



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

"I Z T A C A L A"

EFFECTOS DE LA NORETISTERONA Y DE SUS METABOLITOS 5 α -
DIHIDRONORETISTERONA Y 3 β , 5 α , TETRAHIDRONORETISTERONA SOBRE LA
EXPRESION DEL GENE DE UTEROCLOBINA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A N :
ANA MARIA PASAPERA LIMON
RUBEN GUTIERREZ SAGAL

MEXICO, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A nuestras Familias ...

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Bioquímica Hormonal del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y del Dr. Gregorio Pérez Palacios.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y al Dr. Gregorio Pérez Palacios por su asesoramiento y sus valiosos comentarios que contribuyeron a mejorar el presente trabajo así como por las facilidades otorgadas para la realización del mismo.

Al Dr. Edwin Milgron por el estándar de UTG, por el anticuerpo anti-UTG y por el plásmido pUG12 gentilmente donados.

Al Dr. Gustavo A. García de la Mora por la síntesis de los metabolitos reducidos de la NET empleados en este trabajo.

Al Dr. Guillermo Alfaro y colaboradores por su valioso asesoramiento en las técnicas de hibridación molecular.

Al Dr. Vicente Díaz por su asesoramiento para la obtención del segundo anticuerpo.

Al CONACYT por la Beca Tesis (No. Reg. 53916) otorgada a Rubén Gutz. Sagal para la realización del presente estudio.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a la realización de este trabajo.

I N D I C E

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO	v
I. INTRODUCCION	1
1. Antecedentes generales	1
2. La noretisterona	3
2.1 El efecto antigonadotrópico de la NET	4
2.2 Efectos estrogénicos de la NET	6
2.3 Interacción de la NET y sus metabolitos, 5 α -dihidro- NET (5 α -NET) y 3 β ,5 α -NET, con los receptores intracelulares para hormonas esteroides	8
3. La uteroglobina	10
3.1 Antecedentes generales	10
3.2 Estructura y características.....	13
3.3 La regulación endócrina del endometrio	16
3.4 La uteroglobina en otros tejidos	19
3.5 Estructura del gene de uteroglobina.....	21

3.6 La UTG como marcador molecular de acción progestacional	22
4. Evaluación de la acción progestacional de NET y sus metabolitos	25
II. OBJETIVO	26
III. MATERIAL Y METODOS	27
MATERIALES	27
1. Reactivos	27
2. Material radiactivo	30
3. Equipo	30
4. Soluciones	32
5. Animales de experimentación	33
METODOS	34
1. Tratamiento hormonal	34
2. Obtención de los fluidos uterinos	35
3. Obtención del citosol uterino	37

4. RIA de UTG	37
4.1 Características del método	38
4.2 Principio del ensayo	39
4.3 Iodación de la UTG	39
4.3.1 Procedimiento de radio-iodación	43
4.4 Antisueros	44
4.4.1 Suero anti-UTG	44
4.4.2 Suero antigamaglobulinas de cabra	45
4.4.3 Suero normal de cabra	47
4.5 Titulación de la potencia inmunoreactiva del suero anti-UTG	47
4.6 Protocolo del radioinmunoanálisis	48
5. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-DSS	50
5.1 Soluciones utilizadas en la preparación de geles para electroforesis	50
5.2 Preparación de los geles	52

5.3 Preparación de las muestras	54
5.4 Condiciones de electroforesis	55
5.5 Tinción de las proteínas.....	55
6. Método de doble difusión (Ouchterlony)	56
6.1 Secado del gel y tinción de la placa.....	57
7. Cuantificación de proteínas	58
8. Extracción del ARN	61
9. Electroforesis de ARN en geles de agarosa	65
10. Transferencia de ARN a papel de nitrocelulosa	68
11. Transformación de la bacteria <u>Escherichia coli</u> cepa HB-101 con el plásmido pUG12	70
12. Preparación del ADN plasmídico	74
13. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	83
14. Marcaje radiactivo del ADN por mella y reparación ("Nick translation")	88
15. Hibridación molecular	92
16. Tinción del filtro de nitrocelulosa con azul de metileno	95
IV. RESULTADOS	97

V. DISCUSION	109
VI. CONCLUSIONES	117
VII. BIBLIOGRAFIA	118

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO

Å	Angstrom
A.E	Actividad específica
ADNasa	Desoxirribonucleasa I
ADN	Acido desoxirribonucléico
ADNc	Acido desoxirribonucléico complementario
ARNasa	Ribonucleasa A
ARN	Acido ribonucléico
ARNm	Acido ribonucléico mensajero
ARNr	Acido ribonucléico ribosomal
ASB	Albúmina sérica de bovino
Bisacrilamida	N,N'-metilen-bis acrilamida

C.I.	"Colour Index"
Ci	Curie(s)
cpm	Cuentas por minuto
CSS	Citrato de sodio salino
DATD	N,N'Diallyltartardiamida
D.E	Desviación estándar
D.O	Densidad óptica
dpm	Desintegraciones por minuto
dATP	Sal disódica del 2'- desoxiadenosin 5'-trifosfato
dCTP	Sal disódica del 2'- desoxicitidin 5'-trifosfato
dGTP	Sal disódica del 2'- desoxiguanosin 5'-trifosfato
dTTP	Sal disódica del 2'- desoxitimidin 5'-trifosfato
DSS	Dodecil sulfato de sodio
E ₂	17β-estradiol
EDTA	Acido Etilendiamino tetraacético
FSH	Hormona foliculo estimulante
³ H	Tritio

HEPES	Acido N-2- hidroxi-etilpiperacina-N'- 2-etanosulfónico
IgG	Gama inmunoglobulinas
LH	Hormona Luteinizante
M	Molar
mA	Miliamperes
NET	Noretisterona
5 α -NET	5 α -dihidro-noretisterona
3 β ,5 α -NET	3 β ,5 α -tetrahidro- noretisterona
p/v	Peso a volumen
P ₄	Progesterona
PSA	Persulfato de amonio
RIA	Radioinmunoanálisis
rpm	Revoluciones por minuto
S	Unidades Svedberg
TAE	Tampón tris-acetato-EDTA
TE	Tampón tris-EDTA
TEMED	Tetrametil-etilendiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TNT	Tampón para "Nick Translation"

TSP	Tampón salino de fosfatos
UTG	Uteroglobina
V	Voltios
v/v	volumen a volumen
x g	Número de veces la fuerza de la gravedad
\bar{X}	Media aritmética

I. INTRODUCCION

1. Antecedentes generales.

El crecimiento de la población mundial es un fenómeno que preocupa a cada uno de los miembros de esta enorme comunidad porque a medida que la población crece la disponibilidad de espacio y alimento disminuye y por consiguiente se afecta seriamente el nivel de vida del individuo. La población humana ha crecido ininterrumpidamente a lo largo de la historia excepto por algunos frenos naturales como las epidemias, las guerras y las hambrunas. Este fenómeno no ha pasado desapercibido y ya en 1798 Thomas Robert Malthus en su obra Ensayo sobre el principio de la población (1) pone de manifiesto su preocupación y postula una tendencia universal de la población a aumentar en progresión geométrica, a menos que fuera frenada por la disponibilidad de alimentos.

En 1859 la población mundial llegó a mil millones. Tomó entonces sólo 80 años alcanzar el segundo millar de millones en 1930 y unos 30 años más tarde, en 1961, se llegó a tres mil millones. Posteriormente, en únicamente 15 años se alcanzaron cuatro mil millones y se necesitaron de 11 a 12

para alcanzar los cinco mil, en 1987. La población mundial se incrementa día con día en unos 175,000 individuos y de acuerdo con las actuales proyecciones, puede alcanzar los ocho mil millones entre los años 2020 y 2030 (1a).

La investigación biomédica en diferentes disciplinas ha contribuido substancialmente a la solución parcial de este problema al que se enfrenta la humanidad. En efecto, la introducción del concepto de regulación hormonal de la fertilidad fue tan importante que dió lugar al desarrollo de una gran variedad de estrategias anticonceptivas y posteriormente al establecimiento de programas de planificación familiar. Cabe destacar que en el proceso del desarrollo de tecnología anticonceptiva fue fundamental la síntesis química de compuestos esteroides con mayor actividad hormonal (progestacional y estrogénica) que las hormonas naturales y que mostraran una gran potencia biológica cuando se administraran por vía oral. Al contar con progestinas y estrógenos sintéticos se diseñó inicialmente la terapia anticonceptiva hormonal que fue rápidamente seguida de modificaciones y de nuevos métodos, proceso que continúa hasta nuestros días y en los que la medicina reproductiva cuenta con un gran arsenal en términos de terapéutica anticonceptiva.

Las progestinas sintéticas se han clasificado en dos grupos, de acuerdo a su estructura química: las que derivan de la molécula 17α -OH progesterona (vgr: acetato de medroxiprogesterona, acetato de clormadinona) y aquellas que derivan de la 19-nor-testosterona (vgr: noretisterona (NET), noretinodrel, levonorgestrel). Son las progestinas del último grupo las que mayor uso han tenido en las diferentes formulaciones anticonceptivas, y de ellas destaca la NET que fue la primera en ser usada en la clínica y que ha formado parte no sólo de pastillas anticonceptivas (combinadas o como progestina sola) sino que ha sido también utilizada en anticonceptivos inyectables de larga acción (enantato de noretisterona), en dispositivos intrauterinos medicados, en anillos vaginales y en implantes subdérmicos. A pesar de su amplio uso, el mecanismo íntimo de acción de las progestinas sintéticas a nivel celular y molecular no ha sido completamente entendido lo que ha estimulado su estudio en diversos laboratorios.

2. La noretisterona.

La NET, 17α -etinil- 17β -hidroxi-4-estrene-3-ona, es una progestina sintética, con actividad progestacional, derivada de la 19-nor-testosterona (2) que se utiliza ampliamente como

anticonceptivo debido a su capacidad para inhibir la ovulación (3), una acción mediada por la supresión de la liberación cíclica de gonadotropinas en la hipófisis anterior; sin embargo la NET no posee exclusivamente actividad progestacional; ya que en diversos estudios clínicos y experimentales se ha puesto en evidencia que después de su administración se observan efectos adicionales que clásicamente son considerados como de tipo androgénico, estrogénico y glucocorticoide e incluso puede presentar algunos efectos antihormonales (4,5).

2.1 El efecto antigonadotrópico de la NET.

Para ejercer su efecto a nivel de los órganos blanco las hormonas esteroides necesitan de la presencia de receptores intracelulares que permitan la interacción de la hormona con el genoma celular (6). De esta manera los esteroides inducen la síntesis o la inhibición de la síntesis de proteína(s) específicas en las células blanco. Este es un efecto primario de las hormonas esteroides, cuyo mecanismo de acción se ejerce principalmente a nivel genómico (7).

En 1980 se estudió el efecto antigonadotrópico de la NET en mujeres postmenopáusicas y en pacientes con el síndrome de

feminización testicular completa que habían sido sometidos terapéuticamente a la extirpación quirúrgica bilateral de los testículos; con el objeto de definir si el mecanismo a través del cual la NET ejerce su efecto antigonadotrópico era igual o diferente al de la progesterona (P_4) (8,9). El estudio se realizó en mujeres postmenopáusicas debido a que por las características endócrinas que presenta la mujer cuando cesa su función ovárica; esto es, ausencia de función gonadal, gonadotropinas incrementadas y producción extremadamente baja de estrógenos, constituye un modelo experimental adecuado.

Los resultados demostraron que la NET tuvo un efecto significativo en la inhibición de LH y FSH a diferencia de la P_4 , la cual necesita para ejercer su efecto antigonadotrópico la presencia de su receptor; cuya síntesis es regulada directamente por estrógenos (10). Estos resultados indicaron que la NET no requiere la presencia del receptor de P_4 para ejercer su efecto y por lo tanto que su mecanismo de acción es completamente distinto al de la P_4 .

En los pacientes castrados con el síndrome de feminización testicular completa se combina la ausencia del receptor de andrógenos (debido a una mutación en el gene ubicado en el cromosoma X que regula la síntesis del receptor

de andrógenos) y del receptor estrógeno-regulado de P₄ (inducida por la castración) en la unidad hipotálamo-hipófisis. Los resultados de este estudio demostraron que la NET indujo una inhibición significativa de la función gonadotrópica en estos pacientes, lo cual sugiere que la NET puede utilizar en ciertas condiciones al receptor intracelular de estrógenos para mediar sus acciones.

2.2 Efectos estrogénicos de la NET.

La NET es incapaz de unirse al receptor de estrógenos (11); sin embargo uno de sus metabolitos reducido en el anillo A que resulta de su biotransformación en los órganos blanco (12), el 3 β ,5 α -tetrahidro-NET (3 β ,5 α -NET), interactúa con el receptor de estrógenos con alta afinidad, esta interacción puede ser evitada totalmente administrando tamoxifén (un potente antiestrógeno); estos hallazgos explican que el efecto inhibitor de las gonadotropinas en las mujeres postmenopáusicas y en los pacientes castrados con el síndrome de feminización testicular completa inducido por la NET es ejercido por uno de sus metabolitos reducidos en los carbonos 3 y 5 del anillo A de la molécula (3 β ,5 α -NET) vía el receptor de estrógenos.

La actividad estrogénica del $3\beta,5\alpha$ -NET (compuesto no fenólico y no aromatizable) también ha sido confirmada al demostrar que es capaz de adelantar la pubertad en ratas (apertura vaginal y ciclicidad reproductiva), de la misma manera que lo hace el estradiol (E_2) (13). Esta misma actividad biológica también fue evaluada por la capacidad del $3\beta,5\alpha$ -NET para inducir la síntesis del receptor de P_4 ; la cual es regulada directamente por la acción de estrógenos en la hipófisis anterior de ratas adultas ovariectomizadas. Los resultados demostraron que este compuesto derivado de la NET es capaz de inducir la síntesis del receptor de P_4 ; lo cual correlaciona positivamente con la alta afinidad del $3\beta,5\alpha$ -NET por el receptor de estrógenos (14,15).

Los resultados de estos estudios experimentales in vitro e in vivo enfatizan la importancia del metabolismo de una progestina sintética, en este caso la NET, ya que realmente modula su mecanismo de acción. Es por lo tanto evidente que la demostración de que la NET es enzimáticamente convertida a diferentes metabolitos reducidos a nivel de los órganos blanco fue muy relevante para entender su modo de acción.

2.3 Interacción de la NET y sus metabolitos, 5 α -dihidro- NET (5 α -NET) y 3 β ,5 α -NET, con los receptores intracelulares para hormonas esteroides.

Al evaluar la capacidad de unión de la NET y sus metabolitos con el receptor de P₄ se demostró que la NET y 5 α -NET eran capaces de unirse a este receptor citosólico con afinidades diferentes, siendo mayor para la NET que para la 5 α -NET; mientras el 3 β ,5 α -NET no interacciona en forma significativa con el receptor de P₄. Estos resultados se obtuvieron por análisis de desplazamiento utilizando receptores citosólicos para P₄ de úteros de ratas adultas ovariectomizadas y tratadas con E₂ y empleando como radioligando la progestina sintética ORG-2058 marcada radiactivamente con ³H.

Por otra parte la evaluación de la interacción con el receptor de andrógenos reveló que la 5 α -NET, fue el competidor más potente por el sitio activo del receptor de andrógenos y que la NET también interactúa con este receptor, aunque con menor potencia, mientras que el 3 β ,5 α -NET fue totalmente ineficaz. Los resultados se obtuvieron por análisis de desplazamiento de receptores citosólicos para andrógenos obtenidos de próstatas ventrales de ratas machos

castrados, utilizando como radioligando al andrógeno sintético metiltrienolona-³H.

Unicamente el 3 β ,5 α -NET fue capaz de competir por el receptor de E₂, siendo la NET y la 5 α -NET completamente inefectivos a juzgar por los resultados del análisis de desplazamiento de E₂-³H unido a los receptores citosólicos de E₂ de úteros de ratas prepúberes.

Estos resultados demuestran que la potencia competitiva de la NET y de sus metabolitos por los sitios de unión a los receptores de hormonas esteroides en el citoplasma celular es diferente, no sólo para cada receptor, sino también para cada compuesto en particular. En resumen, se puede establecer que las modificaciones estructurales (mediadas enzimáticamente) en el anillo A de la molécula de NET modulan y orientan su unión específica con los receptores intracelulares de hormonas esteroides en sus órganos blanco y por consiguiente la expresión de su actividad biológica (11).

3. La uteroglobina.

3.1 Antecedentes generales.

A pesar de que los estudios de las secreciones uterinas datan de 1827, la identificación de los componentes específicos en el endometrio sólo fue posible con el desarrollo e introducción de métodos altamente resolutivos para la separación de macromoléculas (16); de esta manera la electroforesis en gel de poliacrilamida y la inmunolectroforesis hicieron posible distinguir las proteínas del plasma sanguíneo, presentes por trasudación de las proteínas realmente secretadas por el útero. Los numerosos estudios en varias especies animales han demostrado que la composición protéica de la secreción uterina varía con la edad de una manera específica y está influenciada por la relación de la concentración en el suero de estrógenos y P_4 . El endometrio de la coneja es uno de los sistemas más convenientes para estudiar este tipo de eventos ya que la uteroglobina (UTG) (17) o blastocinina (18), representa del 40 al 60% de las proteínas totales del fluido uterino, cuando alcanza su máxima concentración, esto es en el quinto día de la gestación. Esta proteína es secretada únicamente entre el primero y el doceavo día del embarazo y después desaparece

totalmente durante el resto de la gestación, a pesar de que la concentración hormonal incrementa continuamente.

Además de la UTG se han descrito otros componentes proteínicos en el fluido uterino; pero no han sido estudiados tan ampliamente (19,20). Inicialmente se postuló que la UTG era una proteína regulada exclusivamente por P_4 ; sin embargo estudios recientes han demostrado que el E_2 tiene efectos específicos sobre la síntesis de UTG y su ARN mensajero (ARNm) (21), y se ha informado de la presencia de una proteína idéntica a la UTG en otros tejidos de la coneja incluyendo: el oviducto (22,23), el blastocisto (17) y el pulmón (24-26) donde su síntesis se expresa en forma constitutiva. Algunos investigadores han propuesto que la UTG uterina ejerce un efecto estimulador sobre el blastocisto además de un retardo en la implantación del blastocisto (17,27,28), de ahí que también se le conozca como blastocinina. Los mecanismos que han sido propuestos para explicar el modo de acción de la UTG van desde la inhibición de proteasas hasta el entrecruzamiento con los antígenos de superficie de histocompatibilidad del blastocisto para prevenir el rechazo por los linfocitos maternos (29,30). La presencia de UTG también ha sido demostrada en el fluido seminal del conejo, por lo que no es un componente exclusivo de un determinado

sexo (24,31). Otra característica interesante que presenta la UTG es su capacidad para unir P_4 (32,33); sin embargo a diferencia del receptor intracelular de P_4 , la UTG tiene una afinidad mínima para interaccionar con las progestinas sintéticas. Otras hormonas esteroides, como el cortisol, la testosterona y los estrógenos, prácticamente no muestran afinidad por la UTG; aunque la UTG interacciona con el dietilestilbestrol (un estrógeno sintético) ligeramente mejor que con las progestinas sintéticas (33).

La capacidad de la UTG de unir su propio regulador (la P_4) ha sugerido que su modo de acción podría ser a través de modular la actividad de P_4 (disminuyendo su concentración) y su transporte dentro del blastocisto. Para mantener el embarazo son necesarias altas concentraciones de P_4 en el útero; sin embargo, estas cantidades de hormona pueden ser perjudiciales para el blastocisto, y en consecuencia la UTG podría secuestrar una fracción de la P_4 endo-uterina.

La presencia de UTG uterina no ha sido informada en otros mamíferos ajenos al orden Lagomorpha (34). Algunas investigaciones recientes han demostrado una proteína de características inmunológicas y electroforéticas similares a

la UTG en el humano; pero esta proteína aún no ha sido claramente identificada (35-38).

3.2 Estructura y características.

La UTG en el conejo ha sido purificada a homogeneidad a partir de lavados uterinos de conejas gestantes o de animales tratados con P_4 (33). La molécula de UTG está compuesta de dos subunidades de 70 aminoácidos, cada una con un peso molecular de aproximadamente 8,000 daltones. La secuencia de aminoácidos de la proteína ha sido establecida y se ha demostrado que las subunidades están unidas por dos puentes disulfuro y otras uniones no covalentes (39).

La UTG interacciona con la P_4 con una constante de disociación (K_d) de 4×10^{-7} M y con 5α -pregnane-3,20-diona, uno de sus metabolitos, con una afinidad mayor ($K_d = 1.3 \times 10^{-7}$ M). Aunque la afinidad es relativamente baja, esta unión UTG-progesterona es biológicamente relevante debido a la abundancia de la proteína. La molécula de UTG puede existir en dos formas: con los puentes disulfuro reducidos u oxidados; sin embargo únicamente la forma reducida es capaz de unir esteroides (33,40). A nuestro conocimiento la UTG no

está vinculada con actividades tales como el metabolismo de la P₄.

La UTG ha sido cristalizada en varias formas (41,42) y se han realizado estudios de difracción de rayos X. La estructura de una de las formas cristalinas fue establecida a una resolución de 2.2 Å. Los estudios tendientes a identificar la estructura del sitio de unión han revelado la presencia de una cavidad hidrofóbica con las características del sitio de unión a P₄ en el estado oxidado; esto sugiere que el sitio de unión está siempre presente y que la entrada de los esteroides está determinado únicamente en el estado reducido de los puentes disulfuro (43).

El ARNm específico para UTG se ha obtenido y preparado a partir de polisomas de endometrio de conejas en el quinto día de la gestación (44), la fracción de poli (A)⁺ del ARN endometrial se ha traducido en diferentes sistemas in vitro (44-46) y los productos de la síntesis de ese mensaje se han a su vez inmunoprecipitado utilizando un anticuerpo específico anti-UTG de conejo preparado en cabra. Cuando el material inmunoprecipitado se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes se demostró la presencia de una única cadena de aminoácidos

(P.M. 10,000 daltones) más grande que la subunidad madura de la UTG. Este péptido se ha identificado como preuteroglobina (44,47-49) la cual contiene una extensión de 21 aminoácidos N-terminales.

Al analizar la secuencia de aminoácidos de esta señal peptídica se encontraron las características usuales, esto es un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, siendo la metionina el aminoácido inicial y una transición alanina-glicina de la señal peptídica a la proteína secretada.

El ARNm de UTG purificado tiene un coeficiente de sedimentación de 8.5 S en gradientes de sacarosa y su peso molecular es de aproximadamente 200,000 daltones, determinado en electroforesis de poliacrilamida en formamida al 99%. Este ARN contiene aproximadamente 600 nucleótidos, de los cuales solamente 273 son necesarios para codificar los 91 aminoácidos de una de las subunidades de la preuteroglobina.

Se ha podido además sintetizar el ADN complementario al ARNm de UTG (50,51), el cual hibridiza con el ARNm puro con una $Rot_{1/2}$ de 6×10^{-4} y ha sido ampliamente usado para estudios de regulación y clonación molecular en bacterias, utilizando el plásmido pBR322.

3.3 La regulación endócrina del endometrio.

Para evaluar los factores hormonales que regulan la función endometrial se han utilizado, conejas inmaduras en condiciones similares a las utilizadas en las pruebas clásicas de Clauberg (51a). Inicialmente se realizaron algunos experimentos con el fin de determinar las condiciones óptimas en las cuales se obtiene la máxima inducción de UTG. Es interesante señalar que en otros sistemas bien estudiados, en aves, tales como la inducción de las proteínas de la clara del huevo o la vitelogenina por estrógenos, un estímulo primario produce una respuesta mínima en las proteínas específicas. Para explicar este efecto primario, se ha propuesto que la estimulación primaria induce una diferenciación celular y una segunda estimulación actúa sobre las células recién desarrolladas las cuales responden sintetizando proteínas específicas; sin embargo, esta explicación ha sido criticada recientemente en el caso de las proteínas de la clara del huevo en el oviducto del pollo (52). Una explicación similar fue sugerida para la UTG en el endometrio ya que se demostró que una inyección de P_4 sola o después de un tratamiento previo con estrógenos, incrementa discretamente la síntesis de UTG y de su ARNm; mientras que una segunda inyección de P_4 induce un incremento notable de

este efecto. Sin embargo, este hallazgo es debido a un incremento en el número de células en el endometrio provocado por la inyección de P_4 ; ya que si la síntesis de UTG y su ARNm se relacionan con el contenido de ADN del endometrio, la estimulación primaria y secundaria con P_4 (con o sin tratamiento previo de estrógenos) produce respuestas similares. Estos experimentos demuestran, por lo tanto, que no es necesaria una diferenciación celular y que es posible estudiar la acción de la P_4 en el endometrio de las conejas prepúberes sin un tratamiento hormonal previo (43,44).

También se creyó de interés evaluar si la inducción de UTG y su ARNm podrían ser un efecto primario de la P_4 , ya que ha sido propuesto que la acción de las hormonas esteroides sobre la síntesis de ARNs puede ser una acción primaria del complejo hormona-receptor sobre el genoma o un efecto secundario a través de la síntesis de proteínas reguladoras, las cuales actuarían a nivel genómico activando la transcripción de genes específicos; este segundo mecanismo implicaría cierta disminución en la respuesta hormonal. Este problema fue estudiado analizando las concentraciones de ARNm de UTG, a intervalos de tiempo cortos después de la inyección de P_4 . Los resultados indicaron que dos horas después de la administración de la hormona, el ARNm de UTG se ha

incrementado en un 70% y después de cuatro horas cerca de 500% (21). Administrando cicloheximida (100 mg) simultáneamente con P₄ (5 mg) se disminuyó la respuesta a P₄ pero no se suprimió su efecto. Se podría por lo tanto sugerir un efecto postranscripcional de la P₄ apoyado además por el sorprendente hallazgo observado entre las concentraciones de UTG y su ARNm en el endometrio; el nivel de ARNm estuvo incrementado hasta el sexto día del tratamiento hormonal; sin embargo los niveles de proteína incrementaron tres veces más de lo que había incrementado el ARNm. Cuando se administra E₂ solo, no se duplica este efecto y a dosis altas de E₂ con P₄ se inhibe la amplificación del efecto postranscripcional. El nivel al cual esa estimulación se lleva a cabo es aún desconocido (53). El E₂ estimula la síntesis del ARNm de UTG, pero el incremento en la síntesis de UTG es mucho menor (21). Otros investigadores han informado que el E₂ inhibe el efecto estimulador de la P₄ sobre la síntesis de ARNm de UTG en el endometrio de animales maduros. Esta discrepancia entre los resultados pueden ser atribuidos a las diferencias en los procedimientos experimentales utilizados tales como el uso de animales adultos en lugar de animales prepúberes y por no correlacionar los resultados con el número de células en las muestras biológicas a través de cuantificar el contenido de ADN (21,54-56). Usando núcleos purificados de endometrio,

Kumar y Bullock (57) pudieron demostrar que la transcripción del gene de UTG se encuentra en un estado estacionario en los primeros días de la gestación (0-5) a pesar del continuo incremento de las concentraciones hormonales.

También se ha estudiado el efecto de otros factores (no hormonales) sobre la síntesis de UTG y sobre el contenido total de esta proteína en el fluido uterino. La carencia de luz parece amplificar la producción de la proteína, la deficiencia de proteínas en la dieta la disminuye, mientras que la edad parece que no tiene un efecto significativo (58).

3.4 La uteroglobina en otros tejidos.

La presencia de proteínas inmunoreactivas similares a la UTG ha sido informada en varios tejidos de la coneja, incluyendo las estructuras ductales y los tractos respiratorio y digestivo de ambos sexos. Aparentemente, la función de la UTG tiene un alcance más amplio que en la fase temprana de la gestación. En el oviducto el E_2 tiene un efecto moderado y limitado sobre la síntesis de UTG, mientras que la P_4 es totalmente ineficaz. La ovariectomía suprime la UTG tanto en el fluido oviductal como en el fluido uterino (22).

Mientras que la UTG en el tracto digestivo no ha recibido mucha atención; en el pulmón existe mucha información experimental (24-26,59,60). La UTG pulmonar es una proteína secretada al fluido traqueo-bronquial de una manera muy similar a la situación uterina. La similitud entre la UTG uterina y la pulmonar ha sido confirmada a través de una variedad de procedimientos fisicoquímicos e inmunológicos. El análisis en gradientes de sacarosa del ARNm de la UTG de origen pulmonar, así como la cinética de hibridación y la estabilidad térmica de los híbridos entre el ADNc de UTG uterina y el ARNm de UTG encontrado en el pulmón demuestran que ambos mensajeros son indistinguibles tanto en tamaño como en secuencia (26). Esta observación fue confirmada posteriormente por análisis de mapeo con nucleasa S1, el cual indicó que el inicio de transcripción es idéntico para ambas moléculas. La producción de UTG en el pulmón por las células epiteliales bronquiales es constante e insensible al estímulo con E₂ o a la P₄. La dexametasona, por el contrario, parece tener un efecto postranscripcional pues incrementa tres veces el nivel de la proteína en conejas prepúberes pero no modifica el nivel de su ARNm. El cortisol tiene un efecto similar pero mucho más débil (26). Algunos resultados algo diferentes en donde la dexametasona estimula el ARNm de UTG en paralelo con la proteína han sido

informados por Lombardero y Nieto, pero esto pudo ser debido a diferencias experimentales (61). En efecto, estos investigadores usaron animales sexualmente maduros en lugar de animales prepúberes y las estrategias de estimulación hormonal también fueron diferentes. La concentración de UTG en el pulmón varía durante el ciclo biológico del conejo; así después de la pubertad ocurre un incremento de dos veces en relación a las condiciones basales; y se ha sugerido que el control de la maduración del pulmón por glucocorticoides es responsable de este incremento. Aunque el tejido pulmonar metaboliza P_4 y contiene receptores intracelulares para ésta hormona (26,53), la función de la UTG en el pulmón es desconocida, como lo es en el endometrio.

3.5 Estructura del gene de uteroglobina.

El estudio del gene de la UTG ha sido realizado en varios laboratorios (50,51,62-65). Los resultados de estos estudios han permitido establecer que hay una copia del gene por genoma haploide, que el gene tiene tres kilobases de longitud y contiene tres exones y dos intrones los cuales pueden reflejar dominios estructurales en la proteína. Los límites de los intrones siguen la regla GT...AG. El gene contiene una señal canónica de poliadenilación, AATAAA, pero

la caja Goldberg-Hogness es bastante rara, puesto que se encuentra una secuencia AAATACAAAAA en las posiciones -33 a -24; además de que han encontrado otras secuencias, en donde A/T es muy abundante, alrededor de las posiciones -95 y -130.

La secuencia 5' no codificante del gene de UTG exhibe complementariedad con el ARN ribosomal 18 S (64). Algunas estructuras repetidas y palindrómicas se han encontrado en toda la terminal 5' del gene más allá del origen de transcripción, pero aún no pueden ser relacionadas con alguna función definida. La transcripción del gene de UTG ha sido, estudiada con análisis de "Northern blot" el cual ha revelado la existencia de cuatro especies de ARN, que corresponden al producto de la transcripción completa después de la poliadenilación (3.2 Kb), parcialmente maduros (2.9 y 1 Kb) y al mensajero maduro (0.6 Kb) el cual contiene 465 nucleótidos transcritos más la señal poli (A) (63).

3.6 La UTG como marcador molecular de acción progestacional.

Los métodos biológicos de Clauberg (51a) y McGinty (66) han sido los más ampliamente utilizados para estudiar y cuantificar el efecto de P₄ y progestinas. Estos métodos

utilizan las modificaciones histológicas que aparecen en el endometrio de conejas prepúberes después de la administración de hormonas esteroides, obteniéndose información de tipo cualitativo y semicuantitativo; sin embargo para entender los mecanismos celulares y moleculares que sirven de base a estos cambios, es necesario evaluar el efecto de esos esteroides sobre una proteína específica, hormono-regulada, y su ARNm. Un modelo experimental adecuado para estos estudios es la UTG (67-69), debido a que es posible determinar, con técnicas de hibridación molecular, su ARNm inducido por el tratamiento hormonal y la proteína misma.

A pesar de que la UTG se identificó en estudios realizados hace más de 15 años no ha sido sino hasta esta última década cuando se le ha empleado como un modelo experimental para evaluar la acción de la P_4 y de progestinas sintéticas en el endometrio de la coneja.

La UTG representa un modelo experimental muy completo para estudiar la regulación diferencial de la expresión génica ejercida por las hormonas esteroides debido a varias razones:

a) La UTG es una proteína que se sintetiza en muy altas concentraciones teniendo un estadio de máxima producción entre el 4° y 6° días de la gestación, cuando se produce cerca de un mg diario de proteína (70), lo que representa del 30 al 40% de todas las proteínas uterinas secretadas (71-75); sin embargo Bullock (76) ha informado que la máxima inducción de UTG ocurre entre el 4° y el 5° día de la gestación, (evaluada por radioinmunoanálisis) es del 22%.

b) La tasa de síntesis uterina de UTG está determinada principalmente por el contenido celular de su ARNm (21,44,50,51,54,74-80) lo cual permite el estudio de la regulación del ARNm específico por efecto de la estimulación con progestinas, por lo menos en el útero de la coneja.

c) La síntesis uterina de UTG ocurre bajo un control hormonal mediado a través de diferentes receptores a hormonas esteroides (80), por lo tanto ofrece una excelente oportunidad para investigar los mecanismos moleculares de la interacción hormonal (especialmente aquellas con el E₂ y la P₄) que resultan en la expresión de un producto génico definido.

d) La inducción in vivo de la síntesis de UTG ocurre en un periodo de tiempo relativamente corto aún durante la inducción primaria (59,78,81), lo cual provee de un buen modelo para realizar estudios donde los cambios en las concentraciones de los receptores de esteroides están relacionados con la expresión de un gene específico.

4. Evaluación de la acción progestacional de NET y sus metabolitos.

La demostración de que verdaderamente la NET se biotransforma en derivados reducidos en el anillo A y la posibilidad de que estos compuestos sean los responsables de los múltiples efectos hormonales, nos condujeron a realizar una serie de experimentos que nos permitirían conocer la potencia progestacional de cada uno de estos compuestos, la cual sería evaluada por su capacidad para inducir la síntesis de UTG en el endometrio de la coneja. De esta manera se puede tener un mejor entendimiento del mecanismo de acción de la NET y de sus metabolitos puesto que se puede detectar su efecto en la inducción de ARNm específicos así como la síntesis de la proteína misma; complementando los resultados que demuestran la interacción de estos esteroides con el receptor citosólico para P₄.

II. OBJETIVO

Evaluar el mecanismo de acción progestacional, a nivel molecular, de la NET y de sus metabolitos reducidos, 5α -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET, en el endometrio de la coneja, por su capacidad para regular la síntesis de uteroglobina y de su ARNm.

III. MATERIAL Y METODOS

MATERIALES

1. Reactivos.

Los siguientes reactivos se adquirieron comercialmente de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO): cloruro de cesio (CsCl) (C-3032), ribonucleasa A (ARNasa), tipo I-A (R-4875), nuevo azul de metileno (azul básico 24, sal doble cloruro de zinc, C.I. 52030) (B-4635), agarosa tipo II (A-6877), glicina (G-7126), tris (hidroximetil) aminometano (TRIZMA base) (T-1503), tris-HCl (T-3253), dodecil sulfato de sodio (DSS sal disódica) (L-4509), ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) (H-3375), azul brillante de coomasie G (B-1131), adyuvante completo de Freund (F-4258), albúmina sérica de bovino (ASB) (Fracción V) (A-4503), ASB libre de ADNasas y proteasas (B-2518), SIGMACOTE (líquido para siliconizar) (SL-2), glicerol (G-7757), aceite de ajonjolí (S-7131), progesterona (P₄) (P-0130), noretisterona (NET) (N-4128), estradiol (E₂) (E-8875), lactoperoxidasa liofilizada (L-2130), resina quelante (C-7901), bromuro de etidio (E-8751), cloruro de magnesio (MgCl₂) (M-8266), sacarosa (S-9378), desoxirribonucleasa I (ADNasa), tipo II-S (D-4513),

sephadex G-50 (G-50-300), formamida (F-7503), azul de bromofenol (B-6131), acetato de amonio (A-7262), sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (A-4915), polivinilpirrolidona (PVP-360), ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica, (EDTA) (ED-255), cloruro de litio (LiCl) (L-0505) y aprotinina (A-4529).

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA): acrilamida (161-0101), bisacrilamida (161-0201), azul de bromofenol (161-0404), TEMED (161-0801), DATD (161-0620), persulfato de amonio (PSA) (161-0700), azul brillante de coomasie R-250 (azul brillante R, C.I. 42660) (161-0400), marcadores proteínicos de bajo peso molecular (161-0304) y β -mercaptoetanol (161-0710).

El sephadex G-25 (17-0032-02), la agarosa A (17-0422-02), el ficoll 400 (17-0400-02), la sal disódica del 2'-desoxiadenosin 5'-trifosfato (dATP) (27-1850-02), la sal disódica del 2'-desoxiguanosin 5'-trifosfato (dGTP) (27-1870-02), la sal disódica del 2'-desoxitimidin 5'-trifosfato (dTTP) (27-1880-02), la sal disódica del 2'-desoxicitocin 5'-trifosfato (dCTP) (27-1860-02), la endodeoxiribonucleasa Pst I (27-0886-03) y la ADN polimerasa I (27-0928-01), se compraron a Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia).

El fenol líquido Q.P. (2864), el hidróxido de sodio (NaOH) (3722), el cloruro de sodio (NaCl) (3624), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (2186), el alcohol isoamílico (9038), el ácido acético (9507), el etanol absoluto (9000-60), el citrato de sodio (3646), el ácido fosfórico (0260-62), el fosfato de sodio monobásico (3818), el fosfato de sodio dibásico (3828), el acetato de sodio (3460), el 1-butanol (9054), el ácido clorhídrico (HCl) (9535-62), el formaldehído (2106) y el bicarbonato de sodio (NaHCO₃) (3506) se adquirieron de J. T. Baker de México; mientras que el metanol (6009), la 8-hidroxiquinolina (7098) y el cloroformo (1/15854) se obtuvieron de Merck de México.

La triptona grado bacteriológico (0123-01), el extracto de levaduras grado bacteriológico (0127-01) y el agar grado bacteriológico (0140-01) se adquirieron de Difco Laboratories (Detroit, Michigan) y la tetraciclina HCl y el cloranfenicol de Bristol Laboratories (Syracuse, N. Y.).

El cloruro de calcio (CaCl₂) (1511) se obtuvo de Baker & Adamson (Morristown, N. J.); mientras que el tiocianato de guanidina (11049) se adquirió de Bathesda Research Laboratories (Gaithersburg, MD).

La 5 α -NET y la 3 β ,5 α -NET fueron sintetizadas a partir de la NET en la Facultad de Química de la UNAM por el Dr. G. A. García; los detalles metodológicos están publicados en (14).

2. Material radiactivo.

La sal trimetilamonio del desoxiadenosin 5'-[α -³²P]trifosfato, [α -³²P]dATP (A.E. 3,000 Ci/mmol) (PB.10204) y el Na¹²⁵I en NaOH 1N (IMS.30); se adquirieron de Amersham International plc. (Amersham Buckinghamshire, Inglaterra).

3. Equipo.

A lo largo del estudio se usaron las siguientes centrifugas: centrifuga refrigerada modelo J-6B de baja velocidad (rotor: JS-4.2), centrifuga refrigerada modelo J2-21 de alta velocidad (rotores: JS-7.5, JS-13 y JA-10) y ultracentrifuga modelo L5-50B (rotor: SW 50.1) de Beckman instruments (Palo Alto, CA); microcentrifuga eppendorf modelo 5414. Los tubos para ultracentrifugación (5 ml) fueron de Sorvall Instruments DUPONT (03127) (Wilmington, DE).

Para el procedimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida se usó el equipo en placa vertical Mini-

protean II Cell, No. 165-2940 y el secador compacto de geles en placa modelo 224 de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA). La cámara para electroforesis en geles de agarosa fue construida en el propio laboratorio de acuerdo con el diseño de Maniatis et al. (82).

El equipo y las soluciones que así lo requirieron se esterilizaron en el siguiente equipo: esterilizador de precisión All American de Wisconsin Aluminum Foundry Co. Inc. (Manitowoc, Wis.); o se filtraron con un porta filtros (swinnex) de 13 mm (SX0001300) o de 25 mm (SX0002500) de diámetro y filtros de 0.45 μ m de 13 mm (HAWP01300) o de 25 mm (HAWP02500) de diámetro de Millipore Corporation (Bedford, MA). En la electroforesis en gel de poliacrilamida y de agarosa se usó la fuente de poder de corriente constante o voltaje constante, modelo EC-454 de E-C Aparatus Corporation (St. Petersburg, Florida).

Los úteros de conejas se homogeneizaron en un politrón de Brinkmann Instruments (Westbury, N.Y.). El espectrofotómetro modelo DU-6 y la microceldilla de cuarzo (566463) fueron de Beckman Instruments. El liofilizador usado fue de LABCONO Dry-Ice. Para visualizar los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se utilizó un

transiluminador Chromato-Vue modelo TM-36 (UVP, Inc. San Gabriel, CA) La radiactividad se cuantificó en el espectrómetro de centelleo Packard Autogamma modelo 500 de United Technologies Packard. En los radioinmunoanálisis (RIA) se utilizaron micropipetas Oxford Adjustable sampler (7733F-25) y el agitador Maxi Mix I (vortex), tipo 16700 (thermolyne). Para el ajuste de pH de las soluciones se utilizó un potenciómetro Beckman modelo 3550. La película radiosensible usada para las autoradiografías fue Ortho-M (160 8850) (GBX-2) de Kodak Diagnostic Film. Se usó un estuche para exposición de 20.3 x 25.4 cm de Sigma Chemical Company (E9385) para la exposición de la película a los filtros de nitrocelulosa radiactivos. Para secar los filtros de nitrocelulosa después de la transferencia se utilizó un horno con vacío Thelco modelo 19. Los tubos de diálisis utilizados (16 mm de ancho) fueron de Spectrapor Membrane Tubing (A. H. Thomas 3787-D20). Para monitorear la sonda radiactiva se usó un Geiger modelo 425 de Victoreen. El análisis densitométrico se llevó a cabo en un densitómetro Gelman DCD-16.

4. Soluciones.

En la preparación de las soluciones se usó siempre agua

bidestilada y desionizada. Las soluciones usadas para la extracción de ARN se filtraron en filtros Millipore de 0.45 μm y se esterilizaron antes de usarlas.

5. Animales de experimentación.

A lo largo de todo el estudio se usaron conejas de la raza Nueva Zelanda de 1 ± 0.2 Kg de peso corporal (animales prepúberes) y de 2.5 Kg (animales adultos no gestantes); las cuales se criaron en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición y fueron alimentadas ad libitum con un concentrado comercial (conejina^{MR}) hasta finalizar el estudio. Los animales se dividieron en siete grupos:

Grupo I	Controles negativos.
Grupo II	Tratadas con P ₄ .
Grupo III	Tratadas con NET.
Grupo IV	Tratadas con 5 α -NET.
Grupo V	Tratadas con 3 β ,5 α -NET.
Grupo VI	Tratadas con E ₂ .
Grupo VII	Conejas con cinco días de gestación (controles positivos).

En cada grupo (I-VI) se incluyeron cinco conejas de $1 \pm$

0.2 Kg de peso (prepúberes) y en el grupo VII se incluyeron cinco conejas de 2.5 Kg no gestantes.

Para la preparación del segundo anticuerpo se usaron conejos machos de raza Nueva Zelanda de 1.5 a 2.5 Kg de peso los cuales fueron inmunizados con el anticuerpo antiuteroglobina (anti-UTG) siguiendo la metodología descrita posteriormente en este capítulo.

METODOS

1. Tratamiento hormonal.

Los esteroides se disolvieron en aceite de ajonjolí y se inyectaron en la parte dorsal de las conejas (1 ± 0.2 kg), vía subcutánea, durante cinco días consecutivos. El tratamiento y la dosis que recibió cada grupo se especifican en el siguiente cuadro:

<u>Grupo</u>	<u>Tratamiento</u>	<u>Dosis</u>
I	Aceite de _____ 500 μ l de aceite ajonjolí	
II	P ₄ _____ 1.0 mg/Kg de peso en 500 μ l de aceite	
III	NET _____ 1.0 mg/Kg de peso en 500 μ l de aceite	
IV	5 α -NET _____ 1.0 mg/Kg de peso en 500 μ l de aceite	
V	3 β , 5 α -NET _____ 0.5 mg/Kg de peso en 500 μ l de aceite	
VI	E ₂ _____ 10 μ g/Kg de peso en 500 μ l de aceite	
VII	Apareamiento -	-

24 h después de la última inyección los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y desangrados, para evitar la acumulación de sangre en los órganos. Después se hizo la disección y se extrajeron los cuernos uterinos en un cuarto refrigerado a 4° C.

2. Obtención de los fluidos uterinos.

Cada cuerno uterino se lavó con 500 μ l de solución salina estéril (NaCl al 0.9%), el líquido de los lavados (fluidos) para cada grupo se colectó en tubos de centrifuga. El volumen de fluido fue de, aproximadamente, 2.5 ml por tratamiento; los cuales se centrifugaron a 1,500 x g durante

20 min, a 4° C con el objetivo de separar los residuos tisulares del fluido uterino. Los sobrenadantes fueron colectados en viales estériles, etiquetados y posteriormente congelados en nitrógeno líquido o en una mezcla de acetona-hielo seco y se almacenaron a -80° C hasta ser utilizados en los análisis posteriormente descritos.

Los cuernos uterinos se distribuyeron de la siguiente manera: cada par de cuernos uterinos de una coneja, se depositaron en dos viales (cinco cuernos en cada vial por grupo), con el fin de tener de cada grupo una muestra para obtener citosol (cuantificación de UTG por RIA, análisis electroforéticos, doble difusión (Outcherlony) y cuantificación de proteínas) y por otra parte con otra muestra para la extracción del ARN total para ser utilizado en las hibridaciones moleculares con la sonda del ADNc de la UTG.

Las muestras depositadas en los viales fueron etiquetadas, congeladas y almacenadas de la misma manera que se describió para los fluidos uterinos.

3. Obtención del citosol uterino.

Se siguió el método descrito por Walters y Clark (83) con leves modificaciones. Los úteros se disecaron y se fragmentaron en porciones pequeñas; las cuales se homogeneizaron en un tampón salino de fosfatos (TSF) 0.01 M pH 7.6 suplementado con 5 000 U/ml de Aprotinina (inhibidor de proteasas), a 4° C. Los tejidos se homogeneizaron en frío en dos intervalos de cinco segundos a una velocidad de 5,000 rpm en un homogeneizador (politrón), el homogeneizado se transfirió a tubos de polialomero de 12.7 x 50.8 mm y se centrifugó en un rotor SW 50.1 a 105,000 x g a 2-4° C durante 60 min utilizando una ultracentrifuga Beckman modelo L5-50B. El sobrenadante o fracción soluble obtenida se designó como citosol y se empleó para la realización de los estudios de RIA, de doble difusión y de electroforesis para la caracterización de la UTG contenida intracelularmente.

4. RIA de UTG.

Para el desarrollo del RIA de UTG se siguió básicamente el método descrito por Mayol y Longenecker haciendo ligeras modificaciones (84). La cuantificación de UTG por RIA de doble anticuerpo ofrece un grado de sensibilidad mayor que

otras metodologías; esta sensibilidad esta relacionada a los métodos extraordinariamente precisos para la detección de radiactividad; lo cual nos permite determinar cantidades de proteína del orden de 10^{-14} g, aproximadamente 10^{-12} M cuando se usa el isótopo ^{125}I . Otra característica importante es también la especificidad que ofrece el método; ya que el ligando es unido al anticuerpo a un sitio de unión específico, y este sitio de unión tiene una configuración que es complementaria a una área particular en la superficie del ligando. La habilidad del anticuerpo para reconocer la configuración externa es la base para la identificación de un compuesto particular en un fluido biológico.

4.1 Características del método (85).

Para establecer un ensayo de radioligandos existen tres prerequisites:

- a) un anticuerpo disponible que una específicamente la substancia a medir o ligando.
- b) El ligando debe ser marcado con un radionúclido (radioligando).
- c) debe lograrse una separación entre la fracción unida de la no unida.

4.2 Principio del ensayo.

1) El ligando es marcado con un radionúclido para formar el radioligando. Paralelamente el ligando (antígeno) se inyecta en un animal para producir anticuerpos específicos contra el antígeno.

2) La realización del ensayo por radioligando es de tipo competitivo; es decir el radioligando y el anticuerpo son adicionados a la mezcla de incubación. Durante el paso de incubación, los reactivos van al equilibrio y se establece una competencia entre el ligando y el radioligando por un sitio específico del anticuerpo. Después de que el equilibrio ha sido alcanzado, una cantidad relativamente pequeña del radioligando se queda unida a los tubos que originalmente contuvieron una cantidad relativamente alta del ligando. Se agrega un agente que precipite el anticuerpo que en este caso es un segundo anticuerpo dirigido contra el primer anticuerpo.

4.3 Iodación de la UTG.

Se han utilizado varios métodos para marcar las proteínas con isótopos radiactivos del yodo. La cloramina T

es un agente oxidante bastante eficaz para este procedimiento pero tiene el inconveniente de producir modificaciones en la molécula de la proteína. La iodación enzimática por lo contrario es menos severa y permite obtener una actividad específica adecuada para nuestros propósitos. Por lo cual se eligió el método de lactoperoxidasa para el marcaje de la UTG (85).

REACTIVOS:

- TSF: Tampón de fosfato de sodio 0.01 M, NaCl 150 mM, pH 7.6
- Lactoperoxidasa liofilizada con una actividad de 23.5 UI/mg a 30° C. Se diluyó un mg de la enzima en 3 ml de tampón de acetato de sodio 0.2 M a pH 4.8, y posteriormente se repartió en alícuotas de 60 μ l.
- Na¹²⁵I en NaOH 1 N 10 μ l (1 mCi).
- Uteroglobina purificada a partir de fluido uterino de coneja gestante de cinco días. La UTG se distribuyó en alícuotas de 6.5 μ g/ 5 μ l.
- H₂O₂ al 30% diluida (10^{-4} X).

La iodación se llevó a cabo en un tubo eppendorf de 1 ml, introduciendo sucesivamente los siguientes reactivos:

- 5 μ l de UTG (6.5 μ g).
- 30 μ l de lactoperoxidasa.
- 10 μ l de Na¹²⁵I (1 mCi).

Las fracciones correspondientes al área cromatográfica de UTG-¹²⁵I fueron reunidas y repartidas en alícuotas de 2,000,000 de cpm / alícuota, utilizando una alícuota por análisis. La actividad específica de la UTG marcada fue de, aproximadamente, 30 mCi/mg de proteína, la cual se calculó en base a la siguiente fórmula:

$$A.E = \frac{B (D/C)}{A}$$

Donde:

A= μ g de proteína

B= 1 mCi

C= (cpm totales)-(cpm del residuo)

D= cpm del pico de la proteína iodada.

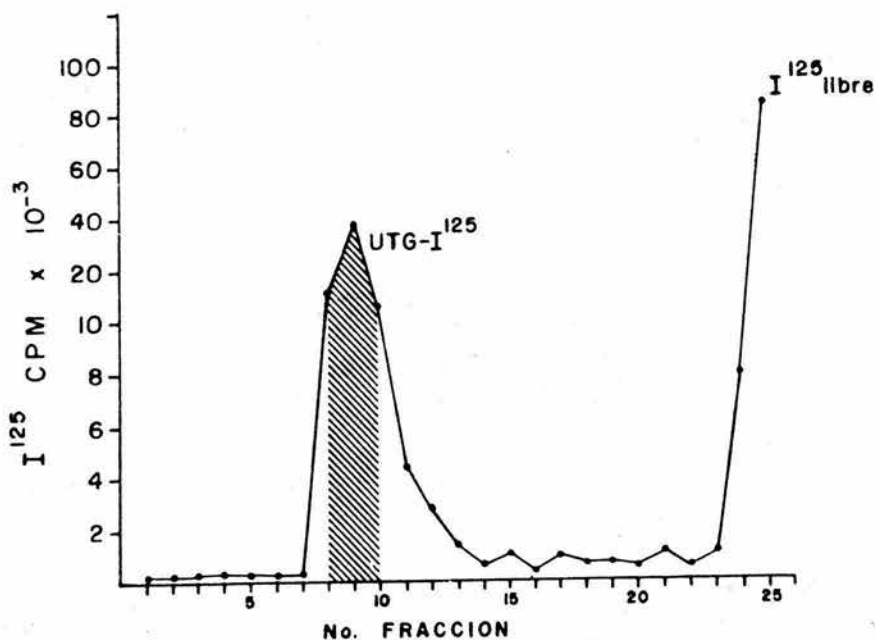


Fig. 1. Separación de la UTG-¹²⁵I en columnas de sephadex G-25. Se marcaron 5 μ g de UTG con ¹²⁵I por el método de lactoperoxidasa. El producto de la reacción se filtró en una columna de sephadex G-25 (TSF 0.01 M, NaCl 150 mM, pH 7.6 suplementado con 3% de ASB) y se tomaron fracciones por minuto en tubos de ensaye (aproximadamente 0.7 ml) y el contenido de radiactividad se determinó en un espectrómetro de radiaciones Γ .

4.3.1 Procedimiento de radio-iodación.

Antes de agregar el H_2O_2 (sustrato enzimático) el tubo se contó en un espectrómetro de radiaciones Γ para determinar la cantidad de radiactividad en el tubo de reacción (con el fin de obtener la actividad específica de la proteína marcada). Posteriormente, se agitó el tubo en un agitador vortex y se agregó 1 μ l de H_2O_2 (tiempo 0) nuevamente se agitó durante 30 segundos (tiempo 2) y se agregó 1 μ l adicional de H_2O_2 bajo agitación continua y después de 90 segundos se agregó otro μ l de H_2O_2 (tiempo 3) y a los 2 min se detuvo la reacción mediante la adición de 400 μ l de TSF a 0° C. La UTG- ^{125}I se separó en una columna de sephadex G-25. La columna utilizada fue de 1.9 x 28 cm; la cual fue empacada el mismo día de la iodación y equilibrada con TSF-ASB al 3%. El tampón de filtración utilizado fue TSF-ASB al 0.3%. Las fracciones correspondientes al área de UTG- ^{125}I (Fig. 1) fueron mezcladas y después se separaron alícuotas en tubos eppendorf de 1 ml (2 millones de cpm/tubo). La actividad específica obtenida fue de 30 μ Ci/ μ g de proteína. Para cada RIA, se tomó una alícuota de UTG marcada y se re-purificó en una columna de sephadex G-25 previamente equilibrada con TSF-ASB al 3%. La UTG- ^{125}I se mantiene estable un mes y medio

aproximadamente, a una temperatura de -20° C conservando sus propiedades inmunoreactivas.

4.4 Antisueros.

4.4.1 Suero anti-UTG.

El suero anti-UTG o primer anticuerpo utilizado en este estudio fue preparado en cabras utilizando UTG purificada del fluido uterino de conejas gestantes y mostró una especificidad muy alta. Su especificidad se analizó en placas de doble difusión y se obtuvo una sola banda de precipitación cuando se analizó contra el fluido uterino de conejas gestantes o un estándar de UTG purificada (Fig. 2).

El antisuero se conservó liofilizado a -20° C y se reconstituyó para su uso con agua bidestilada estéril y posteriormente se centrifugó durante 15 min. El anticuerpo así reconstituido y diluido se conservó durante varias semanas a 4° C sin sufrir alteraciones. El antisuero reconstituido contiene 60 unidades de D.O. a 280 nm sin diluir.



Fig. 2. Especificidad del anticuerpo anti-UTG pura determinada en análisis de doble difusión. En el pozo central de la placa se depositaron 5 μ l de la proteína (5 μ g) y en los pozos periféricos, el anticuerpo en diluciones 1:2. Obsérvese que el antisuero fue capaz de inmunoreaccionar aún a una dilución 1:32 (pozo 6).

4.4.2 Suero antigamaglobulinas de cabra.

El método de doble anticuerpo se utilizó para separar la fracción de UTG- 125 I unida a su anticuerpo de la fracción libre. El segundo anticuerpo fue preparado por la inyección de gamaglobulinas de cabra en un animal aceptor de una especie diferente (conejo). Este antisuero no se diluyó para ser utilizado en el análisis (D.O. 280 nm = 70). El protocolo de inmunización fue el siguiente (86): Se inmunizaron 2 conejos adultos con el anticuerpo anti-UTG (IgG de cabra). Se

disolvieron 1.6 mg de IgG anti-UTG en 1 ml de agua estéril y se tomaron 500 μ l de esta solución y se llevaron a un volumen de 2 ml con adjuvante completo de Freund y se emulsionó utilizando 2 jeringas conectadas por una llave de tres vías pasando la solución de una jeringa a otra, una y otra vez, hasta que se obtuvo una mezcla con una consistencia cremosa. Una vez obtenida la emulsión se procedió a inmunizar a los animales inyectándolos en diversos sitios de la región dorsal utilizando la vía subdérmica de acuerdo al siguiente protocolo:

Semana 0. primera inmunización.

Semana 4. segunda inmunización.

Semana 6. Refuerzo, inyectando únicamente el adjuvante incompleto (sin Bordetella pertussis).

Semana 7. Al finalizar el esquema de inmunización los animales se sangraron a muerte por punción cardiaca. Se obtuvo el suero de la sangre de cada animal en forma individual y se procedió a determinar su potencia inmunológica en placas de doble difusión.

4.4.3 Suero normal de cabra.

En el radioinmunoanálisis de UTG se requiere suero normal de cabra. Este suero se agrega para formar un precipitado más denso junto con los complejos UTG-(anti-UTG) y se le utiliza a una dilución al 2% (v/v) (60 unidades de D.O. a 280 nm).

4.5 Titulación de la potencia inmunoreactiva del suero anti-UTG.

A fin de determinar la zona de reactividad óptima del suero anti-UTG en el RIA, la UTG- ^{125}I fue incubada con diferentes diluciones de suero anti-UTG, en tampón TSF-EDTA 0.05 M-suero normal de cabra 2%. La zona óptima fue aquella en la que se obtuvo una inmunoprecipitación entre el 25 y el 40% de la UTG- ^{125}I y que correspondió a una dilución del antisuero de 1:15,000 (Fig. 3).

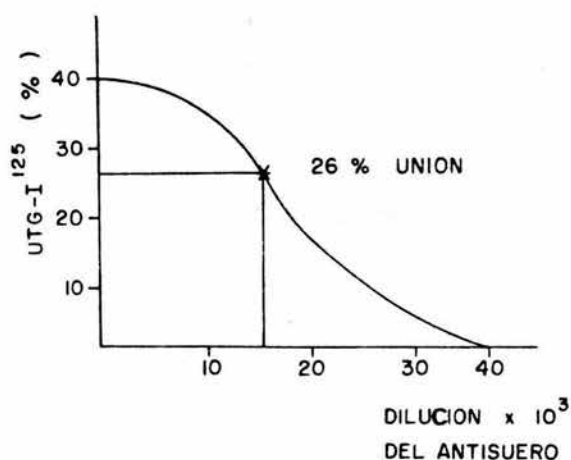


Fig. 3. Titulación de la potencia inmunológica del suero anti-UTG. Se incubaron 10,000 cpm de UTG-¹²⁵I con dosis variables del anticuerpo diluido en TSF-EDTA que contenía 2% de suero normal de cabra. El complejo fue precipitado utilizando un segundo anticuerpo antigamaglobulina de cabra inducido en conejos. La UTG radiactiva inmunoprecipitada está expresada en las ordenadas como porcentaje de la radiactividad total.

4.6 Protocolo del radioinmunoanálisis:

En tubos de vidrio de 10 x 75 mm se adicionaron sucesivamente los siguientes reactivos:

1. 500 μ l de TSF que contiene 1% de ASB y 0.1% de azida de sodio.
2. 100 μ l de UTG (solución estándar o muestra por analizar).
3. 100 μ l de UTG-¹²⁵I (20,000 cpm/tubo) en solución de TSF-ASB 1%.

4. 100 μ l del suero anti-UTG de una dilución ($1/5 \times 10^4$) en tampón TSF-EDTA 0.05 M, que contiene suero normal de cabra al 2%.

Los tubos que contienen todos los reactantes fueron incubados por 48 h a 0° C y posteriormente se les adicionó 50 μ l del segundo anticuerpo no diluido y se agitaron en vortex. Los tubos se incubaron durante 24 horas adicionales a 0° C y la reacción se detuvo agregando 1 ml de TSF 0.01 M a 0° C. Los tubos se centrifugaron a 1,500 x g durante 30 min con excepción de los que contenían únicamente UTG- 125 I (cuentas totales). Se descartó el sobrenadante por decantación y se limpiaron cuidadosamente las paredes de los tubos con un aplicador, evitando tocar el área del fondo del tubo. La radiactividad se cuantificó en un espectrómetro de centelleo para radiaciones Γ . En la figura 4 se muestra una curva estándar típica de un RIA de uteroglobina.

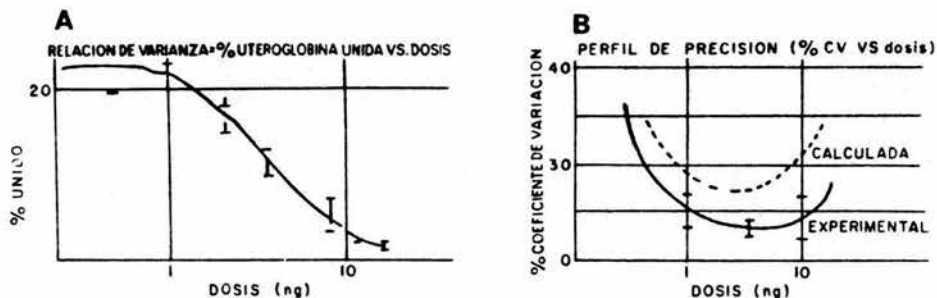


Fig. 4. Curva estándar del radioinmunoanálisis de UTG. A. La UTG compete con la UTG- ^{125}I (10,000 cpm) por el sitio de unión al anticuerpo (0.1 ml de una dilución 1:15,000 en TFS con 2% de suero normal de conejo). Los datos ($\bar{X} \pm \text{D.E.}$) en la curva representan la media de ocho mediciones; la sensibilidad del análisis fue de 1 ng. B. Se presenta el perfil de precisión del análisis donde se obtiene un coeficiente de variación de menos del 10% en la zona óptima de la curva.

5. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-DSS.

Los geles se prepararon de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (87).

5.1 Soluciones utilizadas en la preparación de geles para electroforesis:

1. Tampón inferior (4X):

18.17 g tris

134.4 mg EDTA

4 ml de DSS 10%

Aforar a 100 ml con H₂O

pH 8.8

2. Tampón superior (4X):

6.06 g tris

134.4 mg EDTA

4 ml de DSS 10%

Aforar a 100 ml con H₂O

pH 8.8

3. Acrilamida inferior - DSS:

30 g de acrilamida

0.8 g de metilen bisacrilamida

Aforar a 100 ml con H₂O

4. Acrilamida superior - DSS:

8.5 g de acrilamida

1.5 g DATD

Aforar a 100 ml con H₂O

5. Tampón de aplicación (sol. desnaturalizante):

10 ml de glicerol

5 ml β-mercaptoetanol

50 ml DSS 10%

12.5 ml de tampón superior (4X)

Aforar a 100 ml con H₂O

6. Tampón de electroforesis (4X):

12 g de tris base

57.6 gr de glicina

Aforar a un litro con H₂O

Se prepara el día de la corrida.

(utilizar 1X para la corrida)

7. Tampón superior de electroforesis:

a 400 ml del tampón anterior 1X se le agregan 4 ml de

DSS al 10%

5.2 Preparación de los geles*:

GEL DE RESOLUCION:	12%	10%	
H ₂ O	1.42	1.95	ml
Tampón inferior	1.26	1.26	ml
Acrilamida inferior	2.18	1.75	ml
PSA (10%)	0.016	0.016	ml
TEMED	0.005	0.005	ml

GEL DE CONCENTRACION:

H ₂ O	0.625 ml
Tampón superior	0.625 ml
Acrilamida superior	1.250 ml
PSA (10%)	0.012 ml
TEMED	0.002 ml

* Para placas de 10 x 12 cm x 0.7 mm.

Las soluciones del gel de resolución (inferior) se mezclan en un matraz Kitasato a excepción del persulfato de amonio (PSA) y el TEMED. Posteriormente, se degasifica la solución al vacío, agitando con suavidad y se agrega el PSA y el TEMED. La solución se deposita cuidadosamente en la cámara previamente preparada con las placas. Posteriormente, se añade 1-butanol saturado con agua en la parte superior del gel para homogeneizar su superficie. Al polimerizar el gel resolvidor (aprox. de 20-30 min), se retira la solución de 1-butanol saturado y se lava perfectamente bien con agua bidestilada, el residuo del agua se seca con papel Whatman No. 3 MM. (Durante el proceso de polimerización del gel resolvidor se procede a preparar simultáneamente la solución del gel concentrador de la misma manera que el primero).

La solución del gel de concentración (gel superior) se deposita sobre el primer gel ya polimerizado; para formar los carriles se coloca en el gel superior un instrumento dentado de teflón (peine) del tamaño deseado, y se espera a que polimerice, retirándolo una vez que se han formado los carriles. Los carriles se lavan con el tampón superior quitando los excesos depositados en el fondo con una pipeta Pasteur.

El aparato de electroforesis utilizado en este estudio fue mini-Protean II, BIO-RAD; el cual ofrece la ventaja de analizar muestras que contienen concentraciones muy bajas de proteína; es decir resuelve bandas de proteína en el rango de 20 ng por banda.

5.3 Preparación de las muestras.

Las muestras a ser analizadas fueron ajustadas a una misma concentración de proteína (10 μg) y se llevaron con tampón de aplicación a un volumen final de 30 μl tomando en cuenta el volumen que ocupa el colorante indicador azul de bromofenol (5 μl de una solución al 1%); posteriormente, las muestras se calentaron a 95° C en baño maría durante cinco minutos y se depositaron en el gel.

5.4 Condiciones de electroforesis.

El procedimiento de electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante (100 V) durante el tiempo necesario para que el indicador llegara al frente del gel (~2 h). Las condiciones del procedimiento fueron las descritas en el manual de instrucción del manejo de la cámara de electroforesis utilizada (BIO-RAD, Chemical Division) con algunas modificaciones.

5.5 Tinción de las proteínas.

Al término de la electroforesis el gel fue colocado en una solución de metanol al 50%, durante una hora, para fijar las proteínas y posteriormente se tiñeron con la solución de tinción de azul de coomassie R-250.

Solución de tinción:

Azul de Coomassie R-250	0.25%
Metanol	40%
Acido acético	10%
Aforar con H ₂ O.	

El gel se coloca en la solución de tinción durante el

tiempo necesario hasta visualizar todas las bandas esperadas ya teñidas (de 1 a 2 h aprox.) y se expone a la solución de destinción para remover todo el colorante de fondo.

Solución de destinción:

Metanol 40%

Acido acético 7%

Aforar con H₂O.

Una vez identificadas las proteínas teñidas se seca el gel de poliacrilamida en un aparato secador que funciona a base de calor y vacío, diseñado para este propósito.

6. Método de doble difusión (Ouchterlony) (88).

Se prepara una solución de agarosa tipo A al 1% en solución salina y en baño maria se lleva a una temperatura de 60° C por un período de 30 min (cuando se prepara al instante) y cuando se tienen soluciones concentradas de agarosa ya preparadas se hierve a 100° C hasta derretirla completamente. La solución de agarosa (18 ml) se vierte en una mica de 10 x 10 cm por su lado hidrofílico. La placa se deja gelificar y se hacen los pozos con vacío manteniéndola en una cámara húmeda.

Las muestras (5 μ l) por ser analizadas se depositan en los pozos colocando el suero anti-UTG en el centro de la placa, la cual se deja en la cámara húmeda para que las muestras difundan durante un periodo de 24-48 h. Posteriormente se identifican las bandas de precipitación correspondientes.

6.1 Secado del gel y tinción de la placa.

Una vez identificadas las bandas se lava la placa con TSF 0.01 M dos veces durante cinco min, se repite el lavado y se enjuaga; posteriormente en una placa de equilibrio se coloca papel filtro Whatman No. 3 MM de 20 x 30 cm y sobre éste la placa de Ouchterlony y cinco hojas más de papel filtro y toallitas de papel absorbente. En la parte superior de las placas se coloca una pesa de 50 g sobre un vidrio, de manera que el peso quede repartido sobre el gel. El gel seco se vuelve a lavar rápidamente con TSF y la placa se sumerge en la solución de tinción dejándola durante 20 min como mínimo y se procede a desteñir.

Para este efecto se lava el gel con agua destilada y se sumerge en la solución de destinción hasta quedar el gel casi transparente con excepción de las bandas de precipitación y

el contorno de los pozos teñidos, luego se enjuaga con agua destilada y se deja secar a temperatura ambiente.

SOLUCIONES:

1. Solución de tinción:

Azul de Coomassie blue-G 0.1% en agua: metanol: ácido acético glacial: (5: 5: 2). Filtrar a través de un filtro Whatman No. 1.

2. Solución de destinción:

Etanol	30%
Acido acético glacial	30%.
en H ₂ O.	

7. Cuantificación de proteínas:

El contenido de proteínas de cada una de las muestras tanto de fluido como de citosol, fue determinado por el método descrito por Bradford (89).

1. Preparación del reactivo:

100 mg de azul brillante de Coomassie blue-G y disolver en 50 ml de etanol al 95%. Agregar a la solución

anterior 100 ml de ácido fosfórico al 85% y llevar a 1,000 ml con H₂O, mantener en frasco ámbar. La concentración final del reactivo es: azul brillante de Coomassie blue-G 0.01% (p/v), etanol 4.7% (p/v) y ácido fosfórico 8.5 % (p/v). La solución se filtra a través de un filtro Whatman No. 3 MM.

2. Preparación de la curva estándar para la cuantificación de proteínas.

I. Para preparar la solución concentrada se pesaron 10 mg de ASB y se disolvieron en 10 ml de solución salina 0.15 M.

II. La solución de ASB (concentrada) se analiza en un espectrofotómetro a 278 nm utilizando como blanco la solución salina. La lectura debe de ser ajustada a una D.O.= 0.66, agregando ASB o solución salina.

3. Curva patrón:

La curva se construye con cinco concentraciones de ASB a partir de la solución concentrada.

1. 100 μg = 0.1 ml de la solución concentrada.
2. 75 μg = tomar 3.75 ml de la solución conc. y llevar a 5 ml.
Cada 0.1 ml de esta solución = 75 μg .
3. 50 μg = tomar 2.50 ml de la solución conc. y llevar a 5 ml.
Cada 0.1 ml de esta solución = 50 μg .
4. 25 μg = tomar 1.25 ml de la solución conc. y llevar a 5 ml.
Cada 0.1 ml de esta solución = 25 μg .
5. 0 μg = 0.1 ml de solución salina.

4. Preparación de las muestras de citosol y fluido uterino para la cuantificación de proteínas.

A los tubos que contienen las cinco concentraciones de ASB se les agrega cinco ml del reactivo de Coomassie y se mezclan vigorosamente. Después de dos min, tiempo en que se lleva a cabo la reacción, se mide la absorbancia a 595 nm. La concentración de la proteína estándar (ASB) se grafica contra la absorbancia correspondiente y a partir de la curva resultante y de la absorbancia leída en las muestras de citosol y fluido uterino se cuantifica la concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\text{ml}$) mediante interpolación en la curva patrón linealizada por regresión lineal.

8. Extracción del ARN.

El ARN se extrajo de úteros de conejas (bajo diversas circunstancias fisiológicas y farmacológicas) utilizando el método descrito por Cathala, *et al.* (90) con modificaciones mínimas. Este método utiliza el tiocianato de guanidina a una concentración de 4 M (o más) para disociar los complejos de proteína-ácido nucleico e inhibir la acción de la ribonucleasa (91,92), permitiendo así la extracción de ARNs íntegros. Para separar el ADN del ARN éste último se precipitó de los extractos con LiCl 4 M.

SOLUCIONES:

1. Tampón de lisis:

Tiocianato de guanidina	5	M
Tris-HCl pH 7.5	50	mM
EDTA	10	mM
β -mercaptoetanol	8%	v/v

(adicionar en el momento de usarse).

Filtrar con filtros Millipore de 0.45 μ m.

2. Tampón de solubilización 10X:

EDTA	10	mM
------	----	----

DSS 1% p/v

Tris-HCl pH 7.5 100 mM

Filtrar con filtros Millipore de 0.45 μ m. y esterilizar en autoclave.

3. Solución de LiCl 12 M (Solución concentrada):

Filtrar en millipore 0.45 μ m y esterilizar en autoclave.

4. Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1

Mezclar 24 volúmenes de cloroformo con 1 volumen de alcohol isoamílico.

5. Fenol:

El fenol es equilibrado con Tris-HCl 50 mM - EDTA 1 mM hasta que la solución de tris-HCl tiene pH de 8.

6. Solución saturada de acetato de amonio.

7. Tampón de acetato de sodio 0.2 M. pH 5.

8. Solución de NaCl 2 M.

9. Etanol al 75%

75% de etanol absoluto.

25% de H₂O estéril

METODOLOGIA:

a) Se descongelaron los úteros en hielo y se homogeneizaron con un politrón en tres intervalos de 10 s a velocidad máxima, en tampón de lisis.

b) Al homogeneizado se le adicionaron 7 volúmenes de LiCl 4 M, y se dejó reposar por 24 h a 4° C.

c) El homogeneizado se centrifugó a 4° C durante una hora en tubos Corex de 150 ml a 6,500 rpm en un rotor JS-7.5 y una centrifuga Beckman J2-21.

d) El sobrenadante fue desechado y el precipitado fue resuspendido, con la ayuda de un Potter Elvehjen con pistilo de teflón, en 50 ml de LiCl 3 M.

e) Se volvió a centrifugar la solución obtenida, de la misma manera que en el paso c), el sobrenadante se desecha.

f) El precipitado se resuspendió en 25 ml de tampón de

solubilización, utilizando un Potter Elvehjen con pistilo de teflón, y se vuelve a centrifugar como en el paso c).

g) Se recuperó el sobrenadante y se repitió el paso f); se vuelve a recuperar el sobrenadante y se mezcla con el primero.

h) A los sobrenadantes mezclados se les agrega un volumen igual (50 ml) de fenol saturado y se agita el tubo por inversión en forma repetida durante 5 min.

i) Se adiciona un volumen, igual al del sobrenadante, de cloroformo-alcohol isoamílico (50 ml) 24:1 v/v, y se vuelve a agitar por inversión varias veces.

j) La mezcla resultante se centrifugó 5 min a 6,500 rpm a 4° C, se recuperó la fase superior (fracción acuosa) evitando tocar la interfase (proteínica) y se depositó en un matraz Ehrlenmeyer de 500 ml.

k) Se adicionó 0.05 volúmenes de acetato de amonio saturado, se agitó suavemente y se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto a -20° C. Se deja precipitar toda la noche a -20° C.

l) Se depositó la mezcla anterior en dos tubos Corex de 150 ml y se centrifugó una hora a 4° C.

m) Los precipitados se lavaron dos veces con etanol al 75% para quitar las sales.

n) Los precipitados se resuspendieron en 5 ml de agua desionizada estéril por tubo.

o) Se tomó una alícuota de 10 μ l de la sol. anterior y se llevó a 1 ml con H₂O estéril, se midió la absorbancia (D.O) a 260, 280 y 310 nm. (Una unidad de D.O. a 260 nm es igual a 40 μ g de ARN).

p) Una vez cuantificado el ARN se precipitó con un décimo de volumen de NaCl 2 M, un décimo de volumen de acetato de sodio 0.2 M, pH 5 y dos y medio volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20° C. Se guardó a -20° C hasta su uso.

9. Electroforesis de ARN en geles de agarosa.

Para fraccionar el ARN total (o mensajero) en geles de agarosa es necesario utilizar algún agente químico que

garantice la desnaturalización del ARN. En este tipo de electroforesis son ampliamente utilizados el hidróxido de metil mercurio, el glioxal y el formaldehído. Nosostros utilizamos el último por cuestiones de accesibilidad y manejo (93,94).

SOLUCIONES

1. Tampón HEPES/EDTA 10X:

HEPES 0.50 M

EDTA 0.01 M

pH 7.8

2. Tampón de aplicación:

100 μ l de HEPES/EDTA 10X

Azul de bromofenol 5 mg

Sacarosa 400 mg

Mezclar hasta disolver y adicionar 178 μ l de formaldehído al 37% y 500 μ l de formamida desionizada.

3. Solución de bromuro de etidio (solución concentrada):

Bromuro de etidio 10 mg/ml de H₂O.

Guardar en frasco ámbar a 4° C.

El formaldehído y la formamida son dos compuestos que se oxidan cuando están en contacto con el aire; por esta razón se deben desionizar con una resina quelante hasta que alcancen un pH neutro. Se almacenaron en alíquotas de 1 ml, cerradas herméticamente, a -20° C.

METODOLOGIA:

a) Preparación del gel de agarosa al 1.1%

1.1 g de agarosa tipo II fueron hervidos en 83.3 ml de tampón HEPES/EDTA 1X hasta que la agarosa se disolvió completamente; se dejó enfriar hasta 65° C y entonces se le adicionó 16.7 ml de formaldehído al 37% (concentración final 6%) y se agitó suavemente; cuando la solución alcanzó 45° C fue colado en la cámara de electroforesis, y una vez que hubo polimerizado completamente se llenó la cámara de electroforesis con tampón HEPES/EDTA 1X (gel submarino) suplementado con 6% de formaldehído (el gel se deja reposar una noche a temperatura ambiente).

b) Preparación de los ARNs.

20 μg de ARN total en 5.6 μl de agua, de cada una de las muestras, fueron equilibrados con 2.5 μl de tampón HEPES/EDTA 10X, se adicionaron 12.5 μl de formamida (50% v/v) y 4.4 μl de formaldehído (concentración final 2.2 M); se calentaron en un baño maría a 70° C por 10 minutos; al término las muestras fueron colocadas en hielo por diez minutos; finalmente se le adicionaron 2 μl de tampón de aplicación.

Las muestras fueron depositadas en el gel y se aplicó un voltaje constante de 90 V hasta que el azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel (~ 12 cm). Se cortó el carril que contenía los marcadores de peso molecular (28S y 18S) y se incubó durante una hora en 100 ml de agua suplementada con 70 μl de β -mercaptoetanol, 10 μl de bromuro de etidio (10 mg/ml); y se midió la distancia migrada en un transiluminador de rayos ultravioleta a 240 nm.

10. Transferencia de ARN a papel de nitrocelulosa.

La transferencia del ARN a papel de nitrocelulosa es generalmente conocida como "Northern blotting" por la semejanza que tiene con el "Southern blotting", un método ampliamente utilizado para transferir ADN a papel de nitrocelulosa; el cual fue desarrollado por E. M. Southern en

1975 (95).

El proceso de transferencia se realizó fundamentalmente de acuerdo al método descrito por P. S. Thomas (96).

SOLUCIONES:

1. Citrato de sodio salino (CSS) 20X:

Citrato trisódico 0.3 M.

NaCl 3 M.

pH 7

METODOLOGIA:

Después de la electroforesis el gel es sumergido en 250 ml de CSS 20X por 30 min; se coloca sobre un par de hojas de papel Whatman 3 MM humedecidas con CSS 20X, cuyos extremos están sumergidos en 250 ml de tampón CSS 20X, se coloca arriba del gel el papel de nitrocelulosa humedecido primero en agua y luego en CSS 2X, después se cubre con un par de hojas de papel filtro Whatman 3 MM y con una capa, de 15 cm de espesor, de toallas de papel absorbente; finalmente se coloca en la parte superior una placa de vidrio y una pesa de 0.5 Kg. La transferencia de la gran mayoría de ARNs se logra esencialmente en 16-20 h.

Cuando han transcurrido las 20 h necesarias para la transferencia, se marca en el papel de nitrocelulosa el inicio de los carriles con un lápiz suave; se desecha el gel y el filtro se seca bajo una lámpara, una vez seco, se coloca entre dos hojas de papel Whatman 3 MM y se calienta a 80° C en un horno con vacío por dos horas, esto se realiza con el fin de retener firmemente, en el papel de nitrocelulosa, los ARNs transferidos.

11. Transformación de la bacteria Escherichia coli cepa HB-101 con el plásmido pUG12.

El plásmido recombinante pUG12 fué donado por el Dr. E. Milgrom (Groupe de Recherches sur la Biochimie Endocrinienne et la Reproduction (INSERM, U 135), Faculté de Médecine Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France.) el cual es el resultado de clonar el ADNc de UTG en el plásmido pBR322 en el sitio de restricción pst I (62).

Para la transformación de las células bacterianas (97,98) con ADN plasmídico (circular), que contiene un origen de replicación autónomo y un gene de resistencia a un antibiótico (lo cual se usa como criterio de selección), es necesario que las bacterias que crecen logarítmicamente en un

medio nutritivo se hagan permeables al ADN plasmídico por medio de la incubación en CaCl_2 de tal forma que el ADN del plásmido el cual fue adicionado al medio pueda pasar dentro de la bacteria; se concluye este proceso por un desequilibrio térmico. Las bacterias que han incorporado el ADN del plásmido, son posteriormente seleccionadas en base a su crecimiento en un medio de cultivo de selección en fase sólida que contiene un antibiótico específico al cual el plásmido introducido les confirió resistencia y en donde crecen a pesar de esta substancia.

SOLUCIONES:

1. pUG12 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de TE

TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, pH 7.5)

2. Medio LB (Luria Bertani):

10 g de triptona grado bacteriológico.

5 g de extracto de levaduras grado bacteriológico.

10 g de NaCl.

Ajustar a pH 7.5 con NaOH. Aforar a 1 l y esterilizar en autoclave.

3. CaCl_2 50 mM:

Filtrar en millipore 0.45 μm y esterilizar en autoclave.

4. Tetraciclina (solución concentrada):

Tetraciclina HCl 12.5 mg/ml en etanol/agua (50% v/v).

Almacenar en la obscuridad a -20°C .

5. Medio LB sólido:

Medio LB líquido.

Agar grado bacteriológico 1.5% (p/v).

Tetraciclina HCl 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (concentración final).

La tetraciclina fué utilizada para la selección de las bacterias transformantes.

6. Escherichia coli cepa HB-101:

Utilizada por carecer de sistemas de recombinación (Rec-A).

METODOLOGIA:

Se inocularon 200 ml de LB líquido con una colonia de Escherichia coli HB-101 y se incubaron a 37°C con agitación

constante hasta que alcanzó una D.O. de 0.6 a 580 nm. Este proceso llevó varias horas.

Se centrifugaron a 6,500 rpm 100 ml del cultivo anterior durante 10 min a 4° C en tubos Corex estériles de 150 ml en una centrifuga Beckman J2-21 y un rotor JS- 7.5.

Se resuspendió el precipitado en 30 ml de CaCl₂ 50 mM a 0° C y se dejó en hielo por 30 min.

Se centrifugó a 6,500 rpm durante 15 min y el precipitado fue resuspendido en 1 ml de CaCl₂ a 0° C.

Se tomaron 3 alícuotas de 100 µl de esta suspensión, se colocaron en tubos eppendorf estériles de 1 ml, se adicionaron 200 ng de pUG12 (1 µl) a dos de las alícuotas y se dejaron reposar en hielo durante 15 min.

Los tubos se colocaron en baño maría a 42° C durante 2 min provocando con ello un desequilibrio térmico (choque térmico).

Se sacaron los tubos del baño y se colocaron a temperatura ambiente durante 10 min y se les adicionó 1 ml de

medio LB dejando recuperar a las bacterias durante 45 min a 37° C con agitación suave.

Se tomó una gota de cada uno de los tubos y se esparcieron sobre cajas de Petri con medio LB-sólido suplementado con tetraciclina (12.5 µg/ml) (se hacen diluciones 10⁻³, 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en caso necesario).

Se dejó incubar a 37° C durante toda la noche.

Posteriormente se tomaron 4 colonias de cada una de las cajas con medio selectivo y se inocularon en cajas nuevas; las cuales fueron seccionadas previamente en 4/4.

Se siguió el mismo procedimiento para el control negativo, el cual no fue incubado con el plásmido.

12. Preparación del ADN plasmídico.

Para preparar el ADN plasmídico, las bacterias transformadas son lisadas con lisosima y DSS alcalino; después, la preparación es centrifugada y el sobrenadante se fracciona en un gradiente de CsCl/bromuro de etidio para

purificar el ADN plasmídico del ADN cromosómico de la bacteria. Este método ofrece ADN plasmídico altamente puro.

Se siguió el método descrito por Birnboim y Doly (99) con algunas modificaciones.

SOLUCIONES:

1. Medio LB líquido suplementado con tetraciclina (12.5 $\mu\text{g/ml}$).

2. Cloranfenicol (solución concentrada):

34 mg/ml en etanol absoluto almacenar a -20°C .

3. Tampón para lisosima:

Glucosa 50 mM

EDTA 10 mM

Tris-HCl 25 mM

pH 8

filtrar en millipore $0.45\ \mu\text{m}$ y esterilizar en autoclave.

La lisosima se adiciona justo en el momento que se va a usar a una concentración de 2 mg/ml .

4. Solución de DDS-alcalino:

NaOH 0.2 N

DDS 1 %

5. Acetato de amonio 2 M.

Filtrar en Millipore de 0.45 μ m.

6. Acetato de sodio 3 M:

Disolver 3 moles de acetato de sodio en un volumen mínimo de agua, ajustar el pH a 4.8 con ácido acético glacial y aforar. Filtrar en Millipore 0.45 μ m y esterilizar en autoclave

7. ARNasa 1 mg/ml (solución concentrada):

Se disuelve 1 mg/ml de ribonucleasa A en Tris-HCl 5 mM, pH 8.0 y se calienta a 100° C durante 10 min.

8. Tampón Tris-EDTA (TE):

Tris-HCl 10 mM.

EDTA 10 mM.

pH 8

9. Solución de bromuro de etidio (solución concentrada):

Bromuro de etidio 10 mg/ml de agua.

Guardar en frasco ámbar a 4° C.

10. Butanol saturado:

1-butanol 50%

H₂O 50%

Agitar vigorosamente.

11. NaCl 2 M.

Filtrar y esterilizar.

12. Acetato de sodio 0.2 M.

pH 5

Filtrar y esterilizar.

13. Etanol al 75%:

Etanol 75%

H₂O estéril 25%

14. Tubo de diálisis:

Cortar el tubo de diálisis en porciones de 15 cm de longitud.

Hervirlos 10 min en 0.5 l de NaHCO₃ al 2% y EDTA 1 mM.

Enjuagarlos varias veces con agua destilada.

Colocarlos en un matraz Ehrlemeyer con H₂O y

esterilizarlos en autoclave; guardarlos a 4° C.
Siempre deben ser manejados con guantes.

Es riguroso el utilizar únicamente material esterilizado en autoclave.

METODOLOGIA:

a) Amplificación de la bacteria en un medio nutritivo rico.

1. 10 ml de medio LB suplementado con tetraciclina HCl a una concentración de 12.5 µg/ml fueron inoculados con una colonia de bacterias que contiene el plásmido pUG12; se incubó toda la noche a 37° C con agitación vigorosa.

2. Por la mañana, se inocularon 25 ml de medio LB suplementado con tetraciclina a una concentración de 12.5 µg/ml con 0.1 ml del cultivo anterior (utilizadando un matraz Ehrlenmeyer de 100 ml). El medio se incubó a 37° C con agitación vigorosa hasta que alcanzó una D.O. de 0.6 a 580 nm (fase logarítmica temprana).

3. Se inocularon 500 ml de medio LB precalentado a 37° C y suplementado con tetraciclina (12.5 µg/ml) con los 25 ml del cultivo anterior (utilizar un matraz Ehrlenmeyer de 2 l). Incubar a 37° C con agitación vigorosa hasta alcanzar una D.O. de 0.4 a 580 nm.

4. Al cultivo anterior se le adicionó 2.5 ml de cloranfenicol (solución concentrada). La concentración final del cloranfenicol en el cultivo fue de 170 µg/ml.

5. Se incuba a 37° C de 12-16 horas con agitación vigorosa.

b) Recuperación y lisis de las bacterias.

1). Las bacterias (cultivo anterior) fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 15 min a 4° C en una centrifuga Beckman J2-21 y un rotor JA-10. Se desecha el sobrenadante.

2). El precipitado se resuspendió en 10 ml del tampón de lisosima (suplementado con 2 mg/ml de lisosima). Se dejó reposar en hielo durante 30 min.

3). Se adicionaron 20 ml de la solución de DSS-alcalino y se agita suavemente utilizando un agitador (vortex). La suspensión llega a ser casi clara y ligeramente viscosa se deja reposar durante 5 min. en hielo.

4). Se adicionaron 15 ml de acetato de sodio 3 M a 4° C; se mezcló el contenido del tubo por inversión. En este paso se formó un agregado blanquesino cuyo principal contenido es ADN. El tubo se mantuvo en hielo durante una hora para permitir la precipitación de la mayoría de las proteínas, ARN de alto peso molecular y ADN cromosómico.

5). El tubo (tubo Corex de 150 ml) fue centrifugado a 6,500 rpm en una centrifuga J2-21 y un rotor JS-7.5 durante 1 h a 4° C. Se recuperó un sobrenadante casi claro.

6). Se adicionaron dos y medio volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20° C y se guardó a -20° C durante 30 min. Se centrifugó a 6,500 rpm a 4° C por 1 h y se desechó el sobrenadante.

7). Resuspender el precipitado en un pequeño volumen (900 μ l) de TE pH 8, adicionar 100 μ l de la solución concentrada de ARNasa (concentración final 100 μ g/ml),

incubar 30 min a 37° C y adicionar 100 µl de acetato de amonio 2 M.

8). Centrifugar a 6,500 rpm durante 30 min a 4° C para remover material insoluble. Se recupera el sobrenadante y se precipita con tres volúmenes de etanol preenfriado a -20° C por lo menos durante una hora a -20° C.

9). Se centrifuga a 6,500 rpm durante 1 h a 4° C y el precipitado es resuspendido en 5 ml de TE pH 7.5. La solución se deposita en un tubo de diálisis y se dialisa durante 24 horas en dos litros de TE pH 7.5, a 4° C y agitación constante (usar una barra magnética y cambiar a las doce horas los dos litros de TE por nuevo).

10). Se adicionan 1.03 g de cloruro de cesio (CsCl) por ml de dialisado y se agita el tubo por inversión hasta que el CsCl se disuelve completamente, por cada ml se adicionan 80 µl de la solución concentrada de bromuro de etidio, agitar suavemente por inversión. Una vez que el bromuro de etidio se ha adicionado, no debe exponerse a la luz.

11). La solución anterior se vacía en dos tubos de 5 ml para ultracentrifugación, se equilibran y se completa el

volumen con nugol (aceite mineral).

12). Los tubos fueron centrifugados a 45,000 rpm durante 36 horas a 15° C, en una ultracentrífuga Beckman L5-50B y un rotor SW 50.1 (Es importante que la ultracentrifugación se realice entre 15°-20° C para evitar que el CsCl se precipite).

13). Se iluminan los tubos con una lámpara de luz ultravioleta y se extrae la banda inferior, de las dos que deben aparecer, picando el tubo justo abajo de la banda con una aguja del No. 21 y aspirando suavemente con una jeringa para insulina.

14). Al volumen extraído se le adiciona un volumen igual de butanol saturado, para extraer el bromuro de etidio. Se debe tener cuidado de no poner más de un volumen de butanol ya que se corre el riesgo de precipitar el CsCl y el ADN. El butanol (fracción superior) se desecha y se repite la operación hasta que el butanol sale transparente.

15). La solución se dializa extensivamente contra TE pH 7.5 como en el paso 9).

16). Se recupera el contenido de la bolsa de diálisis en un tubo estéril, se adiciona un décimo de volumen de NaCl 2 M, un décimo de volumen de acetato de sodio 0.2 M pH 5 y dos y medio volúmenes de etanol preenfriado a -20° C. Se deja precipitar a -20° C durante 24 horas.

17). El tubo es centrifugado a 10,000 rpm durante una hora y se lava dos veces con etanol al 75%, después de cada lavado se centrifuga a 10,000 rpm durante 20 min.

18). El precipitado es secado con un flujo de nitrógeno (N_2) muy suave y resuspendido en 500 μ l de TE pH 7.5. Tomar una alícuota de 2.5 μ l, llevarla a 250 μ l con TE y medir la D.O a 260, 280 y 310 nm en una microceldilla de cuarzo. Una unidad de D.O a 260 nm es igual a 50 μ g de ADN/ml. Se guarda el plásmido a -20° C.

13. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

La electroforesis en geles de agarosa es el método más ampliamente utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN; esta técnica permite separar mezclas de fragmentos de ADN que no pueden ser separados adecuadamente por otras técnicas de fraccionamiento, tales como los

gradientes de densidad. Además de que la localización de bandas de ADN pueden ser determinadas dentro del mismo gel con el colorante fluorescente bromuro de etidio; se pueden detectar cantidades tan pequeñas como un ng de ADN por observación directa del gel en luz ultravioleta (100).

SOLUCIONES:

1. Tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE):

Tris-base 0.04 M

Acetato de sodio 0.02 M

EDTA 0.002 M

Ajustar el pH a 7.8 con ácido acético glacial.

Filtrar y esterilizar.

2. Tampón para la digestión con la enzima pst I 10X:

Tris-HCl pH 7.5 200 mM

NaCl 1 M

MgCl₂ 100 mM

ASB (libre de proteasas y ADNasas) 1 mg/ml

3. Tampón de aplicación 5X.

Sacarosa 25%

Acetato de sodio 5 mM

Azul de bromofenol 0.05%

DSS 0.1%

Filtrar y esterilizar.

4. Bromuro de etidio 10 mg/ml

Disolver el colorante en agua.

Guardar en frasco ámbar a 4° C.

5. Tampón Tris-EDTA.

Tris- HCl 10 mM.

EDTA 10 mM.

Ajustar pH a 8.0 con NaOH.

METODOLOGIA:

a) Preparación del gel de agarosa al 0.8%

0.8 g de agarosa tipo II fueron hervidos en 100 ml de TAE, hasta que la agarosa se disolvió completamente; se dejó enfriar hasta 65° C y se le adicionó 5 μ l de bromuro de etidio 10 mg/ml (concentración final 0.5 μ g/ml) y se agitó suavemente, cuando la solución alcanzó aproximadamente 45° C fue colada en la cámara de electroforesis, y una vez que hubo

gelificado completamente se llenó la cámara de electroforesis con tampón TAE (gel submarino).

b) Preparación de los ADNs.

El objetivo de esta electroforesis fue el de purificar el ADNc de UTG; para lo cual fue necesario primeramente digerir el plásmido recombinante pUG12 con la enzima de restricción pst I debido a que el ADNc de UTG fue clonado en el sitio de restricción pst I del plásmido pBR322.

Digestión de pUG12 con pst I.

pUG12	6.0 μ g
Tampón para <u>pst</u> I ..	2.5 μ l
Enzima <u>pst</u> I	10.0 U
H ₂ O estéril	c.b.p. 25.0 μ l

Hacer la mezcla en hielo.

La mezcla de reacción anterior se incubó una hora a 37° C; al término se le adicionaron 6 μ l del tampón de aplicación.

A 100 ng de pUG12 intacto se le adicionaron 2 μ l de tampón de aplicación y se llevó a 10 μ l con agua estéril. El plásmido intacto nos sirvió como control de la digestión enzimática.

c) La electroforesis.

Las muestras fueron depositadas en el gel y se aplicó un voltage constante de 120 V, hasta que el azul de bromofenol llegó aproximadamente a la mitad del gel. Se observó el gel en un transiluminador y se cortaron las bandas correspondientes al ADNc de UTG.

d) Recuperación del ADNc del gel de agarosa por difusión pasiva (101).

Los fragmentos de agarosa que contenían el ADNc de UTG fueron pasados a través de una jeringa de 1 ml estéril (sin aguja) para macerarlos; este macerado se colocó en un tubo de vidrio siliconizado y estéril y se le adicionó un ml de TE; se dejó a temperatura ambiente durante 24 h; después se filtró la agarosa en un filtro millipore de 0.45 μ m y se precipitó con un décimo de volumen de NaCl 2 M, un décimo de volumen de acetato de sodio 0.2 M y tres volúmenes de etanol

a -20° C. Se dejó precipitar 24 horas a -20° C; se centrifugó a 10,000 rpm durante una hora en una centrifuga J2-21 y un rotor JS-13. El precipitado se lavó dos veces con etanol al 75% para quitar el exceso de sales; después de cada lavado se centrifuga 15 minutos en las mismas condiciones que la anterior. El precipitado se seca con un flujo de N_2 suave y se resuspende en 10 μ l de TE. Ahora el ADNc de UTG puede ser marcado con un radioisótopo del fósforo (^{32}P) por "Nick Translation".

14. Marcaje radiactivo del ADN por mella y reparación ("Nick translation").

La ADN polimerasa I de Escherichia coli adiciona nucleótidos a las terminales 3' hidroxiladas que se forman cuando una cadena de la molécula de ADN de doble cadena es mellada por la acción de la enzima ADNasa I. Además la ADN polimerasa I por su actividad exonucleolítica puede remover nucleótidos del lado 5' de la mella (Nick). La eliminación de nucleótidos del lado 5' y la adición simultánea de nucleótidos del lado 3' provoca un movimiento del hueco (Nick) a lo largo del ADN (102). Es posible preparar ADN marcado con ^{32}P con una actividad específica (AE) mayor que

10^8 cpm/ μ g sustituyendo los nucleótidos ya existentes por nucleótidos altamente radiactivos (103,104).

SOLUCIONES:

1. Tampón para "Nick Translation" (TNT) 4X:

Tris-HCl 200 mM, pH 7.5

MgCl₂ 20 mM

ASB 20 μ g/ml (libre de proteasas y ADNasas)

β -mercaptoetanol 1 μ l/250 μ l (adicionar justo antes de usarse).

2. Desoxinucleótidos trifosfatados 1mM (dNTPs) 20X:

Preparar soluciones concentradas 20 mM de cada uno de los nucleótidos (dGTP, dCTP, dTTP) en agua estéril.

Ajustar el pH a 7 con tris-base 50 mM y papel indicador de pH. Una vez ajustado el pH diluir con agua hasta llegar a una concentración de 1 mM. De esta manera se tiene una solución concentrada 20X (1 mM) para cada uno de los nucleótidos. Almacenar a -20° C.

3. Tampón de dilución:

ASB 1 mg/ml

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

β -mercaptoetanol 10 mM

Tris-HCl 50 mM, pH 7.5

4. ADNasa I 100X (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$):

Disolver ADNasa I en agua estéril a una concentración de 1 mg/ml. Tomar 4 μl de esta solución y llevarla a 1 ml de tampón de dilución. Adicionar 1 ml de glicerol y guardar a -20°C .

5. EDTA 0.5 M pH 8.

6. Tampón Tris-EDTA (TE):

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1mM

pH 8

7. Sephadex G-50 hidratado en TE.

8. ADN polimerasa I 5 U/ μl .

9. [α - ^{32}P]dATP. A.E > 3,000 Ci/mmol

METODOLOGIA:

1) Mezclar en un tubo eppendorf de 500 μ l las siguientes soluciones en orden sucesivo y en hielo:

a) ADNc de UTG	8.0 μ l (200 ng/8 μ l)
b) TNT 4X	12.5 μ l
c) dCTP	1.0 μ l (conc. final 20 μ M)
d) dGTP	1.0 μ l (conc. final 20 μ M)
e) dTTP	1.0 μ l (conc. final 20 μ M)
f) ADN polimerasa I	1.0 μ l (5 U)
g) ADNasa I	0.5 μ l
h) Agua estéril	22.0 μ l
i) [α - ³² P]dATP	3.0 μ l (30 μ Ci)

2) Se incuba la mezcla anterior a 15° C durante 3 h.

3) Se detiene la reacción con 1 μ l de EDTA 0.5 M y enseguida se adicionan 100 μ l de TE pH 8.

4) Se deposita la solución anterior en una columna de sephadex G-50 y se centrifuga 5 min a 1,500 rpm en una centrifuga Beckman J-6B. (La columna de sephadex se prepara llenando una jeringa de 1 ml (para insulina) con sephadex G-

50 hidratado y se centrifuga a 1,500 rpm durante 1 min. Se coloca un tubo eppendorf en la parte inferior de la columna para recibir la sonda marcada).

5) La solución recolectada en el tubo contiene el ADNC radiactivo (sonda). Se desnaturaliza la sonda en agua hirviendo por cinco minutos. La sonda esta lista para las hibridaciones moleculares.

15. Hibridación molecular.

El método más ampliamente utilizado para detectar un ARN específico con una sonda radiactiva (ADNC de UTG) en una población de ARNs fijados en papel de nitrocelulosa es la hibridación molecular; este método permite la hibridación (acoplamiento) entre una sonda radiactiva de alta actividad específica obtenida por el método de "Nick Translation" o por cualquier otro y algún ARN específico inmovilizado en papel de nitrocelulosa (Northern blotting). Las condiciones son esencialmente las mismas que fueron descritas por Suggs et al (105) y Wahl et al (106) para la hibridación de ADNs con alguna sonda radiactiva.

Nosotros seguimos fundamentalmente el método descrito por P. Thomas (96).

SOLUCIONES:

1. Formamida desionizada:

La formamida fue desionizada con una resina quelante hasta que alcanzó un pH de 7.

2. EDTA 0.5 M pH 8.

3. DSS al 10%

4. Tampón de Denhardt 50X

Ficoll 400	1 g
Polivinilpirrolidona	1 g
ASB (fracción V)	1 g
H ₂ O estéril	c.b.p. 100 ml.

La solución fue filtrada en millipore de 0.45 μ m y se guardó a -20° C en alícuotas de 20 ml.

5. Tampón de fosfato de sodio 0.6 M, pH 6.5

6. Citrato de sodio salino (CSS) 20X:

Citrato de sodio	0.3 M
NaCl	3.0 M
pH	7.0

7. Tampón de Prehibridación:

Formamida 50% v/v (desionizada).

EDTA 10 mM, pH 8

DSS 0.2%

Tampón de Denhart 4X

Fosfato de sodio 120 mM, pH 6.5

CSS 2X

METODOLOGIA:

El filtro de nitrocelulosa se prehibrida con 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ de tampón de prehibridación de 8-24 h a 42° C; en una bolsa de polietileno sellada con calor; tener cuidado de no dejar burbujas de aire en el interior.

La sonda marcada con [α -³²P]dATP es desnaturalizada en agua hirviendo durante 5 min, se enfría en hielo y se adiciona al tampón de prehibridación por una esquina de la bolsa; se sella con calor, se agita suavemente y se deja hibridar 20 h a 42° C. Al término de ese tiempo el filtro de nitrocelulosa se lava dos veces con 250 ml de CSS 2X por 15 min a temperatura ambiente, después se lava dos veces más con 250 ml de tampón CSS 0.1X y DSS al 0.1% durante 30 min a 50°

C para quitar el exceso de radiactividad no hibridada (condiciones de alta astringencia).

Los papeles se secan bajo una lámpara, se envuelven cuidadosamente con un plástico delgado "Saram wrap" y se expone el filtro, en un cuarto oscuro, a dos películas radiosensibles dentro de un estuche para exposición con pantalla intensificadora; el estuche se guarda a -70° C, se deja exponiendo durante dos días y se revela la primera película, la segunda se revela cuando completa una semana de exposición (sobreexpuesta) utilizando el revelador y el fijador de Kodak por tres minutos cada uno.

La autoradiografía fue monitoreada con un densitómetro para conocer la intensidad de cada una de las bandas.

16. Tinción del filtro de nitrocelulosa con azul de metileno.

Para teñir el filtro de nitrocelulosa con azul de metileno se utilizó el método descrito por T. Maniatis, et al (82). Este método resulta útil para estimar la eficiencia de la transferencia así como el tamaño de ARN transferido, esto

evaluado a través de los marcadores de peso molecular (ARNr: 28S y 18S).

SOLUCIONES:

1. Acido acético al 5%
2. Acetato de sodio 0.5 M, pH 5.2
Azul de metileno 0.04%

METODOLOGIA:

El filtro de nitrocelulosa seco, después de la autoradiografía, fue sumergido por 15 min a temperatura ambiente en ácido acético al 5%, después se transfirió a la solución de acetato de sodio - azul de metileno por diez min. a temperatura ambiente y finalmente se enjuagó el filtro en agua destilada por diez min; en el transcurso de este periodo aparecen las bandas de ARNr (28S y 18S).

IV. RESULTADOS.

La actividad progestacional de la NET y sus metabolitos, 5α -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET, fue evaluada a través de su capacidad para inducir la síntesis de UTG y de su ARNm en el endometrio de la coneja.

Después de realizar los tratamientos con los diferentes compuestos esteroides a los animales de experimentación como se describió en material y métodos y de obtener el material biológico; se cuantificó la concentración de proteínas en el fluido uterino y en el citosol de cada grupo experimental; dato que se utilizó subsecuentemente para la aplicación de cantidades similares de proteína en cada análisis, así como para el cálculo de los resultados por mg de proteína.

Las pruebas de doble difusión se realizaron con el fin de detectar la presencia de UTG en los diferentes citosoles y fluidos uterinos obtenidos.

En las figuras 1 y 2 se presentan los resultados de la doble difusión de los citosoles y de los fluidos uterinos respectivamente. Sólo fue posible detectar UTG por inmunoprecipitación en los pozos 1 y 2 de ambas placas que corresponden a los tratamientos con P_4 y NET respectivamente.

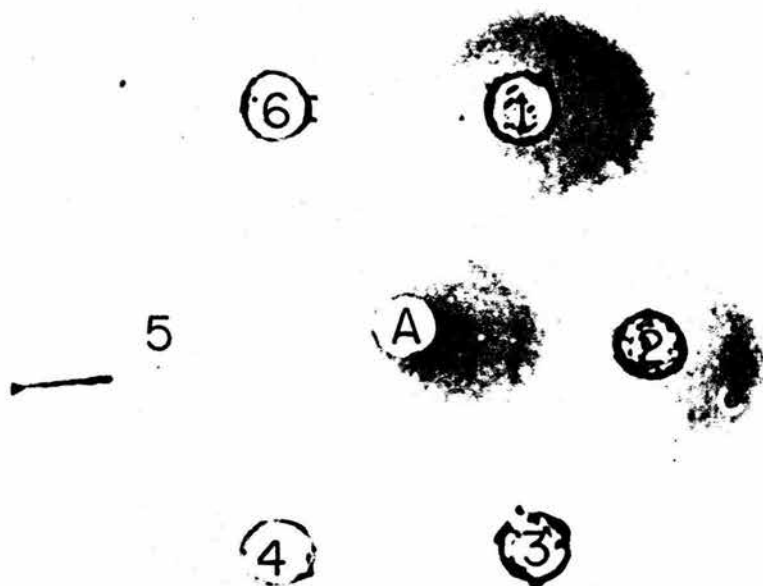


Figura 1. Inmunodetección de la UTG en los citosoles uterinos de conejas por el método de doble difusión (Ochterlony). En el pozo central (A) se depositó 5 μ l de anticuerpo anti-UTG de una dilución 1:2 y en los pozos periféricos se depositaron, 5 μ l de citosol uterino de conejas tratadas con: P₄ (1), NET (2), 5 α -NET (3), 3 β ,5 α -NET (4), E₂ (5) y aceite (6). Se dejó incubar el gel a temperatura ambiente durante 24 h, posteriormente se lavó con tampón de fosfatos 0.1 M pH 7.4 durante 20 min y por último se tiñó con azul de coomassie. Se detectaron arcos de precipitación en las zonas correspondientes a los pozos 1 y 2 (P₄ y NET respectivamente) lo cual indica una alta inducción de UTG. No se detectaron arcos de precipitación en ninguna otra zona del gel.

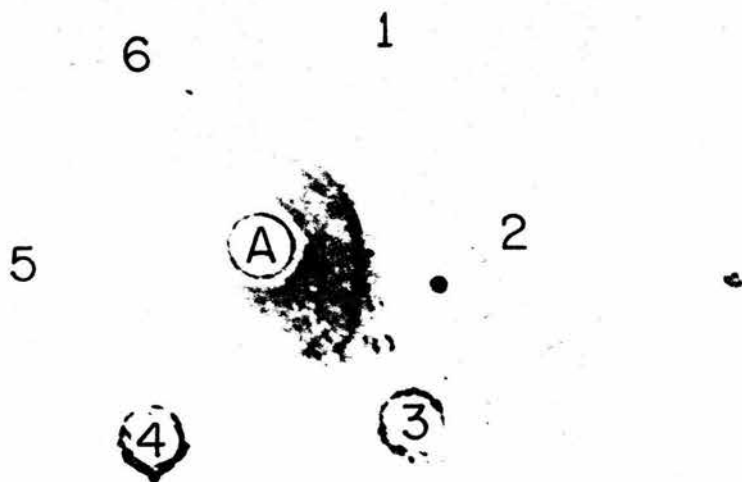


Figura 2. Inmunodetección de la UTG en los fluidos uterinos de conejas por el método de doble difusión (Ochterlony). En el pozo central (A) se depositó $5 \mu\text{l}$ de anticuerpo anti-UTG de una dilución 1:2 y en los pozos periféricos se depositaron, $5 \mu\text{l}$ de fluido uterino de conejas tratadas con: P_4 (1), NET (2), $5\alpha\text{-NET}$ (3), $3\beta,5\alpha\text{-NET}$ (4), E_2 (5) y aceite (6). Se dejó incubar el gel a temperatura ambiente durante 24 h, posteriormente se lavó con tampón de fosfatos 0.1 M pH 7.4 durante 20 min y por último se tiñó con azul de coomassie. Se detectaron arcos de precipitación en las zonas correspondientes a los pozos 1 y 2 (P_4 y NET respectivamente) lo cual indica una alta inducción de UTG. No se detectaron arcos de precipitación en ninguna otra zona del gel.

Con el fin de caracterizar el patrón de proteínas por medio de electroforesis y de medir de una manera cualitativa la concentración de UTG por intensidad y ancho de las bandas en los diversos tratamientos, se realizaron dos electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% - DSS; una para los citosoles y otra para los fluidos uterinos de las conejas que recibieron los diferentes tratamientos. En la figura 3 se muestra el patrón electroforético desarrollado por los citosoles de las conejas, en esta figura se puede observar una banda muy bien definida, de un peso molecular aproximado de 11,000 daltones la cual muy probablemente corresponde al precursor de UTG, conocido como preuteroglobina debido a que es una proteína que no está completamente madura; por otra parte también es posible observar una banda muy tenue y apenas perceptible de aproximadamente 7,000 daltones la cual corresponde a la UTG madura. En la figura 4 se muestra la electroforesis de los fluidos uterinos; en ésta electroforesis se observa una banda, de aproximadamente 7,000 daltones la cual corresponde a UTG sólo en los tratamientos correspondientes a P₄ y NET y desde luego en la muestra de fluido uterino de coneja con cinco días de gestación ya que como previamente se mencionó, en esta etapa de la gestación esta proteína es la que en

mayor cantidad se secreta al lumen uterino, esta banda varía en intensidad de acuerdo con el tratamiento hormonal; la mayor intensidad se registró en la muestra que corresponde al fluido uterino de coneja con cinco días de gestación (carril 3), le sigue P₄ y NET (carriles 4 y 5 respectivamente) los cuales son muy semejantes en grosor e intensidad; no fue posible detectar esta banda en los demás tratamientos. Por otra parte, no aparece la banda de 11,000 daltones, encontrada en la electroforesis para citosoles y que corresponde a preuteroglobina.

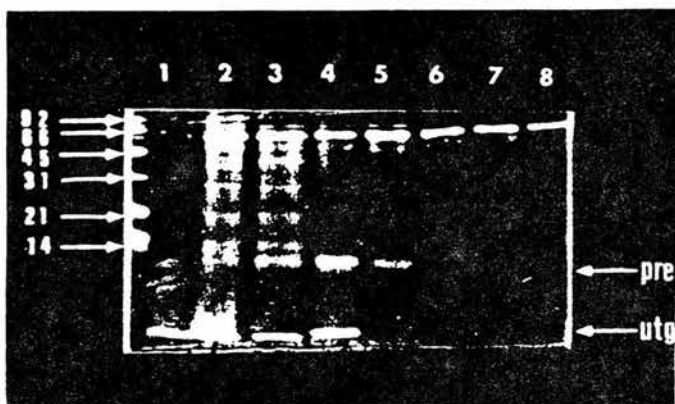


Figura 3. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% - DSS de los citosoles uterinos. Se depositaron 10 µg de proteína por cada carril. De izquierda a derecha se tiene: los marcadores de peso molecular, el estándar de UTG (2 µg) (1), citosol uterino de cinco días de gestación (2), P₄ (3), NET (4), 5α-NET (5), 3β,5α-NET (6), E₂ (7) y aceite (8) respectivamente. A la izquierda se indica el peso molecular expresado en kilodaltones.

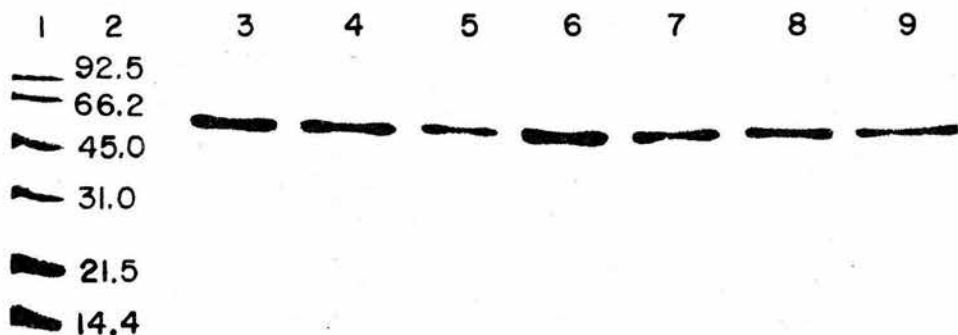
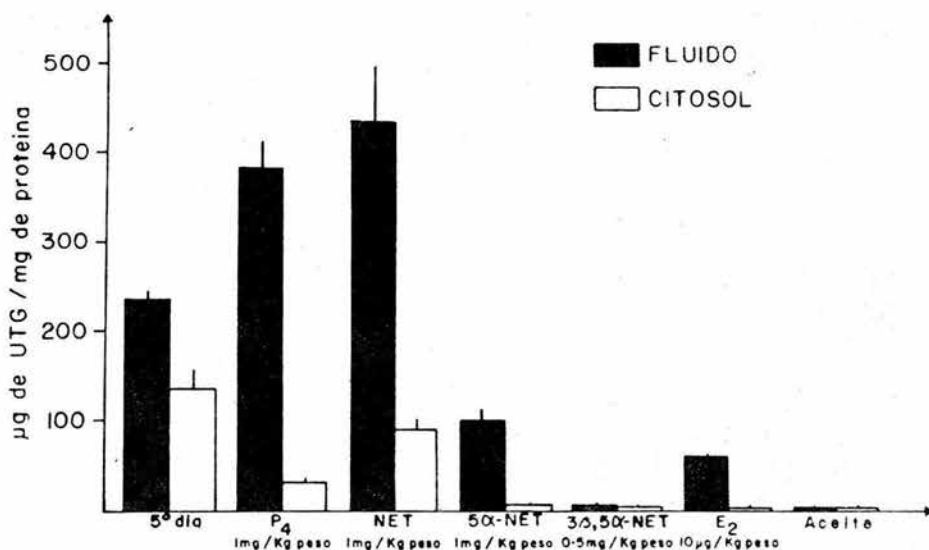


Figura 4. Patrones electroforéticos presentados por los fluidos uterinos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12% - DSS. Se depositaron 10 μ g de proteínas de cada muestra en cada uno de los carriles de la placa. De izquierda a derecha se tiene: los marcadores de peso molecular (1), 2 μ g del estándar de UTG (2), fluido uterino de coneja con cinco días de gestación (3), P₄ (4), NET (5), 5 α -NET (6), 3 β ,5 α -NET (7), E₂ (8) y aceite (9) respectivamente. La electroforesis se realizó a voltage constante (100 V/placa).

Se estandarizó el RIA de doble anticuerpo, específico para UTG, con una sensibilidad de 1 ng/ml, para cuantificar la concentración de esta proteína en cada una de las muestras. En base a este método se encontró la máxima inducción de UTG en los grupos tratados con NET y P₄. Los resultados obtenidos del ensayo se muestran en la gráfica 1.



Gráfica 1. Efecto de la P₄, NET, 5α-NET, 3β,5α-NET y E₂ en la concentración de UTG en el citosol y fluido uterino de la coneja prepúber. La UTG fue cuantificada con un RIA de doble anticuerpo. Cada barra representa la media (\bar{X}) \pm la D.E. de cinco conejas (n=5).

Los resultados del RIA fueron analizados en base a la concentración de proteínas, por ml de fluido y en % de las proteínas totales. Los datos se presentan en la tabla I.

TRATAMIENTO	PROTEINAS mg/ml	UTEROGLOBINA µg/ml	UTG/PROT µg/mg
5 ^o . Día			
F	0.922	152.75 ± 23.17	252.5 ± 9.43
C	9.600	230.00 ± 8.66	155.5 ± 25.89
Progesterona			
F	0.131	34.28 ± 2.75	397.0 ± 28.98
C	10.560	52.05 ± 3.77	32.2 ± 2.33
NET			
F	0.350	123.75 ± 16.63	457.0 ± 64.10
C	12.300	160.37 ± 22.40	99.5 ± 13.37
5α-NET			
F	0.028	0.55 ± 0.07	102.82 ± 10.28
C	11.100	2.95 ± 0.29	0.49 ± 0.06
3β,5α-NET			
F	0.025	1.73 ± 0.03	40.50 ± 1.36
C	10.600	1.03 ± 0.03	1.63 ± 0.03
Estradiol			
F	0.080	0.74 ± 0.04	59.96 ± 1.93
C	10.800	4.95 ± 0.15	0.07 ± 0.00
Aceite			
F	-----	0.05 ± 0.01	-----
C	7.400	0.22 ± 0.01	0.07 ± 0.01

Tabla I. Efecto de la P₄, NET, 5α-NET, 3β,5α-NET y E₂ en la concentración de UTG en el citosol (C) y fluido uterino (F) de la coneja prepúber. La UTG fue cuantificada por RIA. Cada dato representa la media (\bar{X}) ± la D.E. de cinco conejas (n=5). El análisis estadístico se realizó con un Análisis de Varianza. Todos los datos fueron significativamente diferentes con una p=0.005 excepto los grupos II y III [P₄ y NET (fluidos uterinos)] p=0.1 y los grupos I y VI [E₂ y aceite (citosoles uterinos)] p=0.5.

El ARN total extraído de endometrio de coneja con cinco días de gestación, de conejas prepúberes tratadas con P₄ (1 mg/kg), NET (1 mg/Kg), 5 α -NET (1 mg/Kg), 3 β ,5 α -NET (0.5 mg/Kg), E₂ (10 μ g/Kg), y aceite de ajonjolí, así como los extraídos de hígado de coneja y fibroblastos humanos fueron desnaturalizados con formaldehído, fraccionados en un gel de agarosa, transferidos a papel de nitrocelulosa e hibridados con el ADNc de UTG marcado con [α -³²P]dATP y expuestos a una película radiosensible para medir el ARNm de UTG endometrial; la autoradiografía resultante se muestra en la figura 5. En esta figura se puede observar que la concentración del ARNm de UTG, presente en la población de ARNms, varía de acuerdo con los tratamientos, la máxima inducción es observada en el control positivo; es decir las conejas adultas con cinco días de gestación; la P₄ incrementa 10 veces la concentración de ARNm de UTG, mientras que la NET la incrementa 14 veces [comparados con el control basal (aceite)]. 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET y E₂ únicamente indujeron un incremento ligeramente mayor que el control basal, en la síntesis de ARNm de UTG. También es posible observar algunas bandas de alto peso molecular (menor que 28S) principalmente en el control positivo y en el tratamiento correspondiente a NET, aunque P₄ también las presenta un poco más tenues.

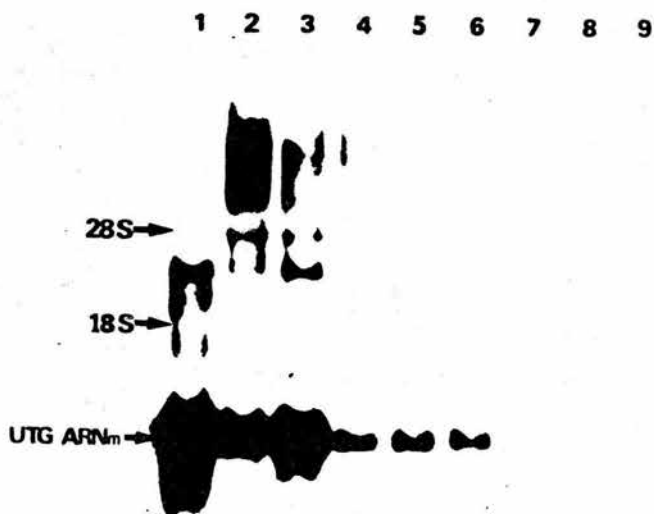


Figura 5. Detección del ARNm para UTG por "Northern blot". Los ARNs totales fueron desnaturalizados con formaldehído 2.2 M, fraccionados en un gel de agarosa al 1.1%, y transferidos a papel de nitrocelulosa por "Northern blotting". Los filtros fueron hibridizados con el ADNc de UTG de coneja marcado con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ por "Nick Translation". Todos las muestras contenían 20 μg de ARN total de endometrio preparados de: conejas con cinco días de gestación (1), conejas tratadas con P_4 (2), con NET (3), con $5\alpha\text{-NET}$ (4), con $3\beta,5\alpha\text{-NET}$ (5) y con E_2 (6). Los ARNs utilizados como control negativo se muestran en los carriles 7, 8, y 9; siendo preparados: de úteros de conejas inyectadas únicamente con el vehículo (aceite de ajonjolí), de hígado de coneja y de fibroblastos humanos respectivamente.

Por otra parte, el filtro de nitrocelulosa fue teñido después de la autoradiografía con azul de metileno para verificar la transferencia e integridad del ARN. Como se puede observar en la figura 6 los ARNs no están desnaturalizados excepto en el carril 2 (ARN de hígado de coneja), se encuentran bien fraccionados, esto es indicado por la separación de los ARNr 28S y 18S; y las concentraciones de ARN son similares en todos los carriles (20 μ g).

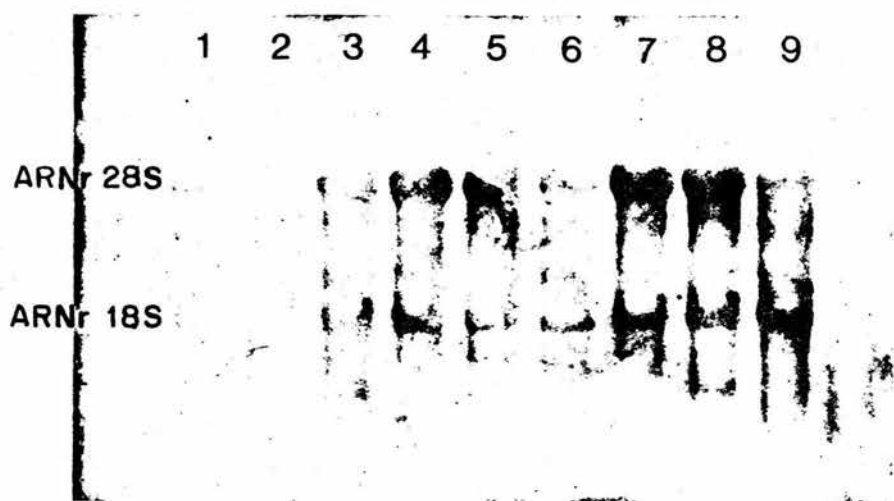
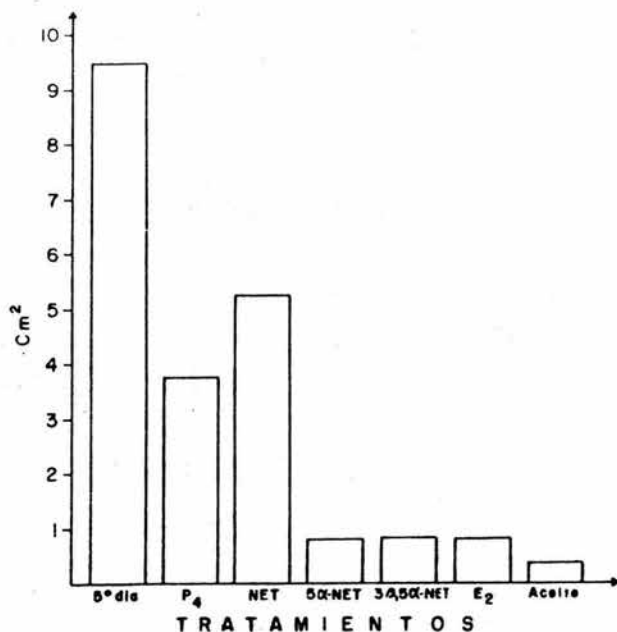


Figura 6. Filtro de nitrocelulosa teñido con azul de metileno. Después de la autoradiografía el filtro de nitrocelulosa fue teñido con azul de metileno como se describe en material y métodos. En el filtro se encuentran transferidos los siguientes ARNs: de fibroblastos humanos (1), de hígado de coneja (2), de conejas sin tratamiento hormonal (aceite) (3) y de conejas tratadas con: E₂ (4), 3 β ,5 α -NET (5), 5 α -NET (6), NET (7), P₄ (8) y de conejas con cinco días de gestación (9).

La autoradiografía fue monitoreada en un densitómetro a 580 nm para obtener los trazos densitométricos de cada uno de los carriles. Cada trazo densitométrico se integró para calcular el área bajo la curva. Los resultados se presentan en la gráfica 2.



Gráfica 2. Resultados del análisis densitométrico. Cada uno de los carriles de la autoradiografía de la Fig. 5 se analizó en un densitómetro a 580 nm y se calculó el área bajo la curva de cada uno de los trazos densitométricos (datos de un experimento).

V. DISCUSION

La actividad progestacional de las hormonas naturales y sintéticas se ha evaluado tradicionalmente por el análisis de los cambios histológicos provocados en el endometrio de la coneja siendo estos últimos la base de los estudios fisiológicos y farmacológicos de las pruebas de Clauberg (51a) y McGinty (15). Los efectos hormonales producen cambios a través de diferentes mecanismos y debido al extenso conocimiento de estos efectos, se consideró importante tratar de estudiar los mecanismos moleculares a través de los cuales se basa la acción de estas progestinas en el endometrio de la coneja. Para este fin se tomó como modelo la UTG (43,46,67) o blastocinina (18) a través del análisis de la regulación de la síntesis y secreción de esta proteína, la cual como antes se mencionó, es secretada en mayor proporción en los primeros días de la gestación de la coneja (1 - 5 días) (17,18,68,69,71,107).

Los resultados de nuestros estudios demostraron que la síntesis y secreción de UTG es inducida por P_4 exógena en la coneja prepúber de una manera similar a lo que se observa con la P_4 endógena en la coneja gestante, confirmando y ampliando las observaciones previas de Loosfelt et al. (21), Kopu et

al. (54), Xiao-Zhou et al. (56), Kumar et al. (57) y Beato et al. (72). En efecto la administración de P_4 a la dosis diaria de un mg durante cinco días, incrementó de una manera significativa la concentración de esta proteína tanto en el citosol como en el fluido uterino (Tabla I y Gráfica 1) superando los niveles alcanzados en la coneja gestante. Es interesante señalar el paralelismo observado entre los resultados obtenidos con los tres métodos analíticos utilizados para la estimación de UTG. Las figuras 1, 2, 3, 4 y la gráfica 1 indican claramente la respuesta a la administración exógena de P_4 en términos de UTG determinada por doble difusión, electroforesis en geles de poliacrilamida-DSS y RIA.

Una vez optimizados estos procedimientos analíticos se procedió a evaluar la potencia progestacional de la NET, utilizando el modelo de la UTG endometrial. Como ya se describió la NET es una progestina sintética derivada de la 19-nortestosterona que es ampliamente utilizada en medicina reproductiva (2). La administración sistémica de NET a conejas prepúberes en una dosis similar a la de P_4 fue capaz de inducir un incremento significativo en la síntesis y secreción de UTG, como se muestra en la gráfica 1. La concentración de UTG inmunoreactiva inducida por NET fue

similar a la que se indujo con una dosis similar de P_4 ($p = 0.1$). Estos resultados sugieren que la progestina sintética (19-nor) utilizada, podría ejercer sus efectos a nivel endometrial de una manera idéntica a como lo hace la hormona natural (P_4); ya que fue capaz de inducir la síntesis y secreción de una proteína regulada específicamente por la acción de P_4 (21,44,54,56,81).

Los resultados obtenidos en esta fase del estudio planteaban la posibilidad de que NET al igual que P_4 estuviera activando el gene de UTG. Para resolver este cuestionamiento decidimos estudiar el efecto de P_4 y NET sobre la concentración de ARNm específico de UTG en el útero de la coneja prepúber comparándolo con lo que ocurre en el útero gestante. La detección del ARNm de UTG se realizó a través de un procedimiento de hibridación molecular tomando ventaja de la disponibilidad del ADNc de UTG. Los resultados obtenidos en estos experimentos demostraron que la administración parenteral de P_4 indujo un incremento significativo en las concentraciones de ARNm específico de UTG en el útero de animales prepúberes (Fig. 5 y Gráfica 2), lo cual ocurrió en forma concomitante con el incremento de la concentración de UTG (Gráfica 1). Esta información que confirma y amplía los datos previos de Atger et al. (44),

Kopu et al. (54), Bullok et al. (74) y Heins et al (78), apoyan fuertemente el concepto de que la síntesis de UTG, inducida por progesterona, es mediada por una activación a través del genoma celular. Es interesante señalar que la concentración de ARNm específico de UTG, en las conejas tratadas con P₄, no alcanzó los niveles observados en el animal con cinco días de embarazo (Fig. 5), esta observación difiere de los resultados obtenidos en la determinación de la concentración de UTG (Gráfica 1 y Tabla I); si esta diferencia obedece al enorme estímulo estrogénico (55,58,79) en el animal gestante no puede ser elucidado en este estudio y requiere trabajo experimental adicional.

Los animales tratados con NET mostraron también un incremento notable en las concentraciones tisulares de ARNm específico de UTG, incremento que ocurrió en forma simultánea a la síntesis de UTG. Esta novel observación apoya la idea de que NET podría ejercer su efecto progestacional de una manera idéntica a como lo hace P₄ a pesar de sus grandes diferencias estructurales. Estos datos están también en paralelo con la demostración de una alta afinidad de la molécula de NET por el receptor de P₄ (11). Nuestros datos están en franca contradicción con los presentados por Arthur y Chang (108) quienes en 1974 postularon que debido a la

ausencia del metilo angular (C-19), la molécula de NET y las progestinas relacionadas estructuralmente eran incapaces de inducir la síntesis de UTG. La explicación a esta diferencia de resultados obedece a razones estrictamente metodológicas ya que las técnicas analíticas para cuantificar UTG utilizadas por estos investigadores (108) no eran apropiadas ni podían dar una estimación cuantitativa.

Cuando se compararon los resultados obtenidos en los animales tratados con NET con los tratados con P₄ se observó que la progestina sintética tuvo un efecto ligeramente mayor que la hormona natural en la concentración de ARNm de UTG (Fig. 5). Este hallazgo es similar al observado en la concentración de UTG, ratificando que la inducción de la proteína es a través de la activación hormonal de su gene.

Debido a que la administración sistémica de progestinas sintéticas tanto en el humano como en diversas especies de mamíferos es inmediatamente seguida por su biotransformación enzimática en otros derivados que retienen diversos tipos de actividad hormonal (14), creímos de interés evaluar en nuestro modelo experimental los efectos que diversos cambios estructurales en la molécula de NET, en particular la reducción en su anillo A, tienen sobre la activación a nivel

transcripcional del gene de UTG. En una serie de estudios realizados previamente en este laboratorio se ha demostrado que la NET es biotransformada a nivel de los órganos blanco a 5α -NET, a $3\beta,5\alpha$ -NET y a su alcohol isomérico 3α (15). Estos productos de biotransformación exhiben diferentes grados de afinidad con los receptores putativos intracelulares de hormonas esteroides (11) y manifiestan efectos hormonales diversos (4,5). En base a estas consideraciones se seleccionaron dos de estos derivados: 5α -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET para examinar su potencia progestacional comparandola con la molécula de la que derivan. Los resultados obtenidos demostraron que la administración sistémica de la 5α -NET ejerce un efecto mínimo sobre la activación del gene de UTG a juzgar por las bajas concentraciones tanto de la proteína (Tabla I y Gráfica 1) como de su ARNm (Fig. 5 y Gráfica 2) encontradas después de su administración. Por otra parte la administración del $3\beta,5\alpha$ -NET disminuyó aún mas la potencia progestacional de la 5α -NET ya que este compuesto tetrahidro derivado de la NET no modificó las concentraciones de ARNm específico en el útero. Estas observaciones nos permiten concluir que la reducción enzimática en 5α y la posterior en 3β suprimen la potencia progestacional de NET y le confiere otro tipo de actividad hormonal. En efecto estudios previos de Chávez et al. (11) han demostrado que el $3\beta,5\alpha$ -NET se une

con el receptor intracelular de E_2 a pesar de no tener un anillo A fenólico y de no aromatizarse enzimáticamente. Es por demás señalar que el comportamiento de el $3\beta,5\alpha$ -NET mimetiza el efecto de estradiol en términos de sus efectos sobre el gene de UTG. En efecto los resultados obtenidos en términos de 5α -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET fueron similares a los observados cuando se administró E_2 en los animales prepúberes, (Graficas 1, 2 y Fig. 5). Uno de los hallazgos más sorprendentes fue la ausencia de actividad progestacional de 5α -NET particularmente, ya que este compuesto interacciona con una actividad relativamente adecuada con el sitio activo del receptor de P_4 ($K_i = 2.6 \times 10^{-7}$ M). Debe recordarse sin embargo que la interacción de un compuesto dado con un receptor no necesariamente se traduce en una respuesta biológica inherente a este tipo de receptor, ya que existe evidencia experimental de que un compuesto dado que se une a un receptor putativo para este compuesto puede manifestar efectos hormonales, antihormonales o bien sinergizar la acción hormonal que dicho compuesto posea. Este podría ser el caso del 5α -NET; el cual interacciona con el receptor de andrógenos y que presenta efectos androgénicos y antiandrogénicos evaluados a través de la actividad de la β -glucuronidasa renal del raton (cepa Balb C); estos conocimientos podrían sugerir que la 5α -NET pudiera tener un

efecto antiprogestacional debido a la discordancia entre la afinidad relativamente alta que presenta este compuesto por el receptor de P_4 y su baja actividad progestacional en cuanto a la síntesis de UTG, además existe evidencia que denota que el 5α -NET exhibe propiedades que evitan la implantación embrionaria en varias especies de mamíferos (109), lo que ha motivado al planteamiento de nuevos objetivos que coadyuven a dilucidar si este metabolito 5α -reducido de la NET podría comportarse realmente como un antiprogestágeno.

VI. CONCLUSIONES

La evaluación global de los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permite presentar cuatro conclusiones importantes.

1. La uteroglobina es un excelente modelo para evaluar la actividad progestacional de progestinas naturales y sintéticas.
2. La noretisterona manifiesta una actividad progestacional similar a la de progesterona en cuanto a la síntesis y secreción de la uteroglobina.
3. Las reducciones del anillo A de la noretisterona reducen dramáticamente su actividad progestacional en este modelo.
4. La afinidad relativamente alta de la 5 α -NET por el receptor de progesterona ($K_i = 2.6 \times 10^{-7}$ M) no correlaciona adecuadamente con la disminución de su actividad progestacional; pero sí con un efecto antiprogestacional, lo cual conduce al planteamiento de nuevos objetivos.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Malthus, T. R. **Ensayo sobre el principio de la población.** Ed. F.C.E. México, 1977.
- 1a. Diczfalusy, E. Riesgos, beneficios y controversias en el uso de anticonceptivos de acción prolongada. En **Avances recientes en regulación de la fertilidad.** eds. G. Pérez-Palacios, J. Garza-Flores y P. E. Hall. Ed. Piensa. México, 1987. pp. 1-16.
2. McGynty D. A. y Djerassi, C. Some chemical and biological properties of 19-nor-17 α -ethynyltestosterone. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 71: 500-515, 1958.
3. Goebelsman, U., Stancyk, F. Z. y Brenner, P. Serum norethisterone concentrations following intramuscular norethindrone oenanthate injection: effect upon serum LH, FSH, estradiol and progesterone. **Contraception** 19: 283-315, 1979.
4. Hilliard, J., Croxatto, H.B., Hayward, J.N. y Sawyer, C.H. Norethindrone blockade of LH release to intrapituitary infusion of hypothalamic extract. **Endocrinology** 79: 411-419, 1966.
5. Revesz, C., Chappel, C. I. y Gaudry, R. Masculinization of female fetuses in the rat by progestational compounds. **Endocrinology** 66: 140-144, 1960.
6. Jensen, E. V. y Jacobson, H. I. Basic guides to the mechanism of estrogen action. **Recent Prog. Horm. Res.** 18: 387-414, 1962.
7. Milgrom, E. "Cloning of "marker" cDNA's: Perspectives in clinical and experimental endocrinology". **J. Steroid Biochem.** 18(4): 511-512, 1983.
8. Pérez-Palacios, G., Fernández-Aparicio, M. A., Medina, M., Zacarias-Villareal, J. y Ulloa-Aguirre, A. On the mechanism of action of progestins. **Acta Endocrinol. (copenh.)** 97: 320-328, 1981.
9. Pérez-Palacios, G., Chávez, B., Escobar, N., Vilchis, F., Larrea, F., Lince, M. y Pérez, A. E. Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. **J. Steroid Biochem.** 15: 125-130, 1981.

10. MacLusky, N. J. y McEwen, B. S. Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274: 276-278, 1978.
11. Chávez, B., Vilchis, F., Pérez, A. E., García, G. A., Grillasca, I. y Pérez-Palacios, G. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J. Steroid Biochem.* 22: 121-126, 1985.
12. Braselton, W. E., Lin, T. J., Ellegood, J. O., Mills, T. M. y Mahesh, V. B. Accumulation of norethisterone and individual metabolites in human plasma during short and long-term administration of contraceptive dosage. *Am. J. Obstet. Gynec.* 133: 154-160, 1979.
13. Lemus, A. E., Damsky, R., Enríquez, J., García, G. A., Vilchis, F. y Pérez-Palacios, G. Efecto de noretisterona y de sus metabolitos 5 α -reducidos sobre la inducción de la pubertad en la rata hembra. (Resumen No. 2) **XI Reunión Bianual de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana y XIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción.** 21-25 de mayo de 1988. Puerto Vallarta, Jal. México.
14. Vilchis, F., Chávez, B., Pérez, A. E., García, G. A., Angeles, A. y Pérez-Palacios, G. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *J. Steroid Biochem.* 24: 525-531, 1986.
15. Larrea, F., Vilchis, F., Chávez, B., Pérez, A. E., Garza-Flores, J. y Pérez-Palacios, G. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J. Steroid Biochem.* 27: 657-663, 1987.
16. Lutwak-Mann, C. Some properties of uterine and cervical fluid in the rabbit. *Biochim. Biophys. Acta* 58: 637-639, 1962.
17. Beier, H. M. Uteroglobulin: a hormone sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim. Biophys. Acta* 160: 289-291, 1968.
18. Krishnan, R. S. y Daniel, J. C., Jr. "Blastokinin": inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Science* 158: 490-492. 1967.

19. Dunbar, B. S. y Daniel, J. C., Jr. High molecular weight components of rabbit uterine fluids. **Biol. Reprod.** 21: 723-733, 1979.
20. Kirchner, C. Non-uteroglobin proteins in the rabbit. En **Steroid Induced Uterine Proteins.** ed. M. Beato. Ed. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press. Amsterdam, 1980. pp. 69-86.
21. Loosfelt, H., Fridlansky, F., Savouret, J. F., Atger, M. y Milgrom, E. Mechanism of action of progesterone in the rabbit endometrium. Induction of uteroglobin and its messenger RNA. **J. Biol. Chem.** 256: 3465-3470, 1981.
22. Goswami, A. y Feigelson, M. Differential regulation of a low molecular weight protein in oviductal and uterine fluids by various hormones. **Endocrinology** 95: 669-675, 1975.
23. Kirchner, C. Uteroglobin in the rabbit. **Cell Tiss. Res.** 170: 415-424, 1976.
24. Noske, I. G. y Feigelson, M. Immunological evidence of uteroglobin (blastokinin) in the male reproductive tract and in non-reproductive ductal tissues and their secretion. **Biol. Reprod.** 15: 704-713, 1976.
25. Beier, H. M., Kirchner, C. y Mootz, U. Uteroglobin-like antigen in the pulmonary epithelium and secretion of the lung. **Cell Tiss. Res.** 190: 15-25, 1978.
26. Savouret, J. F., Loosfelt, H., Atger, M. y Milgrom, E. Differential hormonal control of a messenger RNA in two tissues. Uteroglobin RNA in the lung and the endometrium. **J. Biol. Chem.** 255: 4131-4136, 1980.
27. Krishnan, R. S. Effect of passive administration of antiblastokinin on blastocyst development and maintenance of pregnancy in rabbits. **Experientia** 27: 955-965, 1971.
28. El Banna, A. A. y Daniel, J. C., Jr. Stimulation of rabbit blastocysts in vitro by progesterone and uterine proteins in combination. **Fertil. Steril.** 23: 101-104, 1972.
29. Mukherjee, A. B., Ulane, R. E. y Agrawal, A. K. Role of uteroglobin and transglutaminase in masking the antigenicity of implanting rabbit embryos. **Am. J. Reprod. Immunol.** 2: 135-141, 1982.

30. Mukherjee, A. B., Cordella-Miele, E., Kikukawa, T. y Miele, L. Modulation of cellular response to antigens by uteroglobin and transglutaminase. En **Advances in post-translational modifications of proteins and aging**. eds. R. Porta y F. Wold. Ed. Plenum Publishing Corporation. Nueva York, E. U., 1988. pp. 135-152.
31. Beier, H. M., Bohn, H. y Müller, W. Uteroglobin-like antigen in male genital tract secretions. **Cell Tiss. Res.** 165: 1-11, 1975.
32. Arthur, A. T., Cowan, B. D. y Daniel, J. C., Jr. Steroid binding to blastokinin. **Fertil. Steril.** 23: 85-92, 1972.
33. Fridlansky, F. y Milgrom, E. Interaction of uteroglobin with progesterone 5-alpha pregnane 3,20 dione and estrogens. **Endocrinology** 99: 1244-1251, 1976.
34. Nieto, A. y Lombardero, M. Uteroglobin-like antigen in species of lagomorpha. **Comp. Biochem. Physiol.** 71b: 511-514, 1982.
35. Daniel, J. C., Jr. A blastokinin-like component from the human uterus. **Fertil. Steril.** 24: 326-358, 1973.
36. Kikukawa, T., Cowan, B. D., Tejada, R. I. y Mukherjee, A. B. Partial characterization of a uteroglobin-like protein in the human uterus and its temporal relationship to prostaglandin levels in this organ. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 67: 315-321, 1988.
37. Dhanireddy, R., Kikukawa, T. y Mukherjee, A. B. Detection of a rabbit uteroglobin-like protein in human neonatal tracheobronchial washings. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 152: 1447-1454, 1988.
38. Manyak, M. J. Kikukawa, T. y Mukherjee, A. B. Expression of a uteroglobin-like protein in human prostate. **J. Urol.** 140: 176-182, 1988.
39. Ponstingl, H., Nieto, A. y Beato, M. Aminoacid sequence of progesterone-induced rabbit uteroglobin. **Biochemistry** 17: 3908-3912, 1978.
40. Tancredi, T., Temussi, P. A., y Beato, M. Interaction of oxidized and reduced uteroglobin with progesterone. **Eur. J. Biochem.** 122: 101-104, 1982.

41. Mornon, J. P., Fridlansky, F., Bally, R. y Milgrom, E. Characterization of two new crystal forms of uteroglobin. *J. Mol. Biol.* 127: 237-239, 1979.
42. Mornon, J. P., Fridlansky, F., Bally, R. y Milgrom, E. X-Ray crystallographic analysis of a progesterone binding protein. The C222, crystal form of oxidized uteroglobin at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 137: 415-429, 1980.
43. Atger, M., Mornon, J. P., Svouret, J. F., Loosfelt, H., Fridlansky, F. y Milgrom, E. Uteroglobin: A model for the study of the mechanism of action of steroid hormones. En **Steroid Induced Uterine Proteins**. ed. M. Beato. Ed. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press. Amsterdam, 1980. pp. 341-350.
44. Atger, M. y Milgrom, E. Progesterone induced messenger RNA. Translation, purification and preliminary characterization of uteroglobin mRNA. *J. Biol. Chem.* 252: 5412-5418, 1977.
45. Bullock, D. W., Woo, S. L. C. y O'Malley, B. W. Uteroglobin messenger RNA: translation in vitro. *Biol. Reprod.* 15: 435-443, 1976.
46. Levey, I. L. y Daniel, J. C., Jr. Isolation and translation of blastokinin mRNA. *Biol. Reprod.* 14: 163-174, 1976.
47. Atger, M., Mercier, J. C., Haze, G. Fridlansky, F. y Milgrom, E. N-terminal sequence of uteroglobin and its precursor. *Biochem. J.* 177: 985-988, 1979.
48. Beato, M. y Rungger, D. Translation of the messenger RNA for rabbit uteroglobin in *Xenopus* oocytes. *FEBS lett.* 59: 305-309, 1975.
49. Beato, M. y Nieto, A. Translation of the mRNA for rabbit uteroglobin in cell-free systems. Evidence for a precursor protein. *Eur. J. Biochem.* 64: 15-25, 1976.
50. Atger, M., Savouret, J. F. y Milgrom, E. Synthesis purification and characterization of a DNA complementary to uteroglobin messenger RNA. *J. Steroid Biochem.* 13: 1157-1162, 1980.
51. Arnemann, J. F., Heins, B. y Beato, M. Synthesis and characterization of a DNA complementary to pre-uteroglobin mRNA. *Eur. J. Biochem.* 99: 361-367, 1979.

- 51a. Clauberg, C. **Die weiblichen sexual hormone.** ed. J. Springer. Ed. Springer-Verlag. Berlin, 1933. pp. 88-100.
52. Moen, R. C. y Palmiter, R. D. Changes in hormone responsiveness of chick oviduct during primary stimulation with estrogen. *Dev. Biol.* 78: 450-463, 1980.
53. Loosfelt, H., Fridlansky, F., Atger, M. y Milgrom, E. A possible non-transcriptional effect of progesterone. *J. Steroid Biochem.* 15: 107-110, 1981.
54. Kopu, H. T., Hemminki, S. M., Torkkeli, T. K. y Jänne, O. A. Hormonal control of uteroglobin secretion in rabbit uterus. Inhibition of uteroglobin messenger ribonucleic acid accumulation by oestrogen and anti-oestrogen administration. *Biochem. J.* 180: 491-500, 1979.
55. Isomaa, V., Isotalo, H., Orava, M., Torkkeli, T. K. y Jänne, O. A. Changes in cytosol and nuclear progesterone receptor concentrations in the rabbit uterus and their relation to induction of progesterone-regulated uteroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88: 1237-1243, 1979.
56. Xaio-Zhou, S., Ming-Jer, T., Bullock, D. W. y Woo, S.L. C. Hormonal regulation of rabbit uteroglobin gene transcription. *Endocrinology* 112: 871-876, 1983.
57. Kumar, N. M. y Bullock, D. W. Hybridization analysis of steady state levels of uteroglobin mRNA in rabbit uterus and lung during early pregnancy. *J. Endocrinol.* 94: 1420-1424, 1982.
58. Daniel, J. C., Jr. Factors influencing uteroglobin synthesis. En *Steroid induced Uterine Proteins.* ed. M. Beato. Ed. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press. Amsterdam, 1980. pp. 87-103.
59. Torkkeli, T. K., Kontula, K. K. y Jänne, O. A. Hormonal regulation of uterine blastokinin synthesis and occurrence of blastokinin like antigens in nonuterine tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 9: 101-118, 1977.
60. Torkkeli, T. K., Krusius, T. y Jänne, O. A. Uterine and lung uteroglobins in the rabbit. Two similar proteins with differential hormonal regulations. *Biochim. Biophys. Acta* 544: 578-592, 1978.

61. Lombardero, M. y Nieto, A. Glucocorticoid and developmental regulation of uteroglobin synthesis in rabbit lung. *Biochem. J.* 200: 487-494, 1981.
62. Atger, M., Perricaudet, M., Tiollais, P. y Milgrom, E. Bacterial cloning of the rabbit uteroglobin structural gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93: 1082-1088, 1980.
63. Snead, R., Day, L., Chandra, T., Mace, M. R., Jr., Bullock, D. W. y Woo, S. L. C. Mosaic structure and mRNA precursors of uteroglobin - a hormone-regulated mammalian gene. *J. Biol. Chem.* 256: 11911-11916, 1981.
64. Menne, C. Suske, G., Arnemann, J., Wenz, M., Cato, A. C. B. y Beato, M. Isolation and structure of the gene for the progesterone-inducible protein uteroglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 4853-4857, 1982.
65. Atger, M., Atger, P., Tiollais, P. y Milgrom, E. Cloning of rabbit genomic fragments containing the uteroglobin gene. *J. Biol. Chem.* 256: 5970-5972, 1981.
66. McGinty, D. A., Anderson, L. P. y McCullough, N. B. Effect of local application of progesterone on the rabbit uterus. *Endocrinology* 24: 829-832, 1939.
67. Savouret, J. F. y Milgrom, E. Uteroglobin: a model for the study of progesterone action in mammals. *DNA* 2: 99-104, 1983.
68. Jänne, O. A., Isomaa, V. V., Torkkeli, T. K., Isotalo, H. E. y Kopu, H. T. Hormonal regulation of uteroglobin synthesis in the rabbit uterus. En **Progesterone and progestins**. eds. Bardin, C. W., Milgrom, E. y Mauvais-Jarvis, P. Ed. Raven Press. Nueva York, E. U., 1983. pp. 33-47.
69. Logeat, F., Loosfelt, H., Atger, M., Vu Hai, M. T. y Milgrom, E. Mechanism of progesterone action in the endometrium. En **Progesterone and progestins**. eds. Bardin, C. W., Milgrom, E. y Mauvais-Jarvis, P. Ed. Raven Press. Nueva York, E. U., 1983. pp. 49-57.
70. Beato, M., Arnemann, J., Heins, B., Müller, H. y Nieto, A. Correlation between uteroglobin synthesis and uteroglobin mRNA content in rabbit endometrium. En **Steroid Induced Uterine Proteins**. ed. M. Beato. Ed. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press. Amsterdam, 1980. pp. 351-368.

71. Feigelson, M., Noske, I. G., Goswami, A. K. y Kay, E. Reproduction tract fluid proteins and their hormonal control. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 286: 273-286, 1977.
72. Beato, M. y Arnemann, J. Hormone-dependent synthesis and secretion of uteroglobin in insolated rabbit uterus. **FEBS lett.** 58: 126-129, 1975.
73. Beier, H. M. Oviducal and uterine fluids. **J. Reprod. Fertil.** 37: 221-237, 1974.
74. Bullock, D. W. Progesterone induction of messenger RNA and protein synthesis in rabbit uterus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 286: 260-272, 1977.
75. Nieto, M., y Beato, M. Synthesis and secretion of uteroglobin in rabbit endometrial explants cultured in vitro. **Mol. Cell. Endocrinol.** 17: 25-39, 1980.
76. Bullock, D. W. Uterine proteins as markers of progesterone action. En **Steroid Induced Uterine Proteins.** ed. M. Beato. Ed. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press. Amsterdam, 1980. pp. 315-318.
77. Arnemann, J., Heins, B. y Beato, M. Purification and properties of rabbit uterus pre-uteroglobin mRNA. **Nucleic Acids Res.** 4: 4023-4036, 1977.
78. Heins, B. y Beato, M. Hormonal control of uteroglobin secretion and preuteroglobin mRNA content in rabbit endometrium. **Mol. Cell. Endocrinol.** 21: 139-150, 1981.
79. Hemminki, S. M., Kopu, H. T., Torkkeli, T. K. y Jänne, O. A. Further studies on the role of estradiol in the induction of progesterone-regulated uteroglobin synthesis in the rabbit uterus. **Mol. Cell. Endocrinol.** 17: 71-80, 1980.
80. Jänne, O. A. Hemminki, S. M., Isomaa, V. V., Isotalo, E. H., Kopu, H. T., Orava, M. y Torkkeli, T. K. Uteroglobin synthesis and its relationship to changes in progesterone receptors, RNA polymerases and poly (A) polymerases in the rabbit uterus. En **Steroid Induced Uterine Proteins.** ed. M. Beato. Ed. Elsevier/North-Holland, Biomedical Press. Amsterdam, 1980. pp. 319-340.

81. Torkkeli, T. Early changes in rabbit uterine progesterone receptor concentrations and uteroglobin synthesis after progesterone administration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 559-565, 1980.
82. Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. **Molecular cloning. A laboratory manual.** Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Nueva York, E.U., 1982.
83. Walters, M. R. y Clark, J. H. Cytosol and nuclear compartmentalization of progesterone receptors of the rat uterus. *Endocrinology* 103:601-609, 1978.
84. Mayol, R. F. y Longenecker, D. E. Development of a radioimmunoassay for blastokinin. *Endocrinology* 95: 1534-1542, 1974.
85. Thorell, J. I. y Johansson, B. G. High-specific activity labelling of glycoprotein hormones by means of lactoperoxidase (LPO). en *Excerpta Med. ICS.* eds. Margouls, M. y Greenwood, F. C. 241: 531, 1972.
86. Herbert, W. J. Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. En *Handbook of experimental Immunology.* ed. Weir, D. M. Vol. 3, capitulo 2. Blackwell, Oxford.
87. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
88. Ouchterlony, O. **Handbook of Immunodiffusion and Immunelectrophoresis.** Ed. Ann Arbor Science Publ. Ann Arbor, Mich., E.U., 1968.
89. Bradford, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254, 1976.
90. Cathala, G., Savouret, J. F., Mendez, B., West, B. L., Karin, M., Martial, J. A. y Baxter, J. D. A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *DNA* 2: 329-335, 1983.
91. Cox, R. A. The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Meth. Enzymol.* 12B: 120 - 129, 1968.

92. Rice, S. A. y Doty, P. The thermal denaturation of deoxyribose nucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3937 - 3947, 1957.
93. Rave, N., Crkvenjakov, R. y Boedtke, H. Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzyl-oxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acids Res.* 6: 3559-3567, 1979.
94. Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. y Boedtke, H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4743, 1977.
95. Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517, 1975.
96. Thomas, P. S. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 5201-5205, 1980.
97. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. y Hsu, L. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 2110, 1973.
98. Dagert, M. y Ehrlich, S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* 6: 23, 1979.
99. Birnboim, H. C. y Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523, 1979.
100. Sharp, P. A., Sugden, B. y Sambrook, J. Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose. *Biochemistry* 12: 3055, 1973.
101. Frémont, P., Dionne, F. T. y Rogers, P. A. Recovery of biologically functional messenger RNA from agarose gels by passive elution. *Anal. Biochem.* 156: 508-514, 1986.
102. Kelly, R. G., Cozzarelli, N., Deutscher, M. P., Lehman, I. R. y Kornberg, A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 245: 39-45, 1970.

103. Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. y Berg, P. labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113: 237-251, 1977.
104. Maniatis, T., Jeffrey, A. y Kleid, D. G. Nucleotide sequence of a rightward operator of phage "lambda". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 1184-1188, 1975.
105. Suggs, S. V., Wallace, R. B., Hirose, T., Kawashima, E. H. y Itakura, K. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: Isolation of cloned cDNA sequences for human β_2 -microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 6613-6617, 1981.
106. Wahl, G. M., Stern, M. y Stark, G. R. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyl oxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 3683-3687, 1979.
107. Beier, H. M. Physiology of uteroglobin. En **Novel Aspects of Reproductive Physiology**. eds. C. H. Spilman y J. W. Wilks. Ed. SP Medical and Scientific Books, New York and London, 1978. pp. 219-248.
108. Arthur, A. T. y Chang, M. C. Induction of blastokinin by oral contraceptive steroids: implications for fertility control. *Fertil. Steril.* 25: 217-221, 1974.
109. Reel, J. R. R., Humphrey, R. R., Shish, Y., Windsor, B. L., Sakowski, R., Creger, P. L. y Edgren, R. A. Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biologic activity of testosterone and 19-nor testosterone derivatives. *Fertil. Steril.* 31: 557-561, 1979.