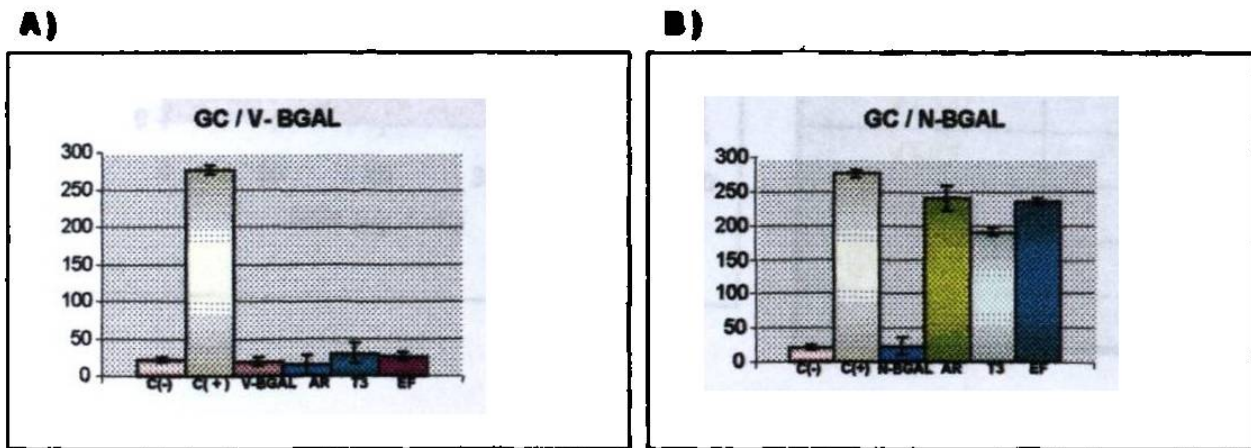


**Resultados: "Regulación de la expresión diferencial del gen hGH – V en células en cultivo"**

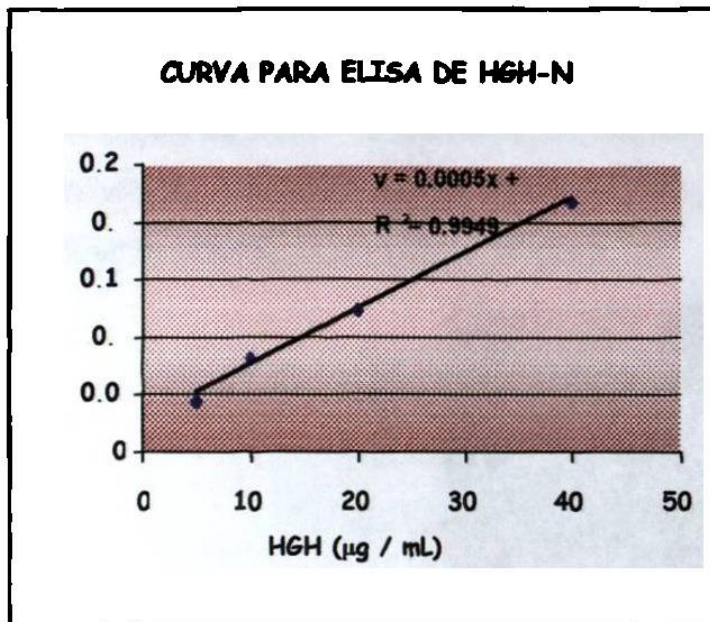
Al analizar la expresión de  $\beta$  – galactosidasa en la línea celular GC también se observó un aumento en los niveles de expresión con los moduladores en el caso del promotor del gen hGH – N, siendo para ácido retinoico el incremento de la expresión de 6.3 veces, 5.1 veces para triyodotironina y 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  $\beta$  – galactosidasa en la línea celular GC.** En estas gráficas se puede observar que la expresión del gen reportero  $\beta$  – 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- $\beta$ -gal, V-  $\beta$ Gal y N -  $\beta$ Gal : células transfectadas con el plásmido 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  $\beta$  – 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	$\mu\text{g} / \text{ml}$
CONTROL NEG	87.00
CONTROL POS	86.4
V / BGAL	86.52
N / BGAL	86.92
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  $\beta$  - 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**

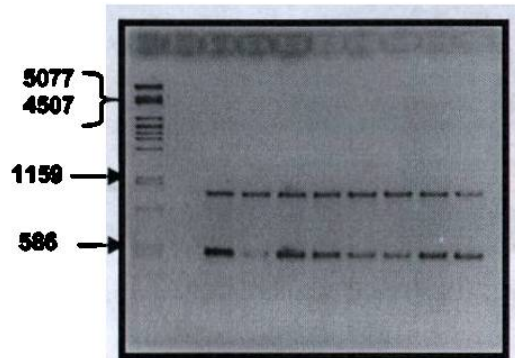
Se realizaron ensayos por RT – PCR para evaluar la expresión del gen completo de hGH – V con su propio promotor transfectado en ausencia y presencia de los moduladores, la reacción se llevó a cabo en dos pasos: primero la retrotranscripción y después la reacción en cadena de la polimerasa.

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.

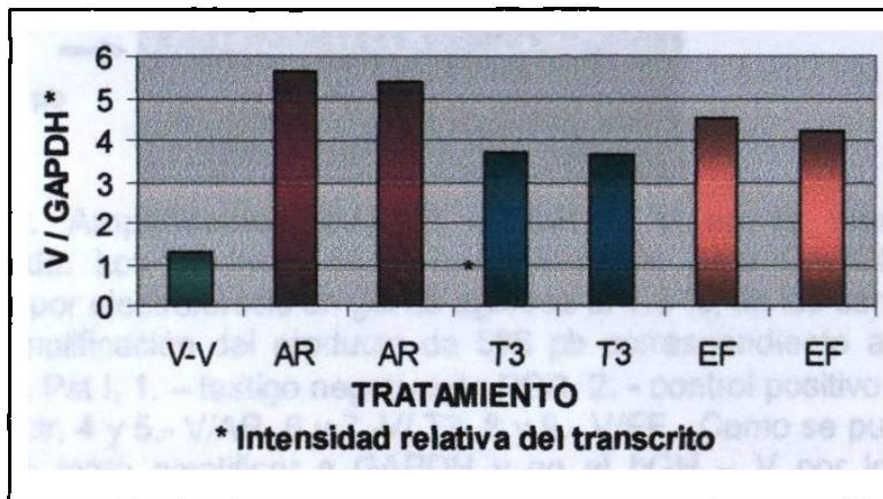
Se observaron en variaciones en la intensidad de la banda de los productos amplificados de hGH – V provenientes de las muestras a las que se le adicionaron moduladores, mientras que la intensidad de la banda correspondiente al gen de GAPDH se mantenía constante. (Figura 10).



**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  $\lambda$  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"**

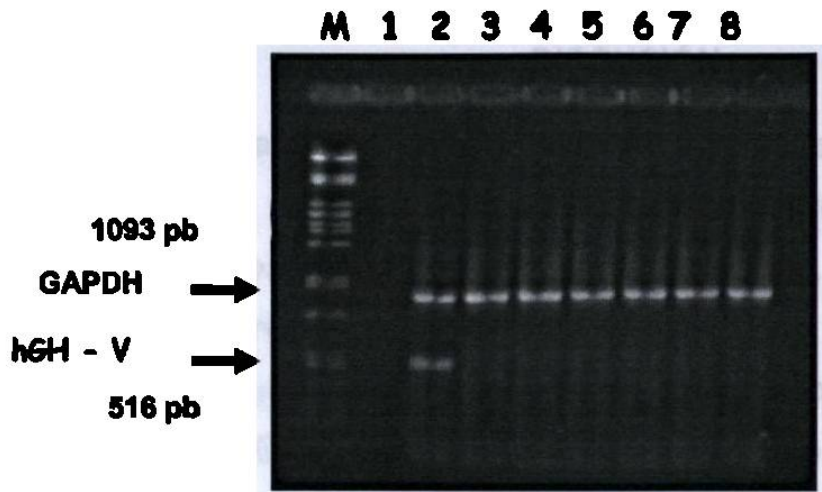
El análisis densitométrico realizado al gel se muestra en la figura 11, donde se puede observar las variaciones de intensidad de respuesta de los productos amplificados a los moduladores.



**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.

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 producto 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  $\lambda$  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  $\beta$  - 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  $\beta$  - 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  $\beta$  - 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  $\beta$  - 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 observo un aumento en los niveles de la proteína de  $\beta$  - 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  $\beta$  - 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 $\alpha$  y TR $\beta$  (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  $\beta$  - 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  $\beta$  - 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  $\beta$  – galactosidasa como en el RT – PCR se debían a la acción de los moduladores sobre los promotores ensayados (hGH – V y hGH – 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.

## **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 logro 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.

## 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  $\beta$  – 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; Anantharamaiah, 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 vultured 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 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 potencial of transfected human placental lactogen genes. *Nucleic Acids Res*; 18 : 16, 4665 – 4670.

Richards, RG; Hartman, SM; Handwerger, 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). Retinoic 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



