

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



“REGULACION DE LA EXPRESION DIFERENCIAL
DEL GEN hGH-V EN CELULAS EN CULTIVO”

POR:

CLARISA GPE. ORTIZ CERVANTES

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA MOLECULAR
E INGENIERIA GENETICA

JULIO DE 2002

FM
OH440

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2007

2002

2002

2007

2002

2007

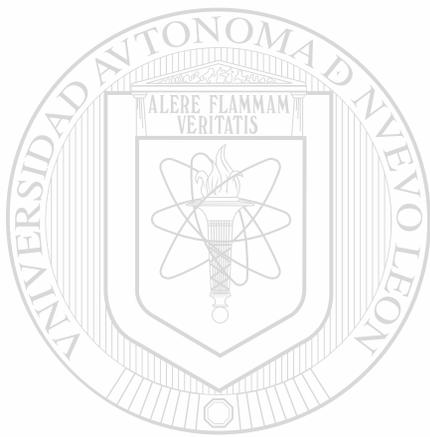
2002

2007

2002

2007

2002

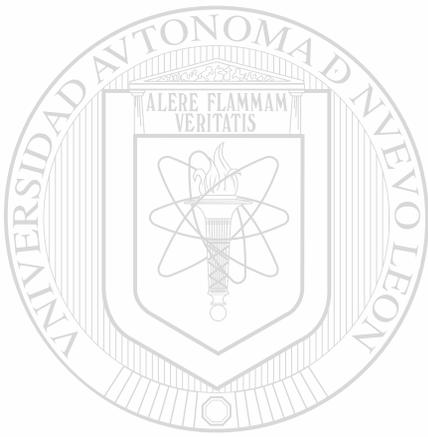


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



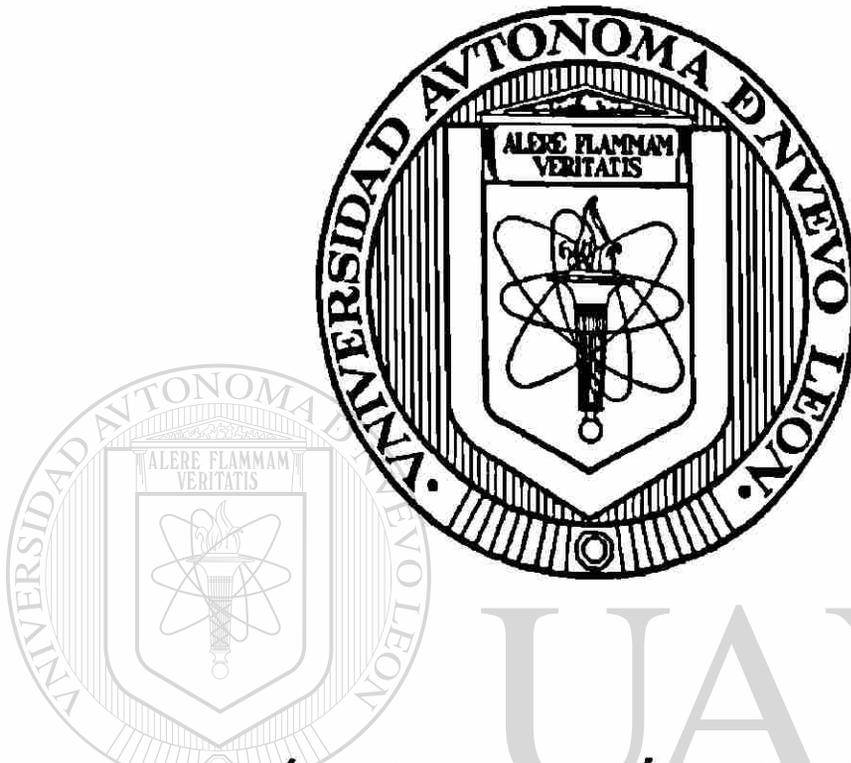
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**“REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN
hGH -V EN CÉLULAS EN CULTIVO”**

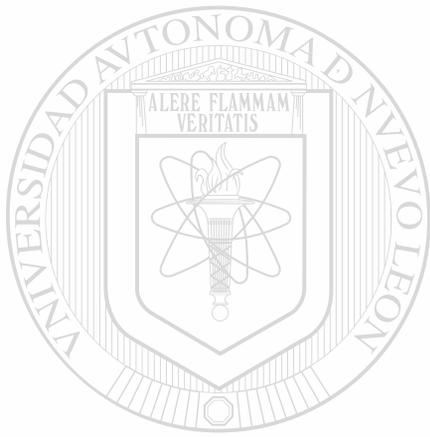
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
POR

CLARISA GPE. ORTIZ CERVANTES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

JULIO DEL 2002

TM
QH440
.4
.07
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

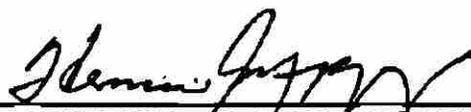
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN hGH-V EN CELULAS EN CULTIVO

Aprobación de la Tesis:



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ
Director de Tesis



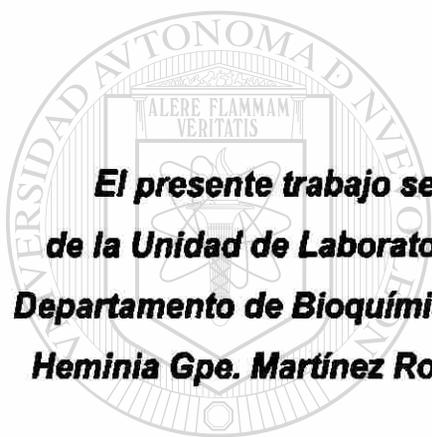
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co – Director de Tesis



DRA AGNES REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
De Investigación y Estudios de Posgrado



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Celular, de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, bajo la dirección de la Dra. Heminia Gpe. Martínez Rodríguez y la co-dirección del Dr. Hugo Barrera Saldaña.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez por la confianza, paciencia y apoyo que me brindó, gracias por sus consejos.

Al Dr. Hugo Barrera-Saldaña por darme la oportunidad de incursionar en el hermoso mundo de la investigación.

A la Dra. Agnès Revol de Mendoza, por sus sugerencias para la elaboración de este manuscrito.

A los que coincidimos en el laboratorio de Biología Celular: Martín, Polo, Virgilio, Martha y Yolanda muchas gracias por todos los gratos momentos que pasamos.

A la “Generación de los 12” Lulú, Lety, Malena, Nancy, Polo, Sergio, Virgilio, Itzel, Mauricio, Prisco y Aurelio, por la amistad que me brindaron durante este tiempo.

A los que coincidimos la ULIEG: Irma, Iram, Claudio con quienes compartí momentos muy agradables.

A mi buena amiga Mónica que siempre estuvo conmigo. Muchas Gracias Moni.

A mis amigos de siempre, que a pesar de la distancia y diferencia de ideas siempre han estado conmigo: Veronica, Luz, Lizbeth, Oscar, Juan.

De manera general, a todo el personal de la ULIEG que de alguna u otra manera estuvo involucrado en el trabajo experimental de mi tesis.

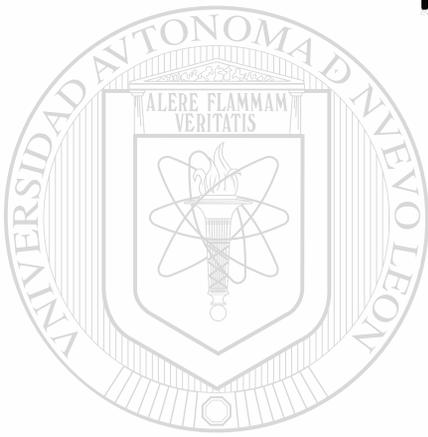
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado.

DEDICATORIAS

A mis queridos padres, Sres. Antonio Ortiz Medina y Gregoria Cervantes Fajardo, por todo el amor, apoyo y confianza que me brindan. Madre tus palabras de confianza me han ayudado en esta importante etapa.

A mi hermano Marco Antonio y a mi nueva hermana Flerida por todo su cariño.

A toda mi familia con quienes crecí y al vernos de nuevo comparto momentos muy gratos.

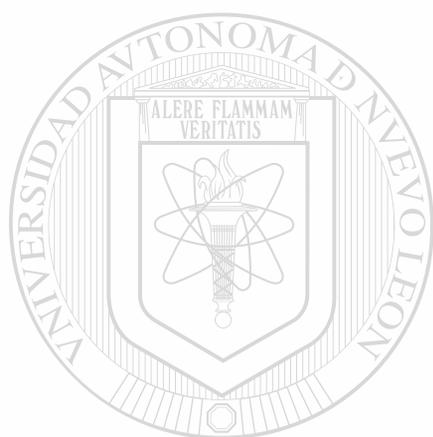


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*Mientras la vida sigue su curso,
¿Quién leerá....este recuerdo de aquella cuya memoria jamás morirá?.....*

TABLA DE CONTENIDO

Página

Capítulo I

Introducción	1
1.1 Modelo de estudio : El locus hGH – hPL	2
1.2 Proteínas codificadas por el complejo hGH – hPL	3
1.3 Funciones de las hormonas codificadas por los genes del complejo hGH hPL	5
1.4 Factores transcripcionales que influyen en la expresión de los genes del complejo hGH – hPL	8
1.5 Influencia de la longitud de los promotores en la expresión	12
1.6 Estimuladores de la expresión de hPL	13
1.6.1 Suero materno	13
1.6.2 AMPc	14
1.6.3 Interleucina 6 y factores de crecimiento	14
1.6.4 Moléculas esteroides y triyodo tironina	15
Justificación	16

Capítulo II

Objetivos	17
2.1 Objetivo general	17
2.2 Objetivos específicos	17

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Capítulo III

Material y métodos	18
3.1 Origen de los reactivos	18
3.2 Secuencias de los iniciadores utilizados	19
3.3 Origen del material biológico	19
3.4 Equipo	20
3.5 Condiciones del cultivo celular	21
3.6 Transfección mediante lipofección	22
3.7 Detección de β - Galactosidasa	23
3.8 Cuantificación de proteínas totales	25
3.9 Detección de hGH – N (ELISA)	26
4.0 Extracción del RNA	28
4.1 Cuantificación de los niveles de expresión de hGH – V	29

Capítulo IV

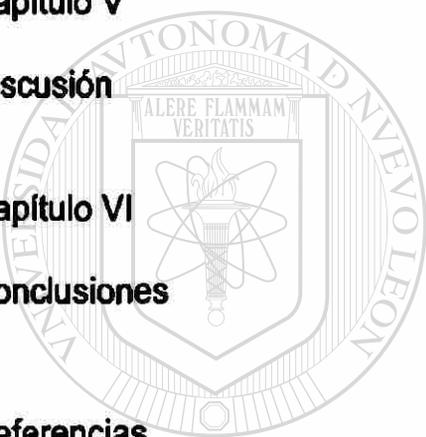
Resultados	35
4.1 Cultivo de las líneas celulares	35
4.2 RNA total de los cultivos celulares	35
4.3 Amplificación de los genes internos hGH – V / GAPDH en JEG – 3	37
4.4 Estudios de transfección	38
4.4.1 Vectores utilizados para los ensayos de transfección	39
4.5 Análisis de los genes reporteros β - galactosidasa y hGH-N	40
4.6 Análisis por RT – PCR de la expresión del gen hGH – V transfectado	42

Capítulo V

Discusión	46
-----------	----

Capítulo VI

Conclusiones	51
Referencias	52

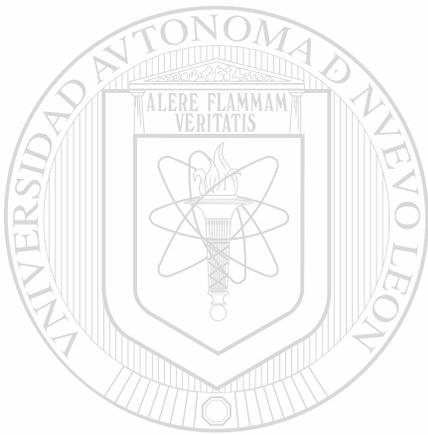


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.- Preparación de los estándares de HGH	27
2.- Componentes de la RT- PCR	31
3.- Preparación de la PCR para hGH – V	31
4.- Preparación de la PCR para GAPDH / hGH – V	33
5.- Actividad de β -Galactosidasa	38



UANL

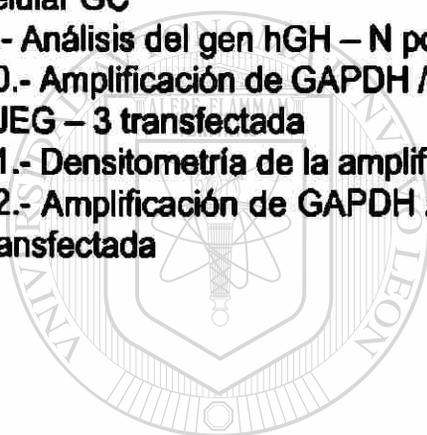
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.- Anatomía del complejo multigénico hGH - hPL	3
2.- Estrategia general	34
3.- RNAs totales de la línea celular JEG – 3	36
4.- RNAs totales provenientes de las líneas celulares JEG – 3 y GC transfectadas	36
5.- Productos amplificados de hGH – V y GAPDH	37
6.- Vectores utilizados en los ensayos de transfección	39
7.- Análisis del gen reportero β – galactosidasa en la línea celular JEG – 3	40
8.- Análisis del gen reportero β – galactosidasa en la línea celular GC	41
9.- Análisis del gen hGH – N por ELISA	42
10.- Amplificación de GAPDH / hGH – V en la línea celular JEG – 3 transfectada	43
11.- Densitometría de la amplificación de GAPDH / hGH - V	44
12.- Amplificación de GAPDH / hGH – V en la línea celular GC transfectada	45



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



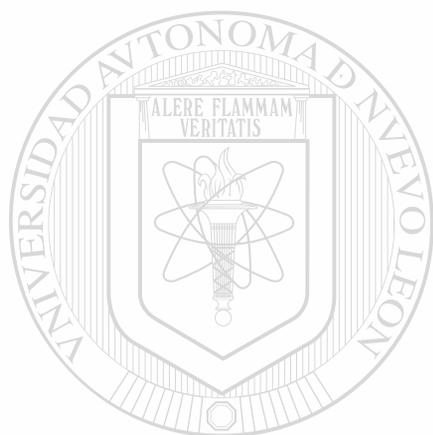
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

μ l	Micro litro
μ g	Microgramo
μ M	Concentración micromolar
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
Abs	Absorbancia
BSA	Albúmina sérica bovina
CPRG	Rojo de clorofenol beta – D galactopiranosido
DMEM	Medio mínimo esencial Dulbecco's
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
GPDH	Glicerol 3- fosfato deshidrogenasa
GH	Homona del crecimiento
HGH -N	Homona del crecimiento normal
HGH - V	Homona del crecimiento variante
h	Horas
IGF - 1	Factor de crecimiento parecido a insulina
kDa	Kilodaltones
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
N	Normal
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
S	Segundos
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Buffer tris– borato
TE	Buffer tris- EDTA
T3	Homona. 3, 3', 5- Triyodotironina
UV	Ultravioleta
U	Unidades
1,25-(OH) ₂ D3	1, 25 – dihidroxivitamina D3

V
Vol.
X

Voltios
Volumen
Número de veces la concentración



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Clarisa Gpe. Ortiz Cervantes

Fecha de Graduación: Julio, 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio : REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL
GEN hGH – V EN CÉLULAS EN CULTIVO**

Número de páginas : 58

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería
Genética**

Área de estudio: Biología Molecular

Propósito y Método del Estudio: La familia de genes hGH – hPL consta de 5 genes localizados en el brazo largo del cromosoma 17, compartiendo entre sí una similitud en secuencia nucleotídica superior al 90 %. Estos genes tienen una expresión selectiva de tejido y niveles de expresión muy variables. Diferencias en las secuencias de los elementos de respuesta a factores transcripcionales tales como vitamina D, éster de forbol, ácido retinoico, triyodo - tironina, interleucina – 6, AMPc, quizás puedan explicar la expresión diferencial que se observa entre los genes del complejo que se expresan en un mismo tejido. El gen hGH – V se expresa en la placenta y codifica para una hormona de crecimiento que alcanza a la circulación materna y sustituye al final del embarazo a la hormona de crecimiento producida en la hipófisis de la madre. hGH - V es el gen activo que se expresa a mas bajos niveles y poco se conoce acerca de la expresión y de su regulación por los diferentes factores transcripcionales.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo de la expresión de la regulación de la expresión del gen hGH–V por diferentes moduladores en cultivo celular (JEG – 3 derivada de coriocarcinoma de placenta humana y GC de hipófisis de rata).

Contribuciones y conclusiones: La expresión endógena de hGH – V no se detectó por RT – PCR en la línea celular JEG – 3, ni en presencia de moduladores (ácido retinoico, triyodotironina y éster de forbol), en cambio en los experimentos de transfección al analizar el gen reportero β -galactosidasa se observó que los tres moduladores aumentaron desde casi 6 veces para ácido retinoico, 5 veces para triyodotironina y 5.3 para éster de forbol. En los ensayos de RT – PCR en los que se analizó la expresión del vector que contenía el gen completo de hGH – V se logró detectar un producto de amplificación y se observaron variaciones de la expresión del promotor con los diferentes moduladores, éstas concordaron con lo observado en los ensayos por ELISA. Se comprobó la especificidad tisular de los promotores de los genes hGH – V y hGH – N.

FIRMA DEL DIRECTOR:



Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez

FIRMA DEL CO-DIRECTOR:



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Con el nacimiento de la tecnología del DNA recombinante, esta biomolécula se ha vuelto una de las más fáciles de analizar. Se han realizado numerosos estudios con el propósito de conocer la organización de los genes y cual es su estructura molecular, para de esta manera lograr entender su función, regulación y origen.

La expresión génica eficiente requiere de múltiples pasos que incluyen la transcripción y el procesamiento del pre-RNAm. Estos eventos nucleares son mediados por complejos de macromoléculas, las cuales han sido analizadas en detalle durante muchos años usando métodos bioquímicos, moleculares y genéticos tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos estudios han revelado los componentes moleculares y los mecanismos básicos implicados en la transcripción y procesamiento de los RNAs necesarios para la expresión de los genes. Pero para comprender por completo la regulación de la expresión génica, es importante revelar el espacio y la interacción temporal de estos eventos (transcripción, procesamiento de RNA, traducción) y analizar como se relacionan unos con otros; así como a la estructura del núcleo celular.

El estudio de las secuencias reguladoras nos permitirá tener una idea de cómo se llevan a cabo todos estos eventos, así como en un momento dado, controlar e incluso manipular la expresión de los genes. Una forma de lograr esto, es sin duda, aportar conocimientos sobre la interacción de estas secuencias con factores transcripcionales y algunas otras moléculas que al unirse al DNA, inician o potencian la transcripción del RNAm.

1.1 Modelo de estudio: El locus hGH-hPL

La familia de los genes hGH y hPL consta de cinco miembros que se localizan en el brazo largo del cromosoma 17 entre las bandas q22- q24, los cuales están ordenados de 5' a 3' de la siguiente manera: hGH-N, hPL-1, hPL-2, hGH-V y hPL-3 (Chen y cols., 1988); todos ellos se encuentran en la misma orientación transcripcional y cada uno de ellos tiene cinco exones y cuatro intrones (Harper y cols, 1982), abarcando una región de aproximadamente 55 kb (Figura 1). Se cree que estos genes se originaron por duplicación a partir de un ancestro común; por lo tanto despliegan una similitud de secuencia nucleotídica superior al 90% (Nickel y cols, 1991). A pesar de ello, estos genes se expresan de manera selectiva: el gen hGH-N se expresa en las células somatotróficas de la adenohipófisis y los cuatro genes restantes lo hacen en el sinciotrofoblasto placentario (Chen y cols, 1988). En contraste con el gen hGH-N, del cual se conoce su función, todavía no se han logrado establecer con precisión los papeles funcionales de los genes placentarios hGH-V y hPLs. El RNAm del gen hGH-N constituye cerca del 3% del total del RNA sintetizado en la adenohipófisis, mientras que los RNAm de los genes que se expresan en la placenta varían desde un 3% para hPL-2 y hPL-3 hasta un 0.001% para el gen hGH-V, pasando por un 0.01% para hPL-1 del RNA placentario total (Chen y cols, 1988). Esta marcada expresión específica de tejido así como los diferentes niveles de expresión de los genes miembros del complejo génico hGH-hPL, lo convierten en un excelente modelo para el estudio de la regulación de la expresión génica en eucariotes superiores.

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH - V en células en cultivo"

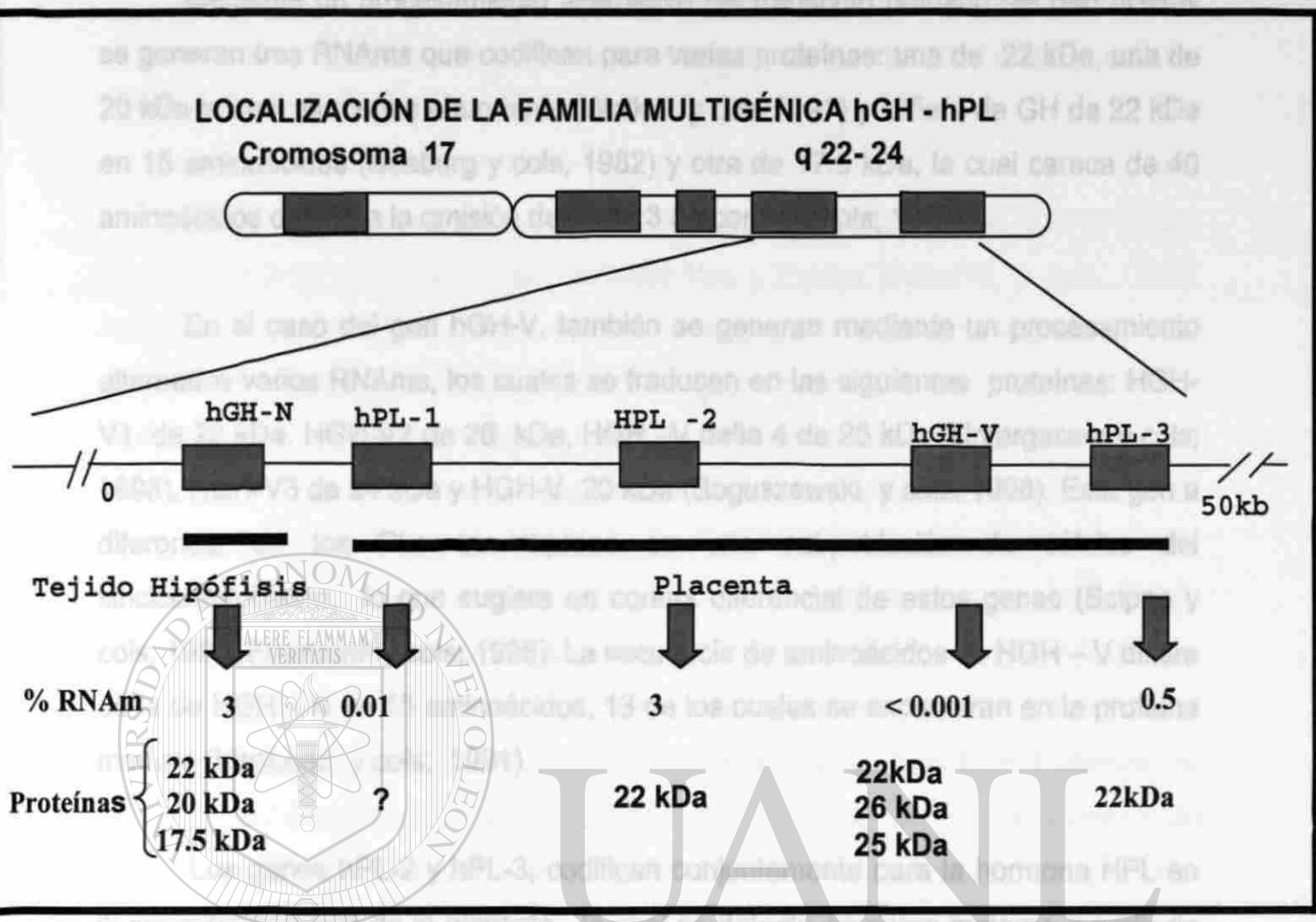


Figura 1. Anatomía del complejo multigénico hGH – hPL. Se muestra el arreglo de estos genes, así como su expresión diferencial y específica de tejido y las proteínas sintetizadas a partir de cada uno de los genes (Harper y cols; 1982; Chen y cols; 1989)

1.2 Proteínas codificadas por el complejo hGH - hPL

Los productos mejor caracterizados de esta familia son los polipéptidos hGH y hPL de 191 aminoácidos y tienen un peso molecular aproximado de 22, 000 daltons, son las proteínas más abundantes producidas por sus respectivos tejidos. Estas proteínas muestran una similitud de secuencia aminoacídica del 85 %, pero su expresión y función son diferentes (Kidd y cols, 1983).

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Mediante un procesamiento alternativo del transcrito primario del gen hGH-N se generan tres RNAs que codifican para varias proteínas: una de 22 kDa, una de 20 kDa la cual es menos abundante (Walker, y cols 1991) y difiere de GH de 22 kDa en 15 aminoácidos (Seeburg y cols, 1982) y otra de 17.5 kDa, la cual carece de 40 aminoácidos debido a la omisión del exón 3 (Lecomte y cols; 1987).

En el caso del gen hGH-V, también se generan mediante un procesamiento alternativo varios RNAs, los cuales se traducen en las siguientes proteínas: HGH-V1 de 22 kDa, HGH-V2 de 26 kDa, HGH –V delta 4 de 25 kDa (Untergasser y cols; 1998), HGH-V3 de 24 kDa y HGH-V 20 kDa (Boguszewski y cols; 1998). Este gen a diferencia de los PLs se expresa en una subpoblación de células del sincitiotrofoblasto, lo que sugiere un control diferencial de estos genes (Scippo y cols; 1993, Eberhardt y cols; 1996). La secuencia de aminoácidos de HGH – V difiere de la de HGH – N en 15 aminoácidos, 13 de los cuales se encuentran en la proteína madura (MacLeod y cols; 1991).

Los genes hPL-2 y hPL-3, codifican conjuntamente para la hormona HPL en el sincitiotrofoblasto de la placenta, la cual se detecta en suero materno a partir de la cuarta semana de embarazo alcanzando niveles de producción de un gramo diario al final del embarazo, constituyendo el 10 % de la producción total de proteína placentaria (Barrera Saldaña y cols; 1983).

En cuanto al gen hPL-1, en los primeros experimentos de detección de transcritos del locus hGH-hPL realizados en placentas a término, no se detectó ninguno con las características esperadas para un transcrito de hPL-1 (Barrera Saldaña y cols; 1983). Además se encontró que contenía una mutación en el sitio donador para la remoción del segundo intrón, que en otros casos inactivan al gen donde se presenta (Reséndez Pérez y col; 1990). Por esta razón se pensó que hPL-1 era posiblemente un gen inactivo o pseudogen.

1.3 Funciones de las hormonas codificadas por los genes del complejo hGH – hPL

HGH -N es responsable del crecimiento de los huesos largos y de múltiples efectos sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Paladini, y cols, 1983). Aunque la GH de hipófisis (hGH – N) tiene un papel crítico en la regulación del crecimiento postnatal, la hormona parece tener un papel limitado en el crecimiento fetal, ya que los tejidos fetales carecen de receptores para GH funcionales (Freemark y cols; 1999); en la sangre HGH se puede asociar con una proteína de transporte e interactúa con las células blanco mediante un receptor específico (De Vos y cols, 1992). Esta hormona tiene una vida media de aproximadamente 25 minutos, en mujeres no embarazadas y en hombres es secretada a la circulación en episodios pulsátiles con niveles muy bajos o indetectables entre cada pulso (Zadik y cols; 1985) habiendo un cambio dramático en la secreción durante el embarazo ya que ésta es reemplazada por la hormona secretada por el tejido placentario de manera no pulsátil (Eriksson y cols; 1988). Esta continua secreción parece tener importantes implicaciones en el ajuste fisiológico durante la gestación y especialmente en el control materno de los niveles de IGF-1 (factor de crecimiento parecido a insulina) (Alsat y cols; 1998) y sus efectos sobre el metabolismo pueden ser directos e indirectos al inducir la síntesis de IGF – 1 .

Los niveles de expresión de HGH-V se detectan en el plasma materno entre las semanas 10 – 12 de embarazo y alcanzan un máximo de 15 – 25 ng/ml en el tercer trimestre; ésto se encuentra asociado con la supresión de la producción de HGH-N en la hipófisis materna, convirtiéndose HGH – V en la forma predominante de GH en el suero materno durante la segunda mitad del embarazo (Freemark y cols; 1999). Los mecanismos de la supresión de la secreción de la GH de hipófisis durante el embarazo se desconocen, sin embargo se sabe bien que la somatomedina C ejerce una retroalimentación negativa y que los niveles de ésta aumentan durante el embarazo (Eriksson y cols; 1988). Probablemente la secreción continua de la GH

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

placentaria provoque los altos niveles de somatomedina C, lo cual resulta en la inhibición de los niveles de GH vía retroalimentación negativa (Eriksson y cols; 1988).

HGH – V no se ha detectado en el suero fetal en ningún momento durante el embarazo, lo que indica que los efectos de la hormona sobre el metabolismo fetal o crecimiento deben ser mediados indirectamente a través de acciones sobre tejidos maternos y posiblemente útero – placentarios. En contraste, la circulación fetal contiene abundantes cantidades de HGH–N, alcanzando niveles máximos a la mitad de la gestación (33.6 ± 2.1 ng/ml muestreo de sangre periumbilical) con un ligero decline de los niveles de 20 ng/ml aproximadamente al término del embarazo (Braunstein y cols; 1980). Las concentraciones IGF-1 en el plasma materno aumentan marcadamente durante el segundo y tercer trimestre de embarazo, de manera paralela con el aumento de las concentraciones de HGH–V (Caufriez y cols; 1990). Se ha propuesto que HGH-V puede ejercer una acción sobre el crecimiento fetal y placentario, mediante IGF-1 (Evain-Brion, y cols, 1994). El aumento en los niveles de IGF – 1 probablemente induce el crecimiento de los tejidos maternos incluyendo útero, senos y glándula tiroidea y sus efectos sobre el corazón y el riñón pueden incrementar el volumen de sangre materna (MacLeod y cols; 1991).

Las acciones biológicas de HGH – N, HGH – V y HPL están mediadas a través de uniones a receptores específicos y de alta afinidad localizados en la membrana plasmática de los tejidos blanco; se han caracterizado dos tipos de receptores para HPL y HGH–V: receptores somatogénicos (HGH) y receptores lactogénicos (HPRL) (Goffin y cols; 1996). HGH – V presenta la misma afinidad para el receptor GH que HGH–N (Kd 0.35 nM), pero su afinidad para el receptor de prolactina es considerablemente menor que HGH–N (Kd 0.24 - 1 nM), por lo que se sugiere que hGH–V tiene una alta actividad somatogénica (promueve el crecimiento) pero presenta una actividad lactogénica débil (Hill y cols; 1988).

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

HPL tiene un papel anti-insulina importante en la regulación del metabolismo materno durante la gestación (Kim y cols; 1971), además de que promueve la retención de nitrógeno en la mujer embarazada. En el feto promueve la glucogénesis, la síntesis de ornitina descarboxilasa y la secreción de insulina en el feto (Hill y cols; 1992).

Las proteínas codificadas por los genes hGH-V y hPL actúan en conjunto en la madre para estimular la producción del IGF-1 y modulan el metabolismo intermedio, resultando en un incremento en la disponibilidad de glucosa y aminoácidos para el producto (Handwerger y cols; 2000). En el feto, HPL actúa vía receptores lactogénicos y posiblemente un único receptor PL module el desarrollo embrionario, regulando el metabolismo intermedio y estimulando la producción de IGFs, insulina y hormonas adrenocorticoideas (Handwerger y cols; 2000). HGH-V es una potente hormona somatogénica, la cual no es liberada en el feto. La secreción de GH de las células del trofoblasto placentario es suprimida por la glucosa, sugiriendo una participación de HGH – V sobre el metabolismo intermedio materno (Goodman y cols; 1991), por lo que es probable que los efectos biológicos de HGH – V sean similares a los de HPL y HGH-N; sin embargo, no existen estudios que revisen directamente los efectos de HGH-V sobre los tejidos maternos y fetales (Handwerger y cols; 2000). Se supone, que la GH placentaria en conjunto con el lactógeno placentario y la prolactina podrían tener un papel en la preparación de los senos para la lactancia (Nickel y cols; 1990).

Poco se conoce sobre la regulación de la producción de HGH – V en embarazos anormales, sin embargo estudios preliminares sugieren que los niveles de HGH-V maternos se encuentran reducidos en embarazos asociados con retardo en el crecimiento intrauterino (Mirlesse y cols; 1993). Se ha reportado un embarazo donde se detectó por medio de PCR la ausencia de los genes hPL-2, hPL-3 y hGH-V resultando en un severo retardo en el crecimiento fetal, un grado bajo de preclampsia y en el cordón umbilical se encontró una sola arteria, pero en general el producto que fue del sexo masculino no mostró anomalías físicas (Rygaard y

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

cols; 1998). Estudios de la familia génica hGH / hPL durante el embarazo revelan una compleja interacción de estas hormonas con algunos otros factores de crecimiento (ej. EGF, TGF- β) (Handwerger y cols; 2000).

1. 4 Factores transcripcionales que Influyen en la expresión de los genes del complejo hGH- hPL

Numerosos factores transcripcionales están involucrados en la expresión de estos genes. Entre ellos se pueden citar factores ubicuos y factores específicos que se unen a la región río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Entre los primeros se encuentran: el Factor Estimulador río arriba (USF) que se une en la posición -290 / -257 y Sp1 que lo hace en la posición -140 / -116. Estos dos factores incrementan la transcripción del gen hGH-N (Lemaigre y cols; 1989). Entre los factores específicos destaca Pit-1, el cual se une al promotor en dos sitios: uno proximal que se localiza entre -92 a -65 pb en hGH-N, -97 a -61 pb para hPLs; (Nachtigal, 1989) y otro distal que se encuentra entre -130 a -105 pb en hGH-N , - 140 a -107 pb para hGH-V y -145 a -118 para hPL-2. Esta proteína que se produce en la hipófisis le confiere especificidad tisular al gen hGH-N y esta característica está dada en parte por el reconocimiento combinado de su promotor por varios factores que actúan en trans (Nickel y cols; 1990, Lefevre y cols; 1987).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Todos estos factores situados antes del sitio de inicio de la transcripción son necesarios para que comience la síntesis de los transcritos. Otros más son importantes para aumentar la producción de los RNAm de los lactógenos. Entre ellos se encuentran los elementos de respuesta a vitamina D localizados en los siguientes sitios: de -1100 a -1070, -600 a -588 y -540 a - 525 que estimulan la síntesis y liberación de HPL por un mecanismo que involucra la transcripción de los genes hPLs (Stephanou y cols; 1995). Se ha observado que la vitamina D no solo activa la transcripción del gen GH de hipófisis de rata, sino que también inhibe la transactivación mediada por ácido retinoico y triyodotironina para este gen (García – Villalba y cols ; 1995).

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Se han localizado tres regiones que responden a triyodotironina y ácido retinoico en el promotor de hPL, los cuales están entre -550 a -523, -611 a - 558 además entre -978 a – 954; también se ha localizado un sitio de respuesta a triyodotironina en el promotor de hPL-2 entre – 67 a – 41 pb. Estas hormonas incrementan la liberación y expresión de los genes hPL's (Stephanou y cols; 1995, Voz y cols; 1991). En células de tumor de pituitaria de rata la concentración de los RNAm de GH se incrementa en respuesta a las concentraciones fisiológicas de triyodotironina (Dobner y cols; 1981), pero al contrario del gen GH de rata, el promotor de hGH-N es regulado de manera negativa por triyodotironina (Cattini y cols; 1986). También se ha demostrado en líneas celulares de hipófisis de rata que el ácido retinoico no incrementa la transcripción del gen GH (Bedó y cols; 1989).

Los sitios de unión de IL-6 están localizados entre -1134 a -1097 pb e incrementan la transcripción de los hPLs (Stephanou y cols; 1994)

Los elementos de respuesta de AMPc y ester de forbol se encuentran entre -1102 a –1096 habiendo una diferencia nucleotídica entre el promotor de hPL-3 respecto a hPL-2, lo cual provoca la regulación diferencial de la expresión de los hPLs (Oury, 1997). Se sabe que existen elementos de respuesta a AMPc 82 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen hGH-N y la regulación de este gen por la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) involucra la interacción entre un elemento tejido específico y un elemento que responde a AMPc. (Dana y cols; 1989).

Existen también regiones reguladoras involucradas en la expresión tejido-específica, de las cuales en los genes placentarios se encuentra una región de 263 pb (Elemento P), situada a -2 Kb del sitio de inicio de transcripción, que reprime la transcripción de estos genes en la hipófisis, pero no en la placenta. Esta secuencia se encuentra presente en todos los genes excepto en hGH-N (Nachtigal, 1992).

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Además de los elementos de regulación que han sido ubicados en la región promotora del gen hGH-N, también han sido localizados otros en la propia unidad transcripcional, como el elemento de unión (o respuesta) a glucocorticoides localizado en el primer intrón entre +86 y +115, (Slater y cols, 1985). Más recientemente ha sido posible la caracterización de un elemento promotor localizado también dentro del primer intrón capaz de dirigir la expresión de genes reporteros, pero se desconoce si esta actividad es tejido-específica (Kolb y cols, 1998).

A pesar de que los genes de la familia hGH- hPL tienen una región reguladora muy similar, esta similitud disminuye río arriba a partir del sitio de inicio de la transcripción, ya que existen cambios sutiles en las secuencias reguladoras río arriba, los cuales podrían ser los responsables de las diferencias de expresión observadas entre los genes. Por ejemplo la diferencia de un nucleótido en el elemento de respuesta de éster de forbol y AMPc lleva a la regulación diferencial de la transcripción de los genes hPL-2 y hPL-3. Esto se debe a que ambas sustancias inducen la transcripción del promotor del gen hPL-2 mientras que el promotor del gen hPL-3 es únicamente regulado por éster de forbol, incrementando la expresión del gen hPL-2 (Oury y cols, 1997). Este tipo de evidencia sugiere que la variabilidad mostrada en la expresión de estos genes podría relacionarse en parte, a la fuerza de sus respectivos promotores (Nachtigal y cols, 1989; Nickel y cols, 1990).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Algunos estudios sugieren un novedoso papel fisiológico a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en la regulación de la expresión de los genes lactógenos placentarios durante el embarazo (Handwerger y cols; 1995). La estimulación parecer ser debido principalmente al pre- β HDL, un componente menor del total de HDL en circulación que es mucho menor en tamaño que la forma de mayor circulación (α -HDL), pero que contiene una proporción más alta de apolipoproteína (apo). Durante el embarazo, las concentraciones en plasma materno de pre- β se incrementan con un patrón paralelo a HPL (Handwerger y cols, 1999). Se han reportado concentraciones bajas de apo A-I en severas condiciones patológicas

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

asociadas con una disminución en las concentraciones HPL plasmáticas, retardo en el crecimiento intrauterino e inclusive preclamsia (Rosing y cols, 1989).

Aunque el lactógeno placentario abunda en la sangre de la mujer embarazada, el nivel de la hormona del crecimiento está muy disminuido después del parto, la hormona de origen placentario desaparece con rapidez, pero la hormona GH hipofisaria permanece bastante baja por algún tiempo. Algunos de los factores que se sabe inhiben a la HGH son la somatostatina y el factor parecido a insulina (IGF-1) que suprimen la expresión del gen hGH–N a nivel transcripcional (Niiri-Onishi y cols; 1999); la secreción de HGH-V probablemente también sea regulada de manera negativa por los inhibidores antes mencionados (Evain – Brion y cols; 1999).

Debe señalarse que la expresión de los genes hGH-hPL no se restringe a los tejidos señalados, pues recientemente se ha descubierto su expresión en otros tejidos como ovarios, donde se ha demostrado la producción de RNAm de GH-N, PL-2, PL-3 y sus correspondientes proteínas. (Schwärzler, 1997), también se han encontrado RNAs con diferentes procesamientos derivados de hGH-N en líneas celulares de linfocitos y de mielomonocitos y mediante análisis de RT-PCR se han determinado transcritos de hGH-N en fibroblastos de la dermis. Este descubrimiento fundamenta la importancia de la hormona de crecimiento en el desarrollo del sistema inmune y además sugiere un posible lazo regulatorio autocrino / paracrino en el tejido de la piel (Palmetshofer, 1995). Se ha logrado detectar RNAm del gen hGH-V con diferentes procesamientos en testículos los cuales codifican para las proteínas de 22 kDa, 26 kDa y una proteína de 25 kDa de longitud, desconociéndose también a la fecha la especificidad tisular y la función para la fisiología testicular del producto del gen hGH-V (Untergasser, 1998).

1.5 Influencia de la longitud de los promotores en la expresión.

En nuestro laboratorio se han realizado experimentos de transfección en cultivos de células derivadas de placenta con construcciones portando delecciones en los promotores de los genes de esta familia multigénica (-2.2 kb, -500 pb, -140pb, -70pb), para comparar su expresión obteniéndose resultados muy interesantes. Por ejemplo, se observó que la construcción con la versión larga del promotor del gen hGH-V iguala los niveles de expresión del gen hPL-2 que es el que se expresa a los niveles más altos (3 %) en placenta (Canizales y cols; 2000).

Con el fin de investigar si la expresión de los genes endógenos hPL y hGH en las líneas celulares usadas en los ensayos de transfección correlacionaban con la fuerza transcripcional observada para las construcciones transfectadas de los promotores, se desarrollaron análisis de RT-PCR del RNA extraído de las líneas celulares JEG-3 línea celular que proviene de un coriocarcinoma humano, la cual secreta las hormonas gonadotropina coriónica, lactógenos placentarios y progesterona, (Kohler y cols; 1971), BeWo que proviene de un coriocarcinoma gestacional maligno de placenta, secreta la hormona gonadotropina coriónica, lactógenos placentarios y progesterona, (Pattillo y cols; 1979) y JAR esta línea fue establecida a partir de un tumor trofoblástico de placenta, produce estrógeno progesterona, gonadotropina y lactógenos en cultivo (ATCC revisión 2001), observándose expresión alta de los genes endógenos en la línea celular de BeWo y una expresión muy baja en la línea celular JEG-3. Esto sugiere que el control de la expresión de los genes es distinto en las diferentes líneas celulares, probablemente la maquinaria transcripcional regula de manera diferencial a los genes placentarios en las distintas líneas celulares (Nickel y cols; 1991).

1.6 Estimuladores de la Expresión de hPL

1.6. 1 Suero materno.

Se ha demostrado que células del citotrofoblasto pueden fusionarse y diferenciarse a un fenotipo que exprese grandes cantidades de hCG y hPL cuando son cultivadas con medio de cultivo suplementado con 10 % de suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo, el suero se utilizó en esta etapa porque es durante este período cuando se presenta un gran incremento en la masa placentaria (de 30 a 120 g), lo que hace pensar que es en este momento donde se encuentran factores involucrados en la diferenciación de los citotrofoblastos. hPL se expresa en el sinciotrofoblasto *in vivo*, en cambio en células trofoblástica *in vitro* con medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal es baja la expresión de este gen. Cuando células citotrofoblásticas son cultivadas con medio de cultivo suplementado con suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo, se observa que la expresión de hCG y hPL aumentan considerablemente, mientras que células cultivadas con medio de cultivo suplementado con suero de mujer no embarazada y de hombre, se diferenciaron hasta sinciotrofoblastos siguiendo un patrón casi idéntico al que se observó cuando las células fueron cultivadas en medio de cultivo suplementado con suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo, pero la cantidad de hormona liberada fue dos veces menor que lo observado con suero de mujer en el segundo trimestre de embarazo. La extensa fusión de células, el nivel de expresión de hormona y el patrón regular en la expresión de las hormonas, sugiere que células del citotrofoblasto cultivadas en suero materno se pueden diferenciar hasta el estadio más avanzado de diferenciación trofoblástica. Las células también son más resistentes a la digestión con tripsina, contrario a lo sucede cuando se cultivan en medio suplementado con suero bovino fetal, en cuyo caso se deforman, tienen menos adherencia y no sobreviven más de dos semanas (Richards y cols., 1994).

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

1.6.2 AMPc

Para verificar si los nucleótidos cíclicos tienen algún efecto en la expresión de los PL, se ensayó con el 8-bromo- AMPc, y se descubrió que esta molécula es capaz de incrementar en promedio 4 veces los niveles de los RNAs de la subunidad α de la CG y del PL (en diferentes tiempos cada uno) en células de placenta de mono rhesus obtenidas en los días 28, 50, 60 ó 140 de embarazo, lo que sugiere en este caso, una regulación mediada vía AMPc (Golos y cols, 1992). También se ha visto que este nucleótido tiene efecto estimulante para expresión de hCG y estrógeno sintetasa (aromatasa) en cultivos primarios de trofoblastos obtenidos de placentas humanas a término (Lobo y cols, 1989).

1.6.3 Interleucina 6 y Factores de crecimiento.

En otro estudio realizado con IL-6, además de los Factores de Crecimiento Epidérmico (EGF), Derivado de Plaquetas (PDGF) y Factor de Crecimiento Tumoral β (TGF- β), se pudieron reconocer algunos efectos que éstos tienen sobre los citotrofoblastos humanos en cultivo. En el caso del EGF se aprecia que estimula la síntesis de HPL y HCG, lo que lo vincula con el proceso de diferenciación, PDGF estimula la proliferación celular y TGF - β e IL -6 estimulan tanto la diferenciación como la proliferación de esta células (Aoki y cols; 1991). Al tercer y sexto día de estimulación con 500 U/mL de IL-6 se aumenta la expresión de los hPLs entre 2.2 a 4.7 veces respecto a las células control, con un efecto dependiente de la dosis y con un mínimo estimulante de 50 U/mL (Stephanou y Handwerger, 1994a). Posteriormente se postuló que los efectos de la IL-6 sobre la expresión de los genes hPLs están mediados, al menos en parte, por el enlace del factor nuclear NF-IL6 a una región entre -1376 a -1088 en el promotor de hPL, que contiene tres elementos de respuesta para ese factor (Stephanou y Handwerger, 1995c).

Introducción: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

1.6.4 Moléculas esteroideas y triyodotironina.

Se ha utilizado al ácido retinoico (RA), triyodotironina (T3) y vitamina D3 (como la forma activa 1,25- dihidroxicolecalciferol). Los receptores de cada una de estas tres sustancias son miembros de la superfamilia de receptores nucleares tiroideos/esteroideos, que funcionan como activadores transcripcionales inducibles al unirse a su ligando y cuya secuencia comparte un alto grado de similitud en el dominio enlazante de DNA (Stephanou y Handwerger, 1995b).

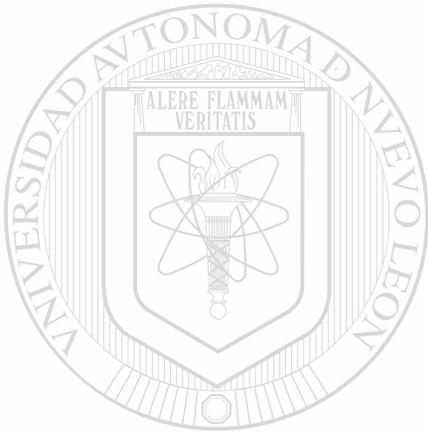
Para los casos de RA y T3 se ha comprobado que aunque no tienen efecto significativo sobre la formación del sincicio, ambos incrementan (en una relación dependiente de la dosis) la expresión y liberación de HPL en cultivos de citotrofoblastos humanos; además estimulan la expresión del RNAm de hGH en células hipofisarias; con RA se logra un aumento en la secreción de hasta 5.3 veces sobre el nivel de los controles, mientras que para T3 hay un aumento de 5.5 veces (ambos al quinto día); tanto RA como T3 estimulan la síntesis del RNAm de hPL previo al aumento en los niveles de proteína (Stephanou y Handwerger, 1995b).

La 1,25-(OH)₂ D3 se produce en placenta, y en cultivo es capaz de estimular la secreción de HPL, en niveles de 2.54 y 4.14 veces mayores (al cuarto y quinto día) a los obtenidos en células control, con un efecto dependiente de la dosis. Todo esto con un incremento previo en los niveles de RNAm (Stephanou y Handwerger, 1994b).

JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones realizadas hasta ahora para conocer como los factores transcripcionales regulan la expresión de los genes pertenecientes a la familia hGH-hPL se han realizado principalmente con los genes hPL-2 y hPL-3, debido a que estos genes presentan los niveles de expresión más altos en placenta.

Poco se conoce de la expresión del gen hGH-V y de su regulación por los diferentes factores transcripcionales. Por lo que se requieren estudios sobre la regulación de dicho gen con el propósito de avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos que regulan su funcionamiento.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Objetivos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Hacer un estudio comparativo de la regulación de la expresión del gen hGH-V por diferentes moduladores en cultivo celular (JEG-3 y GC).

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar el patrón de expresión normal del gen hGH- V en la línea celular JEG-3.

2.2.2 Evaluar la expresión del gen hGH–V en la línea celular JEG-3 bajo la influencia de triyodotironina, éster de forbol y ácido retinoico.

2.2.3 Introducir por transfección en las líneas celulares JEG-3 y GC recombinantes que contengan los promotores distales del gen hGH-V y del gen hGH-N dirigiendo al gen reportero Beta galactosidasa, para estudiar su expresión bajo la acción de moduladores.

2.2.4 Introducir por transfección un plásmido que contenga el gen completo de hGH- V (promotor distal y unidad transcripcional) y estudiar su expresión en respuesta a los moduladores utilizando los transcritos del gen constitutivo GAPDH[®] como referencia.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen de los Reactivos

Las cajas de plástico para cultivo celular se adquirieron de Corning incorporated (Corning, NY, EUA 14831).

Los medios de cultivo Opti – MEM I y Dubecco' s Modified Eagle medium (D – MEM) fueron de la compañía Gibco – BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, EUA); también la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (TR / MML – V).

El suero bovino fetal se adquirió de la compañía Hyclone, Inc. (Logan, UT, EUA).

La tripsina fue de DIFCO Laboratories (Detroit, MI. EUA).

De SIGMA – Aldrich (St. louis, MO, EUA) se adquirió el fenol y los reactivos inorgánicos. El ácido retinoico, trioyodotironina, phorbol 12-myristate 13-acetate, provinieron de esta casa comercial. El isotiocianato de guanidina se adquirió de Gibco – BRL Life Technologies, Inc.

El rojo de cloro fenol - β - D – galactopiranósido (CPRG) fue adquirido en Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany).

El equipo para realizar el ensayo de ELISA para HGH fue de la compañía Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)

El cloroformo utilizado fue de Merck® (EM SCIENCE, Gibbstown, NJ, EUA.).

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

La enzima Taq DNA polimerasa y los dNTPS se adquirieron de Promega (Madison, WI, EUA).

Los oligonucleótidos utilizados en el análisis de PCR fueron sintetizados por GIBCO – BRL Life Technologies.

3.2 Secuencia de los Iniciadores Utilizados

La secuencia de cada uno de los iniciadores utilizados se muestra a continuación:

Iniciador 5' para hGH – V : 5'-cgcgcccgcctgcctggta-3' (940719-1) (Clave ULIEG)

Iniciador 3' para hGH – V : 5'-tcgaattccaggagaggcactggg-3' (113) (Clave ULIEG)

Iniciador 5' para GAPDH : 5' –aggtcggagtcaacggattttgg-3'

Iniciador 3' para GAPDH : 5' –catgggccatgaggtccaccac-3

3.3 Origen del material biológico

Los vectores utilizados para los ensayos de transfección fueron obtenidos de la plasmidoteca del Laboratorio de Biología Celular de U.L.I.E.G.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La cepa bacteriana TOP 10 F' de *Escherichia coli* empleada en los ensayos de transformación y propagación de los recombinantes, se obtuvo del cepario de la ULIEG.

Las líneas celulares JEG-3 (derivada de coriocarcinoma de placenta humana) y GC (derivada de tumor de hipófisis rata) fueron donadas por el Dr. José Luis Castrillo del Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de la Universidad Autónoma de Madrid, en Madrid, España.

3.4 Equipo

Se utilizó un horno de microondas Goldstar modelo Ma-857M, microcentrifugas Eppendorf modelos 5403 y 5415 C, una fuente de poder Gibco-BRL modelo 250, un ultracongelador marca So-Low Environmental Equipment (Cincinnati, OH, EUA), una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas City, MO, EUA). También se utilizó un termociclador MJ Research modelo PT 150 (Watertown, MA, EUA), una balanza digital marca Sartorius modelo 1206 MP (Carmh Göttingen, Alemania), una balanza analítica OHAUS modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), micropipetas Pipetman Gilson de Rainin Instrument Co; Inc. (Emeryville, CA, EUA), un agitador G 10 marca New Bussines Scientific Co; Inc (Edison, NJ, EUA), un equipo de video-computadora marca BioRad, modelo Geldoc 1000 (Hercules, CA, EUA). Para observar las células se utilizó un microscopio invertido Karl Zeiss (Alemania). El pH de las soluciones se ajustó en un potenciómetro Beckman 320.

Las lecturas de absorbancia de los inmunoensayos se llevaron a cabo en un Microwell systems modelo Reader 100 ELISA de Organon Teknika (Turnhout, Belgium).

El procesamiento de datos se realizó en computadoras marcas Macintosh modelos Clasic II, LC III y Power PC (Apple Computer Inc; Cupertino, CA, EUA).

Se empleó el procesador de textos *Microsoft Word* versión 5.1a (© 1987 - 1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft Power Point* versión 3.0(© 1987-1992 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition* 2.5.1. (© 1989 - 1993 Adobe Systems Inc.) y *Molecular Analyst* versión 1.5 de BioRad Laboratories (Hercules, CA, EUA).

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Para efectuar los análisis relacionados con la Biología Molecular se usaron los programas Amplify versión 1.2b (Bill Engels © 1992, University of Wisconsin, Genetics M; WI, EUA) y DNA Strider™ 1.1 (© Ch. Marck and CEA, 1989, Service de Biochimie -Département de Biologie - Institut de Recherche Fondamentale - CEA - Francia).

3.5 Condiciones del cultivo celular

Las líneas celulares JEG-3 y GC se cultivaron en placas con medio Opti-MEM (Gibco-BRL) y D – MEM respectivamente, con SBF al 10 % y solución de antibióticos (sulfato de estreptomycin 100 µg / ml y penicilina 100 U/ml) a 37 °C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5 %.

Para el mantenimiento del cultivo celular se siguió el siguiente protocolo:

1.- A un cultivo confluyente se le eliminó el medio y se le agregaron 2 ml de tripsina 1X (para desprender las células del sustrato) y se incubaron a 37 °C por 5 min.

2.- Una vez recuperadas las células de la caja y eliminada la tripsina por centrifugación a 3, 000 r.p.m. por 5 min, se resuspendieron en 3 ml de medio Opti-MEM o bien D – MEM, según el caso, se contaron en un hemocitómetro y se transfirió una alícuota conteniendo aproximadamente 7×10^4 células a una nueva botella.

3.- Se agregaron 5 ml de medio complementado con un 10 % de SBF y antibióticos.

4.- Las células se incubaron en CO₂ a 37 °C y se les realizó cambio de medio de cultivo cada 48 a 72 h.

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

A partir de cultivos al 80 % de confluencia y en fase logarítmica, se procedió a levantar las células con tripsina 1X y realizar la cuenta celular. Se inocularon 3×10^5 células en placas de 35 mm de diámetro, las cuales se incubaron por un período de 12 - 24 h, antes de la transfección o bien de la adición de los moduladores.

3.6 Transfección mediante lipofección

Esta técnica de gran utilidad para introducir DNA a células eucarióticas, se basa en la formación de complejos de DNA – lípidos los cuales se fusionan a la membrana celular distribuyendo su contenido en el citoplasma, pueden obtenerse comercialmente de varios tipos (lipofectina, lipofectamina, DOTAP, etc) (Life-Technologies. LipofectAMINE™ Reagent. Información técnica).

Para las transfecciones tanto para JEG-3 y GC se utilizó el protocolo previamente estandarizado por el laboratorio de Biología Celular (Canizales-Espinoza; 1996) que se describe a continuación:

1.- Las células se sembraron en cajas petri de 35 mm con 1 mL de medio de cultivo completo.

2.- Se incubaron las células a 37 °C en una incubadora de CO₂ hasta una confluencia del 50 - 80 %. Lo que ocurría entre las 12 - 24 h.

3.- Se prepararon las siguientes soluciones en tubos de micro centrifuga estériles de 1.5 mL.

Solución A : Para cada transfección se diluyeron 3 µg de DNA (1 µg del control de transfección pCMV sport β - Gal y 2 µg del plásmido de interés) en 100 µL de medio libre de suero (OPTIMEM I Reduced Serum Medium).

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Solución B: Para cada transfección se diluyeron 2 μL de lipofectamina y 1 μL de Reactivo Plus en 200 μL de medio libre de suero.

4.- Se combinaron las dos soluciones mezclando suavemente y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 45 min con el fin de que se formaran los complejos.

5.- A cada caja se le adicionaron 300 μL de la mezcla (previamente se les eliminó el medio de cultivo anterior) y se distribuyó suavemente la mezcla por toda el área.

6.- Se incubaron las células con el complejo por 5 h a 37 °C en una incubadora de CO_2

7.- Después de la incubación se adicionaron 200 μL de medio conteniendo la concentración normal de suero y antibióticos, sin remover la mezcla de transfección.

8.- Se reemplazó el medio, por medio fresco a las 24 h después de la transfección.

3.7 Detección de β -Galactosidasa

(Detección del gen reportero β - Gal)

Para la determinación de la actividad de β - Galactosidasa se siguió el protocolo descrito por Eustice y cols; 1994.

1.- Después de 48 - 72 h de haber sido realizada la transfección se retiró el medio de cultivo.

2.- Se adicionaron 150 μL de buffer de lisis en cada caja y usando un gendarme (scraper) se recuperaron las células y se colocaron en un tubo de microcentrifuga (1.5 mL).

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

3.- Las células se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación (la congelación se llevó a cabo en nitrógeno líquido y la descongelación a 37 °C baño María).

4.- Se preparó una curva estándar de diluciones seriadas (5U de la enzima de *E. coli* β - galactosidasa de Sigma - Aldrich en 100 μ L de Buffer - β - gal) conteniendo 2.5U, 1.25U, 0.625U, 0.312U, 0.156U, 0.078U, 0.039U, 0.019U.

5.- Una vez lisadas las células y completamente homogenizadas, una alícuota de 50 μ L para cada punto de la curva estándar fue transferida a los pozos de la placa control (los rangos de expresión de β - galactosidasa se encontraron entre 10,000 a 20,000 pg). Fue necesario diluir el extracto celular en buffer lisis. Una dilución 2:1 del extracto en buffer de lisis (100 μ L de extracto más 50 μ L de Buffer de Lisis) fue una buena dilución inicial, pero se puede usar hasta 150 μ L de extracto celular por reacción. Para el control negativo, se preparó la misma dilución de un extracto celular la cual se hizo a partir de células, que no fueron transfectadas con el gen beta-galactosidasa.

6.- Se adicionaron 150 μ L de 1 mg/ml de rojo de cloro fenol - β - D -[®] galactopiranosido (CPRG) disuelto en buffer β - Gal. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en la oscuridad hasta que se desarrolló el color rojo (aproximadamente 30 min). El desarrollo del color continuó por aproximadamente 3 hrs.

7.- Se midió la absorbancia de 600 nm, colocando la tira en el microlector de ELISA.

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

La actividad de β -Galactosidasa se determinó mediante la siguiente fórmula (Carrol, 1992):

$$\text{Actividad de } \beta\text{-Galactosidasa (U)} = \frac{10^9 \times \text{Abs}^{589}}{(\# \text{ de células}) (t \text{ de incubación en h.)}}$$

Para normalizar la actividad de β -Galactosidasa en U / μ g de proteína se cuantificó la concentración de proteína total en el extracto celular mediante la técnica de Bradford. Se realizó la normalización mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Actividad de } \beta\text{-Galactosidasa en U.}}{\mu \text{ g de proteínas totales}} = \text{U de } \beta\text{-Galactosidasa} / \mu \text{ g de proteína}$$



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**3.8 Cuantificación de proteínas totales
(Bradford, 1976)**

- 1.- Se colocaron en microtubos de 0.5 ml 1.0, 2.5, 5.0, 12.5 y 15 μ l de una solución estándar con una concentración de 0.5 mg / ml de albúmina sérica bovina.
- 2.- Cada tubo se aforó a 50 μ l con solución de NaCl 150 mM. Cada solución tenía una concentración equivalente a 0.5, 1.25, 2.5, 6.25 y 7.5 μ g.
- 3.- La reacción se llevó a cabo con la adición de 150 μ L del colorante azul brillante de Coomassie G-250 e incubó por 5 min a temperatura ambiente.
- 4.- Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. En paralelo con la elaboración de la curva de calibración, se determinó la concentración de proteína de cada una de las muestras problema mediante diluciones 1: 10.

3.9 Detección de HGH- N (ELISA)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Preparación de los estándares de HGH ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se mezclaron 40 μ L de la solución stock de HGH (aprox., 10 ng / mL, solución 1) con 960 μ L del buffer de muestra (solución 6) (concentración final aprox. 400 pg / mL).

Se prepararon los estándares en diluciones seriadas de 1:2, como se describe en la tabla 1.

Tabla 1.- Preparación de curva de estándares

Paso	Solución de trabajo de hGH	de Buffer de muestra (solución 7)	Concentración hGH (pg / mL)
0	0	1000 μL	0
1	1000 μL	0	400
2	500 μL del paso 1	500 μL	200
3	500 μL del paso 2	500 μL	100
4	500 μL del paso 3	500 μL	50
5	500 μL del paso 4	500 μL	25
6	500 μL del paso 5	500 μL	12.5

1.- Se pipetearon 200 μL de la diluciones de los estándares o 200 μL de las muestras en los pocillo.

2.- Se incubó durante 1 h a 37 °C.

3.- Se lavó 5 veces con buffer de lavado (solución 6) durante 30 s aprox.

4.- Se pipetearon 200 μL de anti – hGH – DIG (1 μg / mL) en los pocillos.

5.- Se incubó durante 1 h a 37 °C.

6.- Se lavó 5 veces con buffer de lavado (solución 6) durante 30 s aprox.

7.- Se pipetearon 200 μL de anti – DIG – POD (200 mU /mL) en los pocillos.

8.- Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

9.- Se lavó 5 veces con buffer de lavado (solución 6) durante 30 s aprox.

10.- Se midió la absorbancia a 405 nm.

4.0 Extracción del RNA

El RNA total de las células en cultivo se extrajo por el método de isotiocianato de guanidina- fenol- cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987).

Todo el proceso se llevó a cabo en presencia de hielo.

1.- Se lavaron tres veces las cajas con 3 ml de solución PBS al 1X para eliminar el medio de cultivo.

2.- Se agregaron 500 μ L de solución D en cada caja.

3.- Se disgregó la monocapa de células con un "gendarme" y se recuperó la suspensión en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml.

4.- A éstos se les añadieron 50 μ l de acetato de sodio 2 M pH 4.0, se agitó por inversión.

5.- Se agregaron 500 μ l de fenol saturado con agua tratada con dietilpirocarbonato, se mezcló por agitación.

6.- Se adicionaron 100 μ L de cloroformo - alcohol isoamílico (49 : 1), luego se agitó en vortex durante 10 s para después incubar en hielo durante 15 min.

7.- Se centrifugó durante 15 min a 14 000 rpm y 4°C, después se recuperó el sobrenadante.

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

8.- Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto, frío. Se mezcló bien y los tubos se mantuvieron a -70 °C durante toda la noche para precipitar el RNA.

9.- Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 14 000 rpm y 4°C, se desechó el sobrenadante.

10.- Se añadieron 200µL de solución D, además de 500 µL de etanol absoluto frío; se dejó precipitar nuevamente a -70°C.

11.- Se centrifugó durante 10 min a 14 000 rpm y 4°C, se desechó el sobrenadante y se dejó secar durante 30 min a temperatura ambiente y dentro de la campana de flujo laminar.

12.- Se resuspendió la pastilla en agua tratada con dietilpirocarbonato.

13.- La calidad y cantidad de RNA se determinó por electroforesis en gel de agarosa - isotiocionato de guanidina al 1.5 %, comparándola contra la de un RNA estándar (131.6 ng/µl) (Goda y cols; 1995)

14.- Las electroforesis se corrieron inicialmente a 30 V y después de 30 min. se aumentó el voltaje a 90 V por aproximadamente 1h.

4.1 Cuantificación de los Niveles de Expresión de hGH-V

Para evidenciar la diferencia entre la expresión de este gen bajo las distintas condiciones de cultivo ensayadas, fue necesario realizar la síntesis de DNAc, el cual sirvió después como molde en reacciones de amplificación específica de PCR.

Síntesis de DNAc

El RNA total se convirtió a DNAc (Kawasaki, 1991) por transcripción reversa con iniciadores al azar (random primers). Para ello, se realizó la reacción detallada en la tabla 2.

El RNA se diluyó en el agua- DEPC y se sometió durante 5 min a 95 °C para eliminar la estructura secundaria. Inmediatamente después se mantuvo en hielo durante 10 min para enseguida añadirle la mezcla de los demás reactivos e incubar durante 30 min a 37 °C.

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con iniciadores específicos que permitieron obtener productos amplificados del gen hGH-V. Para detectar el transcrito de hGH-V se utilizaron iniciadores específicos para amplificar este gen , debido a que sus niveles de expresión normalmente son muy bajos. El iniciador *antisentido* es el clave 113. Para efectuar la amplificación se utilizaron los reactivos descritos en la tabla 3.

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Tabla 2. Componentes de la Reacción de Transcripción Reversa.

Reactivo	Cantidad
RNA total	2.5 µg
Buffer 5X	6.0 µL
DTT 100 mM	1.0 µL
Random primers 100 mM	1.0 µL
dNTPs 10 mM	1.5 µL
TR/MML-V (200 U/ µL)	2.0 µL
Agua tratada con DEPC	c.b.p. 30.0 µL

Tabla 3. Preparación de la PCR para hGH-V

Reactivo	Cantidad
DNAc	3.0 µL
Buffer 10X	5.0 µL
MgCl ₂	3.0 µL
dNTPs 10 mM	1.5 µL
Primer hGH-V (5 µM)	5.0 µL
Primer 113 (5 µM)	5.0 µL
Taq DNA polimerasa (5u/µL)	0.5 µL
Agua miliQ	27.0 µL

Materiales y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

El programa de PCR que se utilizó estuvo constituido por los siguientes pasos: desnaturalización inicial por 5 min a 94°C; luego 35 ciclos de desnaturalización durante 1.5 min a 94 °C; apareamiento durante 1 min a 63 °C y extensión a 72 °C por 1 min

La especificidad y amplificación lograda con estos oligonucleótidos específicos para hGH-V fue verificada por Iturbe Cantú (1995), quien utilizó diferentes condiciones de amplificación y probó las secuencias de lactógenos y de hormonas de crecimiento, asegurándose que se amplificaran exclusivamente los transcritos deseados en cada caso. Además, en un principio, por simulación computacional con el programa *Amplify*, se encontró que se producirían bandas de 586 y 838 pb para los de hGH-V. Esto es debido a la diferencia del procesamiento del transcrito primario.

Transcrito de referencia en la PCR

Para normalizar los resultados de la RT-PCR se seleccionó la coamplificación del DNAc del gen que codifica para la enzima gliceraldehído- 3 - fosfato deshidrogenasa (GAPDH), que tiene un nivel de expresión constitutivo, junto con el DNAc de la hormona de crecimiento placentaria. Las condiciones de reacción fueron las que se presentan en la tabla 4.

El programa de coamplificación de PCR consistió en una desnaturalización inicial durante 5 min. a 94 °C, seguida de 30 ciclos con 30 s de desnaturalización a 94 °C, apareamiento de 30 s a 64 °C y extensión por 1 min a 72°C; finalmente una extensión de 5 min a 72 °C. La banda del producto amplificado de GAPDH tuvo un tamaño aproximado de 1093 pb, en tanto que la de hGH – V fue de 586 pb.

Tabla 4. Preparación de la PCR para GAPDH / hGH-V

Reactivo	Cantidad
DNAC	5.0 μ L
Buffer 10X	5.0 μ L
MgCl ₂	8.0 μ L
dNTPs 10 mM	1.5 μ L
Primer hGH-V (5 μ M)	5.0 μ L
Primer 113 (5 μ M)	5.0 μ L
Primers GAPDH (5 μ L)	2.0 μ L
Taq DNA polimerasa (5u/ μ L)	0.5 μ L
Agua miliQ	18.0 μ L

Análisis

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio para luego analizarse con el equipo de Gel Doc. Cada ensayo se realizó por triplicado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Material y Métodos: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

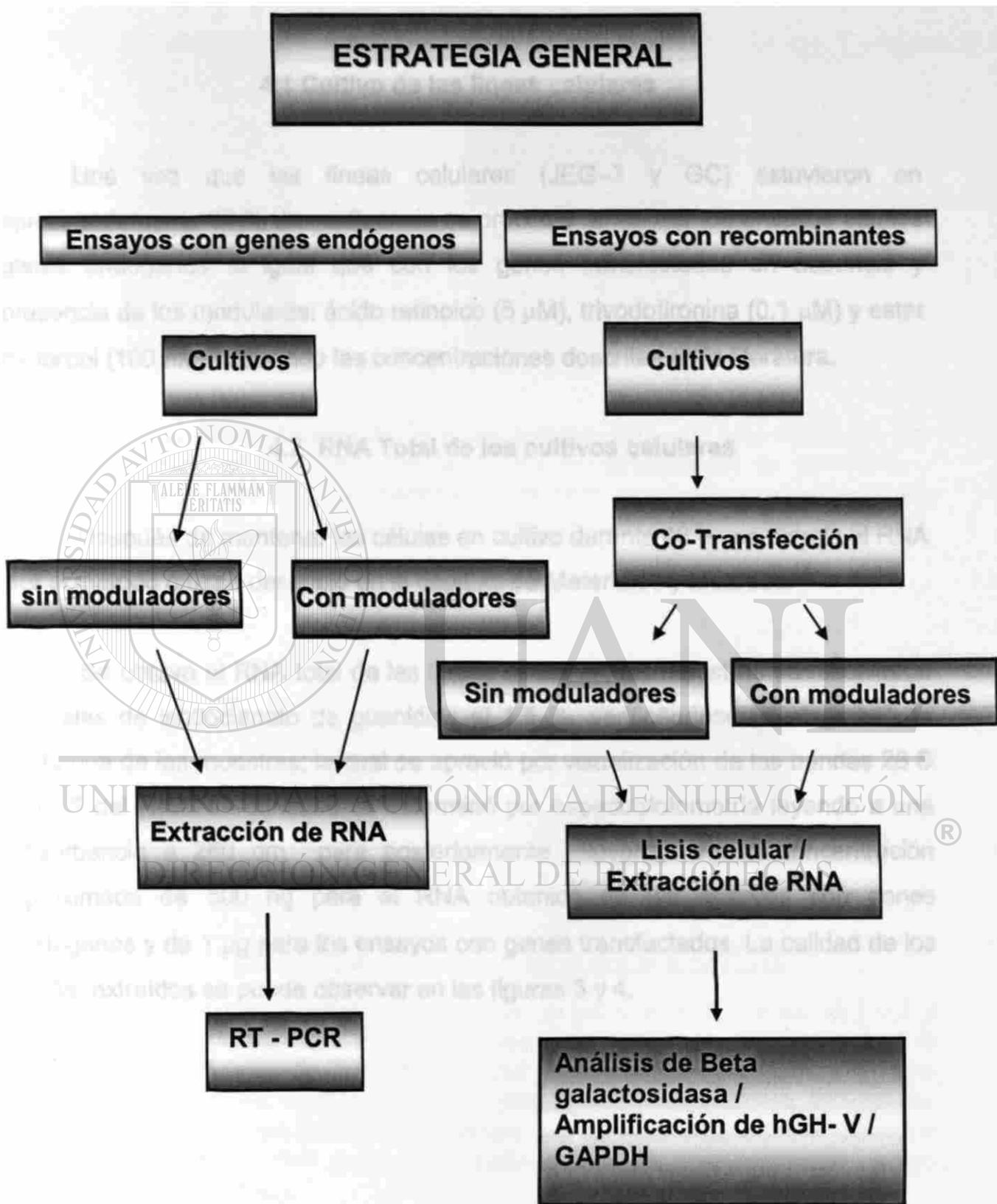


Figura 2. Estrategia general. Planeación de los experimentos que se realizaron con el fin para llevar a cabo este trabajo de tesis.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Cultivo de las líneas celulares

Una vez que las líneas celulares (JEG-3 y GC) estuvieron en aproximadamente 80 % de confluencia se procedió a realizar los ensayos con los genes endógenos al igual que con los genes transfectados en ausencia y presencia de los modulares: ácido retinoico (5 μ M), triyodotironina (0.1 μ M) y éster de forbol (100 nM), utilizando las concentraciones descritas en la literatura.

4.2 RNA Total de los cultivos celulares

Después de mantener las células en cultivo durante 48 h., se extrajo el RNA por el método que se describió en el capítulo de Materiales y Métodos.

Se obtuvo el RNA total de las líneas celulares, las muestras se resolvieron en geles de isotiocianato de guanidina al 1.5 %, verificándose la integridad de cada una de las muestras; la cual se apreció por visualización de las bandas 28 S y 18 S del RNA. La cantidad se determinó por espectrofotometría leyendo a una absorbancia a 260 nm para posteriormente llevarlas a una concentración aproximada de 500 ng para el RNA obtenido de los ensayos con genes endógenos y de 1 μ g para los ensayos con genes transfectados. La calidad de los RNAs extraídos se puede observar en las figuras 3 y 4.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

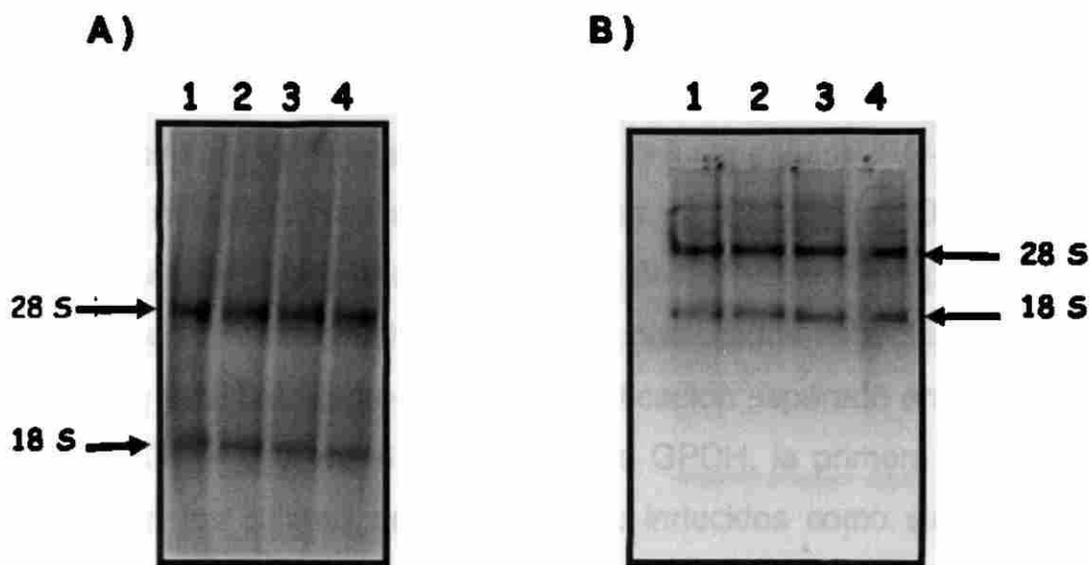


Figura 3. RNAs totales de la línea celular JEG – 3. Los RNAs de los diferentes cultivos se extrajeron con la técnica de isotiocianato de guanidina – fenol – cloroformo. 500 ng aproximadamente, de cada muestra se colocaron en los carriles 1 a 4 A) RNA de células cultivadas sin moduladores, B) RNA de células cultivadas con moduladores.

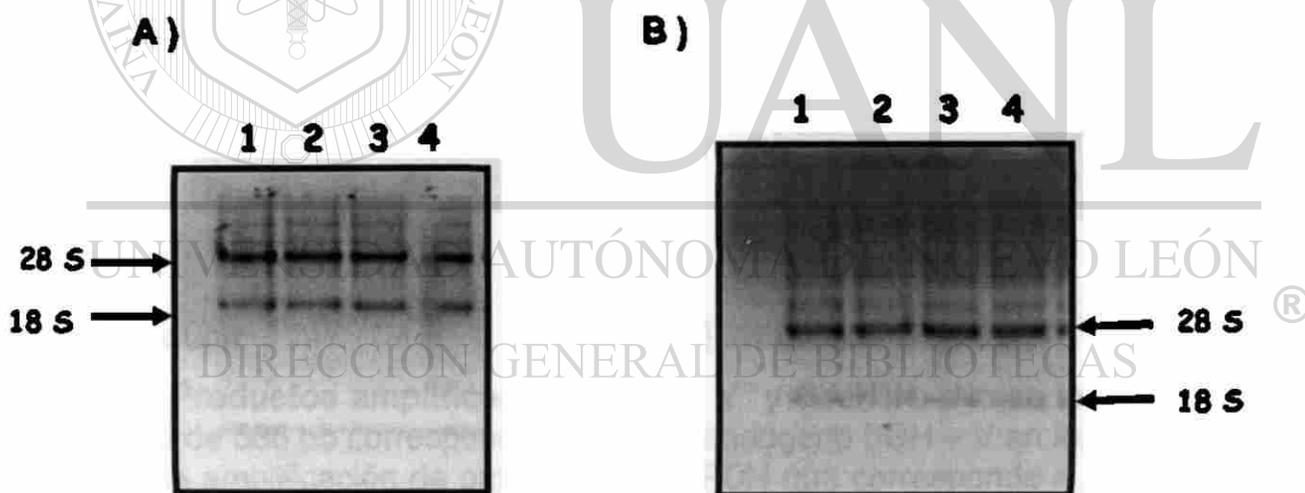
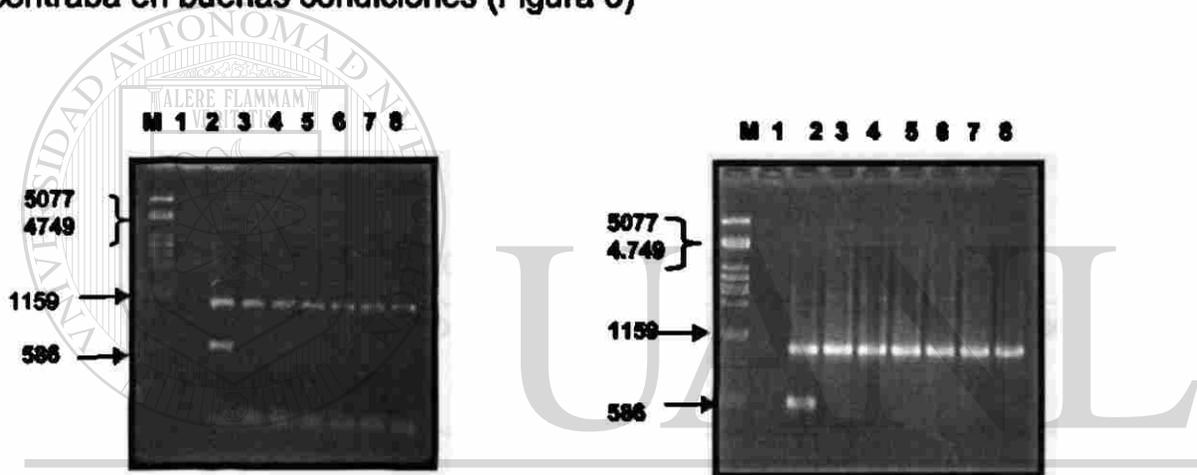


Figura 4. RNAs totales provenientes de las líneas celulares JEG – 3 y GC transfectadas con los recombinantes. Los RNAs se extrajeron con la técnica de isotiocianato de guanidina – fenol – cloroformo. A) RNA de la línea celular JEG – 3 transfectada en ausencia y presencia de moduladores, B) RNA de la línea celular GC transfectada en ausencia y presencia moduladores. En estos gels se muestran los RNA en buenas condiciones con una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aproximadamente.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

4.3 Amplificación de los genes Internos hGH – V / GAPDH en JEG-3

A partir de los RNAs del cultivo de la línea celular JEG-3 sin transfectar, en presencia y ausencia de moduladores; se sintetizaron los DNAc con la enzima transcriptasa reversa y una alícuota de este DNAc se tomó para la amplificación por PCR, en la que se utilizaron los oligonucleótidos específicos para los genes hGH – V y GAPDH. El producto de amplificación esperado era una banda de 586 pb para hGH – V y una de 1093 pb para GPDH, la primera banda no se logró detectar en los cultivos de JEG -3 tanto inducidos como sin inducir pero si se detectó la banda esperada para GAPDH, lo cual nos indicó que el RNA se encontraba en buenas condiciones (Figura 5)



A) Sin inducir

B) Inducidos

Figura 5. Productos amplificados de hGH- V y GAPDH. No se logró detectar una banda de 586 pb correspondiente al gen endógeno hGH – V en los cultivos de JEG – 3, la amplificación de producto de GAPDH que corresponde a la banda de 1093 pb indica que el RNA estaba en buenas condiciones. Carriles M: Marcador λ Pst I, 1: testigo negativo de la PCR, 2: control positivo (cDNA de placenta) , 3 a 8 : diferentes cultivos sin inducir o inducidos con ácido retinoico, triyodo tironina y éster de forbol.

4. 4 Estudios de transfección

Para determinar las condiciones óptimas para los ensayos de transfección, se probaron diferentes concentraciones de DNA transfectando los plásmidos pHGH – V - β -Gal (3. 3 kb) y pCMV – hGH – N en células de JEG – 3 y analizando la actividad de la enzima β - Galactosidasa, resultante de la expresión. y de la hormona HGH .

La influencia del la concentración del DNA se puso de manifiesto al probar 500 ng y 1 μ g de DNA por caja; al realizar los ensayos de análisis de β – galactosidasa se observó primero un aumento progresivo en la intensidad del color, y posteriormente al hacer la cuantificación de β – galactosidasa esto se puso en evidencia (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad de β - Galactosidasa

Muestra (las lecturas se hicieron por triplicado)	Actividad de β - Galactosidasa U / μ g de prot. total
1.- Blanco	20 \pm 0.38
2.- Control negativo	21 \pm 0.38
3.- Control positivo (pCMVsport- β gal)	262 \pm 0.51
4.- 250 ng	208 \pm 0.55
5.- 500 ng	220 \pm 0.53*
6.- 1 μ g	291 \pm 0.52*

Con estos ensayos, se determinó que las condiciones óptimas para los experimentos de transfección fueron 1 μ g para el plásmido pHGH – V - β - Gal y 500 ng para el plásmido pCMV – hGH – N. Se usaron 3 μ l de lipofectamina y 1 μ l de reactivo plus en cajas de 35 mm.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH - V en células en cultivo"

4.4.1. Vectores utilizados para los ensayos de transfección

Para los ensayos de transfección se usaron vectores que contienen los genes de interés para nuestro trabajo, los cuales ya se encontraban en el laboratorio de Biología Celular. (Figura 6). Se utilizaron los que contenían subclonadas las versiones mas largas subclonadas de los promotores del gen hGH - V y hGH - N, así como el gen completo del hGH - V; como controles internos de la transfección se usaron los vectores pCMV - β - Gal y pCMV - hGH - N (Figura 7).

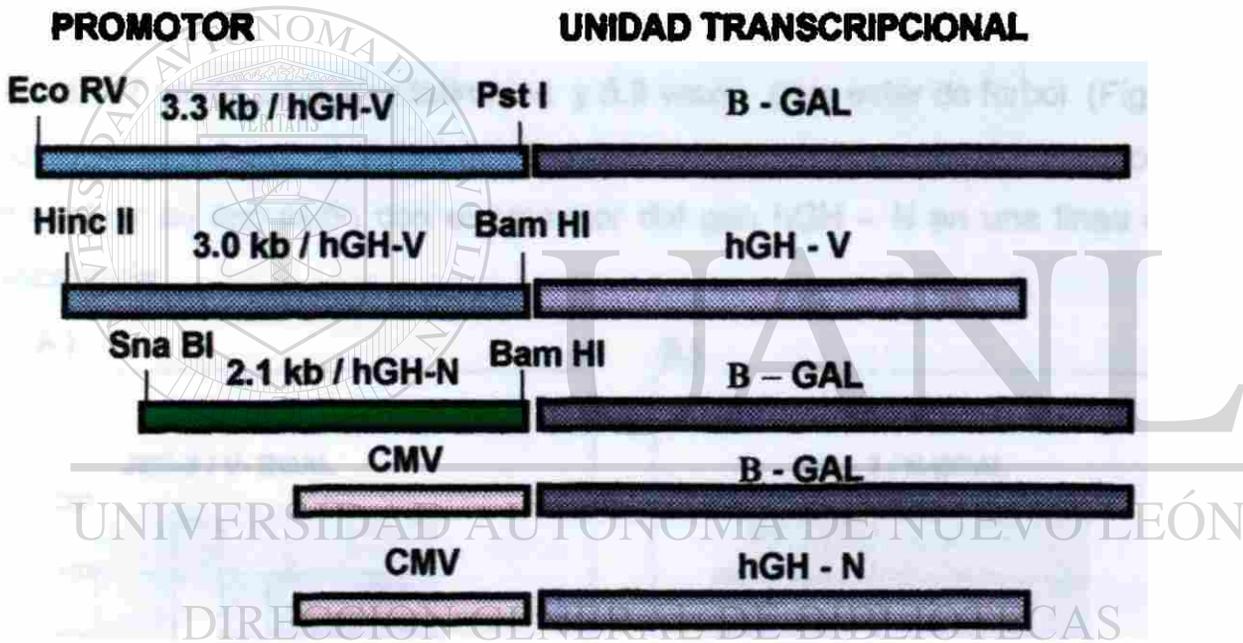


Figura 6. Vectores utilizados en los ensayos de transfección. Se muestra las construcciones que se usaron para llevar a cabo los ensayos de transfección. pHGH-V - β -Gal, el cual contiene el promotor de hGH-V de 3.3 kb, pHGH-N- β -Gal, con el promotor de hGH-N de 2.1kb, el vector que contiene el promotor de 3.0 kb y la unidad transcripcional de hGH-V y los vectores con el promotor de CMV dirigiendo las unidades transcripcionales de β -Galactosidasa y hGH-N.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH - V en células en cultivo"

4. 5 Análisis de los genes reporteros β - Galactosidasa y hGH-N

Se cotransfectaron los plásmidos phGH - V - β - Gal y pCMV - hGH-N y también phGH - N - β - Gal y pCMV - hGH-N en las líneas celulares JEG - 3 y GC, para evaluar la expresión tanto del promotor del gen hGH - V como del gen hGH - N en presencia de Ácido retinoico, Triyodotironina y Ester de forbol; utilizando como gen reportero a lac Z que codifica para β - galactosidasa.

En la línea celular JEG - 3, se observó un aumento en los niveles de expresión de β - galactosidasa con los diferentes moduladores con respecto a la muestra que no fue inducida, siendo para ácido retinoico un incremento de 5.76 veces, 4.7 veces para triyodotironina y 5.2 veces para ester de forbol (Figura 7). Como se esperaba, no se logró detectar expresión de la enzima β - galactosidasa al evaluar su expresión con el promotor del gen hGH - N en una línea celular placentaria.

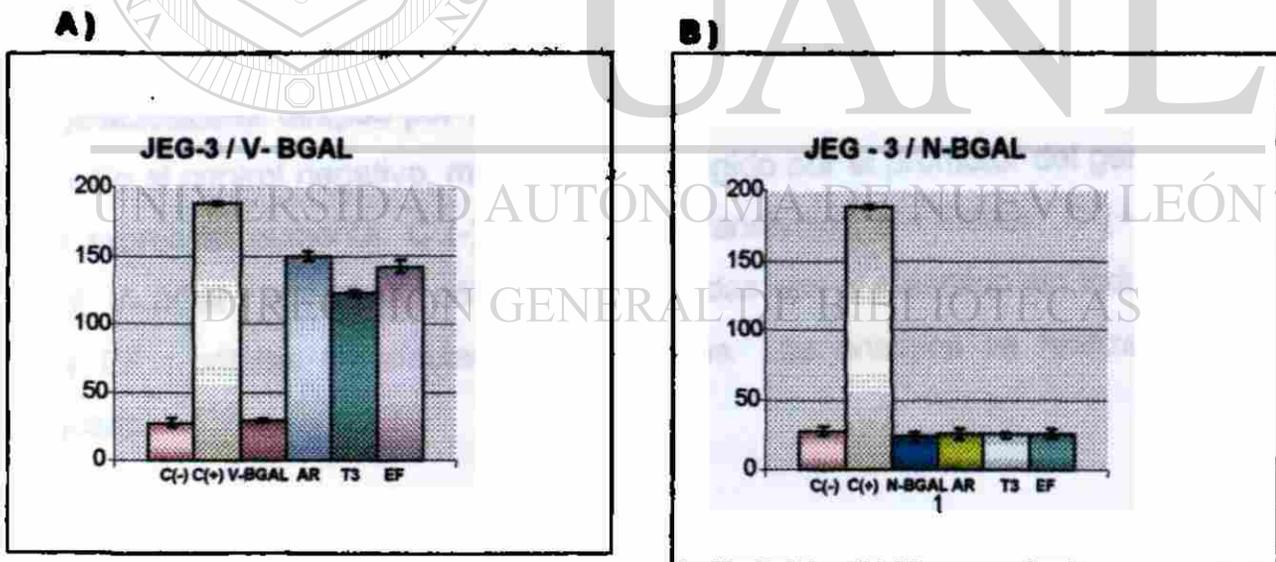


Figura 7. Análisis del gen reportero β - galactosidasa en la línea celular JEG - 3. En estas gráficas se puede observar el aumento en la expresión del gen reportero β - galactosidasa dirigido por el promotor del gen hGH - V en JEG - 3, mientras que dirigido por el promotor del gen hGH - N la expresión no es significativa. C (-): células sin transfectar, sin inducir, C (+): CMV- β -gal, V- β Gal, N - β Gal : células transfectadas con el plásmido sin inducir, AR, T3 y EF : células transfectadas e inducidas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Al analizar la expresión de β – galactosidasa en la línea celular GC también se observó un aumento en los niveles de expresión con los moduladores en el caso del promotor del gen hGH – N, siendo para ácido retinoico el incremento de la expresión de 6.3 veces, 5.1 veces para triyodotironina y 5.8 veces para éster de forbol. No se detectó expresión significativa en el caso del plásmido que contenía al promotor del gen hGH – V en presencia de los moduladores ya que este es un gen de expresión placentaria. (Figura 8).

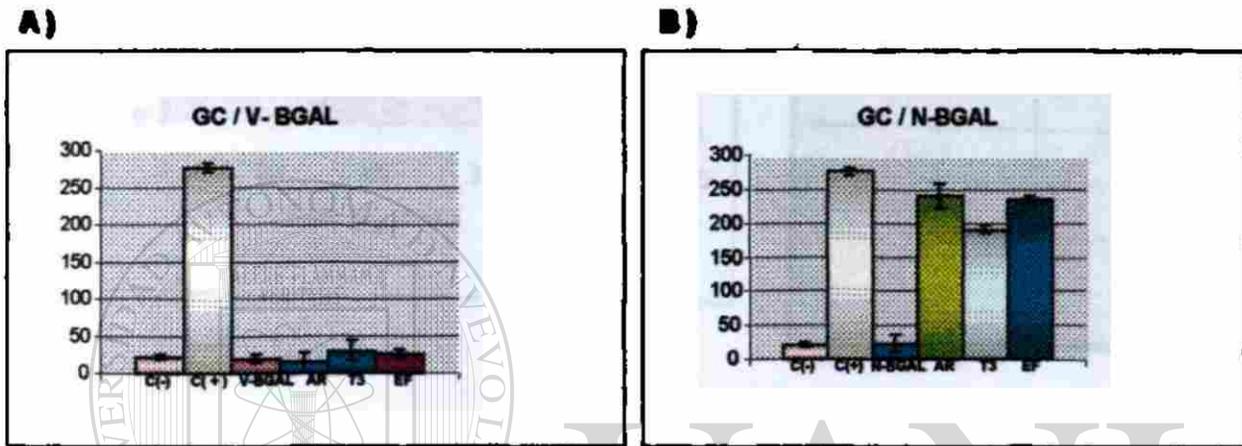
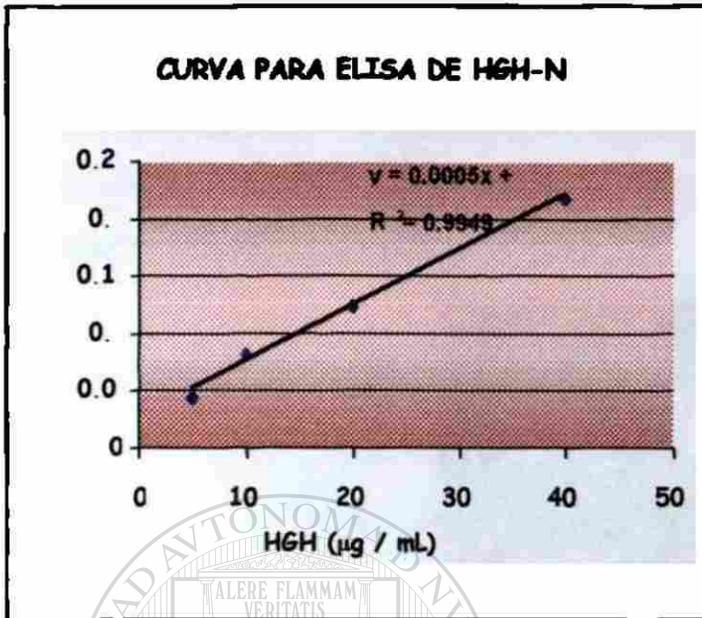


Figura 8. Análisis del gen reportero β – galactosidasa en la línea celular GC. En estas gráficas se puede observar que la expresión del gen reportero β – galactosidasa dirigido por el promotor del gen hGH – N en GC no varía con respecto al control negativo, mientras que dirigido por el promotor del gen hGH – N la expresión aumenta. C (-): células sin transfectar, sin inducir, C (+): CMV- β -gal, V- β Gal y N - β Gal : células transfectadas sin inducir, AR, T3 y EF : células transfectadas e inducidas. Los ensayos se realizaron por triplicado

Para verificar que los resultados que obtuvimos eran debido a la influencia de los moduladores se analizó por ELISA la expresión de gen hGH – N el cual se introdujo en los cultivos celulares en el plásmido pCMV – hGH – N, habiendo muy poca variación entre una muestra y otra, ya que este promotor no responde a los moduladores, por lo que se puede asegurar que las variaciones encontradas en la expresión de β – galactosidasa se debe a la influencia de los inductores adicionados a los cultivos celulares. (Figura 9)

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"



MUESTRAS	µg / ml
CONTROL NEG	87.00
CONTROL POS	86.4
V / BGAL	86.52
N / BGAL	88.92
V / AR	88.92
V / T3	91.03
V / EF	91.00
N / AR	88.00
N / T3	87.03
N / T3	88.51

Figura 9. Análisis del gen hGH – N por ELISA. Para comprobar que las variaciones observadas en la expresión de β - galactosidasa se debían a la acción de los moduladores sobre los promotores de hGH – V y hGH – N en las líneas celulares, se midió por ELISA la hormona hGH, observándose mínima variación en las muestras.

4.6 Análisis por RT-PCR de la expresión del gen hGH – V transfectado

Se realizaron ensayos por RT – PCR para evaluar la expresión del gen completo de hGH – V con su propio promotor transfectado en ausencia y presencia de los moduladores, la reacción se llevó a cabo en dos pasos: primero la retrotranscripción y después la reacción en cadena de la polimerasa.

Debido a que las temperaturas de apareamiento óptimas para los iniciadores de GAPDH (65 °C) y de hGH – V (63 °C) son similares, se decidió coamplificar estos genes, con el fin de normalizar los resultados del gen hGH – V. Sin embargo no se logró amplificar el producto correspondiente a hGH – V, por lo que se optó por amplificar los productos de GAPDH y hGH – V por separado, para posteriormente mezclarlos para correr la electroforesis en gel de agarosa.

Resultados: “Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo

que se optó por amplificar los productos de GAPDH y hGH – V por separado, para posteriormente mezclarlos para correr la electroforesis en gel de agarosa.

Se observaron en variaciones en la intensidad de la banda de los productos amplificados de hGH – V provenientes de las muestras a las que se le adicionaron moduladores, mientras que la intensidad de la banda correspondiente al gen de GAPDH se mantenía constante. (Figura 10).



Figura 10. Amplificación GAPDH / hGH – V en la línea celular JEG – 3 transfectada. Los productos de la amplificación para GAPDH y hGH – V, separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, para lograr separarlas bandas correspondientes a GAPDH de 1093 pb y hHG – V de 586 pb. M - Marcador λ Pst I, 1. – testigo negativo de PCR, 2. - control positivo (Placenta), 3. – V/ sin inducir, 4 y 5.- V/AR, 6 y 7.-V/ T3, 8 y 9.- V/EF.

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

El análisis densitométrico realizado al gel se muestra en la figura 11, donde se puede observar las variaciones de intensidad de respuesta de los productos amplificados a los moduladores.

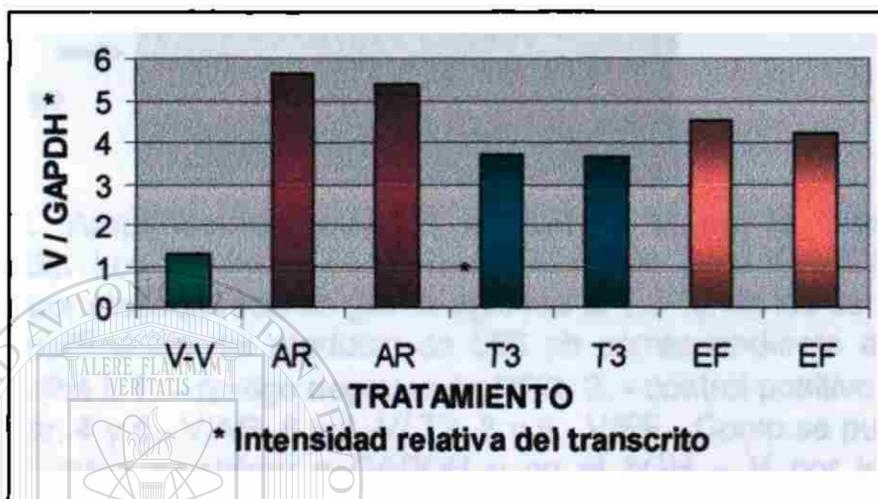


Figura 11. Densitometría de la amplificación de GAPDH / hGH – V. En esta tabla podemos observar las variaciones de intensidad entre los productos de amplificación con moduladores y en ausencia de ellos, se puede ver que en el caso de los productos con AR la inducción es hasta 5.4 veces, con T3 es de 3.7 veces y con EF es de 4.5 veces.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

También se realizaron ensayos por RT – PCR para evaluar la expresión del gen hGH – V transfectado en la línea celular GC y verificar su especificidad celular. Esta se comprobó al no lograr detectar la banda de 586 pb correspondiente a hGH – V, coamplificando con GAPDH con el fin de que fuera testigo interno de la reacción de RT – PCR (Figura 12)

Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH - V en células en cultivo"

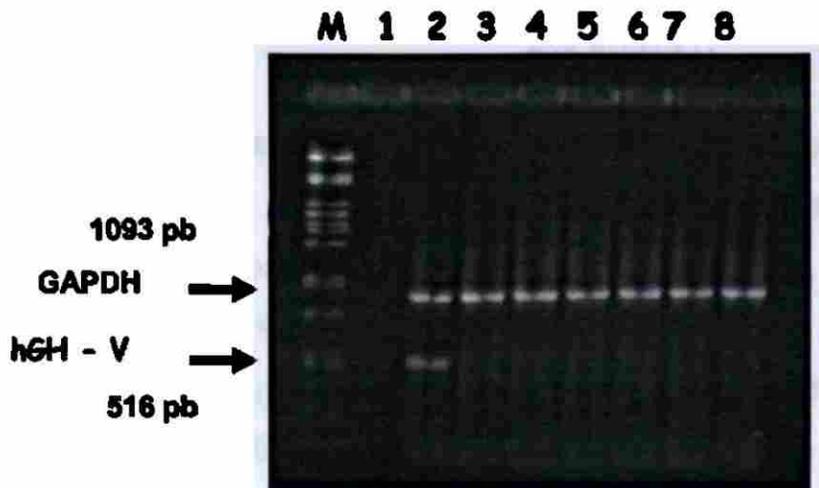


Figura 12. Amplificación GAPDH / hGH - V en la línea celular GC transfectada. Los productos de la coamplificación para GAPDH y hGH - V, separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, en los carriles 3 - 9 no se observa amplificación del producto de 586 pb correspondiente a hGH - V. M - Marcador λ Pst I, 1. - testigo negativo de PCR, 2. - control positivo (Placenta), 3. - V/ sin inducir, 4 y 5.- V/AR, 6 y 7.-V/ T3, 8 y 9.- V/EF. Como se puede ver en este gel solo se logró amplificar a GAPDH y no al hGH - V por lo que podemos comprobar la especificidad tisular del gen transfectado.

CAPITULO V

DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios realizados sobre la regulación de la expresión de los genes de la familia hGH – hPL que se expresan en la placenta se han llevado a cabo en líneas celulares ya establecidas, ó en cultivos primarios de placenta, enfocándose principalmente al estudio de los diferentes componentes del gen : promotor, unidad transcripcional, potenciador, elementos de respuesta a metabolitos, etc. Estos experimentos se han llevado a cabo principalmente con los dos genes que más se expresan en placenta: hPL- 2 y hPL -3 y poco había sido el interés por hGH – V, ya que a pesar de que se consideraba por las características de su secuencia un gen funcional y esto se confirmó por estudios de expresión *in vitro* en líneas celulares no humanas, su expresión *in vivo* no fue detectada por muchos años. La primera evidencia de su expresión fisiológica se logró mediante un análisis de dot blot de RNAm de placenta humana (Frankenne y cols; 1987). Por todo esto, pocos son los estudios sobre la expresión de este gen y su regulación por los factores transcripcionales.

En este trabajo se realizó un estudio comparativo de la regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V bajo la acción de diferentes moduladores en una línea celular placentaria humana (JEG – 3) y una línea celular de hipófisis de rata (GC). Para ello, primero se realizaron, ensayos para tratar de detectar los genes endógenos en la línea celular JEG – 3 en presencia y ausencia de moduladores (ácido retinoico, triyodotironina y éster de forbol), utilizando un iniciador específico para hGH - V, para aumentar la sensibilidad de la reacción. En nuestras condiciones de trabajo no logramos detectar un producto de amplificación para el gen hGH – V, cabe señalar que en un estudio realizado con las líneas celulares BeWo, JAR y JEG – 3 sobre la expresión tejido - específico de los genes pertenecientes a la familia hGH / hPL que se expresa en placenta, no se logró detectar expresión del gen hGH – V en la línea celular JEG – 3. (Nickel y

Discusión: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

cols; 1991). Por lo que es probable que los niveles de expresión de los genes endógenos sean bajos.

Sin embargo en ensayos realizados previamente en nuestro laboratorio se había logrado detectar un producto de amplificación de aproximadamente 738 pb y analizando por medio de la enzima de restricción diagnóstica *Pst* I se comprobó que era un producto de amplificación proveniente de hGH – V; este ensayo se realizó con las líneas celulares JEG- 3, JAR y BeWo; sin embargo en el presente trabajo no se pudieron repetir estos resultados lo cual podría deberse a variaciones en las condiciones de cultivo.

También realizamos ensayos con vectores recombinantes, que contenían las versiones más largas de los promotores del gen hGH – V y hGH - N (para tratar de tener las secuencias a las que se sabe que son las que interaccionan con los moduladores incluidos en este trabajo) dirigiendo al gen reportero β - galactosidasa ya que es un gen que no se encuentra de manera normal en las células en donde se llevaron a cabo los ensayos y su expresión es fácilmente detectable, lo que lo convierte en un buen gen reportero.

En otros trabajos en nuestro laboratorio se ha usado como gen reportero a hGH – N, pero en esta investigación se pensó que al ser éste un miembro de la familia hGH / hPL, podría interferir en la respuesta a moduladores cuando se ensayaba con los promotores hGH – V y hGH – N, mientras que al usar como gen reportero a β - galactosidasa, los resultados obtenidos en la expresión de los promotores bajo la acción de los moduladores son atribuibles solo a los promotores ensayados.

Se usó también el gen completo de hGH – V (promotor distal y unidad transcripcional), y además se cotransfectaron con los vectores que contenían el promotor del Citomegalovirus (CMV) el cual no responde a los moduladores dirigiendo a los genes reporteros β - galactosidasa y hGH – N. Este vector puede

Discusión: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

ser usado como control interno de transfección y de esta manera comprobar que las variaciones en los niveles de inducción son debidas a la acción de los moduladores sobre los promotores ensayados.

En los ensayos de cotransfección realizados en la línea celular placentaria humana JEG – 3 se utilizaron los vectores que contenían a los promotores distales de hGH – V y hGH – N, dirigiendo la unidad transcripcional de β - galactosidasa. Se usaron estos vectores con el objetivo de estudiar el efecto de los moduladores sobre el promotor distal de hGH – V y por otro lado comprobar la especificidad tisular de los promotores de hGH – V y hGH – N. Se observó un aumento en los niveles de la proteína de β - galactosidasa hasta de 6 veces con ácido retinoico, 4.6 veces con triyodotironina y 5.3 veces aproximadamente con éster de forbol. En nuestro trabajo estos tres moduladores estimulan la síntesis y la liberación de β - galactosidasa (reportero) en células citotrofoblasticas (JEG – 3) *in vitro*, y en trabajos anteriores se observó que ácido retinoico y triyodo tironina estimulaban la síntesis y liberación de hPL usando promotores de 0.5 kb y 2.3 kb dirigiendo al gen reportero CAT, además que se cotrasfectaron con vectores que contenían las secuencias para RAR α y TR β (Stephanou y cols; 1994 a). En el caso de la inducción con éster de forbol poco es lo que se conoce acerca de su acción sobre los promotores de los genes de la familia hGH – hPL, pero se sabe que éster de forbol reduce los efectos de hGH en la estimulación del crecimiento de una línea celular de linfocitos (IM-9) (Kazuhiro y cols; 1990); habría que hacer un estudio mas detallado sobre la acción de este modulador en los promotores distales de todos los genes de esta familia tanto en líneas celulares placentarias como de hipófisis con el fin de evaluar la expresión de los genes bajo la influencia de éster de forbol. En el caso de los resultados obtenidos con el promotor del gen hGH – N en JEG -3 no se detectó aumento en los niveles de la proteína de β - galactosidasa (reportero) esto nos indica la especificidad tisular del promotor distal (3.3 kb) de hGH – N ya que necesita de la presencia del factor transcripcional Pit – 1 (GHF- 1) para una eficiente expresión (Karin y cols; 1990).

Discusión: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

En los ensayos de cotransfección llevados a cabo en la línea celular GC con los vectores antes mencionados se observó un aumento en los niveles de expresión del promotor del gen hGH-N bajo la acción de los moduladores con respecto a los niveles del control sin inducir, muy parecido al que se observó en la línea celular JEG – 3, es decir hay mayor aumento con ácido retinoico, le sigue éster de forbol y triyodotironia aunque las variaciones en la expresión del promotor de hGH – N con moduladores son mas altas que las que se observaron con el promotor de hGH – V en los ensayos con JEG – 3. A la vez no se observó aumento en la expresión del promotor del gen hGH – V, por lo que se corroboró la especificidad tisular de este gen, ya que a 2.0 kb aproximadamente río arriba del sitio de inicio de la transcripción se encuentra un elemento inhibidor llamado elemento P el cual está presente en todos los genes de esta familia excepto en el gen hGH – N (Chen y cols; 1989).

Para corroborar los resultados obtenidos también se realizaron ensayos por retrotranscripción seguida de la reacción en cadena de la polimerasa con un iniciador específico para hGH – V. Para éstos se utilizó un vector que contenía el gen completo de hGH – V y se cotransfectó con un vector que contenía al gen reportero hGH – N, en estos ensayos si logramos detectar un producto de amplificación de 586 pb correspondientes al gen de hGH – V en todas la muestras® incluyendo en ausencia de moduladores aunque la banda amplificada era muy tenue (figura 9). Se encontraron variaciones en la intensidad de la banda al igual que en los ensayos de análisis de β - galactosidasa, siendo para ácido retinoico un aumento de hasta 6 veces, 5.3 veces para éster de forbol y casi 4.6 veces para triyodo tironina. Para normalizar los resultados de la reacción de RT – PCR se seleccionó al gen de GAPDH ya que como se mencionó en el capítulo de Material y Métodos es un gen que tiene expresión constitutiva, lo cual observamos en la figura 9.

Discusión: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

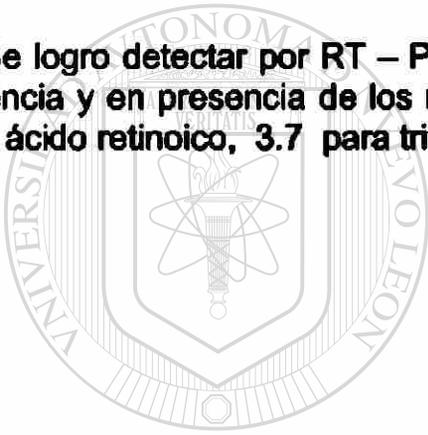
Para comprobar que las variaciones observadas tanto en los ensayos de análisis de β – galactosidasa como en el RT – PCR se debían a la acción de los moduladores sobre los promotores ensayados (hGH \rightarrow V y hGH \rightarrow N), cotransfectamos el plásmido que contenía al promotor de CMV, el cual como ya mencionamos anteriormente no responde a la acción de los moduladores utilizados en este trabajo. Este promotor se usó para dirigir la expresión de la unidad transcripcional de hGH – N llevándose a cabo el análisis mediante un ensayo de ELISA de HGH, teniendo una $R^2 = 0.9949$, con esto podemos estar seguros que las variaciones observadas en la expresión de los promotores analizados son debidas a la acción de los moduladores. La hormona de crecimiento es una proteína que es secretada al medio de cultivo por lo que se puede medir fácilmente al tomar una muestra del medio de cultivo mediante inmunoensayos (Larsen y cols; 1986).

En resumen en este trabajo se encontró que los tres moduladores ensayados incrementan la expresión de los genes reporteros con la expresión específica de tejido que corresponde a su expresión natural, es decir el promotor de hGH-V en las células de placenta y el de hGH-N en las células de hipófisis. Aunque se observaron pequeñas diferencias en cada uno de los moduladores, no puede saberse si estas tienen significancia biológica.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

- 1. Los niveles de expresión del gen hGH – V endógeno en la línea celular JEG-3 no fueron detectados bajo nuestras condiciones de trabajo.**
- 2.- Al transfectar una construcción conteniendo el promotor del gen hGH-V si se logró detectar su expresión. Esto permitió discernir el efecto de los moduladores sobre los promotores de ambos genes hGH.**
- 2. Se comprobó la especificidad tisular de los promotores de hGH – V y de hGH – N.**
- 3.- Se observó que triyodo tironina, ácido retinoico y éster de forbol incrementan la actividad del promotor de hGH – V.**
- 4.- Se logró detectar por RT – PCR el producto de amplificación de hGH – N, en ausencia y en presencia de los moduladores, teniendo incrementos de 5.4 veces para ácido retinoico, 3.7 para triyodotironina y 4.4 veces para éster de forbol.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



REFERENCIAS

Alsat, E; Guibourdenche, J; Couturier, A; Evain – Brion, D (1998). Physiological role of human placental growth hormone. *Mol. Cell Endocrinol*; 140: 121 – 127.

Aoki, Y ; Adach, S; Yoshiya, N; Honma, S; Kanazawa, K; Tanaka, K (1991). Effects of various growth factors on the proliferation and the differentiation of trophoblastic cells *in vitro*. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 43 : 11, 1527 – 1532.

Barrera Saldaña, HA; Seeburg, PH; Saunders, GF (1983). Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J. Biol. Chem*; 258, 3787 – 3793

Bedo, G; Santisteban, P; Aranda, A (1989). Retinoic acid regulates growth hormone gene expression. *Nature* 339 : 231 – 234.

Boguszewski, CL; Svennsson, PA; Janson, T; Clark, R; Carlsson, LM; Carlsson, B; (1998). Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab*; 83 : 8, 2878 – 2885.

Braunstein, GD; Rasor, JL; Engvall, E; Wade, ME; (1980) Interrelationships of human chorionic gonadotropin, Human placental lactogen, and pregnancy – specific beta I – glycoprotein throughout normal human gestation. *Am. J. Obstet Gynecol*; 138: 1205 – 1213.

Bradford, M.M (1976); A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal Biochem* 72:248 – 254.

Cattini, PA; Peritz, LN; Anderson, TR; Baxter, JD; Eberhardt, NL (1986); The 5' – flanking sequences of the human growth hormone gene contain a cell – specific control element. *DNA* 5 : 6, 503 – 509.

Canizales- Espinoza, M; Vila, V; Martínez – Rodríguez, H; Revol, A; Jiménez – Mateo, O; Egly, JM; Castrillo, JL, Barrera – Saldaña, HA (2000). Differential strength of transfected human growth hormone and placental lactogen genes promoters. Enviado a revisión.

Canizales – Espinoza, M (1996). Tesis de Maestría "Estudio comparativo de promotores de genes del complejo hGH – hPL que se expresan en placenta"

Caufriez, A; Frankenne, F; Englert, Y; Golstein, J; Cantraine, F; Hennen, G; Copinschi, G (1990). Placental growth hormone as a potential regulator of maternal IGF – I during human pregnancy. *Am. J. Physiol*, 258 : E1014 – 1019.

Referencias: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Chen, EY; Liao, YC; Smith, DH; Barrera – Saldaña, HA; Gelinas, RE; Seebrug, PH (1988). The human growth locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics* , 4, 479 – 497.

Chomczynski, P; Sacchi, N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*; 162(1), 156-159.

Dana, S; Karin, M (1989). Induction of human growth hormone promoter activity by the adenosine 3' ,5' – monophosphate pathway involves a novel responsive element. *Mol Endocrinol*, 3 (5): 815 – 21.

De Vos, M A , Ultsch, M; Kossia, Koff, AA (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: Crystal structure of the complex. *Science. Jan 17: 255 (5042): 306 – 12.*

Dobner, PR; Kawasaki, ES; Yu, LY; Bancroft (1981). Thyroid or glucocorticoid hormone induces precursor in rat pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 78 (4) : 2230 – 4.

Eberhardt, NL; Hirt, H; Cattini, PA; Anderson, TR, Peritz, L; Baxter, JD; Mellon, P; Issacs; R, Slater, EP, Barta, A (1988). Human growth hormone genes: structure evolution, expression and hormonal regulation. *In Lau Y – F (ed) Endocrine Genes. Oxford University Press, New York.*

Eriksson, L; Frankenne, F; Edén, S; Hennen, G; Schoultz, BV (1988); Growth hormone secretion during termination of pregnancy. *Acta Obstet Scand* 67 : 549 – 552.

Evain – Brion, D; Alsat, E; Igout, A; Frankenne, F; Hennen, G; (1994). Placental growth hormone variant: assay and clinical aspects. *Acta Paediatr. Suppl*, apr, 399: 49 – 51.

Evain – Brion D (1999). Maternal endocrine adaptations to placental hormone in humans. *Acta Paediatr Suppl*, 88 (428) : 12 – 6.

Eustice, D.C; Feldman, P.A; Colberg – Poley, A.M; Buckery, R.M; Neubauer, R.H; (1991). A sensitive method for the detection of β – Galactosidase in transfected mammalian cells. *Biotechniques*. 11(6): 739 -742.

Frankenne; F; Closset, J; Scippo, ML; Smal, J; Hennen, G (1988). The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J. Clin Endocrinol Metab* 66 : 1171 – 1180.

Referencias: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Freemark, M; Handwerger, S (1999). The roles of growth hormone, prolactin and placental lactogen in human fetal development. *Molecular and Cellular Pediatric Endocrinology*. Totowa, NJ: Human Press, 57 – 84.

Garcia – Villalba, P; Jimenez – Lara, Ana M; Aranda, A (1995). Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. *Molecular and Cellular Biology*; 318 – 327.

Goda, SK; Minton, NP (1995). A simple procedure for gel electrophoresis and northern blotting of RNA. *Nucl. Acids, res*; 23 : 16. 3357 – 3358.

Goffin, V; Shiverick ,KT; Kelly, PA; Martial, JA; (1996). Sequence – function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr Rev*; 17 : 385 – 410.

Golos, TG; Handrow, RR; Duming, M; Fisher, JM; Rilling, JK (1992). Regulation of chorionic gonadotropin – alpha and chorionic somatomammotropin messenger ribonucleic acid expression by 8 –bromo – adenosine – 3', 5' – monophosphate and dexamethosone in culture rhesus monkey syncytiotrophoblasts. *Endocrinology*, 131 : 1, 89 – 100.

Goodman, HM; Tai, LR; Ray, J; Cooke, NE; Liebhaber, SA (1991). Human growth hormone variant produces insulin – like and lipolytic responses in rat adipose tissue. *Endocrinology*, 129: 1779 – 1783.

Handwerger, S; Myers, S; Richards, R; Richardson, B; Turzai, L; Moeykins, C; Meyer, T; Ananthramaiah, GM (1995). Apolipoprotein A – I stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. *Endocrinology*; 136 : 5555 – 5560.

Handwerger, S; Datta, G; Richardson, B; Schmidt, CM; Siddiqi, T; Turzai, L; Ananthramaiah, GM (1999). Pre-beta HDL stimulates placental lactogen release from human trophoblast cells. *Am J Physiol* 1999; 276: E384-389.

Handwerger, Stuart; Freemark, Michael (2000). The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*; 13, 343 – 356.

Harper, ME; Barrera – Saldaña HA; Saunders,GF(1982). Chromosomal localization of the human placental lactogen – growth hormone gene cluster to 17q 22 – 24 (1982). *Am J Hum Genet* 1982; 34 : 227 – 234.

Hill, DJ; Freemark, M; Strain, AJ; Handwerger, S; Milner, RD (1988). Placental lactogen and growth hormone receptors in human fetal tissues: relationship to fetal plasma human placental lactogen concentrations and fetal growth. *J. Clin. Endocrinol Metab*, 66 : 1283 – 1290.

Referencias: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Hill, DJ; Riley, SC; Bassett, NS; Waters, MJ (1992). Localization of the growth hormone receptor, identified by immunocytochemistry, in second trimester human fetal tissues and in placental throughout gestation. *J Clin Endocrinol Metab*; 75: 646 – 650.

Iturbe – Cantú, M (1995). Formas alternativas de procesamiento de los ARN mensajeros de los genes lactogeno placentario 1 y hormona del crecimiento variante del genoma humano y su abundancia relativa durante el embarazo. Tesis de licenciatura.

Karin, M, Theill, L; Castrillo, JL; McCormick, A; Brady, H (1990). Cell type specific expression of the growth hormone gene and its control by GHF – 1. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi*, Dec 20, 66(12) : 1205 – 20.

Kawasaki, ES; In PCR protocols, a guide methods and applications (Innis, M; Gelfand, DH; Sninsky, JJ; White, TJ), (1992) 482 pp. *Academic Press, London*.

Kazuhiro, S; Sumiko, S; Yoshiro, S; Hideharu, I; Tadao, T (1990). Human growth hormone – stimulated growth of human cultured lymphocytes (IM – 9) and its inhibition by phorbol diesters through down – regulation of the hormone receptors. *The Journal of Biological Chemistry*; 11320- 11327.

Kidd, VJ; Barrera – Saldaña, HA; Saunders, GF (1983). The human growth and placental lactogen gene complex. En "Perspective on genes and the molecular biology of cancer" (D. L. Robberson y Grady F. Saunders, eds). *Raven press. New Cork*, pp. 143 – 146.

Kim, YJ; Felig, P (1971); Plasma chorionic somatomammotropin levels during starvation in midpregnancy. *Endocrinology Metab*; 32 : 864 – 867.

Kolb, A F; Günzburg, W. H.; Brem, G; Erfle, V; Salmons, B. (1998). A functional eukaryotic promoter is contained within the first intron of the hGH – N coding region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, 332 – 337 (1998).

Lasem, PR; Haney, JW; Moore, DD (1989). Sequences required for cell – type specific thyroid hormone regulation of rat growth hormone promoter activity. *J. Biol. Chem.* 261, 14, 373 – 6.

LeComte, C; Renard , A; Martial, J (1987). A new natural hGH variant – 17 .5 kd produced by alternative splicing. An additional consensus sequence wich might play a role in branch point selection. *Nucleics Acids Res*; 15 : 16, 6331 – 6348.

Referencias: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Lemaigre, FP; Courtois, SJ; Lafontaine, DA; Rousseau, GG (1989). Evidence that the upstream stimulatory factor and the Sp1 transcription factor bind *in vitro* to promoter of the human - growth – hormone gen. *J. Biochem*; 181, 555 – 561.

Lefevre, C; Imagawa, M; Dana, S; Grindlay J, Bodner, M; Karin, M (1987). Tissue – specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans – acting factor. *EMBO J*; 6 : 971 – 981.

Lobo, JO; Bellino, FL (1989). Estrogen synthetase (aromatase) activity in primary culture of human term placental cells : effects of cell preparation, growth medium, and serum on adenosine 3', 5' – monophosphate response. *J. Endocrinol. Metab*; 69 : 4, 868 – 874.

MacLeod, JN; Worley, I; Ray, J; Friesen, HG; Liebhaber, SA; Cooke, NE (1991). Human growth hormone – variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology*; 128 : 1298 – 1302.

MacLeod, JN; Lee, AK; Liebhaber, SA; Cooke, NE (1992). Developmental control and alternative splicing of the placentally expressed transcripts from the human growth hormone gene cluster. *J. Biol. Chem.* 267 : 20, 14219 – 14226.

Mirlesse, V; Frankenne, F; Alsat, E; Poncelet, M; Hennen, G; Evain – Brion, D (1993). Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. *Pediatr. Res*; 34 : 439 – 442.

Nachtigal, MW; Nickel, BE; Klasen, ME; Zhang, WG; Eberhardt, NL; Cattini, PA (1989). Human chorionic somatomammotropin and growth hormone gene expresión in rat pituitary tumour cells is dependent on proximal promoter sequences. *Nucleics Acids Res*; 17 : 11, 4327 – 4337.

Nachtigal, MW; Nickel, BE; Cattini, PA (1992). Pituitary – specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. *J. Biol. Chem*; 18, 8473 – 8479.

Nickel, BE; Kardami, E; Cattini, PA (1990). The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells. *Endocrinology*; 126 : 971 – 976.

Nickel, BE; Kardimi, E; Cattini, PA; (1990). Differential expresion of human placental growth – hormone variant and chorionic somatomammotropin in culture. *Biochem. J.* 267, 653 – 658.

Nickel, BE; Cattini, PA (1991). Tissue – specific expression and thyroid hormone regulation of the endogenous placental growth hormone variant and chorionic sommatomammotropin genes in a human choriocarcinoma cell line. *Endocrinology* 128 : 5, 2353 – 2359.

Referencias: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Niiori – Onoishi, A; Iwasaki, Y; Mutsuga, N; Oiso, Y; Inouek, K; Saito, H. (1999). Molecular mechanisms of the negative effect of insulin – like growth factor – I on growth hormone gene expression in MtT / S somatotroph cells. *Endocrinology* 140(1): 344- 9 .

Oury, c; Alsat, E; Jacquemin, P; Evain – Brion, D; Martial, JA; Muller, M (1997). A one –nucleotide difference in a c AMP and phorbol ester response element leads to a differential regulation of the human chorionic somatomammotropin A and B gene transcription. *J. Mol. Endocrinol*; 18, 87 – 99.

Palmetshofer, A; Zechner, D; Luger, TA; Barta, A (1995). Splicing variants of the human growth hormone mRNA : detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts. *Mol Cell. Endocrinol.* 213 (2) : 225 -34.

Paladini, AC; Peña, C; Poskus, E; (1983). Molecular biology of growth hormone. *CRC Crit Rev Biochem*, 15(1): 25 – 26.

Patillo, RA; Hussa, RO; Ruckert, AC; Kurtz, JW; Cade, JM; Rinke, ML (1979). Human chorionic gonadotropin in BeWo trophoblastic cells after 12 years in continuous culture: retention of intact human chorionic gonadotropin secretion in mechanically versus enzyme-dispersed cells. *Endocrinology*; 105(4): 967-74

Reséndez Pérez, D; Ramírez Solís R; Varela Echavarría, A; Martínez Rodríguez, HG, Barrera Saldaña HA (1990). Coding potential of transfected human placental lactogen genes. *Nucleic Acids Res*; 18 : 16, 4665 – 4670.

Richards, RG; Hartman, SM; Handwerker, S (1994). Human cytotrophoblast cells cultured in maternal serum progress to a differentiated syncytial phenotype expressing both human chorionic gonadotropin and human placental lactogen. *Endocrinology*; 135 : 1 321 – 328

Rosing, U; Samsioe, G; Olund, A; Johansson, B; Kallner, A (1989). Serum levels of apolipoprotein A-I, A-II and HDL-cholesterol in second half of normal pregnancy and in pregnancy complicated by pre-eclampsia. *Hormone Metab Res.* 1989; 2: 376-382.

Rygaard K, Revol, A; Equivel – Escobedo, D; Beck, BL, Barrera – Saldaña, HA (1998). Absence of human placental lactogen and placental growth hormone (hGH –V) during pregnancy: PCR analysis of the deletion. *Human Genet, Jan*, 102 (11): 87 –92.

Scippo, ML, Frankenne, F; Hooghe – Peters, EL; Igoel, A, Velkeniers, B; Hennen, G; (1993). Syncytiotrophoblastic localization of the human growth hormone variant mRNA in the placental. *Mol. Cell. Endocrinol.* 92, r7 (1993).

Referencias: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Seeburg, PH; The Human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone (1982). *DNA* 1: 239 – 249.

Schwarzler, P; Untergasser, G; Hermann, M; Dimhofer, S; Abendstein, B; Madersbacher, S; Berger, P (1997). Selective growth hormone / placental lactogen gene transcription and hormone production in pre and post menopausal human ovaries. *J. Clin. Endocrinol Metab*; 82 (10): 3337 -41.

Slater, EP; Rabenau, O; Karin, M; Baxter, JD; Beato, M (1995). Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol. Cell. Biol*; 5: 11, 2984 – 2992.

Stephanou, A; Ross, R; Handwerger, S (1995). Regulation of human placental lactogen expression by 1,25 – dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology*; 135 : 6, 2651 – 2656.

Stephanou, A; Handwerger, S (1994a). Interleukin – 6 stimulates placental lactogen expression by human trophoblast cells. *Endocrinology*, 132 : 2, 719 – 723.

Stephanou, A; Handwerger, S (1995a). Identification of a composite steroid hormone response element on the human placental lactogen promoter. *Mol. Cell. Endocrinol*; 112 : , 123 – 129.

Stephanou, A; Handwerger, S (1995b). Retinoid acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinology*, 136 : 3, 933 – 938.

Stephanou, A; Handwerger, S (1995c). The nuclear factor NF – IL6 activates human placental lactogen gene expression. *Biochem. Biophys. Res Commun*; 206 : 1, 215 – 222.

Untergasser, G; Kranewitter, W; Schwarzler, O; Madersbacher, S; Dimhofer, S, Berger, P; Organ – specific expression pattern of the human growth hormone / placental lactogen gene – cluster in the testis (1997). *Mol. Cell. Endocrinol.* 130, 53 – 60, 1997.

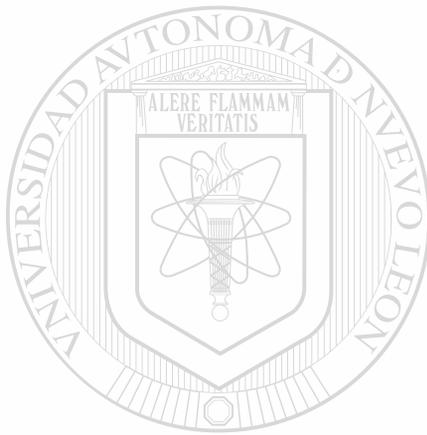
Untergasser, G; Hermann, M; Rumpold, H; Berger, P, (1998). Complex alternative splicing of the GH – V gene in the human testis. *Eur. J. Endocrinol*; 139 : 4, 424 – 427.

Referencias: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"

Voz, ML; Peers, B; Belayew, A; Martial, JA (1991). Characterization of an unusual thyroid response unit in the promoter of the human placental lactogen gene. *J. Biol. Chem*; 266 : 20, 13397 – 13408.

Walker, WH; Fitzpatrick, SL, Barrera – Saldaña, HA; Reséndez – Perez, D; Saunders, GF; (1991).The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocrine Reviews*, 12 : 316 – 328.

Zadik, Z; Chalew, SA; McCarter, RJ Jr; Meistas, M; Kowarski, AA; (1985). The influence of age on the 24 – hour integrated concentration of growth hormone in normal individuals. *J Clin Endocrinol Metab*, Mar 60(3):513 -6

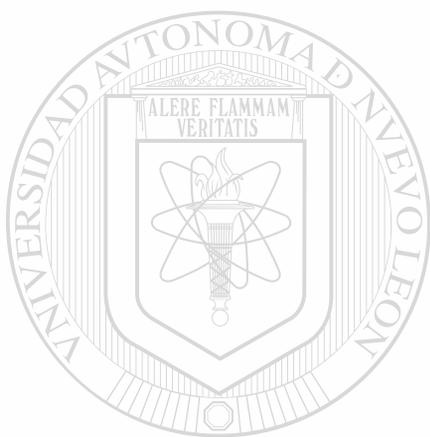


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



