

## FUNCION DE DISTINTAS FORMAS DE FIBRONECTINA EN EL DESARROLLO DE FOLICULOS BOVINOS IN VITRO

ALEJANDRO A. COLMAN LERNER<sup>1</sup>, MARIA LAURA FISCHMAN<sup>1</sup>, GUILLERMO LANUZA<sup>1</sup>,  
PAULA CRAMER<sup>2</sup>, ALBERTO KORNBLIHTT<sup>2</sup>, J. LINO BARAÑAO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental; <sup>2</sup> Instituto de Investigaciones en Genética y Biología Molecular,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** En el presente estudio, se analizó la posibilidad de que las distintas formas de fibronectina (FN), producidas como resultado de la maduración alternativa (*alternative splicing*) del mensajero, ejerzan funciones diferenciales en el desarrollo folicular. En particular se determinó la presencia de la región ED-I, ausente en la FN plasmática, tanto a nivel de mensajero como de proteína, durante este proceso. El análisis de los niveles de FN en fluidos foliculares correspondientes a distintas etapas de desarrollo mostró marcadas variaciones en la concentración de FN ED-I+ mientras que los de FN total permanecieron relativamente constantes. En folículos correspondientes a la fase de selección se observó una correlación inversa entre los niveles de FN ED-I+ y los de estradiol ( $p < 0.001$ ). El tratamiento con estradiol no tuvo efecto sobre el *splicing* alternativo de FN en cultivos de células de la granulosa bovina, mientras que el AMPc tuvo un efecto inhibitorio sobre la incorporación de ED-I. Por otra parte, el factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) estimuló tanto la producción de FN total como la inclusión de la región ED-I. Este efecto fue verificado tanto a nivel de la proteína (Western blots) como del ARN mensajero (Northern blots). Un péptido correspondiente a la región ED-I tuvo un efecto estimulador sobre el crecimiento de una línea de células de la granulosa bovina (BGC-1) mientras que el péptido correspondiente a las regiones flanqueantes no tuvo efecto. Los datos presentados en este estudio plantean una nueva forma de regulación mediante la cual cambios cualitativos en la estructura primaria de la FN podrían mediar algunas de las acciones de gonadotrofinas y factores intraováricos durante el desarrollo folicular.

**Palabras clave:** fibronectina, granulosa, *splicing* alternativo, desarrollo folicular, ED-I, BGC-1, esteroidogénesis

El folículo ovárico está constituido por el ovocito, las células de la granulosa que lo rodean y una capa de células externas denominada células de la teca. Durante el proceso de maduración folicular las células de la granulosa pasan por dos etapas de diferenciación. Inicialmente presentan un fenotipo secretor y proliferativo. Durante este estadio aparece una nueva cavidad,

la cavidad folicular o antro, en la que se vuelcan la mayoría de los productos secretados. Posteriormente las células de la granulosa reducen su capacidad proliferativa y se diferencian a células con una esteroidogénesis muy activa.

Una de las glicoproteínas presentes en el fluido folicular es la fibronectina (FN). Dado que las células de la granulosa la secretan activamente en cultivo, se las considera como la fuente principal de FN del fluido folicular. Si bien se ha demostrado que la FN o la activación de uno de sus receptores celulares es capaz de inducir la luteinización de células de la granulosa en cultivo<sup>1</sup>

Recibido: 27-XII-1996

Aceptado: 20-III-1997

Dirección postal: Dr. J. Lino Barañao, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Vuelta de Obligado 2490, 1428 Buenos Aires, Argentina



su función en la maduración folicular no se ha establecido.

Existen diversas formas de FN que difieren en su estructura primaria como resultado de la maduración (splicing) alternativa de su ARNm. Este fenómeno está sujeto a una estricta regulación temporo-espacial. Los exones ED-I y ED-II (por extra domain) están presentes en la FN sintetizada en el embrión para luego prácticamente desaparecer en el adulto. La FN presente en el plasma (FNp), que es sintetizada en el hígado, carece totalmente de estos exones, que sí son detectables aunque en niveles bajos en algunas matrices extracelulares adultas normales. Sin embargo, en determinadas condiciones fisiopatológicas reaparece la FN-ED-I+. En general, la reexpresión de ED-I ocurre en tejidos proliferantes, como ser durante el crecimiento de ciertos tumores o durante la cicatrización de heridas<sup>2</sup>. Esto nos llevó a pensar que la maduración folicular representaba un excelente modelo para estudiar el splicing alternativo de la FN tanto a nivel de ARN como a nivel proteico.

Con el objeto de determinar cambios en los niveles de FN y de FN-ED-I+ durante el desarrollo folicular, se obtuvieron muestras de fluido folicular por aspiración de folículos bovinos, de un amplio rango de tamaños, provenientes de ovarios recogidos de un matadero cercano. En primer término se clasificó a los folículos en 2 categorías, mayores y menores a 8 mm de diámetro. Estos últimos, por ser muy pequeños para ser procesados individualmente fueron juntados en grupos de entre 2 y 5 mm y entre 5 y 8 mm de diámetro. Los folículos mayores a 8 mm fueron procesados individualmente.

Los ensayos *in vitro* requirieron el cultivo de células BGC-1 y de cultivos primarios de células de la granulosa bovina. La línea BGC-1, obtenida por inmortalización espontánea de cultivos primarios de células de la granulosa bovina<sup>3</sup>, mantiene algunas de las características propias de los cultivos primarios, en particular, la regulación hormonal de la producción de FN<sup>4</sup>. Las células de la granulosa utilizadas en los cultivos primarios fueron obtenidas por aspiración de folículos de entre 2 y 8 mm. Los cultivos se crecieron en DMEM:F12 (con 2,2 g/l de NaHCO<sub>3</sub>) suplementado con 5% de suero de ternero neonato (NCS) para las células BGC-1 y 10% para los cultivos primarios. Para los estudios de

regulación de la síntesis de FN, ambos cultivos fueron crecidos hasta alcanzar confluencia. Luego, el medio fue lavado y reemplazado por medio sin suero con los estímulos indicados. A las 48 horas se prepararon los extractos ya sea para purificar ARN para Northern blot o para medir proteínas por Western blot.

Los niveles de FN total y de FN-ED-I+ fueron determinados mediante un Western blot cuantitativo utilizando un antisuero contra FN plasmática humana y un anticuerpo monoclonal contra ED-1 (ambos provistos por Sigma Chemical Co.). El ensayo es cuantitativo debido a que se realiza en paralelo una curva de calibración con una muestra conocida.

Los Northern blots fueron revelados con sondas específicas. El ARNm de FN fue detectado utilizando una sonda de 5865 pb correspondiente a un fragmento Sal I /Hind III de un ARNm de FN y los ARNm ED-I+ fueron detectados usando la sonda M13EDI de 160 pb correspondiente a un fragmento interno Pst I/Sau IIIA1. También se utilizó una sonda que reconoce al ARNm de la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa para estandarizar los resultados.

Las células BGC-1 fueron utilizadas también para realizar ensayos de síntesis de ADN. Para estos experimentos, se sembraron 5000 células por pocillo de p-96 previamente cubiertas con una capa de colágeno en medio de cultivo sin suero. Al cabo de 2 horas se agregaron los estímulos junto con la timidina tritiada (4 µCi/ml). A las 24 horas se cosecharon las células y la radiactividad se midió en contador de centelleo. Los péptidos recombinantes ED-I y 11-12 utilizados en estos ensayos, fueron obtenidos por expresión en *E. coli* de los fragmentos correspondientes obtenidos por RT-PCR.

En la Fig. 1A se muestran los resultados obtenidos en un Western blot para 18 muestras de fluido folicular revelado con anti-FNp, que revela todas las formas de FN, (Fig. 1A arriba) y con anti-ED-I (Fig. 1A, abajo). Sorprendentemente, no sólo 16 de las 17 muestras fueron positivas para ED-I+ sino que se observaron profundos cambios tanto en la concentración de FN-ED-I+ como en su proporción respecto del contenido total de FN. Las calles 1 a 4, que corresponden a los de folículos pequeños, presentaron mucho mayor concentración y proporción de FN-ED-I+ que el resto de las



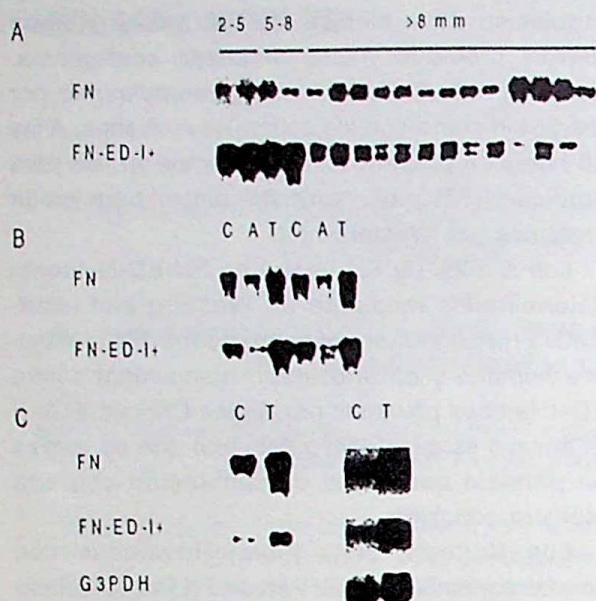


Fig. 1.— Determinación de los niveles de FN total y FN-ED-I+ (A, B y C) y ARNm de FN o FN-ED-I+ (D) por Western blot y Northern blot, respectivamente.

- A. Western blot de FN total (arriba) y FN-ED-I+ (abajo) en muestras de fluido folicular bovino obtenidas por aspiración de los folículos correspondientes. Las muestras correspondientes a folículos de entre 2 y 5 mm, y entre 5 y 8 mm de diámetro son grupos de folículos mientras que el resto corresponde a folículos individuales.
- B. Western blot de FN total (arriba) y FN-ED-I+ (abajo) en extractos celulares de cultivos primarios de células de la granulosa bovina. Las células, obtenidas por aspiración de folículos de entre 2 y 8 mm de diámetro, fueron cultivadas en medio con 10% de suero de ternero neonato hasta alcanzar confluencia. Posteriormente, el medio fue reemplazado por medio libre de suero en ausencia (C) o presencia de 1mM  $Bt_2cAMP$  (A) o 5 ng/ml de  $TGF-\beta$  (T). Luego de 2 días de cultivo, se prepararon los extractos celulares y se realizaron los correspondientes Western blots.
- C. Western blot de FN total (arriba) y FN-ED-I+ (abajo) en sobrenadantes de cultivos de células BGC-1. Las células fueron cultivadas como se explica en B, con la diferencia que en este caso se utilizaron los sobrenadantes en vez de extractos celulares.
- D. Northern blot de ARNm de FN total (arriba) o de FN-ED-I+ (medio) a partir de ARN total extraído de cultivos de células BGC-1 estimuladas (T) o no (C) con 5 ng/ml de  $TGF-\beta$ . Las células fueron cultivadas como se indica en B. Al cabo de los 2 días de estímulo, se preparó ARN y se realizó el Northern blot. Como control de carga de ARN se determinó también la presencia del ARN de la enzima G3PDH.

muestras. Debido a esto, consideramos que constituían un grupo aparte por lo que no fueron incluidos en los análisis estadísticos que se detallan más abajo.

Para obtener un parámetro del estado fisiológico de cada uno de los folículos utilizados, se midió por radioinmunoensayo la concentración de estradiol (E2) y progesterona (P4) en las mismas muestras analizadas en la Figura 1. Tanto los niveles de FN-ED-I+ como la relación FN-ED-I+/FN total presentaron una correlación inversa con la concentración de E2 ( $p < 0,001$  y  $p < 0,002$ , respectivamente). No hubo correlación significativa con los niveles de P4 ni con el volumen de fluido folicular de cada muestra (un índice de su tamaño).

Una alta concentración de E2 en un folículo es un marcador de folículo saludable, mientras que bajos niveles indican que el folículo está atresico, es decir, está degenerando. Como la síntesis de E2 es regulada fundamentalmente por FSH, altos niveles de E2 son indicadores de una elevada producción de AMPc en el interior de las células de la granulosa.

Los residuales de las correlaciones corresponden a las diferencias que existen entre el valor determinado experimentalmente y el predicho por la correlación. Estas diferencias pueden ser azarosas o ser el resultado del efecto de una tercera variable que no está incluida en el análisis. Si los residuales correlacionan significativamente con alguna de las variables, significa que no eran debidos enteramente al azar. En este caso se determinó que los residuales de las correlaciones entre FN-ED-I+ y E2 correlacionan positivamente con el contenido de FN-ED-I+ en las muestras ( $p < 0,05$ ), es decir, a mayor concentración de FN-ED-I+, mayor es el desvío del valor empírico respecto del predicho por la estadística. Esto significa que a concentraciones altas de FN-ED-I+ la dependencia con E2 está alterada por el efecto de otra variable. Dado que la correlación es positiva, esta variable regula positivamente la inclusión de ED-I.

Estos resultados nos llevaron a formular la siguiente hipótesis: existen dos factores en el fluido folicular que regulan la inclusión del exón ED-I en la FN. Uno es el factor de crecimiento transformante  $\beta$  ( $TGF-\beta$ ), que aumenta la síntesis de FN-ED-I+ y el otro es el AMPc, que la inhibe. Esta hipótesis se basa por una parte en que se ha demostrado que  $TGF-\beta$ , cuya producción en el folículo ovárico está ampliamente documentada<sup>5</sup>, es capaz de aumentar la inclusión de ED-I en ciertos tipos celulares<sup>2</sup> y por otra parte, en



que el AMPc, mediador del estímulo gonadotrófico, ejerce un efecto inhibitorio sobre la síntesis de FN en células de la granulosa<sup>3</sup>. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que el AMPc altere el splicing alternativo de la FN.

Para probar esta hipótesis, se realizaron cultivos primarios de células de la granulosa bovina que fueron estimulados con 5 ng/ml de TGF- $\beta$ , 1 mM de Bt<sub>2</sub>cAMP (un análogo no hidrolizable del AMPc) y con 100 ng/ml de E2. El contenido de FN total y de FN-ED-I+ presente en extractos celulares fue determinado por Western blot y los resultados se muestran en la Fig. 1B. Mientras que TGF- $\beta$  aumentó 2 veces el contenido de FN total y 4 veces el de FN-ED-I+, el tratamiento con Bt<sub>2</sub>cAMP redujo a la mitad la síntesis de FN total y 20 veces el contenido de FN-ED-I+. el E2 no tuvo un efecto significativo.

Si los cambios observados en la proporción FN-ED-I+/FN total eran debidos a un efecto sobre el aparato de splicing, entonces también deberían observarse variaciones similares en el contenido de ARNm para FN. Por esto se trataron células BGC-1 con 5 ng/ml de TGF- $\beta$  por 2 días. Posteriormente se determinó la presencia de ARNm para FN y para FN-ED-I+ por Northern blot. Estos experimentos demostraron que el TGF- $\beta$  aumenta 3 veces el contenido total de FN y 6 veces el contenido de FN-ED-I+ (Fig. 1C, derecha), es decir, se registró un aumento del 100% en la proporción de ARNm que contenía al exón ED-I. Como control también se determinó por Western blot el efecto del tratamiento con TGF- $\beta$  en células BGC-1 sobre la secreción de FN (Fig. 1C, izquierda). El TGF- $\beta$  provocó un aumento del 100% en la proporción de FN-ED-I+ sintetizada.

Las variaciones de FN-ED-I+ observadas en los fluidos indicaban que los folículos más pequeños, aquellos menores a 8 mm, eran los que contenían mayor concentración de FN-ED-I+. Estos folículos contienen células de la granulosa en una etapa de mayor proliferación que los de mayor tamaño. Por lo tanto, los datos obtenidos sugerían que la FN-ED-I+ podría participar en la maduración folicular, estimulando la proliferación de las células de la granulosa. Para poner a prueba esta hipótesis, se utilizaron células BGC-1 que fueron estimuladas con un péptido recombinante correspondiente a la región ED-I, con un péptido control que abarca los exones contiguos al exón ED-I, denominado 11-12 y con

FN plasmática (FNp). La figura 2 muestra los resultados de un experimento donde se midió la incorporación de timidina como índice de síntesis de ADN. El péptido ED-I provocó un aumento de 3,5 veces en la síntesis de ADN en una manera dosis-dependiente, alcanzando su efecto máximo a una concentración de 1  $\mu$ M. El péptido 11-12 no tuvo efecto alguno, mientras que la FNp tuvo un leve efecto estimulador (datos no mostrados).

Los resultados que se presentan aquí muestran por primera vez que: 1) Existen importantes variaciones en la concentración de FN-ED-I+ en un adulto en condiciones no patológicas, estando las mismas asociadas al proceso de maduración folicular; 2) El splicing alternativo del transcripto primario de la FN en las células de la granulosa es regulado por TGF- $\beta$  y AMPc y 3) la FN-ED-I+ tendría un papel fisiológico en el ovario, actuando como factor estimulador de la proliferación de las células de la granulosa.

La correlación inversa entre contenido folicular de FN-ED-I+ y la concentración de E2 sugieren que la región ED-I juega un papel fisiológico en la maduración folicular. Los datos sobre el efecto de factores sobre el splicing alternativo *in vitro*, tanto utilizando cultivos primarios como células

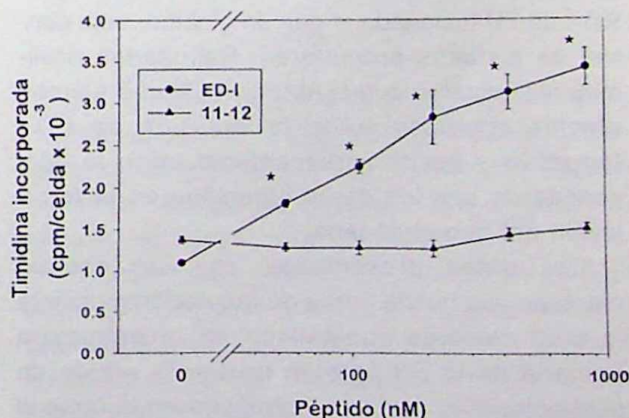


Fig. 2.— Efecto del péptido ED-I recombinante sobre la síntesis de ADN en células BGC-1. Las células BGC-1, sembradas a una densidad de 5000 células/celda en medio libre de suero, fueron estimuladas con concentraciones crecientes de ED-I (círculos) o del péptido control 11-12 (triángulos). Simultáneamente, se agregó 4  $\mu$ Ci/ml de timidina [<sup>3</sup>H]. A las 24 horas, las células fueron cosechadas y la cantidad de timidina [<sup>3</sup>H] incorporada al ADN fue determinada con un contador de centelleo líquido. \* indica diferencias significativas respecto del control sin péptido y del péptido 11-12.



BGC-1 aportan una explicación sobre el mecanismo por el cual se regularía *in vivo* el contenido de FN-ED-I+. En folículos pequeños, en activa proliferación y con escasa respuesta a FSH, existiría una molécula tipo TGF- $\beta$  que aumentaría la síntesis de FN-ED-I+ y a su vez, ésta estimularía la proliferación de las células de la granulosa. Cuando los folículos maduran y adquieren la capacidad de responder a gonadotropinas, aumenta la síntesis de AMPc que a su vez inhibe la síntesis de FN-ED-I+, actuando posiblemente sobre el aparato de splicing, con lo cual disminuiría el efecto mitogénico sobre las células de la granulosa.

Poco se sabe de la función de la región ED-I. Hasta el presente, la evidencia más fuerte sobre un papel «*in vivo*» para esta región ha sido provista recientemente por Jarnagin et al.<sup>6</sup>, quien mostró que la región ED-I de la FN es responsable de inducir la transdiferenciación de lipocitos hepáticos en miofibroblastos en un modelo de fibrosis inducida por ligadura del conducto biliar.

Con el objeto de determinar el mecanismo por el cual el TGF- $\beta$  y el AMPc regulan el splicing alternativo de FN se están realizando transfecciones de cultivos primarios de células de la granulosa con plásmidos conteniendo un gen quimérico que consiste en la región de splicing de ED-I de FN fusionada al gen de globina, bajo control de distintos promotores. Resultados preliminares sugieren que el AMPc y el TGF- $\beta$  ejercen efectos opuestos sobre la inclusión de ED-I (negativo y positivo, respectivamente), lo cual concuerda con los datos obtenidos en la regulación del gen endógeno.

Los datos presentados en este estudio plantean una nueva forma de regulación mediante la cual cambios cualitativos en la estructura primaria de la FN podrían mediar la acción de gonadotropinas y factores intraováricos durante el desarrollo folicular.

## Summary

### *Role of different forms of fibronectin in in vitro bovine follicular development*

This study was aimed at testing the hypothesis that different forms of fibronectin (FN), produced as a consequence of the alternative splicing of the precursor mRNA, play specific roles during

follicular development. In particular, we analyzed the presence of the ED-I region, which is absent in the plasma form. Analysis of FN levels in follicular fluids corresponding to different stages of development of bovine follicles revealed marked changes in the concentrations of ED-I+FN whereas total FN levels remained relatively constant. A negative correlation ( $P < 0.001$ ) was detected between ED-I+FN and estradiol levels. This steroid was without effect on the alternative splicing of FN in primary cultures of bovine granulosa cells. However, cAMP produced a marked decrease in the incorporation of the ED-I region. In contrast, transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) elicited both a stimulation on overall FN synthesis and an increase in the inclusion of ED-I. This effect was evident at the protein level (Western blots) and also in the mRNAs (Northern blots). A peptide corresponding to the ED-I region stimulated DNA synthesis in a bovine granulosa cell line (BGC-1) whereas the peptide corresponding to the flanking sequences was without effect. Data presented herein suggest a novel form of regulation by which changes in the primary structure of FN may mediate some of the effects of gonadotropin and intraovarian factors during follicular development.

## Bibliografía

1. Aten RF, Kolodecik TR, Behrman HR. A cell adhesion receptor antiserum abolishes, whereas laminin and fibronectin glycoprotein components of extracellular matrix promote, luteinization of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1995; 136: 1753-8.
2. Kornblihtt AR, Pesce CG, Alonso CR, et al. The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J* 1996; 10: 248-57.
3. Bernath VA, Muro AF, Vitullo AD, Bley MA, Barañao JL, Kornblihtt AR. Cyclic AMP inhibit fibronectin gene expression in a newly developed granulosa cell line by a mechanism that suppresses cAMP-responsive element-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem* 1990; 265: 18219-26.
4. Colman Lerner AA, Barañao JL. Regulation of fibronectin production in a bovine granulosa cell line: effects of transforming growth factor b and evidence of proteolytic processing. 77th Annual Meeting of The Endocrine Society, 1995, 145.
5. Mulheron GW, Schomberg DW. The Intraovarian Transforming Growth Factor System. In: Adashi EY, Leung PCK (eds) *The Ovary*. New York: Raven Press, Ltd. 1993; 337-61.
6. Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliensky VE, Wang S, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: Cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol* 1994; 127: 2037-48.