

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR DE Egr-1 POR EGF, EN FIBROBLASTOS HUMANOS

Catalina Machuca-R¹, Francisco Martínez-F,² Araceli Barrera-L² Christian Lomelí-R²

¹ Terapia Molecular, UMIEZ, FES-Zaragoza, UNAM, México, catalina.machuca@gmail.com

² Programa de Bioterapéutica Molecular, Departamento e Morfología Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud

Introducción.

El factor de crecimiento epitelial (EGF) es secretado por plaquetas, macrófagos, monocitos y fibroblastos, actúa de forma autocrina y paracrina sobre células epiteliales, células de músculo liso y fibroblastos. La señal de transducción de esta proteína estimula la migración y contractibilidad de fibroblastos y regula la actividad de metal proteasas involucradas en la epitelización. En este sentido la actividad mitogénica es un evento biológico final para EGF y Egr-1. Sin embargo la regulación transcripcional sobre el promotor de Egr-1 no ha sido descrita. En este trabajo se evaluó el efecto de EGF sobre el promotor de Egr-1 en fibroblastos humanos primarios transducidos con el vector adenoviral Adegr1-Luc

Metodología.

Células y Vectores adenovirales: Adenovirus recombinantes no replicativos (AdEgr1-Luc) fueron empaquetados en gran escala en células HEK-293 y purificados de acuerdo con el protocolo del programa de Bioterapéutica Molecular del INR, según el protocolo de gradiente de cloruro de cesio para aplicación *in vivo*.

Los virus fueron titulados por ensayo de placa y OD. Los fibroblastos humanos primarios (HPF) fueron obtenidos de muestras de piel del Banco de Piel y Tejidos del INR, basados en el protocolo de digestión con colagenasa.

Células dérmicas derivadas se cultivaron en medio D-MEM suplementado con 10% de HI-FBS y antibióticos bajo condiciones de cultivo estándar durante una semana y almacenadas para su procedimiento experimental.

Se sembraron 5×10^4 fibroblastos placas de cultivo, después de 12 horas las células fueron infectadas con AdEgr1-Luc a un MOI de 50 durante 2 horas en un medio reducido en suero. Después de la infección, las células fueron mantenidas en 1% de SFB durante 24 horas en condiciones estándar de cultivo hasta la exposición a EGF (5 ng/ml).

La extracción de proteínas se realizó a 2,4 y 6 horas utilizando un Tampón de Lisis celular Glo (promega corp). La actividad de luciferasa se cuantificó utilizando un multidetector DTX-880.

Resultados y Discusión.

El ensayo de la actividad de Luciferasa de células no transducidas no mostró actividad de Luciferasa (0.33-0.5)LC/s). La exposición de fibroblastos humanos transducidos con AdEgr1-Luc a EGF, induce positivamente la actividad del promotor de Egr.1. La actividad luminiscente observada a la 2,4 y 6 horas fue de 1,490LC/s; 2904,66LC/s y 29511.33 LC/s respectivamente.

Conclusiones.

EGF activa la actividad transcripcional del promotor de egr-1 en fibroblastos. Sin embargo, esta actividad puede ser un evento final de la vía no genómica y puede ser discernida por otros estudios alternativos utilizando herramientas proteómicas.

Palabras clave. EGF, promotor egr-1, fibroblastos

Bibliografía.

1. - Sakamoto KM, Bardeleben C, Yates KE, Raines MA, Golde DW, Gasson JC. 1991 Oncogene. 6(5):867-871.
- 2.- Xie B, Wang C, Zheng Z, Song B, et al. 2011 J Neuros. 31 (13): 5032-5044.
- 3.- Zhang W, Chen S. 2001 Exp Cell Res 266:21-30

Proyecto apoyado por FOSIS CONACyT, 161624, PIFUT08-169.