

proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde. De esta manera, utilizando muestras patrones que contienen diluciones seriadas de concentraciones conocidas de la diana, se construye una recta de calibración que relaciona los Ct con el logaritmo de la cantidad inicial de molde ( $N_0$ ). Extrapolando en esta recta los Ct obtenidos para las muestras problema, se puede estimar el valor de sus  $N_0$ .

La eficiencia de la reacción también se puede calcular a partir de los Ct de los patrones. Para lograr una cuantificación correcta, la eficiencia de patrones y muestras problema deben ser iguales, lo que implica una puesta a punto previa de la PCR.

En caso de conocer la concentración absoluta de moléculas de molde en los patrones, los resultados serán absolutos. Pero la cuantificación absoluta no siempre es necesaria. Para analizar cambios relativos en la cantidad de transcritos se elige como patrón un transcrito de referencia que no varíe su expresión en los tratamientos a analizar, normalmente un gen de mantenimiento (*housekeeping*). Comparando los Ct del gen de referencia con el gen problema en muestras tratadas y sin tratar, se pueden determinar cambios relativos en la expresión del gen problema.

Otro resultado a analizar es la curva de fusión del producto. Ésta se obtiene tras la amplificación y se produce como consecuencia del decaimiento de la señal fluorescente debido a la fusión dependiente de

temperatura del producto.

La curva de fusión se puede obtener con los fluoróforos con afinidad por el DNA bicatenario como el SYBR-Green I, y con sondas específicas de secuencia que no se hidrolizan durante la reacción ni queden integradas en el producto, como las balizas moleculares (*molecular beacons*) y las sondas de hibridación.

La derivada de la curva de fusión nos revela un pico máximo correspondiente a la temperatura de fusión del producto ( $T_m$ ). El área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto. Cuando se utiliza el SYBR-Green I se puede confirmar la amplificación de la diana específica a través de este análisis, ya que cuando se obtienen varios productos se detectan varios picos con  $T_m$  y ABC diferentes. De este modo también, la utilización de este fluoróforo sirve para caracterizar el producto. Por otra parte, el uso de sondas específicas de secuencia nos revela una curva de fusión que sirve, principalmente, para genotipar y buscar los SNP, y para detectar mutaciones.

Por todo ello, la RT-PCR tiene aplicaciones en numerosos campos (medicina forense, diagnóstico clínico, control alimentario, análisis de organismos modificados genéticamente...) que continúan ampliándose. Esto, unido a la baja probabilidad de contaminación a la exactitud de los resultados y a la sencillez y rapidez del método, hace de la RT-PCR una técnica cada vez más utilizada en todos los laboratorios del mundo.

---

## FACTORES QUE REGULAN EL DESARROLLO FOLICULAR II: FOLÍCULOS ANTRALES

---

**José Antonio Velázquez Domínguez y Enrique Mendieta Márquez**

*Departamento de Ciencias de la Salud, Laboratorio de Biología Molecular y Fisiología Gonadal, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa.*

---

Las etapas finales del desarrollo folicular se encuentran reguladas por factores de diversa naturaleza y origen los cuales, a través de la participación de múltiples sistemas de señalización autocrina, paracrina y endocrina, que involucran a todas las estirpes celulares que se encuentran en el folículo, son capaces de llevarlo a través de las etapas de maduración que culminan en la ovulación y su posterior luteinización.

### **I. Transición folículo secundario a terciario**

Apartir de esta etapa, el folículo requerirá forzosamente del estímulo de la hormona estimulante del folículo (FSH) para proseguir la proliferación de las células de la granulosa (CG) y establecer, en éstas, una producción creciente de estrógenos. La acción inductiva de la FSH permitirá, posteriormente, facilitar la respuesta del folículo a la hormona luteinizante (LH) y a otros factores extracelulares [Hillier. *Mol. Cell. Endocrinol.* **179**: 39-46 (2001)].

Algunos productos génicos que aparecen en las CG presentes en los folículos secundarios como resultado de su estimulación por la FSH son, entre otros, el complejo

de la aromatasa, los receptores para FSH (FSHR), LH (LHR) y estrógenos (ER), productos polipeptídicos de la familia del factor de crecimiento y transformación- $\beta$ , tales como el *GDF9*, las *inhibinas* y las *activinas*, así como la *folistatina*, una proteína que une a estas últimas con una elevada afinidad [Knight & Glistler. *Reproduction* **121**: 503-512 (2001)], además de los *factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF)-I y -II* y las proteínas que lo unen (las *IGFBP*).

A través de mecanismos aún no comprendidos, que podrían involucrar diferencias en cuanto a la sensibilidad de cada folículo a la estimulación gonadotrópica así como su capacidad de producción temprana de estrógenos, se seleccionará uno o a lo sumo un pequeño número de folículos (dominancia folicular) y podrá continuar su desarrollo hasta alcanzar la fase ovulatoria, mientras que los demás folículos (folículos subordinados) detendrán su crecimiento y estarán destinados a sufrir atresia.

Una vez que las CG hayan expresado los FSHR, su proliferación y diferenciación estarán reguladas principalmente por esta gonadotropina, pero dependerán

también de otros factores extrínsecos y de los factores paracrinós producidos localmente, que pueden presentar acciones tanto estimuladoras como inhibitorias. Cabe señalar que los mecanismos de acción de varios de estos factores no se han dilucidado hasta ahora, por lo que sólo discutiremos a continuación la participación de algunos de estos moduladores en el desarrollo folicular.

Así, al inicio de la transición folículo secundario-terciario, las *activinas* participan en la estimulación de la expresión de los FSHR y de la aromatasa en las CG, inhibiendo a la vez la expresión de los LHR en las CG y en las células de la teca (CT). Conforme las CG continúan su proliferación y el folículo va completando la formación de su antrum, las concentraciones crecientes de estrógenos incrementarán la síntesis de las *inhibinas* y la *folistatina*, por lo tanto disminuyendo las concentraciones efectivas de *activinas* en el folículo.

Esta disminución en la concentración de *activinas* en el folículo antral permitirá la expresión de los LHR en las CG y en las CT, y el incremento en la producción de *inhibinas* promoverá la síntesis *de novo* de andrógenos (principalmente androstendiona) y la expresión de los LHR en las últimas, además de disparar la progresión meiótica en el ovocito detenido en diploteno I, y de regular la síntesis y secreción hipofisaria de FSH a través de mecanismos de retroalimentación negativa [Findlay y cols. *Mol. Cell. Endocrinol.* **191**: 35-42 (2002)].

Diversas estirpes celulares foliculares parecen jugar un papel clave en el establecimiento del patrón heterogéneo de expresión que se observa en las CG de folículos terciarios, ya que las CG murales, en contacto directo con una lámina basal y alejadas del ovocito, sintetizarán el LHR, mientras que las células del cúmulo, en contacto con éste, prácticamente no lo harán. Algunos mecanismos de regulación que se han propuesto para explicar este fenómeno incluyen la participación del *GDF9* como un regulador negativo de la transcripción de LHR en células del cúmulo, la intervención del *KL*, el *factor de crecimiento epidermal (EGF)* y algunos componentes de la matriz extracelular como promotores de la expresión del LHR y de la proliferación celular en las CG murales.

Por otra parte, la expresión plena del fenotipo de las CG parecería contribuir a la regulación funcional de las CT y, en consecuencia, al mantenimiento de un adecuado funcionamiento del folículo. En este sentido, se ha observado que la FSH estimula en las CG la producción de *IGF-I*, el cual incrementa, a su vez, la producción tecal de andrógenos y, finalmente, la síntesis de estrógenos por las mismas CG. Se ha observado que las concentraciones bioactivas de *IGF-I* son mayores en los folículos dominantes que en los subordinados lo que, al parecer, reflejaría los niveles de *IGFBPs* presentes en cada folículo y plantearía una posible explicación de los factores que definen el potencial esteroideogénico de los folículos y el fenómeno de dominancia folicular en el ovario [Richards, *Endocrinology* **142**: 2184-2193 (2001)].

Finalmente, varios de los factores producidos localmente son importantes para la supervivencia de los folículos antrales tempranos. Estos factores pueden actuar

sobre las CG (p. ej., esteroides), las CT (p. ej. *IGF-I*) o del ovocito (p. ej., *activinas*), permitiendo al folículo dominante pasar a folículo preovulatorio o de Graaf [Markström y cols. *Reproduction* **123**: 23-30 (2002)].

## II. Transición folículo terciario-folículo de graaf

La ovulación se dispara con el pico preovulatorio de LH, el cual, a su vez, se induce por la elevada concentración circulante de estrógenos producidos por el folículo preovulatorio. Este pico induce marcados cambios en el folículo que incluyen tanto la reiniciación de los procesos de maduración del ovocito como alteraciones funcionales en el complejo ovocito-células del cúmulo, modificaciones en la expresión génica de las CG que las llevarán hacia la luteinización y otros cambios que provocarán la ruptura de la pared folicular.

El ovocito maduro secreta un factor que permite la expansión de las células del cúmulo (*CEEF*) que permite secretar ácido hialurónico en respuesta a la estimulación por FSH. Al hidratarse genera espacios entre las células que provocan la expansión del cúmulo que precede al proceso de ovulación propiamente dicho. Algunos autores han señalado que la expresión de la enzima hialuronano sintasa 2, responsable de la síntesis de este glucosaminoglucano, parece depender de algunos factores previamente identificados como productos de secreción de los ovocitos (p. ej., *GDF9*) [Eppig. *Reproduction* **122**: 829-838 (2001)].

Los productos proinflamatorios sintetizados por las CG y detectados en elevadas concentraciones en los folículos preovulatorios (p. ej., *interleucinas [IL]-1 $\beta$*  y *-6*, *factor de necrosis tumoral [TNF]- $\alpha$*  y *prostaglandinas [PG]*) contribuyen a la disminución de su producción de estrógenos hacia el final de la transición a folículo de Graaf. Este cambio en el patrón esteroideogénico de las CG parece inducir, junto con la aparición del pico preovulatorio de LH, la expresión de las enzimas remodeladoras de tejidos (*metaloproteinasas de matriz [MMPs]*) indispensables para el proceso de ovulación [Rosenfeld y cols. *Reproduction* **122**: 215-226 (2001)].

Varios tipos de MMP participan en el proceso de ruptura folicular, entre ellas, enzimas con capacidad de degradar colágeno, elastina, proteoglucanos y otros elementos de matriz extracelular, que se encuentran presentes en folículos preovulatorios de ovarios de rata y cabra. El incremento periovulatorio en la actividad colagenolítica se atribuye a aumentar la expresión de los mRNA de la colagenasa intersticial y la colagenasa-3 en las CG de folículos de Graaf de rata y bovino. Otras enzimas cuya expresión se induce en las CG son las gelatinasas, que participan también en la degradación de la membrana basal que separa a las CG y a las CTI [Van Voorhis B.J. *Encyclopedia of Reproduction II*: 376-389 (1999)].

La regulación de la actividad de las MMP y de otras proteasas en el folículo ocurre a través de un mecanismo dependiente de activadores específicos, los cuales controlan el paso de los zimógenos a las formas catalíticas. Un ejemplo de regulador positivo de la actividad de las MMP es el *activador de plasminógeno del tipo urocinasa (uPA)*, activador de varias colagenasas y gelatinasas,

producido por las células del cúmulo. La síntesis del uPA parece inhibirse por el ovocito durante la etapa de folículo terciario, y esta inhibición desaparece una vez que se ha presentado el pico preovulatorio de LH.

Finalmente, se ha sugerido que el ovocito produce un factor anti-luteinizante que previene la diferenciación terminal de las CG, manteniendo activa su síntesis

de estrógenos en detrimento de su producción de progesterona. Este bloqueo biosintético desaparece una vez que se ha presentado el pico preovulatorio de LH, que parece hacer resistentes las CG a la inhibición de su diferenciación. Por lo tanto, una vez que el ovocito se ha liberado, las CG murales y las CT concluirán su proceso de rediferenciación para dar origen a las células lúteas.

## RNAi: LA REVOLUCIÓN SILENCIOSA

Alejandro Ruiz Moreno\* y Ramón Muñoz-Chápuli#

\* *Estudiante de Biología, Universidad de Málaga.*

# *Catedrático de Biología Animal, Universidad de Málaga*

Suele suceder con las revoluciones que sus protagonistas casi nunca son conscientes de ellas. Probablemente ni los colonos que arrojaron el té inglés a las aguas del puerto de Boston en 1773 ni los parisinos que asaltaron la Bastilla pocos años después pensaron que aquello era algo más que un tumulto. Probablemente no sospecharon que estaban cambiando la Historia. Con las revoluciones científicas a veces sucede lo mismo. Es posible que desde hace unos pocos años estemos viviendo una casi sin darnos cuenta. Por eso podría llamarse «silenciosa». Por eso, y también porque se basa en los sistemas de silenciamiento génico o «interferencia por RNA» (RNAi), un recientemente descubierto mecanismo de control de la expresión génica que se ha revelado universal en los eucariotas y que podríamos utilizar con objetivos científicos y terapéuticos.

La historia comenzó hace tan sólo seis años, cuando un grupo de embriólogos del Instituto Carnegie de Washington estaba estudiando en *Caenorhabditis elegans* la interferencia que se produce en la expresión génica mediante la introducción de RNA antisentido en las células [Fire et al., *Nature* **391**:806-11 (1998)]. Desde 1990, y gracias a estudios en las plantas, se conocía que la unión de moléculas antisentido de DNA o RNA al mRNA bloqueaba su traducción. Lo original del estudio del grupo del Carnegie consistió en introducir en las células RNA de doble cadena (es decir, sentido y antisentido hibridados). La sorpresa debió ser grande cuando comprobaron que el efecto de silenciamiento génico era mucho más potente que con RNA de cadena sencilla, contra lo que cabría esperar. Aún más sorprendente fue constatar que la estequiometría del proceso no coincidía con la idea de un simple bloqueo del mRNA por hibridación. Unas pocas moléculas de RNA de doble cadena bastaban para silenciar la expresión génica a pesar de la cantidad mucho mayor de mRNA existente en la célula. Los autores ya apuntaron a la existencia de un mecanismo amplificador o catalítico de naturaleza desconocida.

Aunque el silenciamiento génico presenta diferencias en animales frente a hongos y plantas, el proceso y sus «actores» moleculares son básicamente los mismos. La vía normal, fisiológica, de silenciamiento comienza cuando se expresa un pre-miRNA (*precursor micro-RNA*), una cadena sencilla que puede plegarse y formar

una horquilla de doble cadena denominada miRNA. Otra posibilidad es la aparición de RNA de doble cadena que puede proceder de virus o transposones. En ambos casos estas cadenas dobles de RNA son cortadas por una enzima denominada Dicer en pequeños fragmentos (19 a 24 nt) de doble cadena con extremos 3' salientes (2-3nt) denominados siRNAs (*short interfering RNA*). La caracterización de Dicer [Bernstein et al., *Nature* **409**:363-6 (2001)] permitió identificarla como una RNasaIII así como localizar en su estructura un dominio de unión a RNA de doble cadena.

Los siRNA producidos por Dicer se asocian con un complejo denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*), activándolo y manifestando una actividad helicasa que separa las dos hebras dejando solo la hebra antisentido asociada al complejo. El complejo ribonucleoproteico resultante se une al mRNA diana. Si la complementriedad no es perfecta, RISC queda asociado al mensajero y se atenúa la traducción. Pero si es perfecta, RISC actúa como RNasa, cortando al mensajero y quedando libre para repetir el proceso. Esto es lo que explica que un número pequeño de moléculas de siRNA puedan destruir un número mucho mayor de mRNA.

El estudio de las vías de silenciamiento génico mediadas por miRNA ha permitido descubrir nuevos e inesperados fenómenos que aún no se conocen en profundidad. Uno de los más sorprendentes es el del RNAi transitivo, que se ha observado en plantas, hongos y *C. elegans*. Este fenómeno consiste en que la molécula de siRNA provoca, tras el corte del mRNA diana, la síntesis de nuevos siRNA a partir de secuencias que están en dirección 5' del punto de corte, con lo que se amplifica la señal. El fenómeno necesita RNA polimerasas dirigidas por RNA, un tipo de enzimas que, aparentemente, no existen ni en *Drosophila* ni en el genoma humano. Esto es importante por razones que veremos luego.

Hasta hace muy poco se pensaba que RISC era un complejo multiproteico de componentes desconocidos. Los análisis señalaban la familia de proteínas Argonauta, una familia muy conservada en todos los eucariotas, cuyos miembros se presentan en un número variable en cada especie. Era conocido que algunas mutaciones en los integrantes específicos de esta familia causaban defectos en procesos también específicos y en ocasiones muy