

5.5 Identificación de genes relacionados a PLs y/o PRPs en el gato.

5.5.1 Diseño de los iniciadores.

Se diseñó un juego de iniciadores consenso para PCR largo sobre las regiones más conservadas de los exones II y IV de los DNAs de PRL, PL y PRP de bovino, además de la PRL hipofisiaria de gato. En la figura 17 se representa la estructura de los DNAs mencionados junto con los sitios de unión de los iniciadores.

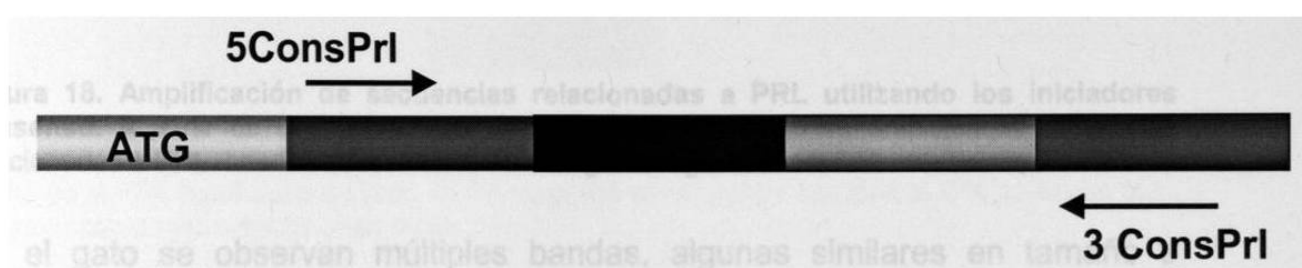


Figura 17. Iniciadores consenso. Se esquematizan los sitios de unión de los iniciadores consenso sobre los DNAs de la familia de la PRL.

La secuencia de los iniciadores en sentido 5' a 3' es la siguiente:

TGC TGT CAG ACC TGC TCY TGT G 5consprl

TGC TTG AAT CCC TGC GTA GGC 3consprl

5.5.2 Amplificación de los genes por PCR largo.

La amplificación de los diferentes genes de proteínas relacionadas a prolactina se efectuó a partir de DNA genómico de gato, vaca y borrego con iniciadores consenso. Una vez estandarizada la reacción, los productos amplificados se resolvieron por electroforesis (Figura 18). Se obtuvieron en cada carril varias bandas de intensidad y tamaño variable que va desde los 7000 pb hasta los 1000 pb.

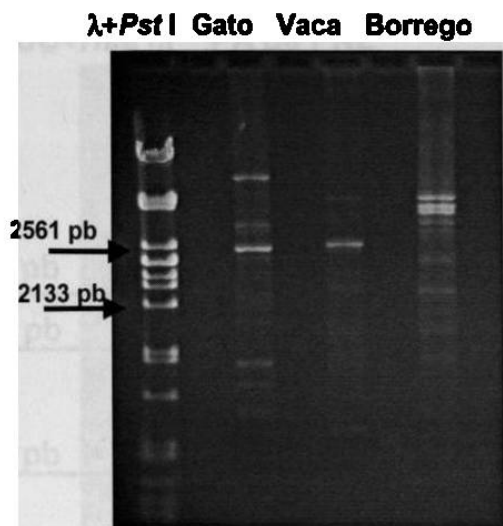


Figura 18. Amplificación de secuencias relacionadas a PRL utilizando los iniciadores consenso. A partir de DNA genómico de gato, vaca y borrego se amplificaron secuencias relacionadas a PRL. Los PA se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8 %.

En el gato se observan múltiples bandas, algunas similares en tamaño e intensidad a las observadas en los productos amplificados de vaca y borrego. Por lo que se procedió a hibridar con sondas para verificar la identidad de estas bandas.

5.5.3 Hibridación de los productos amplificados con la sonda de PRL hipofisiaria de gato.

5.5.3.1 Marcaje de la sonda.

Los genes que presentan similitud con la PRL se identificaron por hibridación utilizando como sonda el DNAc de la PRL hipofisiaria de gato, obtenida por RT-PCR con los iniciadores específicos de PCR largo. En la figura 19 se observa el PA del DNAc de la PRL.

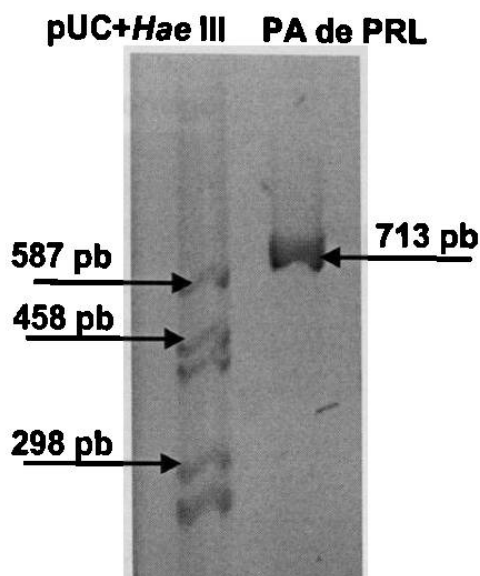


Figura 19. Preparación de la sonda de PRL. Se obtuvo un PA de 713 pb correspondiente al DNAc de la PRL hipofisiaria de gato. El PA se corrió en un gel de agarosa al 2 % junto con pUC + *Hae* III como marcador de peso molecular.

5.5.3.2 Hibridación.

En la figura 20, se observa una señal muy fuerte con una de las bandas de alto peso molecular en el carril de los PA de gato y otra, más débil, de tamaño similar en el carril del borrego. En el caso del gato, se había previamente identificado la banda 7 kpb como derivada de la amplificación del gen de la PRL con los iniciadores consenso. Las bandas de alrededor de 2500 pb e inferiores que se observan muy intensas en el gel para los PA de gato y vaca no dieron señal con esta sonda.

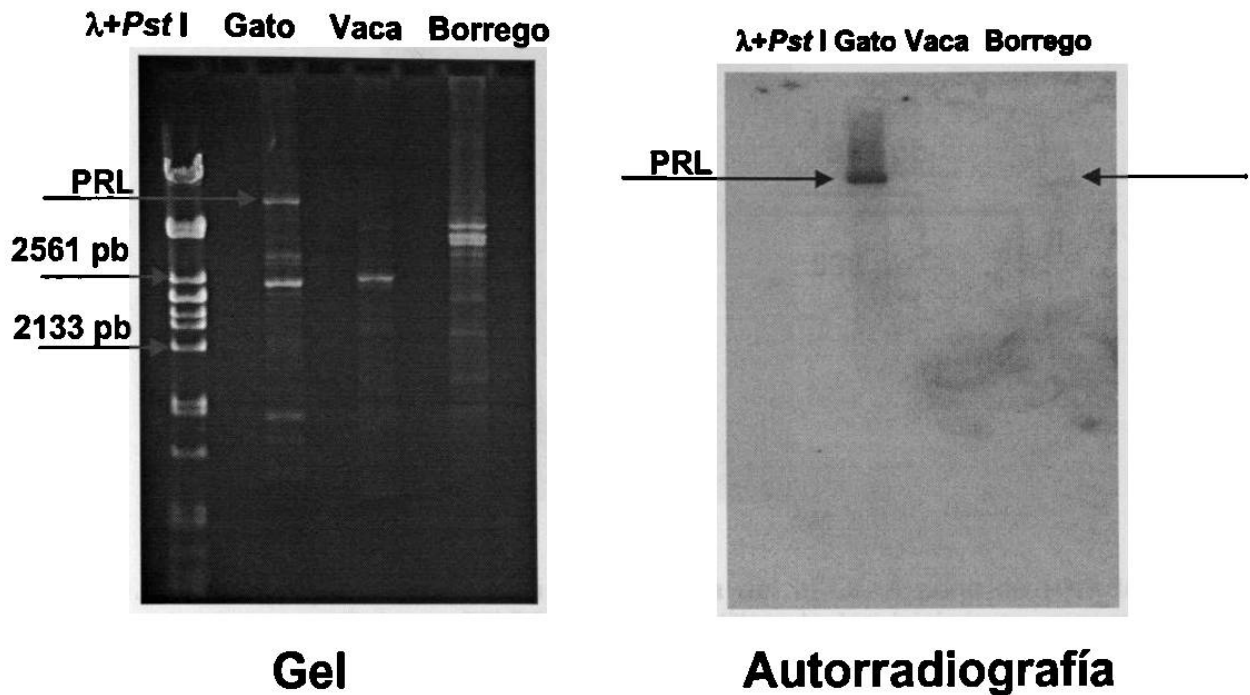


Figura 20. Identificación de los genes de PRL por hibridación. Los productos amplificados con los iniciadores consenso a partir de DNA genómico de gato, vaca y borrego fueron separados en un gel de agarosa al 0.8 % (izquierda). El gel se puso a hibridar con una sonda correspondiente al DNAc de la PRL de gato, marcada con radiactividad. El resultado se observa en la autorradiografía (derecha).

5.5.4 Hibridación de los productos amplificados con sonda de Lactógeno Placentario Bovino II (bPLII).

5.5.4.1 Marcaje de la sonda.

Los genes relacionados al Lactógeno Placentario se evidenciaron por hibridación utilizando el bPLII como sonda. Este se amplificó por RT-PCR a partir de RNA de placenta bovina y se verificó su identidad mediante digestión con las enzimas *Ava II* y *Fok I*. En la figura 21 se observan las digestiones realizadas.

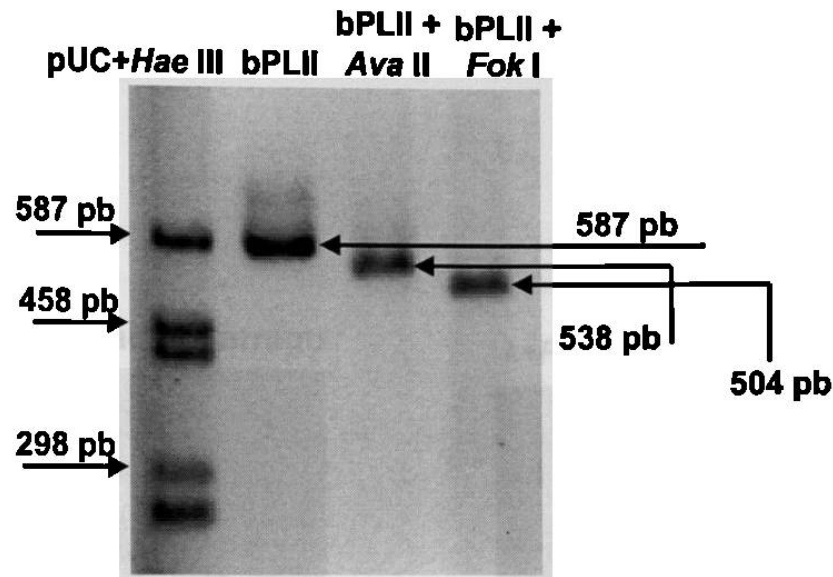


Figura 21. Obtención y caracterización de la sonda del bPLII. A partir de RNA total de placenta bovina, se amplificó por RT-PCR el bPLII utilizando los iniciadores consenso. El producto amplificado se digirió con enzimas de restricción, con el fin de caracterizarlo. Tanto el PA como los productos de la digestión del bPLII se resolvieron en un gel de agarosa al 2 %. EL tamaño del PA como los de las digestiones correspondieron a los esperados.

5.5.4.2 Hibridación.

Al hibridar los PA con la sonda del bPLII, se observaron al menos 5 bandas para los PA de gato, donde la de mayor peso molecular corresponde a la previamente identificada con la sonda de PRL (Figura 22). La diferencia de señal observada indicó que la reacción cruzada entre PL y PRL en las condiciones usadas fue muy baja. En el carril correspondiente a los PA de vaca se observó una mancha muy intensa de aproximadamente 5000 pb, misma que en el gel no se alcanza a distinguir. Esta podría corresponder al propio gen del bPLII. Cabe remarcar que existen bandas que se observan muy intensas en el gel, pero que no presentan hibridación; por lo cual, se puede concluir que la señal observada no se debe a la secuencia de los iniciadores. En el caso del borrego se observan en el gel varias bandas intensas de entre 5000 y 2500 pb,

mismas que presentaron señal en la autorradiografía, aunque el grueso de la mancha hace difícil relacionar las bandas con exactitud.

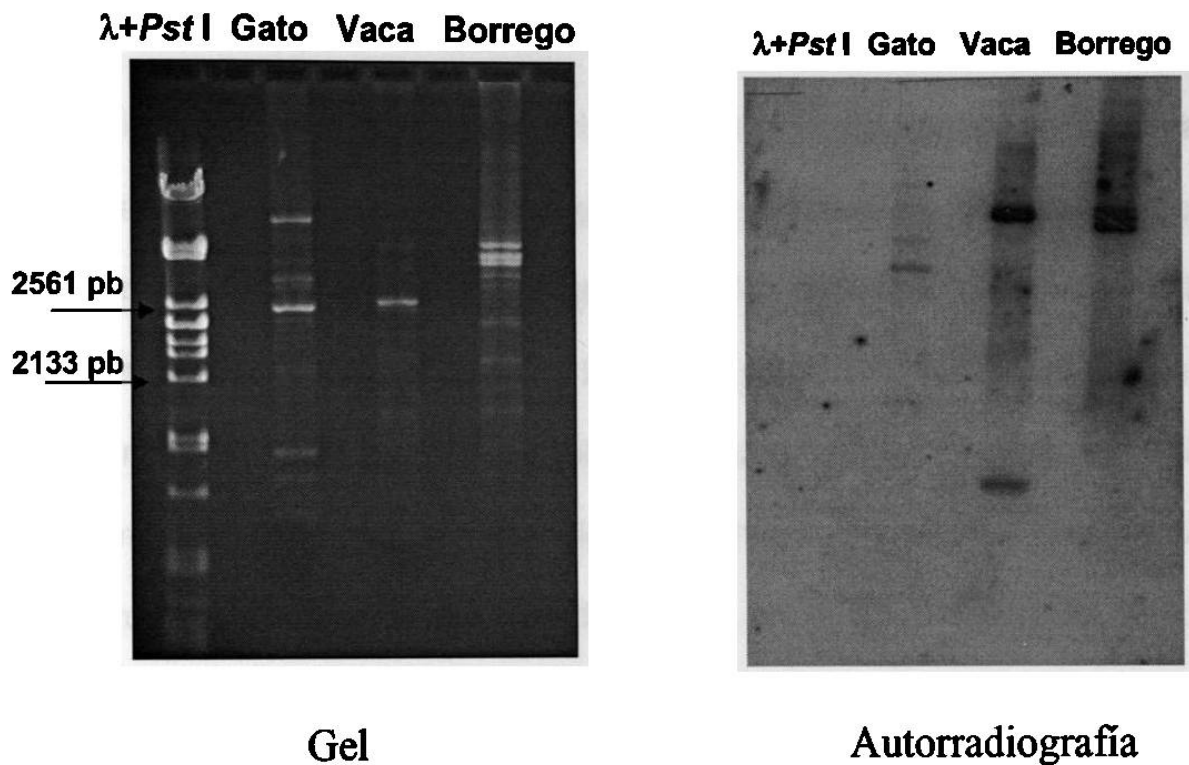


Figura 22. Identificación de los genes relacionados a PL por hibridación. Los genes relacionados a PL se amplificaron por PCR con los iniciadores consenso, a partir de DNA genómico de gato, vaca y borrego. Los PA se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 % (izquierda) y se sometieron a hibridación utilizando como sonda el DNAC del bPLII marcado con radiactividad. El resultado se muestra en la autorradiografía (derecha).

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

El estudio comparativo de las secuencias nucleotídicas está permitiendo aclarar los mecanismos de evolución de los genomas y precisar los mecanismos que se llevaron a cabo durante la divergencia de las especies. La familia de la hormona del crecimiento, prolactina y lactógeno placentario constituye un buen modelo molecular para estudiar la evolución de una familia de genes dentro de los mamíferos. La familia se expandió notablemente en algunos órdenes de mamíferos por duplicación del gen de la GH, en el caso específico de los primates y por duplicación del gen de la PRL en los casos de roedores y rumiantes. De estas duplicaciones del gen de la PRL surgieron los PLs y proteínas relacionadas a PRL, que presentan una expresión específica en la placenta, aunque sus funciones quedan todavía poco elucidadas. En otros órdenes muy cercanos a los rumiantes no se ha reportado hasta la fecha la existencia de genes relacionados a PRL.

6.1 Obtención del gen de la PRL.

Para obtener el gen de la PRL de gato se siguieron dos estrategias a la par. La subclonación de una clona fágica y amplificación por PCR largo. La primera de ellas consistió en subclonar una clona fágica denominada λ PRP-1, cuyo

tamaño de inserto es de aproximadamente 17000 pb. Al ser digerida con las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI, esta clona genera 6 fragmentos de diferentes tamaños, de los cuales uno de 4.5 kpb y otro de 2.9 kpb hibridan con una sonda de PRL hipofisaria de gato. El fragmento de 2.9 kpb fue previamente subclonado por Pérez Rodríguez (66) e incluye el exón IV y parte de los intrones flanqueantes. Al subclonar el inserto en los sitios *Eco* RI y *Bam* HI, se lograron obtener clonas con insertos de 2.9 kpb (previamente reportada), 3.2 kpb y 0.9 kpb. Sin embargo el fragmento de 4.5 kpb aún no se ha logrado obtener. En este trabajo se logró introducir el fragmento de 3.2 kpb en el vector pBS-SK+, el cual se caracterizó y se determinó su secuencia completa. Este incluye el promotor proximal, a partir del sitio *Bam* HI situado 506 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, hasta el sitio *Eco* RI ubicado a 435 pb en el intrón 2. Este fragmento no presentaba hibridación con la sonda de PRL dado que la sonda utilizada únicamente contenía la secuencia codificante del exón III al V.

La segunda estrategia consistió en la amplificación del gen mediante PCR largo, para lo cual se diseñaron dos juegos de iniciadores específicos tomando como DNA blanco la secuencia del DNAC de la PRL previamente reportada en el GenBank (número de acceso U25974). Además de ser específicos estos iniciadores se diseñaron de entre 28 y 29 bases y con una T_m próxima a los 72 °C, que son las características principales para los iniciadores de PCR largo.

El primer juego de iniciadores se une sobre el ATG (sentido) y antes de la señal de poliadenilación (antisentido), esto con la finalidad de amplificar en un solo

ensayo la totalidad del gen. Como al inicio de trabajo no se sabía si la amplificación era factible, se diseñó un segundo juego de iniciadores sobre el exón IV. Dado que las Tm de los cuatro iniciadores eran compatibles entre sí, se podían combinar y así amplificar el gen en dos partes. Sin embargo, esta opción no se utilizó, ya que con el primer juego de iniciadores fue posible amplificar de un solo paso todo el gen. El segundo juego de iniciadores se usó posteriormente para la secuenciación del gen, junto con otros tres iniciadores que se diseñaron sobre cada exón.

Una vez estandarizado el PCR largo, se pudo amplificar el gen en un solo ensayo y se procedió a caracterizarlo. El primer indicio que permitió suponer que este PA era el gen de la PRL fue el tamaño de entre 9 Kpb y 10 Kpb. Junto con el PA correspondiente al gen de PRL se observó una segunda banda de aproximadamente 2.5 Kpb (Figura 8), lo cual, en un principio se supuso que se trataba de otro gen relacionado con la familia GH/PRL/PL. Ensayos posteriores evidenciaron que este PA de mayor tamaño, era producido únicamente por el iniciador sentido y que nada tenía que ver con los miembros de esta familia. La digestión enzimática del PA con *Bam* HI liberó los dos fragmentos esperados (Figura 9). Finalmente la identidad del PA se confirmó nuevamente, al lograr reamplificar el producto de 9 – 10 kpb con los iniciadores consenso que se aparean más al interior del gen, obteniendo así una banda de aproximadamente 7 Kpb.

Para facilitar la clonación del PA, se eligió clonarlo en dos fragmentos en el vector pBS-SK+, aprovechando el sitio de restricción *Bam* HI único. Debido a

que la rTth polimerasa empleada en el PCR largo deja los PA con extremos romos, los sitios elegidos fueron *Bam* HI y *Eco* RV para el vector.

Esta estrategia permitió obtener los 2 tipos de clonas esperados (Figura 10), con lo cual se obtuvo la totalidad del gen. La clonación del PA facilitó su análisis y la determinación de su secuencia.

6.2 Análisis del gen.

Durante el análisis de la secuencia del gen se logró evidenciar que la organización génica consta de 5 exones de tamaño similar a los del humano, separados por 4 intrones de longitud entre 2.1 kpb y 2.6 kpb. El tamaño de los intrones se determinó por PCR utilizando los iniciadores de secuenciación y específicos, los cuales, se unen en los exones flanqueantes. Estos intrones son más cortos que los del humano, y su tamaño más homogéneo. El tener intrones más cortos en el gato, respecto al humano se deba tal vez a la presencia en estos intrones de secuencias repetitivas *Alu* que son propias de los primates. A la fecha, no existen más reportes de genes completos de PRL en mamíferos, por lo que no se tiene otro marco de referencia que no sea el humano.

Para completar la secuencia del gen fue necesario subclonar los intrones 1 y 2, ya que por su tamaño no era posible secuenciarlos en un solo ensayo. Antes de proceder con la subclonación, se realizó una PCR con los iniciadores de secuenciación para amplificar dichos intrones. Los PA fueron caracterizados con diferentes enzimas de restricción a fin de elegir aquellas que se encontraran presentes en el intrón y en el sitio de policlonación del pBS-SK+.

Finalmente se tiene clonado el promotor proximal a partir de la subclona fágica y la unidad transcripcional del gen de PRL a partir del PA. De las 3.2 kpb de la subclona fágica se tienen secuenciadas 2856 pb, repartidas en 506 pb del promotor, 71 pb del exón I, 1662 pb del intrón 1, 182 pb del exón II y 435 pb del intrón 2, faltando la parte media del intrón 1. En la clona proveniente del PA el extremo 5' del gen de PRL, además de las secuencias que comparten con la subclona fágica, se tienen adicionalmente 768 pb más del intrón 2, 108 pb del exón 3 y 753 del intrón 3. Finalmente la clona con el extremo 3' del gen de PRL se tiene secuenciada en su totalidad. En la figura 23, se esquematizan, el promotor y la unidad transcripcional del gen de la PRL de gato, indicando los pb que se tienen secuenciados.

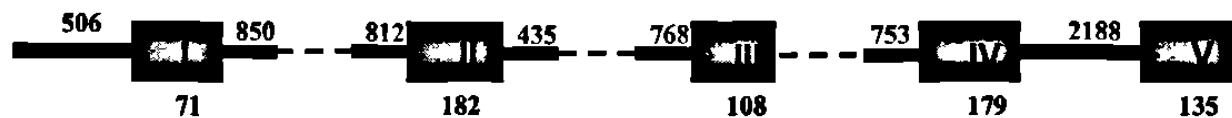


Figura 23. Avance de la secuenciación del gen. Esquema en el que se juntan los resultados de la secuenciación de las tres clonas del gen de PRL (subclona fágica y las dos del PA). En barras negras se representan las pb secuenciadas, mientras que en línea punteada se esquematizan las regiones que faltan por secuenciar.

6.2.1 Análisis del promotor.

En humano y rata, el gen de la PRL contiene dos promotores. Uno distal situado aproximadamente 5 kpb río arriba del sitio de inicio de la transcripción, el cual dirige la expresión del gen en la placenta. El segundo promotor, llamado

proximal, situado inmediatamente anterior del sitio de inicio de la transcripción y encargado de la expresión del gen en la hipófisis (36).

En este trabajo se logró subclonar a partir de la clona fágica y secuenciar el promotor proximal del gen de PRL del gato. Al hacer los alineamientos con los promotores de humano y bovino se observó que las 240 pb cercanas al sitio de inicio de la transcripción se encuentran bien conservadas entre las 3 especies, mientras que la alta semejanza se pierde en las partes más distales por inserciones, deleciones y substituciones. Los sitios de unión a factores transcripcionales se encuentran bien conservados en las tres especies, tanto en secuencia como ubicación. Lo que sugiere que en el gato los mecanismos de regulación de la transcripción del gen de la PRL en hipófisis son similares a los reportados para humano y rata, debido a que el promotor proximal por sí solo es suficiente para permitir la expresión específica de tejido (35). Este promotor es el blanco de diversas señales extracelulares, como glucocorticoides y hormonas tiroideas, mientras que el promotor distal responde a señales enviadas por los estrógenos (73). Dentro de los sitios de unión a factores transcripcionales encontrados en el promotor del gato destacan, la caja TATA ubicada a - 30 pb y los sitios de unión a Pit-1 que es el factor transcripcional específico de tejido responsable de la expresión del gen en la hipófisis (35). El promotor presenta varios sitios de unión a Pit, sin embargo se ha demostrado en otras especies que el sitio de unión a Pit adyacente a la caja TATA es el responsable de la expresión del gen (35). Adicionalmente se encontraron siete sitios más de unión a factores transcripcionales, la mayoría de ellos, responsables de respuesta a hormonas como la insulina, factores de

crecimiento y AMP_c (35). Al construir el árbol filogenético con la secuencia del promotor, se observó que el promotor de gato y el bovino están más relacionados entre sí y más cercanos al ancestro común, lo que sugiere que en estas especies los mecanismos de regulación de la transcripción, al menos en la hipófisis, son similares y parecidos a los de la secuencia ancestral.

6.2.2 Análisis del DNAc.

El análisis del DNAc del gen de PRL de gato reveló que este gen está más relacionado con el del humano, siendo ambas secuencias más cercanas al ancestro común, mientras que en rumiantes y roedores se observó una evolución rápida. Este análisis corrobora los resultados reportados por Wallis (37). La evolución más rápida de la PRL podría ser la consecuencia de una especialización de la proteína o bien a cambios adaptativos, dado que las substituciones no afectan los aminoácidos responsables de la unión al receptor (37). Los cambios observados en rumiantes caen en secuencias que contribuyen a la proteína madura, esto puede constatarse en la figura 15, donde el análisis del extremo 5' no traducible indica que en esta región no hubo cambios drásticos.

6.2.3 Análisis de los intrones.

El análisis de la evolución de los intrones con las secuencias disponibles de los intrones se calculó la distancia entre el humano y el gato mediante el método de Kimura. Del intrón 3 se analizaron 1446 pb correspondientes al extremo 3' de

ambos genes. La distancia calculada por el programa Phylip fue de 0.5466, compartiendo ambas secuencias una similitud de aproximadamente un 55 %.

El análisis del intrón 4 se hizo con la totalidad de la secuencia de éste (2188 pb). La distancia calculada por el programa Phylip fue de 0.9150, el doble de la presentada para el intrón 3. Este resultado no es congruente con el hecho de que los intrones presentan una evolución "neutra" ó libre, es decir, que no está influenciada por las fuerzas de la selección natural. Sin embargo, este aumento de los cambios en el intrón 4, puede reflejar recombinaciones que ocurrieron en esta región. De hecho, el tamaño del cuarto intrón humano (2581 pb), es mayor que el del gato (2188) y el análisis de la secuencia reveló la presencia de una secuencia repetitiva *Alu*. Estos elementos repetitivos son específicos de los primates y por lo tanto no se encuentran en las secuencias de especies de no primates.

6.3 Genes relacionados a PRL en carnívoros.

Mientras que en rumiantes y roedores existen familias de genes relacionados a PRL que se expresan principalmente en la placenta. No existe evidencia de la duplicación del gen de la PRL en carnívoros. Está claramente demostrado que en ambos grupos esta familia génica proviene de la duplicación del gen de la PRL (37). Sin embargo, en rumiantes, la familia de genes relacionados a PRL aparentemente se originó durante el curso evolutivo del orden *Artiodactyla* y los cambios nucleotídicos vinieron después de la divergencia de este orden. En roedores, no está claramente demostrado si la familia de genes relacionados a PRL se originó antes o después de la divergencia de los roedores de los demás

grupos de mamíferos. En ambos grupos, los genes relacionados a PRL han presentado cambios muy rápidos y varias duplicaciones (37).

Dado que los carnívoros se encuentran filogenéticamente cerca de los rumiantes, sería probable que en el gato (representante de los carnívoros), también haya habido duplicación del gen de la PRL. Es por esto que nos dimos a la tarea de evidenciar o descartar este acontecimiento.

La identificación de genes relacionados a PLs y/o PRL se realizó mediante PCR largo utilizando iniciadores consenso diseñados a partir de la secuencia de PRL y PL bovino (siendo éstos más cercanos a los carnívoros, que los roedores). Antes de estandarizar el PCR largo, se comprobó la funcionalidad de los iniciadores consenso mediante una reacción de RT-PCR usando RNA total de placenta bovina. Para verificar la identidad del DNAc amplificado, se realizó una caracterización enzimática. El patrón de cortes reveló que bajo estas condiciones se favorecía la amplificación del bPL II, mismo que se uso como sonda en los ensayos subsecuentes. Una vez estandarizado el PCR largo con estos iniciadores, se procedió a amplificar dichos genes a partir de DNA genómico de gato, vaca y borrego, obteniendo en cada caso diferente patrón de bandas. Cabe mencionar que se obtuvieron bandas muy intensas en el caso del borrego (Figura 18).

Para determinar la identidad de los PA, éstos se hibridaron con las sondas de PRL de gato y bPLII.

El PA de mayor tamaño (7000 pb) en el gato correspondió al gen de la PRL, como lo confirmó la hibridación con la sonda de PRL. Con este antecedente se

pudo precisar que en el caso del borrego, la banda de aproximadamente 7000 pb correspondía también al gen de la PRL,

La hibridación con el bPLII permitió evidenciar genes relacionados a PRL ó a PL. Como se esperaba, se observaron señales de hibridación muy fuertes en los carriles al bovino y borrego. De está manera se confirmó la amplificación de al menos el gen del bPLII a partir de DNA genómico de bovino. La presencia de varias bandas en el caso del borrego, sugiere que para esta especie, los iniciadores consenso permitieron amplificar varios genes relacionados a PL y/o PRL. Cabe mencionar que para esta especie se ha reportado hasta la fecha solo un PL (57).

En el caso del gato, se observaron también bandas que hibridan con la sonda del bPLII. La ausencia de señal para las bandas más intensas (Figura 22), permite descartar que la hibridación se deba a los iniciadores.

Una banda de alrededor de 3000 pb, dio una buena señal y otras más grandes presentaron una señal más débil. La diferencia de intensidad observada entre los carriles de rumiantes y el gato, se puede atribuir al hecho de que la sonda es derivada del bovino.

Este resultado demuestra que en el gato existen genes relacionados a los PLs, los cuales, en este trabajo se denominaron "PLs like". Este trabajo es el primero que demuestra que en carnívoros también existen genes relacionados a PL y por lo tanto que en este orden, hubo también duplicación del gen de la PRL.

Aunque los PLs bovinos y de roedores provienen de la duplicación del gen de la PRL, estos genes son más divergentes que los otros genes relacionados a PRL. Esto sugiere que pudieron haber divergido temprano durante la evolución.

La demostración que existen genes relacionados a PL en el gato (representante de los carnívoros), apoya esta hipótesis, por lo tanto, los resultados indicarían que el gen de la PRL se duplicó una primera vez generando el gen ancestral del PL, en un ancestro común de los rumiantes y carnívoros. El gen se duplicó nuevamente en rumiantes, generando así a los diferentes PLs descritos en bovinos, mientras que el gen de la PRL seguía sufriendo eventos de duplicación.

El obtener la(s) secuencia(s) de los genes del gato relacionados al PL, permitirá precisar la evolución de los genes de PRL y PL en los órdenes Artiodactyla y Carnívora, además su comparación con las secuencias de PL relacionadas para los roedores permitirá confirmar o descartar si estos genes son ortólogos, aclarando así un paradigma de la evolución de los genes de esta familia en mamíferos “¿Son independientes los eventos de duplicación del gen de la PRL en roedores y rumiantes?”.

En este trabajo se evidenciaron genes relacionados a PL, sin embargo, no se sabe a la fecha si estos genes son funcionales y que dirige la expresión de proteínas placentarias. Forsyth, mediante RIA no logró detectar actividad lactogénica en plasma de gato (74), lo que indicaría que estos genes son pseudogenes. Sin embargo, como se mencionó, la expresión de las proteínas de la familia de la PRL tienen un patrón espacio-temporal muy específico. El análisis de la expresión de estos genes en placenta de gato a lo largo de la gestación permitirá ver si estos genes se expresan, o si se trata de pseudogenes, en qué periodo de la gestación se expresan y si realmente tienen actividad lactogénica para poder llamarlos PLs.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

En este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

- 1.- La estrategia de PCR largo permitió amplificar la totalidad de la unidad transcripcional del gen de la PRL de gato.
- 2.- Se logró clonar y secuenciar el gen completo de la PRL de gato, incluyendo la región proximal del promotor.
- 3.- El gen de la PRL de gato consiste de 5 exones separados por 4 intrones cuyo tamaño varía entre 2.1 y 2.6 Kpb.
- 4.- El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas permitió confirmar que el gen de la PRL presentó una evolución lenta en esta especie.
- 5.- La región promotora proximal presenta una alta similitud con las reportadas para los genes de PRL de humano y bovino, por lo cual se pudo inferir que la regulación del gen en la hipófisis es similar entre estas especies.
- 6.- Por primera vez se evidenciaron genes relacionados a PLs en el orden carnívora. Este resultado demuestra que la duplicación del gen de la PRL ocurrió también en este orden.

CAPITULO VIII**BIBLIOGRAFÍA**

- 1) Singer M, y Berg P. 1991. Genes and Genomes. A changing perspective. *University Science books*. USA.
- 2) Ohta Tomoko 1991. Multigene families and evolution of complexity. *J. Mol. Evol.* **33**:34-41.
- 3) Rubin D.A. y Dores R.M. 1994. Cloning of a growth hormone form a primitive bony fish and its phylogenetics relationships. *General and Comparative Endocrinology.* **95**:71-83
- 4) Amemiya Y, Sogabe Y, Nozaki M, Takahshi A y Kawauchi H. 1998. Somatolactin in the white sturgeon and african lungfish and its evolutionary significance. *General and Comparative Endocrinology* **114**:181-190.
- 5) Tanaka M, Yoshitaka H, Masanori W and Nakashima K. 1992. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene* **112**:235-239.
- 6) Forsyth I.A. 1994. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. *Experimental and Clinical Endocrinology* **102**:244-251.
- 7) Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA. 1984. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J.* **3**:429-437.

- 8) Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA. 1981. Human prolactin: cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem* **256**:4007-4016.
- 9) Bewley TA, Li CH. 1972. Circular dichroism studies on human pituitary growth hormone and ovine pituitary lactogenic hormone. *Biochemistry* **11**:884-888.
- 10) Goffin V, Martial JA, Summers NL. 1995. Use of a model to understand prolactin and growth hormone specificities. *Protein Eng* **8**:1215-1231.
- 11) Sinha YN. 1995. Structural variants of prolactin: Occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* **16**:354-369.
- 12) Rentier-Delrue F, Swennen D, Lion M, Martial JA. 1989. Tilapia prolactin: molecular cloning of two cDNAs and expression in *Escherichia coli*. *DNA* **8**:261-270.
- 13) Striker P, Grueter R. 1928. Action du lobe antérieur de l'hypophyse sur la montée laiteuse. *C R Soc Biol* **99**:1978-1980.
- 14) Ogawa M, Yagasaki M, Yamazaki F. 1973. The effect of prolactin on water influx in isolated gills of the goldfish *Carassius auratus*. *L. Comp Biochem Physiol A* **44**:1177-1183.
- 15) Pérez-Villamil B, Bordiu E, Puente-Cueva M. 1992. Involvement of physiological prolactin levels in growth and prolactin receptor content of prostate glands and testes in developing male rats. *J Endocrinol* **132**:449-459.
- 16) Silverin B. 1980. Effects of prolactin on the gonad and body weight of the male pied flycatcher during the breeding period. *Endocrinologie* **76**:45-50.

- 17) Dodd MHI, Dodd JM. 1976. The biology of metamorphosis. In: Lofts B (ed) *Physiology of the Amphibia. Academic Press, New York* 467-599.
- 18) Yamamoto K, Kikuyama S. 1982. Effect on prolactin antiserum on growth and resorption of tadpole tail. *Endocrinol Jpn* 29:81-85.
- 19) Duncan MJ, Goldman BD. 1895. Physiological doses of prolactin stimulate pelage pigmentation in Djungarian hamster. *Am J Physiol* 24:664-667.
- 20) Johnson JW, Tyson JE, Mitzner W, Beck JC, Andreassen B, London WT, Villar J. 1985. Amniotic fluid prolactin and fetal lung maturation. *Am J Obstet Gynecol* 153:372-380.
- 21) Glasow A, Horn LC, Taymans SE, Stratakis CA, Kelly PA, Kohler U, Vonderhaar BK, Bornstein SR. 2001. Mutational analysis of the PRL receptor gene in human breast tumors with differential PRL receptor protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3826-3832.
- 22) Kumaran B, Gunasekar PG, Aruldas MM, Govindarajulu P. 1989. Influence of prolactin on neural and glial cellular adenosine triphosphatases in immature male bonnet monkeys (*Macaca radiata, Geoffroy*). *Indian J Exp Biol* 27:17-19.
- 23) Kumaran B, Gunasekar PG, Aruldas MM, Govindarajulu P. 1988. Role of prolactin on neural and glial cellular enzymes involved in carbohydrate metabolism. I. Studies on immature male bonnet monkeys. *Brain Res* 450:325-333.
- 24) Sorenson RL, Brelje TC, Hegre OD, Marshall S, Anaya P, Sheridan JD. 1987. Prolactin (*In vitro*) decreases the glucose stimulation threshold,

- enhances insulin secretion, and increases dye coupling among islet β cell. *Endocrinology* **121**:1447-1453.
- 25) Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE. 1997. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology* **138**:756-763.
- 26) Nicoll CS. 1974. Physiological actions of prolactin. In: Knobil E, Sawyer WH (eds) Handbook of Physiology. Section 7. *Endocrinology American Physiological Society* Washington DC 253-292.
- 27) Chilton BS, Daniel Jr JC. 1987. Differences in the rabbit uterine response to progesterone as influenced by growth hormone or prolactin. *J Reprod Fertil* **79**:581-587.
- 28) Vijayan E, Jayashree J. 1993. Prolactin suppression during pre- and post-implantation periods on rat uterine glucosamine synthase activity. *Indian J Exp Biol* **31**:386-388.
- 29) Nag S, Sanyal G, Ghosh KK, Biswas NM. 1981. Prolactin suppression and spermatogenic developments in maturing rats. A quantitative study. *Horm Res* **15**:72-77.
- 30) Murphy WJ, Durum SK, Longo DL. 1993. Differential effects of growth hormone and prolactin on murine T cell development and function. *J Exp Med* **178**:231-236.

- 31) Gordon EM, Johnson TR, Ramos LP, Schmeidler-Sapiro KT. 1991. Enhanced expression of factor XII (Hageman factor) in isolated livers of estrogen and prolactin treated rats. *J Lab Clin Med* 117:353-358.
- 32) Nagy E, Berczi I. 1991. Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinology* 128:2776-2784.
- 33) Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639-669.
- 34) Posner BI, Kelly PA, Shiu RP, Friesen HG. 1974. Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterization. *Endocrinology* 95:521-531.
- 35) Makiko Suzuki Fliss, Patricia M. Hinkle and Carter Bancroft. 1999. Expression cloning and characterization of PREB (Prolactin regulatory Element Binding), a novel WD motif DNA-binding protein with a capacity to regulate prolactin promoter activity. *Molecular Endocrinology* 13:644-657.
- 36) Gaasenbeek M, Gellersen B, DiMattia GE. 1999. Dnase I hypersensitivity analysis of non-pituitary human prolactin gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 152:147-159.
- 37) Michael Wallis. 2000. Episodic evolution of protein hormones: Molecular evolution of pituitary prolactin. *Journal of Molecular Evolution* 50:465-473.
- 38) Sifuentes Rincón AM. 2000. Estudio de la familia génica GH-PL en el gato doméstico (*Felis catus*): Un modelo molecular para precisar la evolución de los carnívoros. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la UANL.

- 39) Roby KF, Deb S, Gibori G, Szpirer C, Levan G, Kwok SC, Soares MJ. 1993. Decidual prolactin-related protein. Identification, molecular cloning and characterization. *J Biol Chem* 15:3136-3142.
- 40) Houghton DJ, Shackleton P, Obiekne BC, Chard T. 1984. Relationship of maternal and fetal levels of human placental lactogen to the weight and sex of the fetus. *Placenta* 5:455-458.
- 41) Josimovich JB, and Atwood BL. 1964. Human placental lactogen (HPL), a trophoblastic hormone synergizing with chorionic gonadotropin and potentiating the anabolic effects of pituitary growth hormone. *Am J Obstet Gynecol* 88:867.
- 42) Beck JS, Gordon DD, Donald D, Melvin JM. 1969. Characterization of antisera to a growth-hormone-like placental antigen (human placental lactogen): immunofluorescence studies with these sera on normal and pathological syncytiotrophoblast. *J Pathol* 97:545.
- 43) Bhaumick B, Dawson EP, Bala RM. 1987. The effects of insulin-like growth factor-I and insulin on placental lactogen production by human term placental explants. *Biochem Biophys Res Commun* 144:674-682.
- 44) Wilson EA, Jawad MJ, Vernon MW. 1984. Effect of epidermal growth factor on hormone secretion by term placenta in organ culture. *Am J Obstet Gynecol* 149:579-580.
- 45) Handwerger S, Quarford S, Barrett J, Harman I. 1987. Apolipoproteins AI, AII and CII stimulate placental lactogen release from human placental tissue: A novel action of HDL apolipoproteins. *J Clin Invest* 79:625-628.

- 46) McGarry EE, Beck JC. 1972. Biological effects of non-primate prolactin and human placental lactogen in Wolstenholme GEW, Knight J. (eds): Lactogenic Hormones. *London Churchill Livington* 361.
- 47) Felber JP, Zaragoza M, Benuzzi-Badoni and Genazzani AR. 1972. The double effect of human chorionic somatomammotropin (HCS) and pregnancy on lipogenesis and on lipolysis in the isolated rat epidermal fat pad cells. *Horm Metab Res* 4:293.
- 48) Williams C and Coltart TM. 1978. Adipose tissue metabolism in pregnancy: the lipolytic effect of human placental lactogen. *Br J Obstet Gyneacol* 85:43.
- 49) Walker WH, SL Fitzpatrick, HA Barrera-Saldaña, D Reséndez-Perez and GF Saunders. 1991. The human placental lactogen genes: Structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocrine Reviews* 12:316-328.
- 50) Kim YG and Felig. 1971. Plasma chorionic somatomotropin levels during starvation in midpregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 32:864.
- 51) Hill DJ, Freemark M, Strain AJ, Handwerger S, Milner RDG. 1988. Placental lactogen and growth hormone receptors in human fetal tissues: Relationship to fetal plasma HPL concentrations and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 66:1283-1290.
- 52) Strain AJ, Hill DJ, Swenne I, Milner RDJ. 1987. The regulation of DNA synthesis in human fetal hepatocytes by placental lactogen, growth hormone and insulin-like growth factor I/somatomedin-C. *J Cell Physiol* 132:33-40.

- 53) Swenne I, Hill DJ, Strin AJ, Milner RDJ. 1987. Effects of human placental lactogen and growth hormone on the production of insulin and somatomedin-C/insulin growth factor I. *J Endocrinol* 113:297-303.
- 54) Hill DJ, Crace CJ, Strain AJ, Milner RDG. 1986. Regulation of amino acid uptake and DNA synthesis in isolated human fetal fibroblast and myoblast: Effect of human placental lactogen, somatomedin-C, multiplication stimulating activity and insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 62:753-761.
- 55) Hurley TW, Thadani P, Kuhn CM, Schanberg SM, Handwerger S. 1980. Differential effects of placental lactogen, growth hormone and prolactin on rat liver ornithine decarboxylase in perinatal period. *Life Sci* 27:2269-2275.
- 56) Freemark M, Handwerger S. 1985. Ovine placental lactogen inhibits glucagon-induced glycogenolysis in fetal rat hepatocytes. *Endocrinology* 116:1275-1280.
- 57) Gregoraszczyk EL, Gertler A, Futoma E. 2000. Effect of exogenous ovine placental lactogen on basal and prostaglandin-stimulated progesterone production by porcine luteal cells. *Acta Vet Hung* 48:199-208.
- 58) Guoli Dai, Michael W, Wolfe and Michael J Soares. 1999. Distinct regulatory regions from the prolactin-like protein-C variant promoter direct trophoblast giant cell *versus* spongiotrophoblast cell-specific expression. *Endocrinology* 140:4691-4698.
- 59) Rasmussen CA, Orwig KE, Vellucci S, Soares MJ. 1997. Dual expression of prolactin-related protein in decidua and trophoblast tissues during pregnancy in rats. *Biol Reprod* 56:647-654.

- 60)Toft DJ, Linzer DI. 2000. Identification of three prolactin-related hormones as markers of invasive trophoblasts in the rat. *Biol Reprod* 63:519-525.
- 61)Toft DJ, Linzer DI. 1999. Prolactin (Prl)-like protein-J a novel member of the Prl/growth hormone family is exclusively expressed in maternal decidua. *Endocrinology* 140:5095-5101.
- 62)Dai G, Belinda M, Chapman, Bing Liu, Kyle E, Orwig, Danhua Wang, Robert A, White, Preuett B and Soares MJ. 1998. A new member of the mouse prolactin (PRL)-like protein-C subfamily, PRL-like protein-C α : Structure and expression. *Endocrinology* 139:5157-5163.
- 63)Müller H, Liu B, Croy AB, Head JR, Hunt JS, Dai G and Soares MJ. 1999. Uterine natural killer cells are targets for a trophoblast cell-specific cytokine prolactin-like protein-A. *Endocrinology* 140:2711-2720.
- 64)Dietz AB, Georges M, Threadgill DW, Womack JE, Schuler LA. 1992. Somatic cell mapping, polymorphism and linkage analysis of bovine prolactin-related proteins and placental lactogen. *Genomics* 14:137-143.
- 65)Anthony RV, Liang R, Kayl EP, Pratt SL. 1995. The growth hormone/prolactin gene family in ruminant placentae. *J Reprod Fertil Suppl* 49:83-95.
- 66)Pérez Rodríguez LA. 2001. Subclonación y caracterización del gen de la prolactina en el gato doméstico (*Felis catus*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Chiapas.

- 67) Barrera Saldaña HA. 1982. Expresión of the human placental lactogen genes. Ph. D. Thesis, Graduate School of Biomedical Sciences, The Texas University at Houston.
- 68) Inoue H, Nojima H, Okamaya H. 1999. High efficiency transformation of *E. coli* with plasmid. *Gene* **96**:23-28.
- 69) Sambrook J, Fritsh EF and Maniatis T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- 70) Sanger FS, Nicklen AR. 1997. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad USA* **74**:5463-5467.
- 71) Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Pacckage) version 3.5c. Departament of Genetics, University of Washintong, Seattle.
- 72) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smit JA, Struhl K. 1992. Short protocols in molecular biology 3rd Ed. John Wiley & Sons Inc.
- 73) Cécile Van de Weerd, Bernard Peers, Alexandra Belayew, Joseph A Martial. 2000. Far Upstream sequences regulate the human prolactin promoter transcription. *Neuroendocrinology* **71**:124-137.
- 74) Forsyth IA. 1986. Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the roles or prolactin, growth hormone and placental lactogen. *Journal Dairy Science* **69**:886-903.



DONATIVO

