloquea la peroxidasa endógena incubando durante 30 minutos con peróxido de hidrógeno (SIGMA) al 3% en metanol (J.T. Baker) al 3%. Para evitar uniones inespecíficas se incubó en amortiguador de HEPES (N{2hidroxietil}piperazina-N'-(2-ácido etansulfónico)) 10mM, NaCl₂ 150mM y CaCl₂ 2.6 mM (Merck) (HCN) - suero de cerdo al 2% por 30 minutos; el exceso se eliminó con amortiguador HCN-Tween 20 (SIGMA) al 0.1%. Se emplearon anticuerpos policlonales anti TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3 y contra los receptores (R I y RII) generados en conejo (Santa Cruz, USA), el anticuerpo primario, se empleó en una dilución: 1:150 en HCN-suero de cerdo al 2%, incubando por un período de 2 hr 30 min, protegido de la luz. Se realizó una segunda incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (Santa Cruz, USA), a una dilución de 1:200, en HCN-suero de cerdo al 2 %. Como sistema de amplificación se utilizó estrepto-avidina biotina 1:100 (DAKO, USA) 1 µl de complejo (0.5 µl A + 0.5 µl B) + 99 µl HCN- suero de cerdo 2%. Entre cada incubación se realizaron lavados con HCN-Tween 20 0.1%. El revelado se realizó con 3-3'diaminobenzidina 0.02 mM (SIGMA) en HCN y se contrastó con hematoxilina de Harris (Merck).

29

Extracción de RNA.

La extracción de RNA se realizó por el método de tiocianato de guanidina, empleando un reactivo comercial (Trizol, GIBCO BRL) de acuerdo a los procedimientos de Chomczynski & Sacchi (1987). Con este fin se homogenizó el tejido con politrón en 1.5 ml de Trizol y después se adiciona 300 µl de cloroformo (Merck) se centrifuga a 10000 g para separar una fase acuosa, donde se encuentra soluble

el RNA y una fase orgánica que contenía el DNA, proteínas y componentes celulares. A partir de la fase acuosa se recuperó el RNA por precipitación con alcohol isopropílico absoluto (J.T. Baker). El RNA se lavó en etanol al 75% y se resuspendió en 20 μ l de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC 0.01% v/v) (SIGMA).

Para cuantificar la concentración de RNA de la muestra se diluyó 1 μ l de RNA-muestra en 1 ml de agua desionizada y se tomaron lecturas a 260 / 280 nm de absorbencia en un equipo comercial (GENE QUANT, Pharmacia Biotech).

La relación de absorbencia 260/280 nm determina el grado de pureza de la muestra, con un óptimo ≤ 1.6

La concentración de RNA muestra se obtiene con el valor de absorbencia a 260 nm x 40 que es igual a la concentración de RNA en μ g por μ l de muestra.

30

Pureza: Abs 260 / 280 Óptimo ≤ 1.6

Concentración de RNA: (Abs 260nm) * (40) = [μ g de RNA / μ l]

Para confirmar la integridad del RNA se realizó una electroforesis en gel de agarosa (ultra pura grado electroforesis GIBCO BRL) al 1%, en una cámara de electroforesis submarina (Hoefer Scientific Instruments), con amortiguador de Tris-Acetato EDTA (TAE 1x) durante 40 minutos a un voltaje constante de 80V. La tinción del gel, se llevó a cabo con bromuro de etidio 0.01% (SIGMA) y se observó el patrón de corrimiento en un transiluminador de luz UV (Hoefer Scientific Instruments) (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Transcripción inversa a partir del RNAm

A partir del aislado del RNAs_e se obtuvo cDNA (ácido desoxirribonucleico complementario) por retrotranscripción o transcripción inversa (RT), mediante una mezcla de RNA (5µg/µl) y Oligo dT (GIBCO BRL) según recomendaciones de fabricación, incubando 10 min. a 70°C y 3 min. a 4°C. Se agregó amortiguador 5x [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂] (GIBCO BRL), DTT 0.1 mM (GIBCO BRL), mezcla de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) 10 mM (Grado PCR GIBCO BRL) y se incubó 2 min. a 42°C y 3 min. a 4°C, adicionando la enzima M-MLV (Moloney murine leukaemia virus) (GIBCO BRL). Esta mezcla se incubó por 50 min. a 42°C y la enzima se inactiva durante 15 min. a 70°C. Para eliminar el RNA restante se incubó con RNAsa (GIBCO BRL), por espacio de 20 min. a 37°C.

A partir del cDNA obtenido por retrotranscripción se realizó la PCR (del inglés Polimerasa Chain Reaction), para la cual se utilizó amortiguador de PCR 10x [200 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl], mezcla de dNTPs 10 mM (GIBCO BRL), MgCl₂ 50 mM (GIBCO BRL), oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para las tres isoformas del TGF-β, sus receptores y β-actina como control positivo (ver cuadro 2), Taq DNA polimerasa 5U/µl (GIBCO BRL), agua-DEPC cuanto baste para un volumen final de 25µl, además se adicionaron 25µl de aceite mineral (SIGMA). Se procesó en un termociclador (PERKIN ELMER DNA Thermal Cycler 480), las temperaturas óptimas de alineamiento para cada isoforma y receptores se obtuvieron a partir de la secuencia de oligonucleotidos y según la formula:

$$T_m = 2(T+A) + 4(G+C)$$

Donde: T_m = temperatura optima de alineamiento.
 T = número de Timinas.
 A = número de Adeninas.
 G = número de Guaninas.
 C = número de Citocinas.

El equipo de PCR se programó de la siguiente manera dependiendo de cada una de las isoformas:

TGF- β 1:

94°C 5 min. 1 ciclo
94°C 1 min.]
63°C 45 seg.] 40 ciclos
72°C 2 min.]
72°C 7 min.

TGF- β 2:

94°C 5 min. 1 ciclo
94°C 1 min.]
58°C 1 min.] 30 ciclos
71°C 1 min.]
72°C 5 min.

TGF- β 3:

94°C 5 min. 1 ciclo
94°C 30 seg.]
60°C 30 seg.] 30 ciclos
72°C 30 seg.]
72°C 7 min.

β -actina:

94°C 5 min. 1 ciclo
94°C 50 seg.]
55°C 50 seg.] 40 ciclos
72°C 50seg.]
72°C 10 min.

Receptor I:

94°C 5 min. 1 ciclo
94°C 1 min.]
64°C 1 min.] 30 ciclos
72°C 1 min.]
72°C 5 min.

Receptor II:

72°C 5 min. 1 ciclo
94°C 30 seg.]
60°C 30 seg.] 30 ciclos
72°C 30 seg.]
72°C 7 min.

La determinación de β -actina se realizó como control de la PCR en todas las muestras, como producto constitutivo.

Para confirmar la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 6 % en una cámara vertical (Bio Rad Mini-Protean II), mezclando 10 μ l del producto amplificado, más 3 μ l de amortiguador de carga (Azul de bromo fenol 25 %, Xilencianol FF 25% Gilcerol 30%, Agua-DEPC), incluyendo en cada gel un marcador de peso molecular (READY.LOAD 100 bp DNA ladder, GIBCO BRL), con amortiguador de Tris Boratos EDTA (TBE1x) a voltaje constante de 100V durante 2 horas. La tinción del gel se realizó con reactivo de plata, según recomendación del fabricante (Bio-Rad Silver Stain KIT).

Para obtener la secuencia sentido y antisentido, así como la longitud de cada una de las isoformas de TGF β y sus receptores (Tabla 1) se obtuvo la secuencia completa de su cDNA a partir del Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/genebank>) y con la ayuda de un programa de computadora se obtuvieron secuencias de no más de 20 pb que no se repitieran dentro de éste o en otro cDNA y que no fueran complementarias entre si o consigo mismas.

33

Isoforma del TGF- β	Secuencia		Tamaño del amplificado	Temperatura de alineado
	sentido	antisentido		
TGF- β 1	5'TCACCCGCGTGCTAATGGTG3'	CCGTGACGAAGGGCTTACAG	298 pb	63°C
TGF- β 2	5'ACCTTTTGTCTCTGCATCT3'	AAAGCGGACGATTCTGAAGT	374 pb	58°C
TGF- β 3	5'AACCCACACCTGATCCTCAT3'	CCTCAGCAGAAGTTGGCATA	357 pb	60°C
Receptor I	5'TGTCAITGCTGGTCCAGTCTG3'	CTCTGCCTCTCCGAACCATG	357 pb	64°C
Receptor II	5'TCGCCGAGGTCTACAAGGCCA3'	TGTCATTGCTGGTCCAGTCTG	357 pb	60°C
β - actina	5'GGTCTTCAAACATGATCTGGG3'	5'GGGTGAGAAGGATTCCTATG3'	245 pb	55°C

Tabla 2. Oligonucleotidos específicos para las isoformas de TGF- β , sus receptores y β - actina.

RT-PCR *in situ*

Retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa *in situ*.

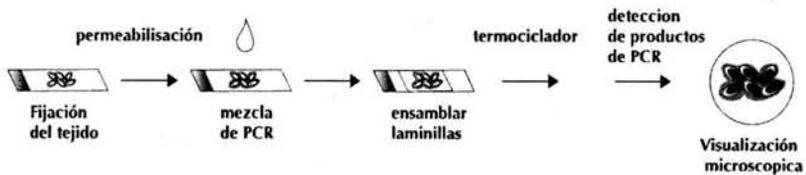
Para la RT-PCR *is*, a partir de los tejidos embrionarios fijados en etanol se hicieron cortes de 3 μ m y se extendieron en laminillas previamente tratadas con amino-silano (SIGMA) 2% y expuestas a luz UV durante toda la noche. Las laminillas se desparafinaron en placa de calentamiento a 60°C durante toda la noche y se lavaron en xileno (J.T.Baker) a 37°C seguidos de dos lavados sucesivos de xileno a temperatura ambiente por 10 minutos cada uno. Los tejidos se lavaron en Etanol (J.T.Baker) fresco y se hidrataron a través de gradientes de soluciones acuosas de Etanol (75, 50 y 25%) hasta agua DEPC (SIGMA) fresca, 10 minutos en cada uno a temperatura ambiente.

La permeabilización del tejido se hizo con HCl 0.02 M (Merck) durante 10 minutos, después se lavo con amortiguador de fosfatos (PBS) 1x por 3 minutos; para eliminar proteínas se incubo con Proteinasa K 1mg / ml (SIGMA) durante 30 minutos a 37°C, para inactivar esta enzima se llevo a ebullición por 15 segundos. Para reducir los niveles de fosfatasa alcalina endógena, se sumergieron los cortes de tejido, en ácido acético 20% durante 15 segundos y se restablecieron condiciones fisiológicas con PBS pH 7.3 por 2 minutos y agua DEPC.

Para evitar la unión de los iniciadores a DNA genómico durante la transcripción inversa fue necesaria una pre-digestión de la muestra con DNasa, para lo cual se incubo por 15 minutos a temperatura ambiente con una mezcla de amortiguador 10x [500 mM KCl, 100mM Tris-HCl, pH 8.3], DNasa I (grado Biología molecular GIBCO BRL) y agua-DEPC, se agregó 3 μ l EDTA (GIBCO BRL) para inactivar la enzima por 10 minutos a 65°C, y PBS pH 7.3 por 2 minutos.

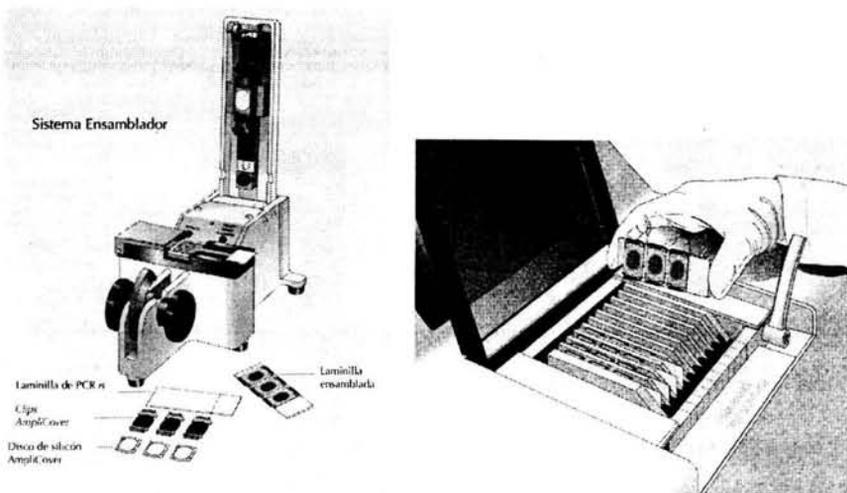
Para la retrotranscripción o transcripción inversa (RT), se puso sobre el tejido una mezcla de Oligo dT (GIBCO BRL), amortiguador 5x [250 mM Tris-HCl (pH8.3), 375 mM KCl, 15mM MgCl₂] (GIBCO BRL), DTT 0.1 mM (GIBCO BRL), mezcla de dNTPs 10 mM (Grado PCR GIBCO BRL) y enzima M-MLV (moloney murine leukaemia virus) (GIBCO BRL). Esta mezcla se incubó por 60 min. a 37°C y por 15 min. a 70°C, para detener la actividad de la enzima. Para eliminar el RNA restante se incubó con RNAsa, por espacio de 20 min. a 37°C. y se fijo la muestra en para-formaldehído al 4%, durante 6 min. a 4°C, se restablecieron condiciones fisiológicas con un amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7.3).

Para la PCR *is*, se preparo una mezcla de reacción para la cual se utilizó amortiguador de PCR 10x [200 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl], mezcla de dNTPs 10 mM marcados con digoxigenina (GIBCO BRL), MgCl₂ 50 mM (GIBCO BRL), oligonucleótidos 100 mM sentido y antisentido específicos para las tres isoformas del TGF-β, sus receptores y β-actina como control positivo, Taq DNA polimerasa 5U/μl (GIBCO BRL) y agua-DEPC para un volumen final de 50 μl, suficiente para cubrir el tejido.



Para la retrotranscripción y la PCR, se utilizó un sistema de clip (Ampli Cover Clips y Ampli Cover Disc, Perkin Elmer GeneAmp In situ PCR System 1000), en el cual, se utiliza un clip metálico y un disco de silicón, que protege la muestra y que permite mantener

un volumen de la mezcla de reacción de 50 μ l y un rango de temperatura constante en todo el tejido durante toda la PCR, evitando la evaporación de la mezcla de reacción.



Sistema ensamblador de laminillas y Termociclador de laminillas PERKIN ELMER GENE AMP In Situ SYSTEM 1000 36

Las muestras se procesaron en un termociclador de laminillas (PERKIN ELMER GENE AMP In Situ SYSTEM 1000), el equipo se programó de la misma manera que para el PCR convencional.

Para el sistema de detección se utilizaron anticuerpos anti-digoxigenina (GIBCO, BRL) en una dilución 1:500 en un amortiguador de TBS (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) y suero fetal bovino 2%, se incubó en cámara húmeda durante 30 min. Se lavó 3 veces en TBS durante 10 min. Se incubó con NBT (Nitro azul de tetrazolio) – BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato) (Boheringer) en una dilución 1:50, por un periodo de 30 min en cámara húmeda, protegido de la luz. Después de lavar 2 veces con TBS durante 10 min, se lava con agua desionizada y se contrasta con un colorante ácido, Nuclear Fast Red (Nuclear Fast red 0.1% y Sulfato de amonio 5%).

RESULTADOS

RT-PCR DE TGF- β 1, 2 Y 3 Y SUS ISOFORMAS EN HOMOGENIZADO EMBRIONARIO.

La RT-PCR para las diferentes isoformas de TGF- β y sus receptores, a partir de la extracción de RNA total de homogenizado embrionario en diferentes etapas de gestación (10, 12 y 14 días de gestación), presentó un marcado incremento para las isoformas del TGF- β (1 y 2) mientras que esta elevación es menos evidente en TGF- β 3. En contraste la expresión del RI disminuyó gradualmente y fue más estable para el RII (Figuras 3 a 7). La estimación de estos cambios en todos los marcadores se realizó al comparar la expresión de β -actina (Figura 8) como transcrito constitutivo. Debido a que se trabajo con homogenizados de embriones completos, no fue posible, determinar el origen de estas citocinas (materno o fetal) ni el lugar donde podrían ejercer su acción biológica por medio de esta metodología.

37

Amplificación de las isoformas de TGF- β y sus receptores en homogenizados embrionarios

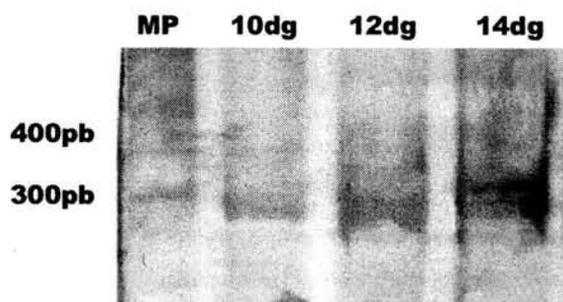


Fig 3. Producto de amplificación del cDNA de TGF- β 1 de 298 pb

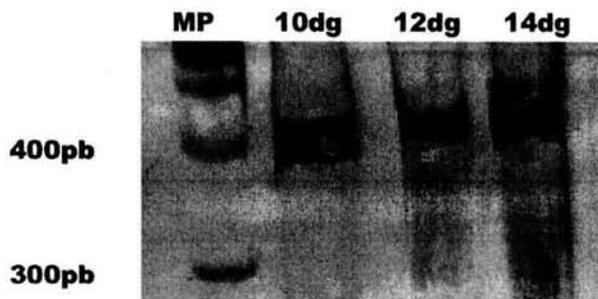


Fig 4. Producto de amplificación del cDNA de TGF- β 2 de 374 pb

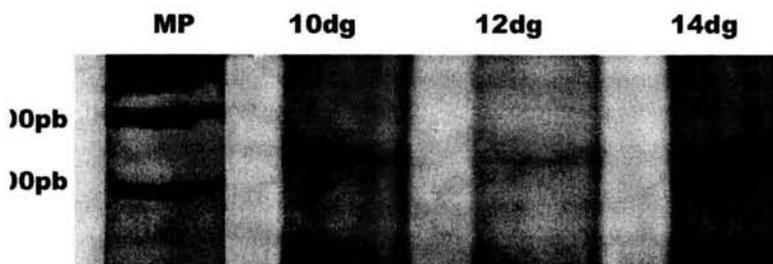


Fig 5. Producto de amplificación del cDNA de TGF- β 3 de 357 pb

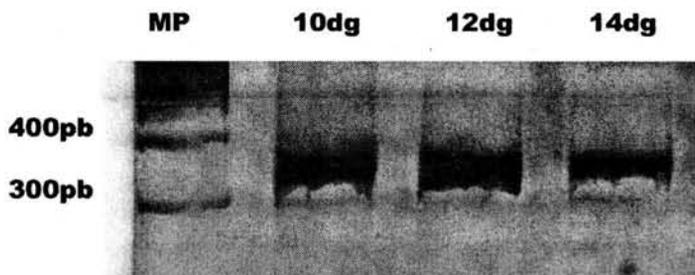


Fig 6. Producto de amplificación del cDNA de Receptor I de TGF- β de 357 pb

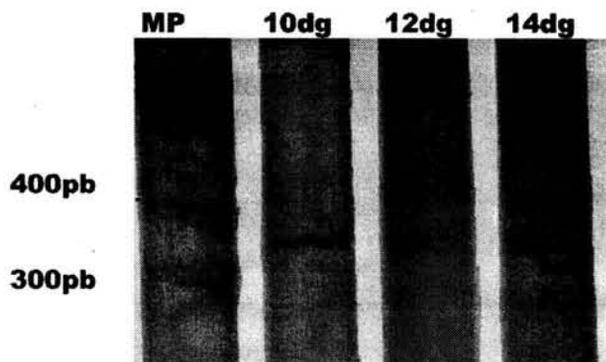


Fig 7. Producto de amplificación del cDNA del Receptor II de TGF- β de 357 pb

39

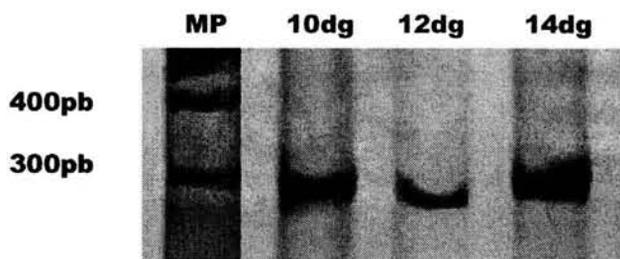


Figura 8. Producto de amplificación del cDNA de β - actina de 298 pb como producto constitutivo

INMUNOHISTOQUIMICA.

Mediante inmunohistoquímica se evaluó la presencia de las isoformas β 1 y 2 de TGF- β las cuales estuvieron presentes solo en la región placentaria y el trofoblasto durante los primeros días de gestación (día 10 dg), mientras que TGF β 3, fue negativo (fig 9a,10a,11a). Al avanzar el desarrollo embrionario la expresión de las isoformas se va haciendo más intensa hacia las regiones de diferenciación y proliferación celular. Para el día 12 de gestación el embrión mostró inmunoreactividad para las isoformas β 1 en la región torácica (en corazón y pulmón), así como en SNC (tejido neuroencefalico). La expresión de β 2 y β 3 fue menor o negativa comparada con β 1 y estuvo limitada a corazón y tejido neuroencefalico (fig. 9b,10b,11b). El patrón de inmunoreactividad fue similar para las tres isoformas, acentuándose la expresión de TGF β 1 en corazón, pulmón y tejido nervioso en el día 14 de gestación (fig. 9c,10c,11c).

Los receptores I y II empiezan a tener mucha expresión para el día 10 en placenta y tejidos materno-fetales (fig. 12a,13a); conforme avanza el desarrollo se encontró la perdida gradual de dicha expresión placentaria y materno-fetal. Por otra parte, el RI se empieza a expresar en menor cantidad y no hay expresión del RII durante el día 12 post coitum en tejido embrionario a pesar de que involucra zonas de organogénesis temprana o zonas que sufren proliferación y diferenciación tempranas como son tejido nervioso, corazón y pulmón (fig 12b,13b). Para el día 14 de gestación la expresión de estos receptores se empieza a recuperar sobre todo en corazón y tejido neuroencefalico (fig. 12c,13c), notándose una mayor actividad de la proteína del RII durante esta etapa (Tabla 3).

TGF- β 1.

Figura 9a TGF- β 1 10dg

10 dg. Trofoblasto (\sphericalangle) presenta una tinción intensamente positiva, al igual que la unión materno - fetal (\rightleftharpoons), perdiéndose hacia la periferia.

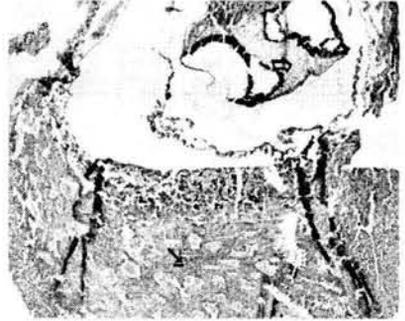
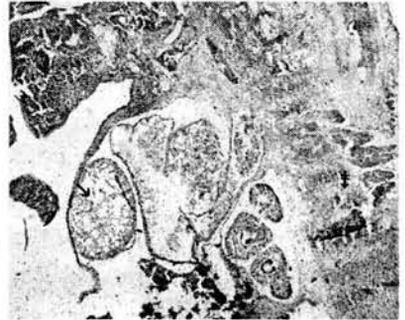


Figura 9b TGF- β 1 12dg

12 dg. El Corazón (\sphericalangle) y el epitelio bronquial, presentan una tinción intensamente positiva al igual que el tejido mesenquimal. En cerebro y somitas presentan una tinción intensamente positiva(\ddagger).



41

Figura 9c TGF- β 1 14dg

Presentan tinción positiva en células en corazón(\sphericalangle) y epitelio bronquial



TGF- β 2.

Figura 10a TGF- β 2 10dg

10 dg. La unión materno fetal(↘) y el trofoblasto (↗) presentan reacción positiva a TGF- β 2.

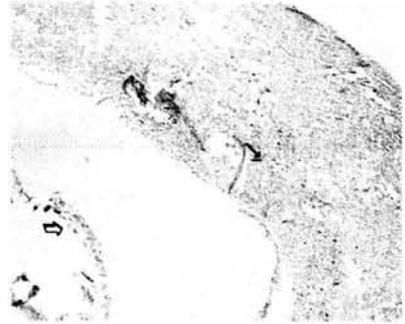
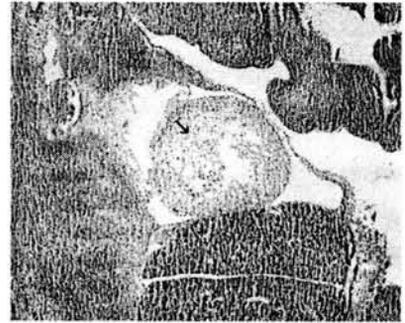


Figura 10b TGF- β 2 12dg

12 dg. En neuroblasto y tubo neural son positivas. La tinción es de menor intensidad en corazón(↘), y no hay inmunoreactividad en pulmón.



42

Figura 10c TGF- β 2 14dg

14 dg. Se presenta inmunoreacción en tejido cardiaco, que incluye al pericardio y miocitos cardiacos (↘).



TGF- β 3

Figura 11a TGF- β 3 10dg

10 dg. Esta fase embrionaria no presentó inmunoreactividad.



Figura 11b TGF- β 3 12dg

10dg. Esta fase embrionaria presentó una ligera inmunoreactividad en corazón(↘).

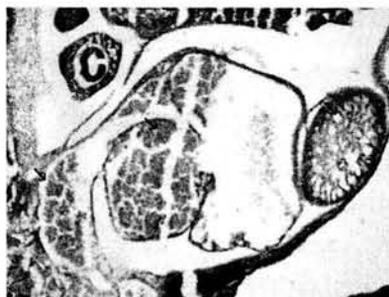
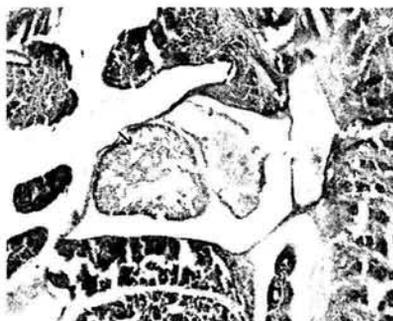


Figura 11c TGF- β 3 14dg

14 dg. Se encontro tinción positiva en tejido cardiaco, así como en la pared auriculo-ventricular (↘).



Receptor I.

Figura 12a RI 10dg

10 dg. La porción materna (↘) es positiva, las células endoteliales, vellosidades del trofoectoblasto (⇨) presentan positividad hacia las regiones periféricas.

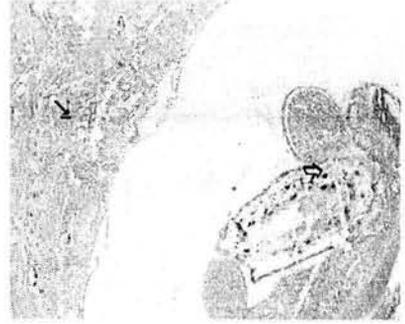
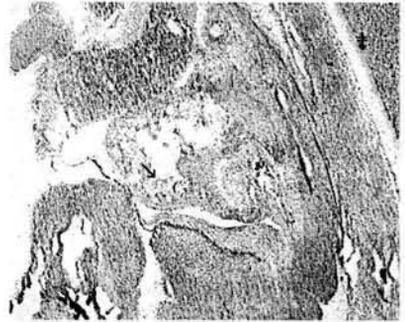


Figura 12b RI 12dg

12 dg. Intensa inmunotinción en células musculares primitivas del corazón (↘), pero menos intensa en sistema nervioso (‡).



44

Figura 12c RI 14dg

14 dg. En epitelio bronquial hay reacción intensamente positiva, la inmunoreactividad es menos intensa en músculo cardíaco (↘) y en citoplasma de células de tejido nervioso (‡).



Receptor II.

Figura 13a RII 10dg

10 dg. Presenta positividad en el embrión completo. Intensa tinción en placenta (↘) y en vellosidades trofoectoplásticas (⇨).

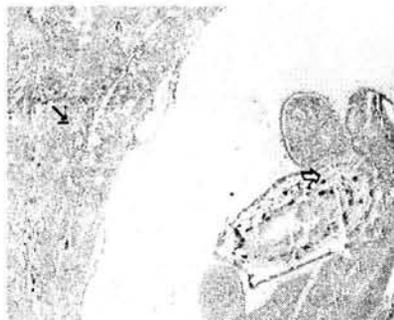


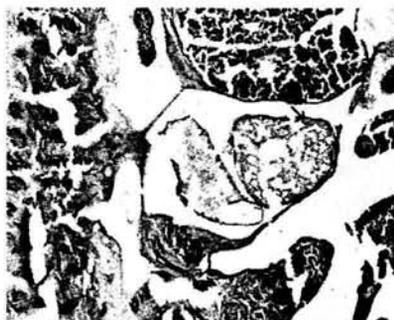
Figura 13b RII 12dg

12 dg. En esta fase de embriogenesis la inmunoperoxidasa es negativa.



Figura 13c RII 14dg

14dg. Presenta inmunoreactividad células de músculo cardiaco (↘).



		INMUNOHISTOQUIMICA														
		10 dg					12 dg					14 dg				
		β1	β2	β3	RI	RII	β1	β2	β3	RI	RII	β1	β2	β3	RI	RII
Torax	corazón						3	2	+/-	1	-	3	3	+/-	+/-	1
	Pulmón						2			+/-		2			1	
S.N.C	T. Neuroencefalo						2	+/-	1	1		2			1	1
	M. Espinal									1						
Embrión	Placenta /materna	3	2	-	1	3										
	Embrión	3		-	1	+/-										
	Trofoblasto	3	+/-	-		+/-										

Tabla 3. Zonas que resultaron positivas en la Inmunohistoquímica para TGF-β 1, 2, 3 y sus receptores I y II, en el embrión de rata. (1 positivo; 2 moderadamente positivo; 3 intensamente positivo; - negativo; +/- ligeramente positivo).

RT – PCR *in situ*.

Al aplicar esta técnica se lograron definir detalles respecto a los tejidos y células en los cuales se lleva a cabo la transcripción de los diferentes isoformas de TGF-β y sus receptores. Además, se pudo correlacionar la presencia del RNAm con la síntesis de proteínas (Tabla 3 y 4).

La expresión de RNAm de TGF-β1,β2 y β3 durante el día 10 de gestación fue notablemente intensa, sobre todo en la región materno-fetal y el trofoblasto (fig. 14a,15a,16a). El transcrito del receptor RII de TGF-β, mostró una expresión menor pero positiva en la región placentaria, no así el receptor RI que fue negativa (fig. 17a,18a). Para el día 12 de gestación los tejidos que mostraron una expresión temprana e intensa del mensajero de TGF-β1,2 y 3 fueron los ubicados en sistema nervioso central (fig. 15b,16b). Para el día 14 de gestación solamente encontramos expresión del RNAm de TGF-β2 en corazón (fig. 15c), mientras que el RNAm de TGF-β3 estuvo presente en SNC, en tejido neuroencefálico y medula espinal (fig. 16c).

El mensajero del RI no se expresa en tejido materno-fetal en el día 10 de gestación (fig.17a), pero el mensajero del RII se expresa debilmente y aumenta hacia el día 12 de gestación en los tejidos que típicamente sufren diferenciación y proliferación celular, como corazón y SNC, sin embargo, el RI no presentó expresión alguna durante esta etapa (fig. 17b,18b). Por el contrario, para el día 14 gestación, el RNAm del RI mostró una abundante expresión en zonas de organogénesis temprana , como corazón, pulmón y tejido nervioso, mientras que el RII fue negativo (fig. 17c,18c) para esta etapa (Tabla 3).

TGF- β 1

Figura 14a TGF β 1 10 dg

10 dg. La placenta (\sphericalangle) en su región materno-fetal (\Rightarrow) presenta expresión de esta citocina TGF β 1.

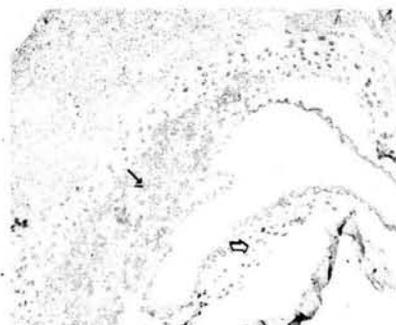
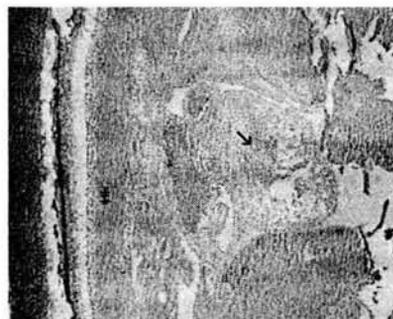


Figura 14b TGF β 1 12 dg

12 dg. La porción dorsal del embrión (tubo neural (\ddagger)), presenta marca positiva, y las células cardiacas (\sphericalangle) no presentan marca.



TGF- β 2

Figura 15a TGF β 2 10 dg

10 dg. Se desarrolla señal intensa en los componentes placentarios (\sphericalangle), trofoectoblasto (\curvearrowright), así como en células sanguíneas y canales vasculares de la placenta.



Figura 15b TGF β 2 12 dg

12 dg. Fue positivo en tubo neural y tejido neuroencefálico (\ddagger).



48

Figura 15c TGF β 2 14 dg

14 dg. El corazón, células circulantes y células hemáticas, son intensamente positivas (\sphericalangle).



TGF- β 3

Figura 16a TGF β 3 10 dg

10 dg. Intensamente positiva en la porción placentaria (\sphericalangle) no así en la porción embrionaria (\rightrightarrows).



Figura 16b TGF β 3 12 dg

12 dg. Intensamente positiva en mesénquima del sistema nervioso periférico, tanto en tejido neuroencefálico y medula espinal ($\#$). Todos los elementos cardiacos mostraron positividad para el RNAm de TGF- β 3 (\sphericalangle).



49

Figura 16c TGF β 3 14 dg

14 dg. Señal positiva en la periferia de la región encefálica ($\#$), entre piel y columna vertebral, así como en músculo cardiaco (\sphericalangle).



Receptor I

Figura 17a RI 10 dg

10 dg. RT – PCR is negativo.

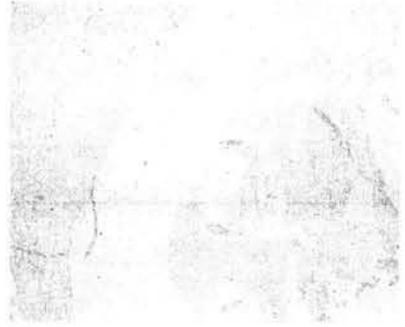
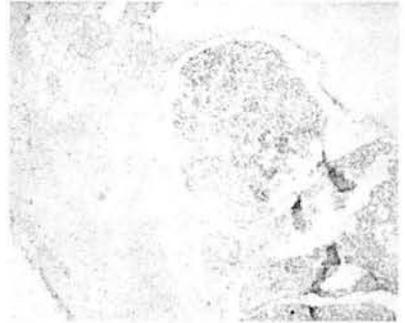


Figura 17b RI 12 dg

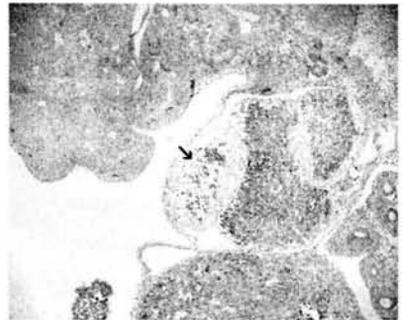
12 dg. Resultados negativos en esta fase de embriogenesis.



50

Figura 17c RI 14 dg

14 dg. Positivo en la cavidad torácica, músculo cardíaco, células ventriculares y aurículas (↘).



Receptor II

Figura 18a RII 10 dg

10 dg. Fue positiva en componentes placentarios (↘), pero en componentes trofoblasticos es negativa (↗).

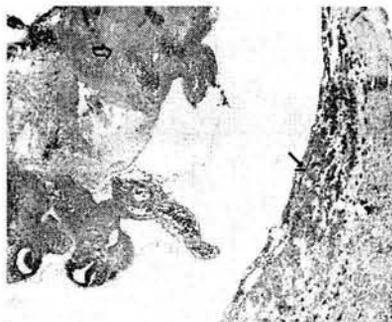


Figura 18b RII 12 dg

12 dg. Presenta positividad en músculo cardiaco, células ventriculares y aurículas (↘).

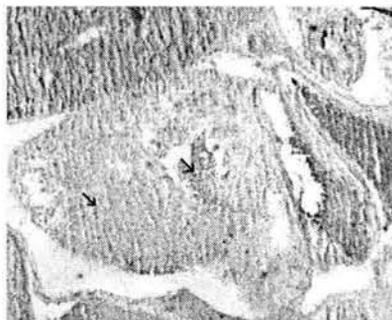
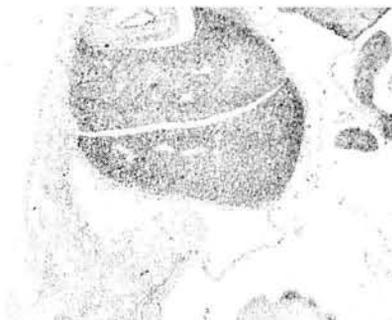


Figura 18c RII 14 dg

14 dg. Resultado negativo.



		RT - PCR is														
		10 dg					12 dg					14 dg				
		β1	β2	β3	RI	RII	β1	β2	β3	RI	RII	β1	β2	β3	RI	RII
Torax	Corazón							2		2		3		3		
	Pulmón							3		2				2		
S.N.C	T. Neuroencefalo						2	2	3		1			3	3	
	M. Espinal						2	2	3		2			3	2	
Embrión	Placenta /materna	3	3	3	-	2										
	Embrión		3													
	Trofoblasto	3	3												..	

Tabla 4. Zonas que resultaron positivas para RT-PCR is para TGF-β 1, 2, 3 y sus receptores I y II, en el embrión de rata. (1 positivo; 2 moderadamente positivo; 3 intensamente positivo; - negativo; +/- ligeramente positivo).

DISCUSIÓN

Desde los primeros trabajos en los cuales se describió la importancia de distintos factores de crecimiento en el desarrollo embrionario, destacó el estudio del TGF- β (Twardzik et al, 1982; Ellingsworth et al, 1986; Heine et al, 1987).

Distintos reportes han evaluado las diferencias en la expresión temporal y espacial de esta citocina, tanto en lo que se refiere a su transcrito (Wilcox and Derynck, 1988; Lehnert and Akhust, 1988; Pelton et al, 1989; Millan et al, 1991), como en la síntesis de proteína (Ellingsworth et al, 1986; Heine et al, 1987; Potts and Runyan, 1989; Thompson et al, 1989) y los resultados emanados de dichos estudios han permitido ampliar el conocimiento acerca de los procesos que regulan la organogénesis en el modelo murino.

Este trabajo intenta aportar nuevos datos acerca de la participación de las isoformas de TGF- β y sus receptores usando como método principal de detección del RNAm de estos marcadores a la técnica de RT-PCR *in situ*. Durante el estudio también se empleó la inmunohistoquímica a fin de lograr una evaluación de la síntesis proteica del TGF- β . 53

El estudio de las isoformas de TGF- β y más recientemente de sus receptores ha permitido determinar que algunos cambios en la expresión de esta proteína, así como del transcrito tienen relación con los mecanismos de proliferación y diferenciación celular los cuales son esenciales durante el desarrollo embrionario (Massagué, 1990; Attisano et al, 1994; López-Casillas, 1998). Al revisar la literatura, es posible apreciar que distintos grupos de investigadores han enfatizado la importancia que tiene este factor de crecimiento en las etapas tempranas de la organogénesis (Sporn and Roberts, 1986; Wilcox and Derynck,

1988; Cheng et al, 1993; Letterio et al, 1994; Letterio and Bottiger, 1998; Blewett et al, 1995; Sanford et al, 1997).

Por otra parte, es evidente que algunas diferencias en los resultados obtenidos en estudios anteriores, especialmente en cuanto a la localización del TGF- β , pueden ser explicados al menos parcialmente por las características que distinguen a los métodos que se han empleado en la detección de esta citocina.

En cualquier caso, la interpretación de la trascendencia biológica del TGF- β debe tener como base la aplicación de métodos que generen información detallada y precisa respecto a su localización y expresión temporal y espacial.

La identificación apropiada de una proteína mediante inmunohistoquímica depende de la especificidad del anticuerpo. Además, estos inmunoensayos no permiten distinguir si el TGF- β presente en el tejido puede ser de origen materno o embrionario, ⁵⁴ y simplemente localizan el sitio donde esta proteína se produce, almacena ó la ubicación en la que ejerce su acción biológica. En este estudio inmunohistoquímico utilizamos anticuerpos policlonales específicos para las isoformas de TGF- β y sus recéptores y encontramos que TGF- β 1, β 2 y sus receptores (RI y RII) estuvieron presentes en tejido placentario. A partir del día 12 gestación las isoformas y sus receptores se hicieron evidentes mediante su inmunoreactividad tanto en el tejido fetal como en el compartimiento materno.

La PCR es un método altamente sensible y específico. Se acepta que es más sensible que la hibridación puesto que el proceso de amplificación incrementa sustancialmente la capacidad de detectar un número limitado de copias de DNA ó RNA. Su especificidad es alta siempre y cuando se seleccione una secuencia de iniciadores

(oligonucleótidos) adecuados, que permitan identificar un solo blanco a partir del ácido nucleico que se pretende analizar (Gu, 1995; Luque and Herráez, 2001). Debido a que es una técnica que tiene la capacidad de detectar pequeñas cantidades de RNAm cuando se usa la variante RT-PCR, que incluye un proceso de retrotranscripción no es raro encontrar un gran número de estudios aplicados a la embriogénesis. En trabajos anteriores en los cuales se ha determinado al TGF- β mediante RT-PCR, se ha logrado identificar que su RNAm se expresa durante la preimplantación de embriones de ratón en estado de morula y durante todo el desarrollo embrionario (Mummery, 2001).

En este trabajo se obtuvieron homogenizados de embriones murinos en diferentes fases del desarrollo y con estas muestras se logró detectar el transcrito de las diferentes isoformas de TGF- β y sus receptores al aplicar la RT-PCR convencional o en tubo. Aunque se encontró que de acuerdo a la progresión del desarrollo embrionario había distintos niveles de expresión de TGF- β 1, β 2 y β 3, en especial cuando se evaluó el período de 10 a 14 días de gestación, también se apreció que durante estas fases coincidía la presencia de los receptores de esta citocina. Al emplear la RT-PCR *in situ*, que es una variante que permite identificar las células o tejidos individuales que expresan un transcrito, se encontró que durante el día 10 dg, las isoformas TGF- β 1, β 2 y β 3 predominaron en placenta y trofoblasto, lo que coincidió con una baja expresión del receptor RI. En los siguientes días de gestación (12 y 14 dg) los transcritos de las tres isoformas de TGF- β estuvieron localizados principalmente en los tejidos embrionarios y fueron más abundantes en la región neural. Sólo el TGF- β 3 y el receptor RII estuvieron presentes en el primordio de corazón, pulmón y sistema nervioso. Al evaluar estos resultados respecto a los hallazgos obtenidos mediante

inmunohistoquímica se encontró que la expresión de los RNAm y la síntesis de TGF- β coincidieron en cuanto a su localización y fase de desarrollo embrionario.

Esto concuerda con estudios previos que tienen como base el uso de la RT-PCR en tubo, en los cuales se enfatiza la necesidad de apoyarse con técnicas de inmunohistoquímica y/o hibridación *in situ*, que aporten evidencias directas acerca del tejido o células productoras de TGF- β tomando en cuenta sus acciones autócrinas y parácrinas (Lehnert and Akhurst, 1988; López-Casillas, 1998), en particular cuando se evalúa su participación en alguno de los estadios del desarrollo embrionario (Mummary, 2001).

Los grupos que han usado la hibridación *in situ* para identificar al TGF- β , han reportado un número de factores que pueden influir en los resultados, particularmente respecto a la especificidad del método. La sonda que se utiliza para esta metodología puede unirse inespecíficamente dependiendo de su tamaño y secuencia (Jakowlew, 1992; Luque and Herráez, 2001). Además, es posible obtener resultados erróneos si no se usan condiciones apropiadas de incubación, astringencia y detección.

Aunque en este trabajo se decidió explorar principalmente la utilidad de los métodos que detectan proteínas o transcritos al estudiar el TGF- β , también fue posible analizar con base en nuestros hallazgos algunos de los mecanismos en los que puede participar dicha citocina durante el desarrollo embrionario murino.

En trabajos iniciales sobre desarrollo embrionario y TGF- β se propuso que esta citocina podría intervenir en la transformación epitelio-mesénquima (Potts and Runyan, 1989). Al estudiar la porción atrioventricular de corazón, se encontró por métodos

inmunohistoquímicos que TGF- β puede participar en por lo menos dos procesos distintos de la transformación atrioventricular: activación y migración (Brown et al, 1996).

Durante el proceso de desarrollo embrionario el TGF- β activo presenta una distribución muy limitada mientras que el TGF- β latente está localizado abundantemente en matriz extracelular y puede ser activado *in vivo* por agentes caotrópicos, enzimas proteolíticas y pH extremo entre otros, dependiendo de las necesidades del embrión (Ghosh and Brauer, 1996). Actualmente se acepta que la señalización del TGF- β activo, depende de la presencia de al menos una de las isoformas de TGF- β y sus receptores RI y RII (Massague, 1996), los cuales se han encontrado colocalizados desde el inicio de la organogénesis en el tejido nervioso mediante técnicas inmunológicas (Mariano et al, 1998). A este respecto, nuestros datos de RT-PCR convencional mostraron que al menos una de las isoformas y los receptores (RI y RII) se expresan desde los primeros días de gestación constituyendo un requerimiento para la señalización de TGF- β . Además, nuestros hallazgos mediante inmunohistoquímica indicaron que una vez que se expresó el transcrito del TGF- β en tejidos embrionarios, se llevo a cabo la síntesis proteica.

La interacción de TGF- β con sus receptores es uno de los requisitos para que se lleven a cabo los procesos de diferenciación, proliferación, activación, migración y transformación, especialmente durante los primeros días de desarrollo embrionario (Attisano et al, 1994; Massagué, 2000). Aunque distintos autores han reportado que el TGF- β y sus receptores presentan diferentes niveles de inmunoreactividad desde los primeros días de gestación, tanto en la región materna, como la embrionaria, hay pocos estudios que evalúen la ubicación precisa del RNAm del TGF- β y que permitan aclarar la controversia

acerca de la participación del TGF- β de origen materno ó fetal durante la embriogenesis. Nuestros datos indican que la ubicación del transcrito de TGF- β y sus receptores difieren claramente al comparar el tejido materno y embrionario. Al realizar la *RT-PCR in situ*, se observó que el RNAm de las isoformas de TGF- β tiene una expresión temprana y se localiza casi exclusivamente en la región materna, mientras que los receptores se expresan tardíamente en el embrión, debiendo esperar hasta 10 días de gestación para que aparezca el receptor RII y 14 días más para encontrar el receptor RI. Un dato interesante al respecto, es que se ha descrito que en el proceso de implantación embrionaria es necesaria la presencia del TGF- β , el cual parece ser proporcionado por la madre. El estudio de ratones *knockout* para TGF- β ha aportado otros datos experimentales a este respecto. Los embriones que carecen de TGF- β (*knockout*) son incapaces de producir su propia proteína y a pesar de que estos animales pueden nacer, presentan algunas deficiencias en su desarrollo o mueren inmediatamente después del nacimiento por graves problemas inflamatorios (Letterio et al, 1994; Letterio and Bottinger, 1998). Adicionalmente, se ha descrito que el TGF- β de origen materno puede regular la respuesta inmune materna y que su producción puede evitar el rechazo durante el desarrollo embrionario (Mummery, 2001).

58

En definitiva el TGF- β y sus receptores parecen intervenir en el mantenimiento de la homeostasis en muy diversos niveles del desarrollo embrionario. Entre otras funciones, tienen la capacidad de regular la proliferación de las células del sistema inmune y su extravasación a distintos tejidos (Kulkarni et al, 1993). Los ratones nulos para TGF- β 1 son incapaces de producir tanto el RNAm como la proteína y mueren rápidamente después de 3 o 4 semanas de edad,

cuando desarrollan una rápida y excesiva respuesta inflamatoria con infiltrados masivos de linfocitos y macrófagos en muchos órganos, pero principalmente en corazón y pulmón (Letterio et al, 1994).

En estudios recientes basados en la modificación de genes ó en modelos *in vitro* han surgido nuevas evidencias que enfatizan la importancia del TGF- β en la embriogenesis. Se ha observado que los ratones *knockout* para el TGF- β 2 presentan anomalías en el proceso de apoptosis durante el desarrollo del corazón (Poelmann, 2000). Al estudiar al TGF- β 3 como un iniciador de la transformación endotelio-mesénquima, se ha encontrado que los BMP2 (proteína morfológica de hueso-2) pueden ser importantes regulando sinérgicamente con el TGF- β 3 dicha transformación endotelial y el desarrollo del embrión (Yamagishi et al, 1999). Además, algunos autores describen que el TGF- β tiene capacidad para modular un miembro de las SMAD con capacidad inhibitoria (cSmad6, chicken Smad6) que se encuentra ampliamente expresada durante el desarrollo del corazón, ojos y extremidades (Yamada et al, 1999) y que la activación de otras SMADs pueden influir en la transcripción de genes que actúan directamente sobre ciclo celular, tales como la p21, inhibiendo la proliferación celular (Moustakas et al, 2002). Por lo anterior, sería interesante estudiar la participación de estos factores y otros factores en el modelo *in vivo* mediante RT PCR *in situ*.

CONCLUSIONES.

- ◆ Las isoformas de TGF- β (β 1, β 2 y β 3) y sus transcritos tienen diferentes patrones de expresión tisular durante el desarrollo embrionario.
- ◆ Los receptores RI y RII de TGF- β se expresaron en forma simultánea con al menos una de las isoformas de TGF- β a lo largo de la embriogénesis murina.
- ◆ La expresión temporal y coordinada de TGF- β 1, β 2 y β 3 y sus receptores sustenta que estos mediadores tienen un papel esencial en el control de la diferenciación y proliferación celular.
- ◆ Las técnicas de RT-PCR *in situ* e inmunohistoquímica permitieron conocer la acción biológica y el origen de TGF- β , así como la distribución de las isoformas y receptores, durante la organogénesis murina.

REFERENCIAS.

- ◆Assoian RK., Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB. *Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification and characterization.* *J. Biol Chem* 1983 Jun 10; 258(11):7155-60.
- ◆Attisano L, Wrana JL, Lopez-Casillas F, Massague J. *TGF- β receptor and actions,* *Biochimia et Biophysica Acta.* 1994 Mayo 26;1222(1) 71-80.
- ◆Blewett, CJ, Cilley RE, Ehrlich HP, Dillon PW, Blackburn KH, Krummel TM. *Regenerative healing of incisional wounds in murine fetal lungs maintains in organs culture.* *J. Ped. Sur.* 1995, 30:945-948.
- ◆Boyer AS, Ayerinskas II, Vincent EB, McKinney LA, Weeks DL, Runyan RB. *TGFbeta2 and TGFbeta3 have separate and sequential activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart.* *Dev Biol* 1999 Apr 15;208(2):530-45
- ◆Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV. *Antibodies to the Type II TGFbeta receptor block cell activation and migration during atrioventricular cushion transformation in the heart.* *Dev Biol* 1996 Mar 15;174(2):248-57
- ◆Butler, H. & Juurlink, B.H. *An atlas for stanging mammalian and chick embryos.* CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1987.
- ◆Camenisch TD, Molin DG, Person A, Runyan RB, Gittenberger-de Groot AC, McDonald JA, Klewer SE. *Temporal and distinct TGF- β ligand requeriments during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis.* *Dev Diol.* 2002

Aug1:248(1):170-81.

- ◆ Carlson, B. *Embriología básica de Patten*. Nueva Editorial Interamericana. 1990 México.
- ◆ Cheng H L, Schneider S L, Kane CM, Gollnick SO, Grande C, Thompson D, Pietrza KE, Tomasi TB. TGF b2 gene and protein expression in maternal and fetal tissues at various stages of murine developmental. *J Reprod. Immunol.* 1993 Nov;35(2): 133-48.
- ◆ Chomczynski, P. & Sacchi, . *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *N. Anal. Biochem.* 1987 Apr, 162(1):156-9.
- ◆ Derynck R, Jarrett JA, Chen E Y, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV. *Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transform cells*. *Nature.* 1985 Aug 22-28;316 (6030):701-5
- ◆ Derynck Rix, Xin.Hua Feng. *TGF-β receptor signaling*. *Biochimia et Biophysica Acta*, 1988, 1333 (97) F106-F150.
- ◆ Dichmann DS, Miller CP, Jensen J, Scott HR, serup P. *Expression and misexpression of members of the FGF and TGF-β families of growth factors in the developing mouse pancreas*. *Dev Dyn* 2003 Apr, 226 (4):663-74.
- ◆ Ellingsworth LR, Brennan JE, Fok K, Rosen DM, Bentz H, Piez KA, Seyedin SM. *Antibodies to the N-terminal portion of cartilage-inducing factor A and transforming growth factor beta: Immunohistochemical localization and association with differentiating cells*. *J Biol Chem* 1986 Sep 15;261(26):12362-7
- ◆ Flanders KC, Ludenke G, Engels S, Cissel DS, Roberts AB, Kondaich P, Lafyatis R, Sporn MB, Unsicker K. *Localization and*

actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. *Development*. 1991 Sep;113(1):189-91.

◆Gilbert Scott P. *Development Biology Third edition Sinauer Associates INC*. 1991. pp. 891 USA.

◆Ghosh S, Brauer PR, *Latent transforming growth factor-beta is present in the extracellular matrix of embryonic hearts in situ*. *Dev Dyn* 1996 Feb;205(2):126-34

◆Gu J. *In Situ PCR and Related Technogy*, Edition, Eaton Publishing Co. 1995 USA.

◆Haase AT, Retzel EF, Staskus KA. *Amplification and detection of lentivirus DNA in side Cell*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:4971-4975.

◆Heras A, Phillips T, key M. *Immunostaining of lymphocyte markers in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using catalyzed signal amplification*. DAKO Corporation. 1997.

◆Heine U, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam HY, Thompson NL, Roberts AB, Sporn MB. *Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo*. *J Cell Biol* 1987 Dec;105(6 Pt 2):2861-76

◆Ignotz, RA. & J. Massagué. *Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix*. *J. Biol Chem* 1986 Mar 25;261(9):4337-45.

◆Jakowlew SB, *Pattern of expression of TGF β4 mRNA and protein in the developing chicken embryo*. *Dev Dyn*. Dec 195(4):276-89.

◆Kaufman, M.H. *The atlas of Mouse Development*. 1995. Academic Press. Harcourt Brace & Company, Publishers.

◆Kulkarni AB, Huh C, becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders

KC, Roberts AB, Sporn MB, Wardd , Karlsson S. *Transforming growth factor β 1 null in mice causes excessive inflammatory response and early death*. Proc. Natl Acad Sci USA. 1993 Jan; 90; 770-774.

◆Lewis Fraser, *An Approach to in situ PCR*, PE Applied Biosystems, 1996 USA

◆Lehnert SA, Akhurst RJ. *Embryonic expression pattern of TGF beta type-1 RNA suggests both paracrine and autocrine mechanisms of action*. Development 1988 Oct;104(2):263-73

◆Letterio J, Geiser AG, kulkarni AB, Roche NS, Sporn MB, Roberts AB. *Maternal rescue of transforming growth factor- β 1 null mice*. Science. 1994 Jun 24;264(5167):1936-38.

◆Letterio J, Böttinger EP. *TGF- β Knockout and Dominant-Negative Receptor Transgenic Mice*. Mineral and electrolyte Metabolism. 1998;24:161-167.

◆Lewin's, Benjamin. *Genes VII*. Oxford University Press and Cell Press .2001.

◆López-Casillas F. *El lado oscuro y el lado brillante del TGF- β* . Mensaje bioquímico, vol XXII 1998.

◆Luque José and Angel Herráez. *Texto Ilustrado de Biología molecular e Ingeniería Genética*. Ediciones Harcourt, S.A. México. 2001.

◆Mariano JM, Montuenga LM, Prentice MA, CuttittaF, Jakowlew SB. *Concurrent and distinct transcription and translation of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in rodent embryogenesis*. Int. J. Dev. Biol. 1998. Nov.; 42(8):1125-36.

◆Massagué J..*The transforming growth factor- β family*. Annu. Rev. Cell. Biol. 1990 (6):597-641.

- ◆Massague J. TGF-beta signaling: receptors, transducers and Mad proteins. *Cell*. 1996 Jun. 28;85(7):947-50.
- ◆Massagué J. *TGF-β signal transduction*. *Annu. Rev Biochem.* 1998. 67:753-9.
- ◆Massage J. *How cells read TGF-β signals*. *Nature Reviews Mol. Cel. Biol.* 2000 dec. 1(3):169-78.
- ◆Millan FA, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ. *Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo*. *Development* 1991 Jan;111(1):131-43
- ◆Miller DA, Lee A, Pelton RW, Chen EY, Moses HL, Derynck R. *Murine transforming growth factor-beta 2 cDNA sequence and expression in adult tissues and embryos*. *Mol Endocrinol* 1989 Jul;3(7):1108-14.
- ◆Montuenga Lm, Mariano JM, Prentice MA, Cuttitta F, Jakowlew S. *Coordinate expression of transforming growth factor-β1 and adrenomedullin in rodent embryogenesis*. *Endocrinology* 1998 (9) 139; 3946-57.
- ◆Moustakas A, Pardalik, Gaal A, Heldin Ch. *Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation*. *Immunol lett.* 2002 Jun 3; 82(1-2):85-91.
- ◆Mummery CL. *Transforming growth factor beta and mouse development*. *Microsc. Res. Tech* 2001 Feb 15;52(4):374-86.
- ◆O'Rahilly, R, & Fabiola Müller. *Human Embryology and Teratology second edition*, 1996. Wiley-Liss New York. 468 pp.
- ◆Pelton RW, Nomura S, Moses HL, Hogan BL. *Expression of transforming growth factor beta 2 RNA during murine embryogenesis*. *Development* 1989 Aug;106(4):759-67
- ◆Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI.

Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. J Cell Biol 1991 Nov;115(4):1091-105

◆Pinar H, Thompson NI, Flandres KC, Sporn MB, Sung J, Rogers BB. *Distribution of transforming growth factor beta in a two-week-old human embryo.* Growth Factor. 1992;6 (3):203-8.

◆Poelmann RE, Molin D, Wisse LJ, Gitternberger-de Groot AC. *Apoptosis in cardiac development.* Cell Tissue Res. 2000. Jul;301(1):43-52.

◆Potts JD, Runyan RB. *Epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart can be mediated, in part, by transforming growth factor beta.* Dev Biol 1989 Aug;134(2):392-401

◆Roberts AB, Sporn MB. *Transforming Growth Factor - β : Recent Progress and New Challenger.* J. Cell Biology. 1992 Dec. 119(5)1017-1021.

◆Roberts AB, Sporn MB. *Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF- β).* Growth Factors. 1993;8(1):1-9.

◆Rojas-Espinosa. *Inmunología (de memoria).* Segunda edición, Editorial Medica panamericana. 374pp, 2001.

◆Sanbrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual.* Second Edition . Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 3 volume.

◆Sandberg M, Vuorio T, Hirvonen H, Alitalo K, Vuorio E. *Enhanced expression of TGF-beta and c-fos mRNAs in the growth plates of developing human long bones.* Development 1988 Mar;102(3):461-70

◆Sandberg, M, Autio-Harmanen H, Vuorio E. *Localization of the expression of types I, III, and IV collagen, TGF-beta 1 and c-fos genes in developing human calvarial bones.* Dev Biol 1988 Nov;130(1):324-34

◆Sanford LP, Ormsby I, Giffenberger-de Gract A, Sariola Hannu, Friedmas R, Bolvin G, Cardell E, Dotchman T. *TGF-β 2 Knockout mice have multiple developmental defects that are non'overlapping with other TGF - β Knockout phenotypes.* Development. 1997, 124, 2659 – 1670.

◆Sankar S, Mahooti-Brooks N, Centrella M, McCarthy TL, Madri JA. *Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2.* J Biol Chem 1995 Jun 2;270(22):13567-72

◆Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. *Transforming growth factor-β: Biological fuction and chemical structure.* Science. 1986Aug1;233(4763):532-4.

◆Ten Dijke P, Hansen P, Iwata KK, Pieler C, Fulkes JG. *Identification of another member of transforming growth factor type beta gene family.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998 July;85(13):4715-4719.

◆Thompson NL, Flanders KC, Smith JM, Ellingsworth LR, Roberts AB, Sporn MB. *Expression of transforming growth factor-beta1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice.* J. Cell Biol. 1989 Feb;108(2):661-9.

◆Twardzik DR, Ranchalis JE, Todaro GJ. *Mouse embryonic transforming growth factors related to those isolated from tumor cells.* Cancer Res 1982 Feb;42(2):590-3

- ◆ Unsicker K, Meier C, Kriegstein K, Sartor BM, Flanders KC. *Expression, localization, and function of transforming growth factor-beta in embryonic chick spinal cord, hindbrain, and dorsal root ganglia.* J Neurobiol 1996 Feb;29(2):262-76
- ◆ Wilcox JN, Derynck R. *Developmental expression of transforming growth factors alpha and beta in mouse fetus.* Mol Cell Biol 1988 Aug;8(8):3415-22.
- ◆ Wolpert, L. et al. *Principles of Development.* 1998. Current Biology, LTD, Oxford University Press. 484 pp.
- ◆ Yamada M, Szendro PI, Prokscha A, Schwartz RJ, Eichele G. *Evidence for a role of Smad6 in chick cardiac development.* Dev Biol 1999 Nov 1;215(1):48-61
- ◆ Yamagishi T, Nakajima Y, Miyazono K, Nakamura H. *Bone morphogenetic protein-2 acts synergistically with transforming growth factor-beta3 during endothelial-mesenchymal transformation in the developing chick heart.* Dev Biol 1999 Apr 15;208(2):530-45
- ◆ Zhao J, Bu D, Lee M, Slavkin HC, Hall FL, Warburton D. *Abrogation of transforming growth factor-beta type II receptor stimulates embryonic mouse lung branching morphogenesis in culture.* Dev Biol 1996 Nov 25;180(1):242-57.
- ◆ Zhao Y, Young S. *Expression of transforming growth factor- β type II receptor in a rat lung is regulated during development.* Ann. J. Physiol. 1995 Sep; 269(3pt1):L419-26.
- ◆ Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B. *Going mad with Smads.* The New England Journal of Medicine. 1999 Oct.(7) 341: 1144-1147.

ANEXO I

FUNDAMENTOS DE LAS TECNICAS EMPLEADAS.

Reacción en cadena de la polimerasa-.(del ingles polymerase chain reaction) PCR.

La PCR es una herramienta extremadamente sensible y relativamente directa para amplificar cantidades muy pequeñas de DNA o RNA. A partir de las cuales se pueden obtener millones o billones de copias idénticas de un gene, para detección, secuenciación clonación o diagnóstico (Gu, 1995).

EL DNA es una doble cadena de nucleótidos unida por puentes de hidrógeno de manera complementaria. La Adenina (A) se une siempre a una Timina (T) y la Citosina (C) siempre con una Guanina (G). Estos ácidos nucleicos están unidos unos a otros por uniones fosfodiester (Lewin's, 2001).

69

Para la PCR es necesario mantener tres gradientes de temperatura, que definen tres diferentes pasos: desnaturalización, alineamiento y extensión.

La doble cadena de DNA se desnaturaliza y separa en dos cadenas simples, a una temperatura de 94°C, una secuencia de ácidos nucleicos específica o iniciadores, no mayor de 15 a 22 ácidos nucleicos de longitud, sirve para iniciar y finalizar el sitio específico de unión para formar la cadena complementaria en dirección 5' - 3'. Esta alineación de iniciadores se lleva a cabo en un rango de temperatura de 45 a 65°C.

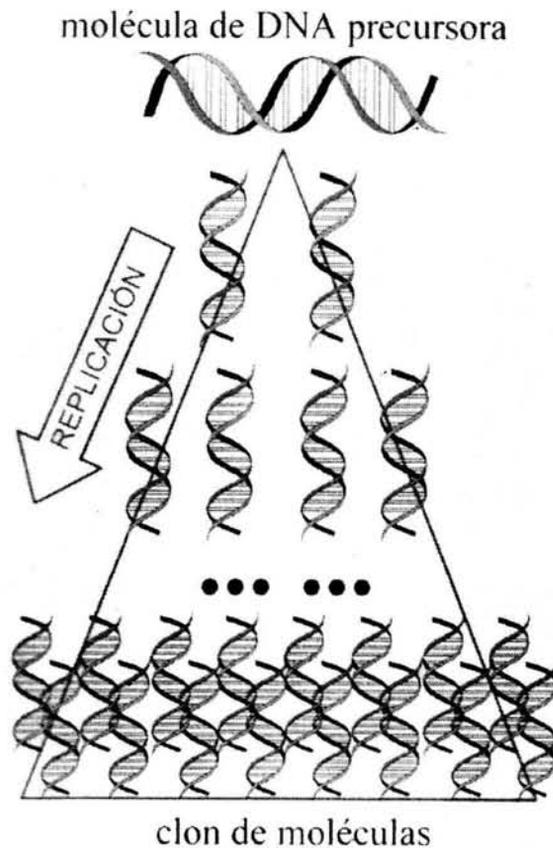
La Taq DNA polimerasa es una enzima capaz de formar una cadena

complementaria a partir de estas cadenas simples, en un rango de temperatura de 70 a 75°C y esta reacción de polimerización o extensión se lleva a cabo en presencia de Taq DNA polimerasa, cloruro de magnesio ($MgCl_2$), dNTP's e iniciadores.

Después del primer ciclo se tienen dos nuevas cadenas sintetizadas que sirven de molde o templado para las siguientes reacciones de PCR y esta crecerá de forma exponencial después de cada ciclo.

El producto final de la PCR puede detectarse por electroforesis, donde se separa el producto de acuerdo a peso molecular (Luque and Herráez, 2001).

PCR



Retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa - *in situ*

Del inglés polymerase chain reaction retrotranscription – *in situ* RT-PCR *in situ*.

La PCR *in situ*, es una técnica que permite localizar secuencias de DNA o RNA dentro de una población de células heterogéneas. Es una combinación del PCR convencional utilizado en biología molecular y la hibridación *in situ* utilizada en estudios morfológicos. Fue descrita en 1990 por Haase y colaboradores, para amplificar DNA lentiviral, y se ha ido modificando con el paso de los años dependiendo del objetivo a investigar (Haase, 1990).

RT-PCR *is*, es utilizado para detectar RNAm en concentraciones bajas dentro de la célula o tejido. Para esta técnica es necesario obtener un producto de cDNA por transcripción reversa, que es amplificado posteriormente *in situ*.

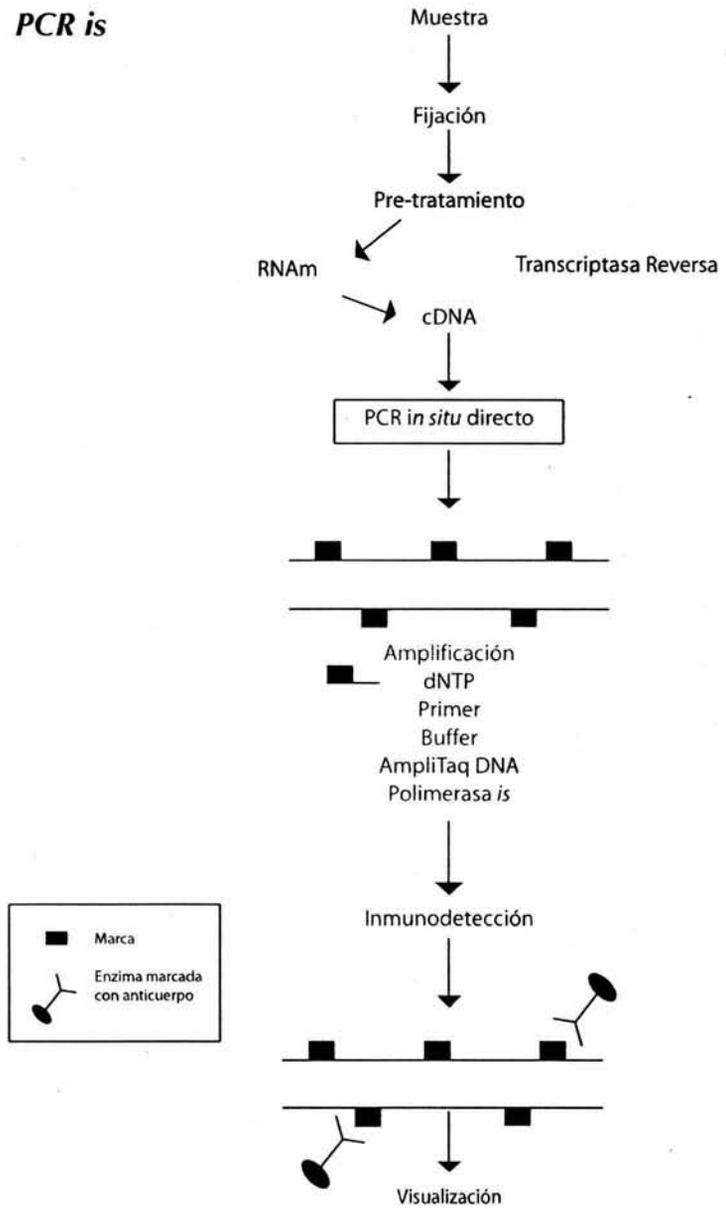
71

La detección de RT-PCR *in situ*, por el método directo utiliza una transcriptasa reversa viral termolabil, del tipo Moloney Murine Leukaemia Virus (MMLV) transcriptasa reversa.

Es necesario un tratamiento previo de las células o tejido con DNasa libre de Rnasa. La mezcla de la PCR *in situ* incluye dUTP marcado con digoxigenina, para la posterior amplificación a partir de cDNA producido por retrotranscripción (RT).

Durante la amplificación, el UTP marcado con digoxigenina se incorpora en el amplificado y estos pueden detectarse a través de un complejo enzima – anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina y su cromógeno específico como sustrato. Las células positivas se visualizan por precipitados azules que se detectan por microscopia de luz (Lewis, 1996).

PCR is



Transcripción inversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa *in situ* (RT-PCR *is*). Tomado de *An Approach to In Situ PCR*, 1996. PE Applied Biosystems.

Inmunohistoquímica.

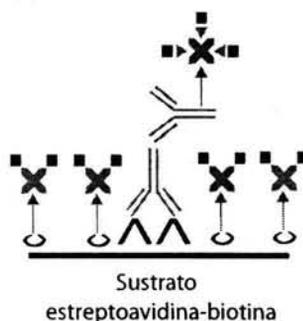
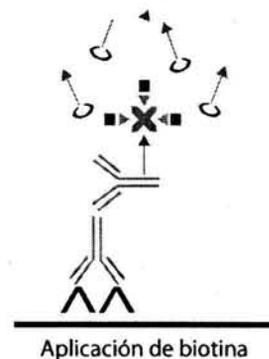
Las técnicas inmunohistoquímicas son utilizadas para visualizar o detectar antígenos propios de las células o de tejidos (Rojas-Espinosa, 2001). Utilizando un anticuerpo primario dirigido contra un antígeno específico acoplado o conjugado a una enzima biotinilada, para bloquear sitios inespecíficos se utiliza leche descremada, albumina o en este caso suero de cerdo. Un complejo streptoavidina-biotina-peroxido se une a un anticuerpo secundario biotinilado (Heras et al, 1997).

El anticuerpo acoplado a la enzima se hace evidente al adicionar el sustrato de la enzima más un cromógeno que permita la formación de productos coloreados, insolubles y estables, en el caso de la peroxidasa se utiliza el peróxido de hidrógeno como sustrato y la 3-3'diaminobenzidina como cromógeno (Heras et al, 1997).

Los productos se visualizan como puntos color marrón dependiendo de la cantidad de producto se correlaciona con la intensidad de la tinción.



73



ANEXO II

REACTIVOS Y SOLUCIONES.

Amino-silano 2%

Amino-silano	
(β -metacriloxipropil-trimetoxilano)	2 ml
Acetona	98 ml
Volumen final	100ml

PBS 1X

KCl	0.2 gr
K_2HPO_4	0.12 gr
NaCl	8 gr
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	2.16 gr
Ajustar pH a 7.3 y aforar a 1000ml con agua DEPC.	

74

H_2O_2 /MeOH 3%

H_2O_2	3 ml
MeOH	100 ml

Amortiguador de Hepes, $NaCl_2$ y $CaCl_2$. (HCN)

Hepes (N{2hidroxietil}piperazina-N'-(2-ácido etansulfónico))	10mM	2.383 gr.
$NaCl_2$	150mM	8.766 gr.
$CaCl_2$	2.6mM	0.293 gr.

Aforar a 1000 ml con agua destilada

HCN - TWEEN 20 0.1%

Tween 20 1 ml.

Aforar a 1000 ml con HCN

HCN - Suero de Cerdo 2%

Suero de cerdo 2 ml.

Aforar a 100 ml con HCN

3-3'Diaminobencidina 0.02 mM

DAB 0.004 gr

HCN 10 ml

H₂O₂ 4 ml

Mezclar y proteger de la luz.

Agua DEPC 0.1%

DEPC (Dietil pirocarbonato) 1ml

Aforar a 1000 ml con agua desionizada.

Agitar 12 hrs, esterilizar,

Agitar 12 hrs, esterilizar,

Agitar 12 hrs, esterilizar, almacenar a temperatura ambiente.

75

TBS

Tris-HCl 50 mM 0.61gr.

NaCl 150 mM 0.88 gr.

Ajustar a pH de 7.6 al Tris-HCl, mezclar el NaCl y aforar a 100 ml con agua DEPC.

TBS - MgCl₂

Tris-HCl 0.1 M 0.157 μ g.

NaCl 50mM 0.0292 μ g.

MgCl₂ 50mM 0.10165 μ g

Ajustar pH de 9.5 al Tris -HCl, mezclar los demás reactivos y aforar a 10 ml con agua DEPC.

TBS- Fab

Tris-HCl	10 mM	0.157 μ g.
NaCl	150mM	0.0876 μ g.

Ajustar pH de 7.5 al Tris -HCl, mezclar los demás reactivos y aforar a 10 ml con agua DEPC.

Agarosa 1%

Agarosa grado electroforesis	0.5 gr .
TAE 1X	50 ml.

Disolver por calentamiento, enfriar y vertir en camara de electroforesis, el tiempo de polimerización es de 5 a 10 min.

TAE 10X

Tris base	54gr.	
Acido acético glacial	25ml.	
EDTA (ácido etilendiamino- etra-acético)	0.5M pH 8	20 ml.

76

Gel de poliacrilamida al 40%

Stock de poliacrilamida al 40%	1.25 ml
Agua desionizada	3.25 ml
TBE 10x	0.5 ml
TEMED (N N N' N'-tetra-metil-etilendiamina	10 μ l
PSA (persulfato de amonio) 10%	25 μ l

Mezclar todos los reactivos y el tiempo de polimerización es de aproximadamente 5 minutos.

Acrilamida al 40% solución stock

Acrilamida	7.6 gr.
Bis-acrilamida	0.4gr.

Ajustar a 20 ml. con agua desionizada. Almacenar protegido de la luz.

TBE 10 X

Tris base	54 gr.	
Acido Bórico	27.5 gr.	
EDTA (ácido etilendiamino- tetra-acético)	0.5M pH 8	20 ml.

El EDTA solo se disuelve hasta que alcanza pH 8.

Mezclar los reactivos y aforar a 500 ml. Almacenar a temperatura ambiente

PSA 10%

Persulfato de amonio	1gr.
Agua desionizada estéril	10 ml.

Disolver, alicotear en tubos eppendorff y almacenar a 4° C.

Bromuro de Etidio 0.01%

Bromuro de Etidio	10µl
-------------------	------

Aforar a 100 ml de agua destilada.

Proteinasa K 10mg/ml solución stock

Proteinasa K	50mg
--------------	------

Aforar a 50ml de agua-DEPC, alicotear y guardar en congelación

Proteinasa K 1mg/ml

Apartir de la solución stock (10mg/ml)

Proteinasa K	5ml
--------------	-----

Aforar a 50ml de agua-DEPC estéril, almacenar a 4° C

Acido acético 20%

Ac. Acético glacial	20 ml.
---------------------	--------

Aforar a 100 ml de agua-DEPC estéril.

HCl 0.02M

Acido Clorhídrico 37 % 82.78 μ l

Diluir en 50 ml de agua-DEPC estéril.

Nuclear Fast-Red

Sulfato de amonio 5% 5 gr.

Agua-DEPC 100 ml.

Nuclear Fast Red 0.1% 0.1 gr.

Disolver por calentamiento, dejar enfriar a temperatura ambiente, filtrar y agregar 1 cristal de timol como preservativo, almacenar a temperatura ambiente.

Sorensen 0.38 M

Na_2HPO_4 2.69 gr

$\text{H}_2\text{ONaH}_2\text{PO}_4$ 2.27 gr.

Ajustar pH 7.3 y aforar a 50 ml con agua DEPC.

78

Para-formaldehído 8%

p-formaldehído 8 % 8 gr.

Agua DEPC 100 ml.

Disolver por calentamiento 60 a 70° C, ajustar pH 7.3 con NaOH 1N.

Para-formaldehído 4%

p-formaldehído 8% 30 ml.

Sorensen 0.38 M 30 ml.

Mezclar volumen a volumen.

Notas

Notas

Índice de Abreviaturas.

cDNA.	Ácido desoxinucleico complementario .
dg.	Días de gestación.
DNasa.	Inhibidor de DNA.
DEPC.	Dietil pirocarbonato.
ECM.	Matriz extracelular.
LAP.	Péptido asociado de latencia.
LLC.	Complejo latente.
LTBP.	Proteína latente de unión.
M-MLV.	Molones Murine Leukaemia Virus.
NBT-BCIP.	Nitroazul de tetrazoleo-5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato.
pc.	Post coitum
PCR.	Reacción en cadena de polimerasa.
PBS.	Amortiguador de fosfatos.
RNAm.	Ácido ribonucleico mensajero.
RNasa.	Inhibidor de RNA.
RT-PCR.	Retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa.
RT-PCR is.	Retrotranscripción de la reacción en cadena de la polimerasa in situ
RI.	Receptor I de TGF- β .
RII.	Receptor II de TGF- β .
TGF-β.	Factor de Crecimiento Transformante Tipo beta.
TGF-β1.	Isoformas del Factor de Crecimiento Transformante Tipo beta.