

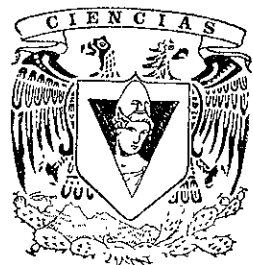


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

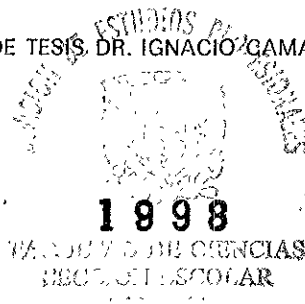
FACULTAD DE CIENCIAS

“REGULACION DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR A PROGESTERONA POR HORMONAS ESTEROIDES Y DURANTE LOS PRIMEROS DIAS DE LA GESTACION EN EL PULMON DEL CONEJO”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
SARA TERESA MENDEZ CRUZ



DIRECTOR DE TESIS, DR. IGNACIO GAMACHO ARROYO



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

263712



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Regulación de la expresión del receptor a progesterona por hormonas
esteroideas y durante los primeros días de la gestación en el pulmón
del conejo,

realizado por Méndez Cruz Sara Teresa

con número de cuenta 8532352-8 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Propietario

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Propietario

Quím. Julia Jeanett Segura Uribe

Suplente

Biól. Christian Humberto Guerra Araiza

Suplente

Biól. Vicente Castrejón Téllez

FACULTAD DE CIENCIAS
U N A M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Este trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el apoyo de una beca tesis de Fundación UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento y gratitud a las siguientes personas que con su valiosa ayuda hicieron posible la realización de este trabajo:

De una manera muy especial al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por su gran apoyo para la realización de esta tesis, su paciencia y su interés en todo momento.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón por sus consejos, comentarios y sugerencias en el trabajo realizado

A Fundación UNAM por otorgarme una beca en el programa de Iniciación Temprana a la Investigación y una beca tesis, con la cual realice este trabajo.

A Julia Segura y Christian Guerra por el apoyo que me han brindado, las sugerencias y revisión de este trabajo.

A todos los integrantes del laboratorio de Endocrinología Molecular: Gaby, Andrea, Mauricio, Adriana, José, Abelardo, Juanita, Francis, Isabel y Margarita, por hacer más agradable todo el trabajo.

Al profesor Vicente Castrejón por sus comentarios y revisión de este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios, por darme fuerzas y la oportunidad de seguir adelante y disfrutar mis triunfos y fracasos, por enseñarme lo hermoso de la vida.

A mi hijo Miguel Angel, por ser mi todo, porque eres el motivo por el cual sigo adelante, eres lo más hermoso que la vida me pudo haber dado.

A mi esposo Rafael, porque a pesar de todo, siempre me tuviste fé y siempre tuve tu apoyo y tu amor, porque quiero seguir adelante contigo, ahora que se me amas y yo a ti.

A mi madre, la Sra. Sara Cruz, por su amor y cariño y por el gran esfuerzo por sacarnos adelante.

A mis hermanos, Mario, Adolfo y Juan Carlos por su amor y travesuras que me han hecho feliz.

A mi hermana Carolina (Nanni) por ser alguien tan especial en mi vida al brindarme tu ayuda y apoyo.

A mi abuela, la Sra. Ana María Herrera, por su gran cariño y su tiempo.

A mi familia, tíos y primos, en especial a Beto y Violeta por estar cerca de mi.

A todos mis amigos de la Facultad de Ciencia que me regalaron momentos tan maravillosos.

GRACIAS.

INDICE	PAG.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	
3.1. Estructura y función de las hormonas esteroides	3
3.2. Mecanismos de acción de las hormonas esteroides	5
3.3. Características de la progesterona (P ₄)	7
3.4. Características y regulación del receptor a progesterona (PR)	9
3.5. P ₄ y embarazo temprano en la coneja	13
3.6. Estructura y función pulmonar	16
3.7. Papel de la P ₄ en el funcionamiento pulmonar	19
3.8. Caracterización del PR en el pulmón	21
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
5. OBJETIVOS	23
6. MATERIALES Y METODOS	
6.1. Animales de experimentación	24
6.2. Extracción de RNA total	25
6.3. Electroforesis del RNA total	27
6.4. Hibridación Northern blot	31
6.5. Análisis densitométrico	35
7. RESULTADOS	36
8. DISCUSION	41
9. CONCLUSIONES	44
10. REFERENCIAS	45
11. APENDICE	54

RESUMEN

La progesterona (P_4) es una hormona esteroide que ejerce múltiples funciones en el organismo, tanto en tejido reproductivo como en otros tejidos periféricos; en el pulmón incrementa la ventilación y reduce la tensión alveolar del bióxido de carbono en el pulmón durante el embarazo en los mamíferos. Las acciones de la P_4 son mediadas por su receptor intracelular (PR). Estudios inmunohistoquímicos han determinado la presencia del PR en el pulmón del conejo. En este trabajo se estudió la expresión del gen del PR tanto en el pulmón de conejas adultas ovariectomizadas tratadas con estradiol (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) por dos días consecutivos y estradiol (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + P_4 (5 mg/kg) al tercer día, como en conejas preñadas durante los primeros 5 días de la gestación. Después de 24 horas de cada tratamiento y en los correspondientes días de la gestación, se extrajo el pulmón, se aisló el RNA total de cada una de las muestras y se llevó a cabo un análisis de la expresión del gen del PR por hibridación tipo Northern blot. Los resultados muestran que el tratamiento con estradiol incrementa la expresión del gen del PR mientras que el tratamiento con P_4 la disminuye. Por otro lado se observó que la expresión del gen del PR se incrementó significativamente el primer día de la gestación y disminuyó progresivamente hasta alcanzar su expresión más baja en el día 5. Estos resultados permiten sugerir que la expresión del gen del PR en el pulmón del conejo es regulada por estradiol y P_4 , cuyos niveles varían durante la gestación y los ciclos reproductivos en los mamíferos.

INTRODUCCION

La P_4 regula distintos procesos fisiológicos en los mamíferos. Muchas de las acciones de esta hormona están mediadas por su receptor intracelular (PR). En el pulmón, se ha observado que la P_4 induce un incremento en la ventilación y disminuye la tensión alveolar del bióxido de carbono, esto último se ha observado en la fase lútea del ciclo menstrual y durante el embarazo en el ser humano. La acción estimuladora de la P_4 en la ventilación está mediada a través de PR localizados tanto en el sistema nervioso central como en el pulmón. Aunque se tienen algunas evidencias sobre el papel del estradiol en la regulación del PR a nivel pulmonar, se desconoce el patrón de expresión de estos receptores en distintas condiciones fisiológicas así como los mecanismos involucrados en su regulación, por lo que en este trabajo se evaluó la expresión del gen del PR en el pulmón del conejo tanto en la gestación temprana como con diferentes tratamientos hormonales por la técnica de Northern blot.

ANTECEDENTES

3.1. Estructura y función de las hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas están involucradas en diferentes procesos biológicos en los mamíferos (Camacho-Arroyo et al, 1995), como la regulación de la proliferación y la diferenciación celular. Así mismo son moléculas que desempeñan un papel muy importante en la regulación de la homeostasis celular, la función reproductiva, el dimorfismo sexual y la respuesta al estrés.

Su estructura básica consiste de un núcleo tetracíclico al cual se le denomina ciclopentanoperhidrofenantreno debido a que presenta tres anillos de seis átomos de carbono y un anillo de cinco átomos de carbono (Gorbman, 1962). Estas se biosintetizan a partir del colesterol en el testículo, ovario, la corteza de las glándulas suprarrenales y en algunos órganos en forma transitoria, que tienen actividad esteroideogénica como la placenta y el hígado fetal.

Las progestinas, glucocorticoides y mineralocorticoides tienen 21 átomos de carbono; los andrógenos 19 y los estrógenos 18 átomos de carbono respectivamente. La separación de los carbonos 20 y 22 de la cadena lateral del colesterol da lugar a los pregnanos, esta serie incluye a la P₄ (Hicks, 1988). En la Fig. 1 se muestra la biosíntesis de las hormonas sexuales a partir del colesterol.

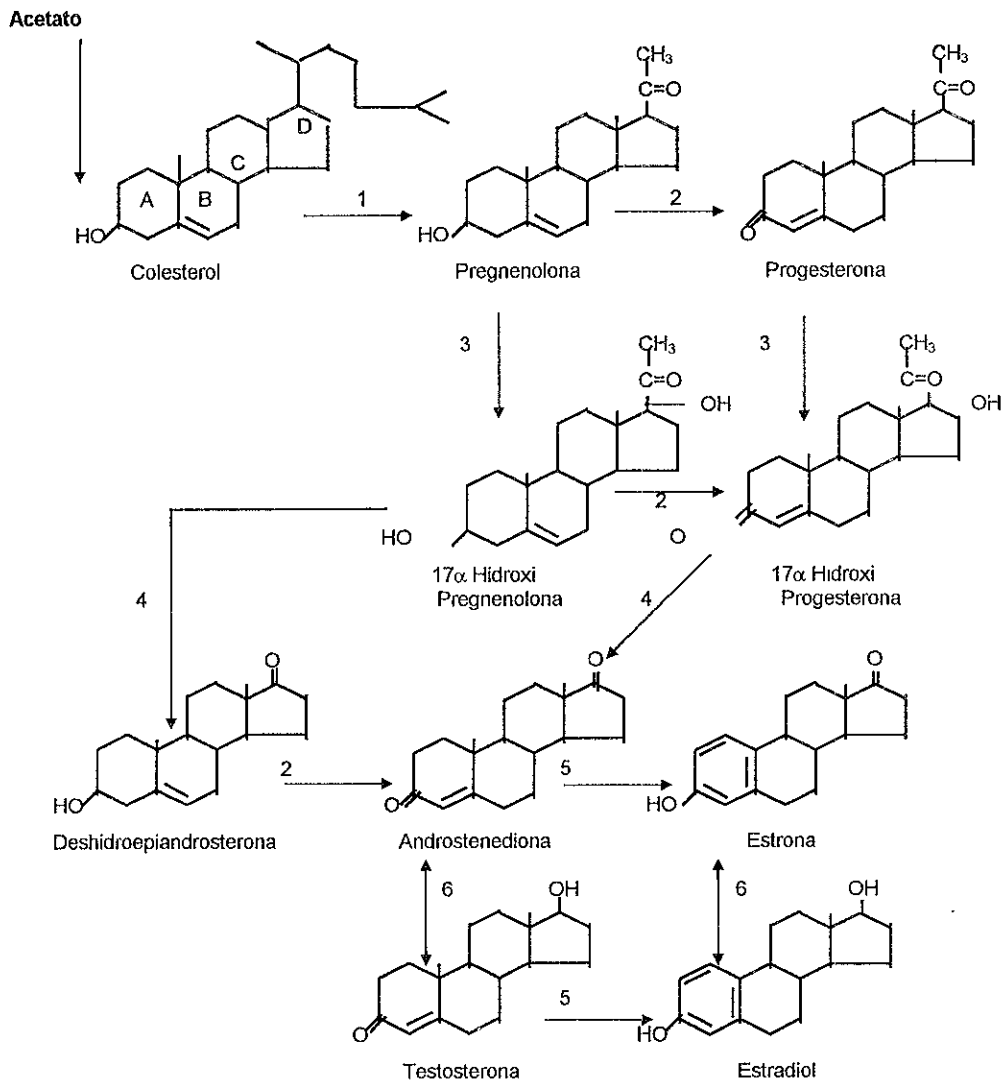


Figura 1. Biosíntesis de los principales esteroides. 1) 20,22 Desmolasa, 2) 3 β -OH deshidrogenasa. 3) 17 α -hidroxilasa, 4) 17,20- esteroide liasa (desmolasa) ,5) aromatasa . 6)17 β -OH-deshidrogenasa (Gore-Langton and Armstrong, 1988).

3.2. Mecanismos de acción de las hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas modulan un gran número de actividades biológicas al actuar sobre sus células blanco modificando la expresión de diferentes genes (Yamamoto, 1985). Los esteroideos se unen a proteínas, como globulinas, que los transportan a las células blanco a través del torrente sanguíneo (proteínas transportadoras). Al llegar a la célula, entran libremente hasta el núcleo donde se unen a su receptor el cual sufre un cambio conformacional y pierde afinidad y se separa de proteínas de choque térmico (como las Hsp 90) a las que se encuentra unido. Los receptores de hormonas esteroideas pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares que incluye entre otros, factores de transcripción que se unen al promotor de ciertos genes (Kraus, 1993).

Los receptores de hormonas esteroideas presentan varios dominios estructurales: una primera región amino-terminal hipervariable con zonas reguladoras de la transcripción de algunos genes; el segundo dominio es el de unión al DNA, de 66 a 68 aminoácidos, que es además una región altamente conservada y controla la actividad transcripcional; presenta dos dedos de zinc que facilitan la unión al DNA. El tercer dominio es una región pobremente conservada y está involucrada en la modulación de la función del receptor; además forma homodímeros (Katzenellenbogen, 1996). El cuarto dominio es el de unión al esteroide y a las Hsp 90 (Landers, 1992).

La unión de la hormona al receptor, activa a este último, lo cual provoca cambios conformacionales que permiten la unión del receptor al DNA con gran afinidad en secuencias específicas llamadas Elementos de

Respuesta a Hormonas (HRE) (Fuller, 1991). A estos elementos de respuesta se pueden unir a otras moléculas y conjuntamente regulan la transcripción de genes específicos. Esta regulación se ve reflejada en diversos cambios fisiológicos posteriores (Fig. 2).

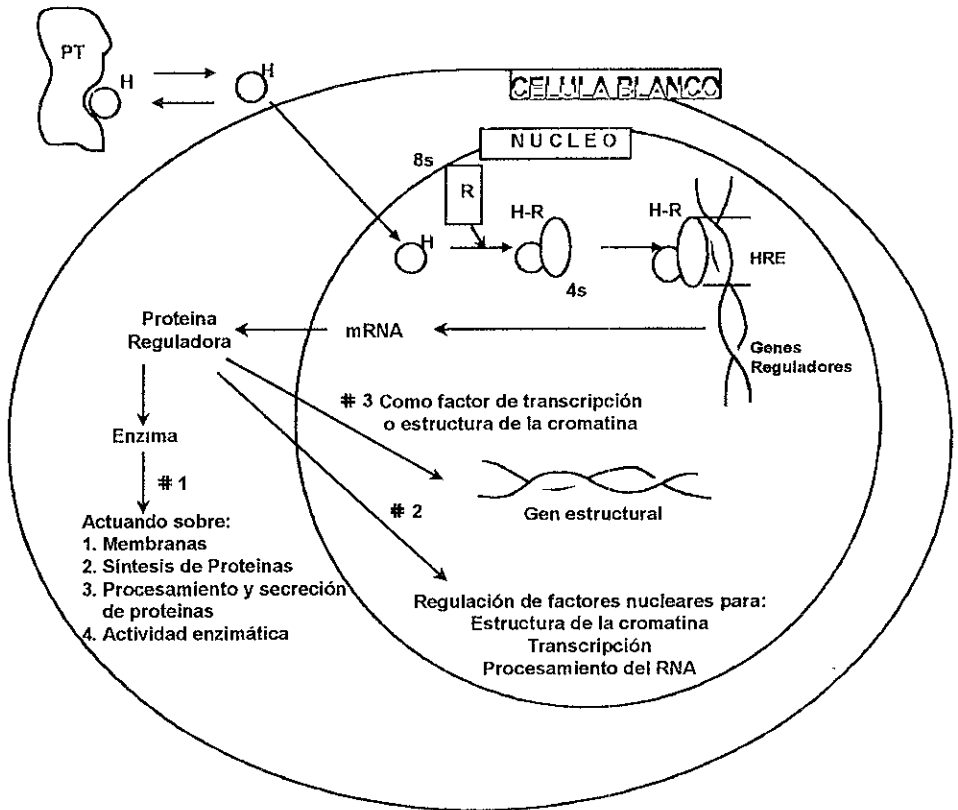


Figura 2. Mecanismo general de acción de las hormonas esteroideas. El receptor activado por la hormona esteroide se une a un elemento de respuesta hormonal localizado en el extremo 5' de un gen específico, regulando así la transcripción de dicho gen. PT= proteína transportadora, R= receptor, H= hormona esteroide, H-R= complejo hormona-receptor activado, HRE= elementos de respuesta a hormonas esteroideas (Landers, 1992).

3.3. Características de la progesterona (P₄)

La P₄ es una hormona esteroide compuesta de 21 átomos de carbono, que se sintetiza a partir del colesterol en el retículo endoplásmico liso en las células del cuerpo lúteo en el ovario, las glándulas suprarrenales y la placenta (Fig. 3). El colesterol es convertido a un elemento intermedio llamado pregnenolona y éste último es el que da origen a la P₄, la cual tiene una vida media corta que va de horas a días según la especie y es metabolizada en el hígado a pregnandiol (Hicks, 1988).

Sus principales órganos blanco son el útero, la glándula mamaria y el cerebro, entre otros. Las células que sintetizan y liberan la P₄ así como las células blanco, presentan enzimas que reducen a esta hormona formando varios metabolitos con actividades características. Dichos metabolitos pueden tener funciones similares o diferentes a la P₄, modulando así las acciones de la misma. Los metabolitos de la P₄ generados pueden incrementar, prolongar o terminar con los efectos de esta, o proporcionar mecanismos alternativos que modulen sus acciones (Camacho-Arroyo et al, 1995). La actividad biológica de estos metabolitos a partir de la P₄ es diferente en cada especie y en cada ciclo reproductivo de los mamíferos (Graham, 1997).

Las funciones primordiales de la P₄ son la de preparar y mantener al endometrio para la implantación del embrión, incrementar la temperatura basal del cuerpo en el momento de la ovulación (Ganong, 1994), estimular la maduración del ovocito, promover el crecimiento uterino, suprimir las contracciones del miometrio, desarrollar el tejido

alveolar de las glándulas mamarias para la preparación de la secreción de leche y también está involucrada en la modulación de la masa ósea (Graham, 1997) y en diversas funciones del sistema nervioso, como la conducta sexual y la excitabilidad neuronal.

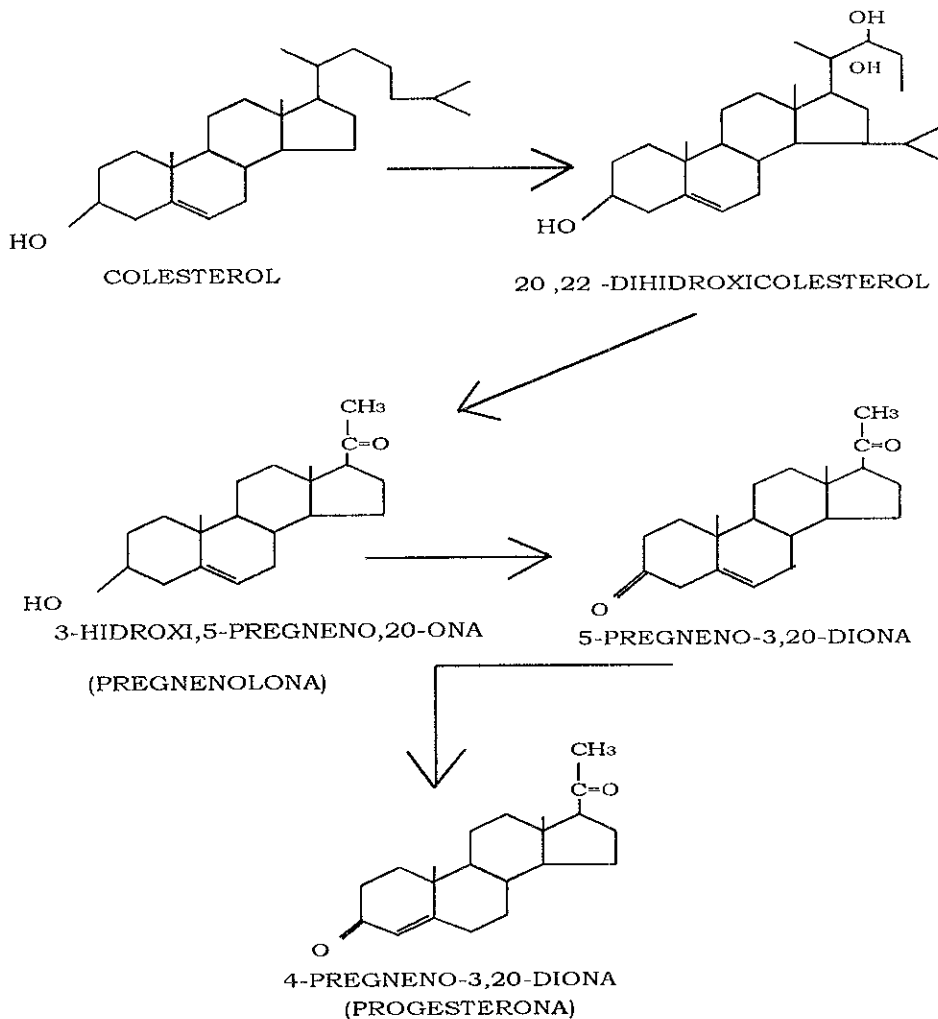


Fig. 3. Biosíntesis de la progesterona a partir del colesterol, (Hicks, 1988).

3.4. Características y regulación del receptor a progesterona (PR)

Los efectos de la P_4 están mediados por su receptor nuclear (PR) que reconoce específicamente a la hormona. Este receptor pertenece a una superfamilia de factores de transcripción que son activados por su ligando específico. En algunas especies este receptor consta de dos isoformas y pueden regular diferentes genes (Gronemeyer, 1991).

Las isoformas del PR se denominan A y B y se diferencian por 164 aminoácidos, presentes en la forma B en la región N-terminal. Estas isoformas se han encontrado en el humano, la rata y en el pollo (Syvälä, 1997). En el pollo la isoforma A es de 79 kDa y la isoforma B de 110 kDa y en mamíferos la isoforma A es de 94 kDa y la isoforma B de 120 kDa (Gronemeyer, 1987). En el conejo sólo se ha descrito la isoforma B (Syvälä, 1996).

Las dos isoformas del PR son reguladas por distintos promotores (Fig.4). El significado biológico de las proteínas A y B es desconocido (Lydon, 1995); sin embargo, se ha reportado que la isoforma A es un represor específico del promotor de la función de la forma B bajo ciertas circunstancias en la célula. La expresión de los niveles de las isoformas A y B puede ser diferente en ciertos tejidos blanco (Vegeto, 1993).

El gen del PR en el humano se encuentra localizado en el cromosoma 11 en el brazo q22-q23 (Savouret, 1990); el tamaño del cDNA tiene una longitud de más de 90 kb, y comprende 8 exones de 2380, 152, 117, 306, 145, 131, 158 y 153 pb respectivamente; además presenta 7 intrones (Misrahi, 1993). El tamaño del mensajero es de 3014 pb (Milgrom, 1987).

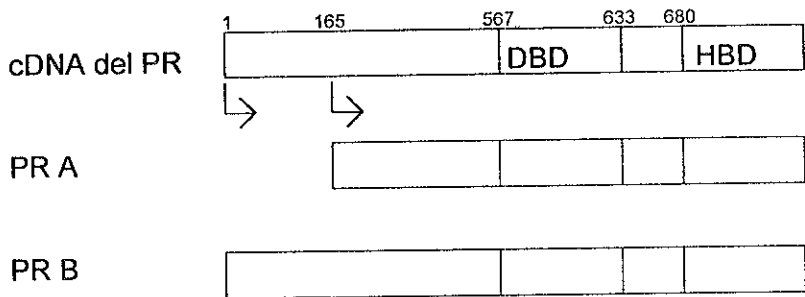


Fig. 4. El cDNA del PR humano y las proteínas del PRA y PRB. Las flechas indican el sitio de inicio de la traducción de las dos isoformas. DBD es el dominio de unión al DNA; HBD es el dominio de unión a la hormona. Los números indican la posición de los aminoácidos de los distintos dominios (Graham, 1997).

La secuencia 5' no codificante del gen del PR humano presenta una gran homología (cerca de un 70%) con la secuencia correspondiente al gen de PR de conejo. Particularmente, la secuencia correspondiente a la región del promotor rica en G-C (Misrahi, 1993).

Cuando el receptor no está unido a su ligando específico se dice que se encuentra inactivo. Cuando la hormona se une al receptor ocurre una transformación del receptor, de su forma inactiva a la activa en donde disminuye de tamaño, de 8s a 4s; esto se debe a que en la forma inactiva el receptor forma complejos oligoméricos con proteínas tales como las Hsp 90 que son proteínas de choque térmico que se encuentran unidas a la región cercana al dominio de unión al ligando. Este complejo no puede unirse al DNA. Cuando la hormona se une a su receptor las proteínas Hsp 90 son liberadas, quedando activo el receptor en presencia de su

ligando, la P_4 . Posteriormente el PR se une en forma de dímeros a elementos de respuesta a P_4 (PRE), como se puede apreciar en la figura 5 (Carson-Jurica, 1990, Landers y Spelsberg, 1992). Esto provoca que los PR funcionen como factores de transcripción que pueden interactuar con otras proteínas, regulando la transcripción de genes específicos (Beato, 1989).

La expresión del PR se ha descrito en numerosos tejidos, tales como el útero y el miometrio; en el ovario se ha encontrado en las células de la granulosa y en el cuerpo lúteo, tejido vaginal en mamíferos y en el oviducto del pollo. El PR también se ha descrito en tejido normal y neoplásico de mama. En machos se ha localizado en el testículo; otros tejidos y tipos celulares en donde se expresa en PR son el cerebro, el hipotálamo ventromedial, el área preóptica, el timo y en los islotes pancreáticos de rata y en el pulmón del conejo (Graham, 1997).

Experimentos con ratones con mutaciones en el gen del PR muestran anomalías en el desarrollo de tejidos reproductivos, como la hiperplasia uterina, un desarrollo limitado de las glándulas mamarias y la incapacidad de ovular y de exhibir conducta sexual; sugiriendo que la P_4 tiene un papel de coordinador pleiotrópico en diversos eventos reproductivos en los mamíferos (Lydon, 1995).

Se ha observado que este receptor es regulado a la alta por estrógenos y a la baja por la P_4 en muchos tejidos blanco, como el útero (Graham, 1997); dicha inducción es a nivel transcripcional. Una administración a corto plazo de P_4 en pollos pretratados con estrógenos disminuye la capacidad total de unión a la hormona por el PR, mientras

que una administración prolongada de P_4 incrementa el PR en el oviducto (Syvälä, 1996).

En otros estudios, se demostró por técnica de Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), que la expresión del gen del PR es regulado por hormonas sexuales esteroideas en el hipotálamo y la corteza cerebral, al igual que en el útero en conejas adultas; presentando una regulación a la alta por estrógenos y a la baja por la misma P_4 (Camacho-Arroyo et al, 1996).

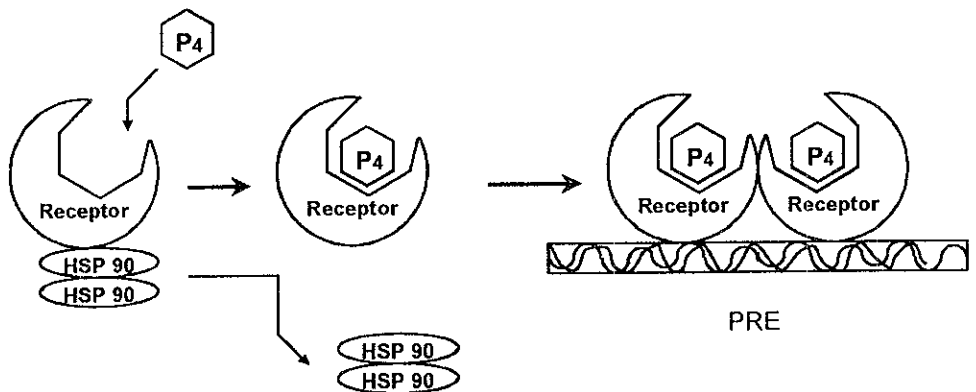


Figura 5. Activación del receptor a progesterona. Al unirse la P_4 al receptor se liberan las dos proteínas HSP 90 quedando "activo" el receptor para unir a los elementos de respuesta a P_4 .

3.5. P_4 y embarazo temprano en la coneja.

El cuerpo lúteo juega un papel muy importante en el establecimiento y mantenimiento de la gestación en casi todos los mamíferos. Se sabe que los cambios que ocurren en el útero por acción progestacional durante el período temprano de la gestación, son de vital importancia para que el proceso de implantación del blastocisto se lleve a cabo, para lo cual se requiere que el folículo productor de estrógenos se convierta en poco tiempo a cuerpo lúteo, que es el productor de P_4 (Dickman, 1975).

La P_4 , sintetizada en el cuerpo lúteo, es esencial en la preparación del endometrio, la implantación del embrión y el mantenimiento del embarazo, proporciona protección inmunológica al embrión, inhibe las contracciones del endometrio y reduce la síntesis de prostaglandinas, mantiene además el crecimiento y la plasticidad uterina e induce la síntesis de proteínas como la uteroglobina, uteroferrina, etc (Castro, 1996).

En los ciclos reproductivos de los mamíferos se identifican dos tipos de ovulación: la cíclica y la refleja. La primera se clasifica con base en la respuesta del epitelio uterino a la estimulación hormonal, por lo que se tienen ciclos menstruales y estrales (Fox, 1970); mientras que la ovulación refleja es inducida por la cópula (Staples, 1967).

La coneja es una especie que presenta ovulación refleja, es decir que la ovulación se da en respuesta a estímulos externos como la monta o el coito. Esta se produce aproximadamente 12 horas después de la

cópula; 7 días después se lleva a cabo la implantación del blastocisto (Dickmann, 1975).

Las concentraciones de P_4 en el plasma, endometrio y lumen uterino aumentan en forma progresiva durante los primeros días poscoito y se mantienen altas hasta el día de la implantación (Tabla 1) (Beier, 1991). Durante el período de preimplantación en la coneja, estos cambios hormonales ejercen un efecto regulador sobre el número de receptores para estrógenos y para P_4 en el endometrio, lo cual prepara al útero para la implantación del blastocisto (Dickmann, 1975).

Se tienen evidencias de la expresión del PR en el útero de la coneja en etapas tempranas del embarazo, presentando un patrón de expresión característico en donde en el segundo día se presentan altas concentraciones de PR. En los días 0 y 1 de la gestación, la tasa de expresión es baja; sin embargo, esta expresión se ve incrementada significativamente en el día 2. Posteriormente a partir del día 3, la expresión del gen del PR disminuye progresivamente hasta el día 5 de la gestación (Gutierrez, 1993).

	Días de la gestación									Días Postparto	
	0	1	2	3	6	10	15	24	30	1	2
P ₄ (ng/ml)	1.45	1.6	1.04	5.1	10	13	15	9.5	5	2	1
17βE ₂ (pg/ml)	42	41.5	53	50	109	64	76	64	60	45	47

Tabla 1. Niveles plasmáticos de P₄ y 17β-estradiol en la coneja entre el coito (día 0), durante y después de la gestación (Challis, 1973).

3.6. Estructura y función pulmonar.

Los pulmones son órganos de forma cónica situados en la cavidad torácica, separados entre sí por el corazón y cubiertos por membranas pleurales. Entre dichas membranas se encuentra un espacio intrapleural en donde se secreta un líquido lubricante que permite el desplazamiento de los pulmones sobre la pared torácica. En el humano, el pulmón derecho se divide en tres lóbulos, mientras que el izquierdo sólo posee dos, pero incluye una depresión en la que se localiza el corazón. Cada lóbulo se subdivide a su vez en lobulillos, que incluyen vasos linfáticos, arteriolas, vénulas, bronquiolos terminales y respiratorios, sáculos alveolares y alvéolos. El intercambio de gases se efectúa a través de la membrana alveolocapilar (Tortora, 1980).

Los conductos alveolares están rodeados por numerosos alvéolos y sacos alveolares. Los alvéolos son estructuras en forma de copa, recubiertos por epitelio y sostenidos por una delgada membrana basal. Las paredes de estos consisten principalmente en dos tipos de células epiteliales: células escamosas o células alveolares de tipo I y las células granulares o células alveolares de tipo II. Estas últimas son las responsables de producir un fosfolípido que se conoce como agente surfactante que disminuye la tensión superficial. Por otro lado, en los alvéolos se observa una red de capilares sanguíneos compuestos por una sola capa de células endoteliales y una membrana basal (Ganong, 1994).

El intercambio de gases entre los pulmones y la sangre se lleva a cabo por difusión entre los alvéolos y la pared de los capilares. Se ha calculado que los pulmones contienen 300 millones de alvéolos, lo cual

permite disponer de una inmensa área superficial para el intercambio de gases (Tortora, 1985).

La función primordial de los pulmones es el proceso de respiración, el cual está compuesto por dos etapas principales: la respiración externa y la respiración interna; la primera se refiere a la absorción de O_2 y eliminación del CO_2 de los pulmones; la segunda es la utilización del O_2 y la producción de CO_2 por las células del cuerpo y el intercambio gaseoso de éstas en su medio líquido (Ganong, 1994).

Se denomina ventilación pulmonar al intercambio de aire entre la atmósfera y los alvéolos pulmonares. Este proceso se lleva a cabo gracias a los gradientes de presión que existen entre los alvéolos (presión negativa) y la atmósfera en el momento de la inspiración (inhalar aire) y la espiración (expulsarlo) y se presenta en determinado período de tiempo (Guyton, 1987).

Uno de los mecanismos por los que ocurre el proceso de la ventilación se da a nivel alveolar, estos presentan una presión intra-alveolar y con ayuda del agente surfactante disminuye la tensión superficial lo que evita que lleguen al colapso. Durante la inspiración los músculos inspiratorios distienden la cavidad torácica, disminuyendo la presión intrapleural y la intra-alveolar haciéndose negativa con respecto a la presión atmosférica por lo que desplazan el aire dentro de ellos gracias a la elasticidad pulmonar y tiende a disminuir cuando estos músculos no actúan provocando un aumento en la presión interna ocasionando la salida del aire de los alvéolos a la atmósfera (Guyton, 1987).

En el proceso respiratorio se conocen varias alteraciones, una de ellas es la hiperventilación, que es el aumento del ritmo respiratorio, la

cual puede ser voluntaria y en donde actúan mecanismos químicos reguladores de la respiración, como son los quimiorreceptores del bulbo raquídeo y de los senos carotídeos y aórtico, al estimularse por una disminución o aumento en la presión del bióxido de carbono de la sangre arterial (Ganong, 1994). Además de esta importante función respiratoria, existen otras funciones que desempeñan como la síntesis de una sustancia tensoactiva para uso local y la liberación de sustancias que entran en la sangre y son transportadas por el torrente sanguíneo, así como la eliminación de otras que llegan a través de la arteria pulmonar. Algunos ejemplos de sustancias que son sintetizadas o almacenadas por los pulmones son las prostaglandinas, la histamina y la calicreína (Ganong, 1994).

3.7. Papel de la P₄ en el funcionamiento pulmonar

En el pulmón, la P₄ juega un papel biológico muy importante en el proceso respiratorio. Esta hormona está implicada en el incremento de la ventilación alveolar que ocurre durante la fase lútea del ciclo menstrual en el humano y además estimula la respiración, provocando una disminución en la presión parcial del CO₂ conforme avanza el embarazo. En todo el transcurso del embarazo existen cambios en la presión de O₂ (incrementa) y CO₂ (disminuye) y en el pH arterial, ya que existe una correlación entre dichos cambios y el incremento en la concentración de P₄ plasmática. En algunos pacientes con deficiencia respiratoria se les trata con P₄ para incrementar su respuesta respiratoria (Brodeur, 1986).

En condiciones normales, en una mujer durante el ciclo menstrual las concentraciones de bióxido de carbono en los alvéolos disminuye durante la fase postovulatoria del ciclo (Goodland, 1952). Se sabe que la administración de P₄ exógena o de progestinas sintéticas estimula la respiración ya que disminuye la tensión alveolar del CO₂. Se ha observado que en ratas hembras ovariectomizadas existe un incremento en el número de PR en el útero, relacionado con la estimulación de la ventilación (Brodeur, 1986); donde se muestra que la P₄ combinada con estrógenos incrementa la ventilación y disminuye la presión arterial parcial del CO₂. En contraste con estos datos, existen diversos estudios realizados en animales machos en los cuales, al administrarles progestinas sin un pretratamiento con estrógenos no se observa una respuesta ventilatoria (Brodeur, 1986). Sin embargo, en mujeres no

embarazadas y en hombres existe una respuesta ventilatoria al administrarles P_4 (Hannhart, 1989).

Por otra parte, hay estudios en los que se han correlacionado los niveles de P_4 con el incremento en la ventilación, lo cual apoya el hecho de que al administrarles P_4 en hombres normales y pacientes con trastornos respiratorios, se provoque hiperventilación. Muchas especies animales presentan hiperventilación durante el embarazo cuando los niveles de P_4 son elevados (Bayliss, 1987).

3.8. Caracterización del PR en el pulmón.

Ya que la mayoría de los efectos de la P_4 están mediados por el PR, se ha demostrado por métodos inmunohistoquímicos la presencia del PR en varios tipos celulares del pulmón de la coneja, como por ejemplo células epiteliales alveolares, neutrófilos, eosinófilos, entre otros. Esto sugiere que algunos de los efectos de la P_4 juega un papel muy importante en la función respiratoria ya que pueden ser mediados por su receptor localizado en las células pulmonares (Camacho-Arroyo et al, 1994). Esta inmunoreactividad es predominante en los núcleos de las células del pulmón así como en otros tejidos sensibles a la P_4 (Perrot-Applanat, 1988, Groyer-Piccard, 1990).

Es posible que los niveles de PR sean determinantes para la respuesta ventilatoria a progestinas y que exista una variabilidad en esta respuesta, proporcional al número de receptores (Brodeur, 1986). En el pulmón fetal de conejo se demostró, por ensayos de unión, la presencia del PR en el desarrollo ontológico (Giannopoulos, 1982).

En análisis por Western blot en el pulmón se demuestra que la proteína es reconocida por los anticuerpos monoclonales que se utiliza, confirmando la importancia de este en el padecimiento de enfermedades respiratorias (Press, 1988).

En humanos, el PR se ha localizado en epitelio normal y neoplásico de células mesenquimatosas. También se ha detectado en células vasculares en pacientes con padecimientos de hipertensión pulmonar o isquemia. Sin embargo, en casos de muerte por hipertensión pulmonar

postembólica, no se ha encontrado la presencia del PR; esto puede ser causa del decaimiento del receptor postmortem (Barberis, 1995).

Por métodos inmunohistoquímicos específicos, se ha identificado la presencia del PR en algunas neoplasias pulmonares y al definir esto, se puede sugerir que el PR tenga un papel potencial en la terapia hormonal para estas enfermedades (Ohori, 1991).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La P_4 juega un papel muy importante en la fisiología de los mamíferos al actuar a nivel del sistema reproductivo y del sistema nervioso central. En el pulmón, la P_4 y sus metabolitos pueden regular funciones tan importantes como la ventilación.

Se ha determinado la presencia del PR en el pulmón del conejo por métodos inmunohistoquímicos y sin embargo se desconoce el patrón de expresión del gen durante el embarazo temprano, por lo que en este trabajo se estudió el patrón de expresión del gen de PR en el pulmón del conejo, sugiriéndose que su expresión está relacionada con los niveles de estrógenos y P_4 que cambian durante el embarazo.

OBJETIVO

Evaluar el papel del estradiol y la P_4 en la regulación de la expresión del gen del PR en el pulmón de la coneja.

Conocer el patrón de expresión del gen del PR en el pulmón de la coneja durante el embarazo temprano y después del tratamiento con estradiol y P_4 en conejas ovariectomizadas.

MATERIALES Y METODOS

6.1. Animales de experimentación

En este trabajo se utilizaron conejas adultas Nueva Zelanda (3-4 kg), que se mantuvieron bajo un ciclo de luz oscuridad 12:12 h, con agua y alimento disponible *ad libitum*. Se realizaron dos clases de experimentos: uno farmacológico y otro fisiológico.

En el experimento farmacológico, se ovariectomizaron 9 conejas bajo anestesia total con ketamina. Quince días después de la cirugía las conejas (3 animales por tratamiento) fueron tratadas por vía subcutánea con: a) vehículo (aceite de maíz), b) estradiol (25 µg/Kg) durante 2 días; y c) estradiol en la dosis y tiempo mencionados más una administración subcutánea de P₄ (5 mg/Kg) al tercer día. Después de 24 horas de cada tratamiento los animales se sacrificaron por medio de una sobredosis de anestesia, se realizó la disección del pulmón y se extrajo el RNA total.

Para el experimento fisiológico, 18 conejas se pusieron a copular con machos experimentados. Para demostrar que hubo fecundación, se les hicieron frotos vaginales para comprobar la presencia de espermatozoides en el aparato reproductor de las mismas. Posteriormente las conejas se sacrificaron por decapitación a diferentes tiempos (del día 0 al día 5 de la gestación) tomando el día de la cópula como el día 0 y así sucesivamente hasta el día 5 después del apareamiento. Se obtuvieron los pulmones de todas ellas y se prosiguió a extraer el RNA total.

6.2. Extracción de RNA total.

El RNA total se extrajo del tejido pulmonar proveniente de los diferentes grupos de conejas en estudio, de la siguiente manera:

1. En tubos nuevos y estériles, se homogenizaron en un politrón 100 mg de tejido por 1 ml de TRIzol (ver apéndice) a 4°C.

2. Las muestras homogenizadas se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de cloroformo por 1 ml de homogenado; los tubos se taparon, se agitaron con vortex por 30 seg y se mantuvieron en hielo por 5 minutos.

3. Las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C. Al final se obtuvieron dos fases: la fase inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la fase superior acuosa incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se mantuvieron en la interfase y en la fase orgánica respectivamente.

4. La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen equivalente de isopropanol; la muestra se mantuvo a 4°C durante toda la noche.

5. Las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 12 000 rpm a 4°C. El RNA se precipitó como una pastilla blanca amarillenta.

6. Se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 75%. Se centrifugó a 7 500 rpm durante 8 minutos a 4°C.

7. Una vez más se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó con etanol al 80%. Se centrifugó nuevamente a 7 500 rpm durante 8 minutos a 4°C.

8. Por último, se removió el sobrenadante con una pipeta microvolumétrica, se colocaron los tubos invertidos sobre una gasa estéril y después se incubaron en un horno con vacío a temperatura ambiente durante 10 minutos, sin dejar que la pastilla se secase por completo para evitar la insolubilidad de la misma.

9. La pastilla de RNA se disolvió en 50 μ l de H₂O-DEPC.

10. Se hicieron diluciones 1:100 y se leyó la absorbancia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda: 260 y 280 nm. Se determinó la concentración de RNA mediante la siguiente fórmula: 1 unidad de absorbancia a 260 nm = 40 μ g/ml de RNA. También se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}). El RNA se considera puro cuando el valor de esta relación es entre 1.8 y 2.

6.3 Electroforesis del RNA total.

1. Se preparó un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes al 1% de la siguiente manera:

	concentración final	cantidad
Agarosa	1 %	1.2 g
Formaldehído	6 %	19 ml
MOPS	1 X	10 ml
Agua - DEPC	-----	91 ml

La agarosa se disolvió en agua tratada con DEPC. Posteriormente se agregaron el formaldehído y el MOPS, se mezcló la solución y se vertió en el molde para gel perfectamente sellado que más adelante se colocó en la cámara .

2. Para la electroforesis, las muestras se prepararon de la siguiente manera :

	Concentración final.
RNA	3 µg
Formamida	50 %
Formaldehído	6.5 %
MOPS	1 X
Amortiguador de carga	1 X
Bromuro de Etidio	2.5 µg

El RNA se puso en solución con la formamida, el formaldehído y el MOPS y se incubó a 75°C por 5 minutos, se colocó inmediatamente en hielo por 5 minutos. Se le agregó el amortiguador de carga (ver apéndice) y el bromuro de etidio.

3. Se depositaron 20 μ l de muestra en cada carril en el gel y se corrieron a 80 voltios por 90 minutos. Posteriormente, el gel se observó en un transiluminador bajo luz ultravioleta.

4. Una vez comprobada la integridad del RNA, se corrió otro gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes al 1.1%. En esta ocasión se cargaron 25 μ g de RNA en las mismas condiciones señaladas en el punto 2. El gel se corrió a 80 voltios por 1.5 h en un amortiguador MOPS 1X. Posteriormente, el gel se lavó con agua tratada con DEPC por 30 minutos en agitación constante.

5. El gel se enjuagó con agua estéril varias veces, se cortó un fragmento de membrana de Nylon y dos de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño del gel. Se sumergieron durante 10 minutos en una solución de SSC 10 X (ver apéndice).

6. Se colocó un fragmento de papel Whatman 3 MM sobre un soporte más ancho y largo que el gel, se colocó dentro de un recipiente y se llenó con SSC 10 X. Cuando el papel Whatman, que se encontraba sobre el soporte, se humedeció por completo, se eliminaron las burbujas de aire con una varilla de vidrio.

7. Se colocó el gel sobre el papel encima del soporte en posición invertida, se eliminaron las burbujas entre el gel y el papel Whatman con una varilla de vidrio. Se cortó la esquina del gel para señalar el primer carril.

8. Se colocó la membrana de Nylon sobre el gel y se le cortó la misma esquina que al gel, se eliminaron las burbujas entre la membrana y el gel, sobre la membrana se pusieron dos pedazos de papel Whatman y se eliminó el aire con una varilla de vidrio.

9. Se cortaron toallas de papel del mismo tamaño que el gel y se colocaron encima del papel Whatman hasta alcanzar una altura de 8 a 10 centímetros. Se colocó un soporte de vidrio encima de las toallas de papel y encima del vidrio una pesa de 500 g.

10. Las muestras se transfirieron por capilaridad durante 18 horas. Al pasar este tiempo se quitaron las toallas y el papel Whatman. Se marcaron los pozos del gel en la membrana con un lápiz .

11. La membrana se retiró del gel y se eliminó el exceso de sales sumergiéndola en SSC 6 X a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se colocó la membrana sobre papel Whatman y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

12. Se colocó la membrana en dos fragmentos de papel Whatman y se utilizó una fuente de luz UV (Cross-Linker UV, Stratagene) para fijar el RNA a la membrana.

6.4. HIBRIDACION NORTHERN BLOT

1. Se preparó el amortiguador de prehibridación, de la siguiente manera:

	Concentración final
Formamida	40%
SDS 10%	0.2%
EDTA 0.5M	0.01M
PBS	0.12M
Reactivo Denhardt 100X	4X
DNA esperma de salmón	100 µg/ml
SSC 20X	2X

Se prepararon 0.2 ml por cm² de membrana.

El DNA esperma de salmón se disolvió previamente en 1 ml de agua estéril tratada con DEPC y se incubó a 95⁰C por 5 minutos; inmediatamente se colocó en hielo por otros 5 minutos y posteriormente este se agregó a la mezcla de prehibridación.

2. Se colocó la membrana de nylon dentro de un tubo de hibridación. Se le añadió la solución de prehibridación dentro del tubo y se selló perfectamente con parafilm para evitar escurrimientos. Se colocó en un horno de hibridación con agitación a 42⁰C por un período de 24 horas.

3. La sonda del PR e marcó radioactivamente con α -³²P el método de Random Primers que incluyó una mezcla de :

- 1 μ l cDNA PR conejo [100 ng]
- 2 μ l dATP [0.1 mM]
- 2 μ l dGTP[0.1 mM]
- 2 μ l dTTP [0.1 mM]
- 15 μ l Random Primers Buffer
- 4 μ l [α -³²P] dCTP (50 μ Ci)
- 23 μ l H₂O estéril
- 1 μ l Fragmento Klenow de la DNA polimerasa

4.El cDNA se mezcló con el agua y se desnaturalizó a 100⁰C por 5 minutos. Se colocó inmediatamente en hielo por otros 5 minutos.

5. Al cDNA se le agregó el buffer de iniciadores aleatorios, más los dideoxinucleótidos no marcados (dATP, dGTP y dTTP).

6. En la campana de extracción y detrás de la pantalla de acrílico se agregaron el [α -³²P] dCTP y el Fragmento Klenow.

7. La solución se mezcló perfectamente y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas, dentro de un blindaje de plomo y detrás de la pantalla de acrílico.

8. Media hora antes de que terminara la incubación se prepararon unas columnas de Sephadex G-50 (ver apéndice) de la siguiente manera: en el fondo de una jeringa de insulina se colocó fibra de vidrio estéril. En seguida se le agregó poco a poco la solución de Sephadex con una pipeta Pasteur estéril. Se centrifugó la columna a 1 500 rpm por 3 minutos a 4°C, hasta que el Sephadex G-50 quedara debidamente empaquetado.

9. Dentro de un tubo de centrifuga se colocaron las columnas con un tubo eppendorf sin tapa debidamente etiquetado al final de las mismas para recibir la sonda purificada.

10. Terminado el tiempo de incubación se agregaron a la mezcla de reacción 5 µl de solución stop buffer y 100 µl de TE. Se mezclaron perfectamente.

11. La sonda marcada se colocó dentro de la columna y se centrifugó a 1500 rpm durante 3 minutos. Con el contador Geiger se determinó que al menos se hubiera incorporado el 50% de la radioactividad usada para el marcaje.

12. El cDNA marcado hirvió por 5 minutos en una parrilla detrás del acrílico y después se colocó en hielo por otros 5 minutos.

13. Se eliminó aproximadamente la mitad de la solución de prehibridación y se introdujo la sonda marcada al tubo en donde se encontraba la

membrana con el RNA de los pulmones a analizar. El tubo se selló con parafilm y se verificó que no tuviera fugas.

14. El tubo se colocó en un horno de hibridación con agitación a 42^oC y se hibridó durante 24 horas.

15. Transcurrido este tiempo se le agregó a la membrana 10 ml de SSC 2X dentro del tubo y la solución sobrante se vertió en el bote de desechos radioactivos líquidos.

16. La membrana se sacó del tubo de hibridación. Esta se colocó dentro de un recipiente de plástico para lavarla con una solución de SSC 2X durante 30 minutos, agitándose constantemente. Se vertió el SSC 2X en el bote de desechos radioactivos líquidos y se volvió a agregar SSC 2X y se dejó agitando por 30 minutos.

17. Se desechó el SSC 2X y se le agregó una solución de SSC 0.1X + SDS 0.1% y se lavó por 20 minutos a 50^oC. Se determinaron las cuentas de la membrana con el Geiger.

18. La membrana se colocó en una bolsa de plástico y posteriormente se selló.

6.5. ANALISIS DENSITOMETRICO.

La membrana se colocó dentro de un cassette con pantallas intensificadoras con placas Hyperfilm β max (Amersham Co., UK) y se colocó dentro del REVCO a -70°C , por un período de 72 horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo, en condiciones de oscuridad se revelaron las placas manualmente con un revelador (Kodak, GBX) por 3 minutos, posteriormente se lavó con agua de la llave y después se sumergió en la solución fijadora (Kodak, Wash system cleaner) por 10 minutos; transcurrido este tiempo se volvió a lavar con agua y se dejó secando por unos minutos. La señal obtenida en las placas se cuantificó por densitometría en un analizador Scan Jet 3C (Hewlett Packard).

Una vez obtenido la primera placa se lavó la membrana con una solución de remoción con:

Tris HCl 1 M pH 8	10 mM
EDTA 0.5 M	1 mM
SDS 10%	1%

a una temperatura de 54°C y se llevó a cabo el mismo procedimiento desde la prehibridación hasta la obtención de la placa a excepción de que el cDNA usado fue el de ciclofilina (CP), el cual es un gen de expresión constitutiva y se utilizó como control de expresión (Haendler, 1987).

RESULTADOS

Para determinar la expresión del gen del PR en el pulmón de conejas tratadas con estradiol y P₄ y en conejas durante los primeros días de la gestación se obtuvo el RNA total para posteriormente realizar un análisis de Northern blot, haciendo una correlación entre la expresión del gen del PR y el gen de CP que se utilizó como un control de expresión constitutiva.

El análisis por Northern blot mostró la presencia de tres transcritos del PR durante los primeros días de la gestación, con pesos moleculares de 6.1, 4.4 y 1.8 kb. El transcrito que corresponde a 4.4 kb fue el más abundante (Fig. 6). Nótese la diferencia de los transcritos en la figura 6 que están marcados con líneas. En el primer carril, que corresponde al día 0 de la gestación, se observa que hay una expresión baja que aumenta considerablemente al primer día de la gestación (carril 2); a partir del día 2 las cantidades de RNAm del PR disminuyen progresivamente hasta el día 5. Esta expresión de cada transcrito del PR cambió de acuerdo al ambiente hormonal de los animales durante la gestación temprana. El control de expresión de la CP se mantuvo constante durante la gestación temprana.

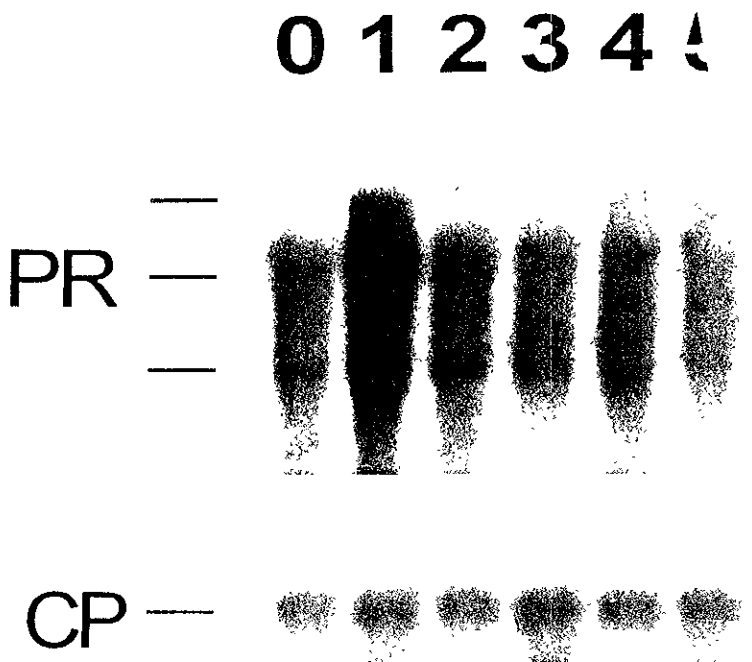


Fig. 6. Northern blot representativo del RNAm del PR del pulmón de la coneja durante los primeros días de la gestación. Se utilizaron 25 μ g de RNA total del pulmón de conejas gestantes, del día 0 al 5. El gen de CP fue utilizado como un gen control de expresión constitutiva. Los tres diferentes transcritos del RNAm del PR que corresponden a 6.1, 4.4 y 1.8 kb son indicados con las líneas. Cada carril indica los días de la gestación, iniciando el día de la cópula (día 0) hasta el día 5.

En la figura 7 se muestra el análisis densitométrico que se realizó con la expresión del PR en los primeros días de la gestación en el pulmón de la coneja en relación a la expresión del gen de CP. Se observa que en el día 1 de la gestación el incremento es aproximadamente el doble con respecto al día 0, siendo significativo este aumento. Se utilizaron 3 animales por día y por tratamiento.

Con respecto al experimento farmacológico, se observó que el tratamiento con estradiol a conejas ovariectomizadas indujo un incremento significativo en el contenido de RNAm del PR con respecto al vehículo en el pulmón mientras que la administración de P_4 después del tratamiento con estradiol redujo la expresión del receptor (Fig. 8). El primer carril corresponde al vehículo (V) el segundo al tratamiento con benzoato de estradiol (E) y el tercero al tratamiento de benzoato de estradiol + progesterona (P); el último carril corresponde al útero de coneja (U) que se utilizó como control, ya que en este tejido se ha caracterizado la expresión de dicho gen. La inducción se observó más evidentemente en el transcrito de 4.4 kb que en los demás. El transcrito mayor del PR, de 6.1 kb, ya se había detectado en el útero de animales ovariectomizados (Gutierrez, 1993) y tratados con estrógenos pero no en el pulmón. Sin embargo, este transcrito se observó claramente en el pulmón en el día 1 de la gestación (Fig. 6).

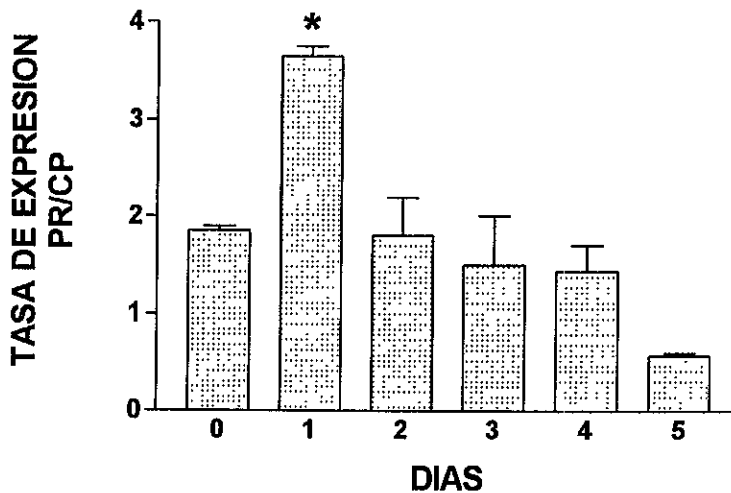


Fig. 7. Análisis densitométrico del contenido de RNAm del PR en el embarazo temprano en la coneja. La expresión relativa del PR en el pulmón durante la gestación temprana en la coneja fue correlacionada con la expresión constitutiva del gen de CP en los días 0 al 5 de la gestación. La mayor tasa de expresión se presenta en el día 1. El asterisco representa que hay diferencias significativas con respecto a los demás días.

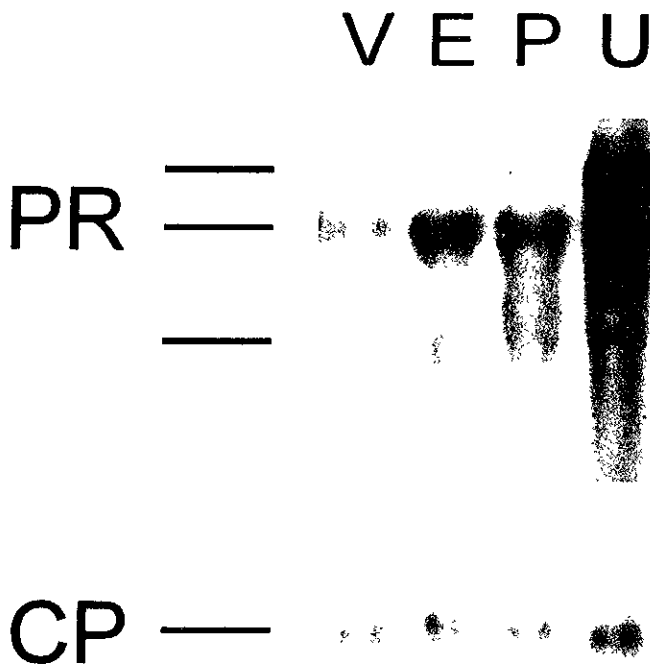


Fig. 8. Northern blot representativo del contenido de RNAm del PR en el pulmón de conejas tratadas con hormonas. Las conejas ovariectomizadas fueron tratadas con vehículo (V), benzoato de estradiol (E) y benzoato de estradiol + progesterona (P). Se utilizaron 25 μ g de RNA total para el análisis de Northern blot. El último carril corresponde al útero de la coneja (U) en donde se observan claramente los tres transcritos del RNAm del PR (6.1, 4.4 y 1.8 kb), que se señalan con las líneas.

DISCUSION

En este trabajo se determinó la presencia de RNAm del PR en el pulmón de la coneja en los primeros días de la gestación y bajo los tratamientos con estradiol y P₄. Se encontraron diferentes transcritos del gen del PR en el pulmón de la coneja de igual forma a los que se habían observado en el útero tanto de la coneja como de la rata (Gutiérrez, 1993; Kraus & Katzenellenbogen, 1993).

Se identificaron al menos tres transcritos del gen en el pulmón con diferentes pesos moleculares (6.1, 4.4 y 1.8 kb), en cuales se han descrito en otras especies; el primero corresponde al encontrado en el útero del pollo (Jeltsch, 1990). El segundo transcrito tiene un peso de 6.1 kb siendo el de mayor tamaño, y se ha observado en el útero del conejo (Loosfelt, 1986; Misrahi, 1988). En conejas ovariectomizadas este último se observó en el útero pero no en el pulmón (Figs. 6 y 8). Sin embargo este transcrito fue claramente detectado en el pulmón de conejas preñadas en el día 1 (Fig. 6). El significado funcional de la presencia de varios transcritos del PR en el pulmón es hasta ahora desconocido ya que, de acuerdo a Loosfelt (1984), sólo la isoforma B del PR es expresada en el conejo, aunque la posibilidad de la presencia de dos isoformas del PR en el pulmón del conejo no puede ser descartada.

Se encontró que la abundancia relativa de cada transcrito del RNAm del PR en el pulmón varía de acuerdo al estado hormonal de los animales. La expresión del gen del PR es regulada a la alta por estradiol y a la baja por P₄ de manera similar a lo observado en el útero y el hipotálamo del conejo (Camacho-Arroyo et al, 1996). Los efectos del

estradiol y la P_4 en la expresión del gen del PR pueden deberse a los cambios en la velocidad de la transcripción del PR o a la estabilidad del RNAm (Turcotte, 1991).

La expresión del gen del PR en el pulmón puede ser regulada por estradiol y P_4 , por medio de los elementos de respuesta a estrógenos que se traslapan en el sitio de iniciación de la transcripción del gen del PR en el conejo (Savouret, 1991).

Los datos sobre la regulación de la expresión del gen del PR por hormonas sexuales evaluados por el contenido de RNAm del PR en el pulmón se correlacionan con los datos previamente reportados en donde se estudió a nivel de la proteína, por la técnica de inmunohistoquímica. Se ha informado que el tratamiento con estradiol en conejas ovariectomizadas incrementa el número de células inmunoreactivas al PR en el pulmón en comparación con los animales ovariectomizados tratados con vehículo (Camacho-Arroyo et al, 1994). Esto es una correlación entre los efectos del estradiol en la expresión del gen del PR tanto a nivel del mensajero como a nivel de la proteína, lo cual sugiere que los cambios en el contenido de la proteína del PR en el pulmón del conejo después del tratamiento con hormonas sexuales esteroides son el resultado de modificaciones que ocurren a nivel transcripcional.

Durante la gestación temprana el RNAm del PR se detectó en el pulmón del conejo en el día 0 con un marcado incremento en el día 1 seguido por una clara disminución en los días 2-5 (Fig. 6). Esta expresión del gen del PR presentó un patrón similar al encontrado en el endometrio de la coneja, con la diferencia de que en el útero la mayor expresión del gen del PR se encontró en el día 2; en el día 3 el contenido de RNAm del

PR fue ligeramente alto y disminuyó hasta los días 4 y 5 (Gutierrez, 1993). Estas diferencias pueden deberse a la presencia de factores tejido-específico que regulan la expresión del gen del PR en el útero y en el pulmón.

En el caso del útero, no se ha encontrado una correlación entre el contenido de RNAm del PR y de su proteína, ya que desde el día 3 de la gestación la proteína del PR endometrial no se detectó en el útero a pesar del alto contenido del RNAm del PR (Gutierrez, 1993).

Estos resultados sugieren que en condiciones fisiológicas el contenido de RNAm del PR en el pulmón depende de las concentraciones de hormonas sexuales esteroides. El contenido máximo de RNAm del PR fue observado en el día 1 de la gestación cuando la concentración de progesterona plasmática es baja, mientras que el contenido más bajo de RNAm del PR se detectó en el día 5 de la gestación cuando hay un aumento en la concentración de P_4 plasmática (Tabla 1) (Challis, 1973; Hilliard, 1971).

Es importante señalar que este estudio se realizó sólo en la gestación temprana en el pulmón del conejo ya que la expresión del PR se desconoce a lo largo del embarazo o en el momento del parto.

Una perspectiva a futuro de este trabajo es estudiar la expresión del PR en el pulmón de la coneja en el embarazo tardío y el alumbramiento, ya que en estas etapas los niveles plasmáticos de P_4 aumentan para mantenerse altos durante toda la gestación. También podrían estudiarse otras especies en donde se desconozca el patrón de expresión del PR.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran cambios en la expresión del gen de PR durante los primeros días de la gestación en el pulmón de la coneja; la máxima expresión se encontró en el día 1 y disminuyó progresivamente hasta el día 5 de la gestación.

Con respecto a la expresión del PR durante el tratamiento con estradiol y P₄, se observó la mayor tasa de expresión cuando se administró el estradiol en relación con el vehículo, presentándose una regulación a la alta; la menor tasa de expresión del gen del PR se observó cuando se administró la P₄, presentándose una regulación a la baja por dicha hormona.

Esto sugiere que el gen del PR está regulado por estradiol y P₄ y que su expresión pudiera estar relacionada con los cambios en la fisiología pulmonar que ocurre durante los ciclos reproductivos de los mamíferos.

REFERENCIAS

- Barberis M, Veronese S, Bauer D, De Juli E and Harari S. 1995. Immunocytochemical detection of progesterone receptors. *Chest*. **107**: 869-74.
- Bayliss D, Millhorn D, Gallman E and Cidowski J. 1987. Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **84**: 7788-7792.
- Beato M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. **56**: 335-344.
- Beier HM, Elger W, Hegele-Hartung, Mootz O and Beier-Hellwing K. 1991. Dissociation of corpus luteum, endometrium and blastocyst in human implantation research. *Journal of Reproduction and Fertility*. **92**: 511-523.
- Brodeur P, Mockus M, Mc Cullough R & Moore LG. 1986. Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. *Journal of Applied Physiology*. **60**: 590-595.
- Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa A, Pérez G & Cerbón MA 1994. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and

glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *Journal of Endocrinology*. **142**: 311-316.

-Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G y Cerbón MA. 1995. La progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del sistema nervioso central. *Revista de Investigación Clínica*. **47**: 329-40.

-Camacho-Arroyo I, Pasapera AM and Cerbón MA. 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neuroscience Letters*. **214**: 25-28.

-Carson-Jurica MA, William T, Schrader, Bert W, O'Malley; 1990. Steroid receptor Family: Structure and Functions. *Endocrine Reviews*. **11** (2): 201-220.

-Castro I. Efecto antiprogestacional y anti-implantación de la noretisterona y sus metabolitos reducidos en el anillo A: evaluación a nivel genómico. Tesis. Facultad de Medicina. UNAM. 1996.

-Challis JFG, Davies IJ & Ryan KJ. 1973. The concentrations of progesterone, estrone and estradiol 17 β in the plasma of pregnant rabbits. *Endocrinology*. **93**: 971-976.

-Dickmann Z, Dey SK and Gupta JJ. 1975. Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **72**: 298-300.

-Fox, R.R. and Lair, C.W. 1970. Sexual cycles in reproduction and breeding techniques for laboratory animals. The State University, New Brunswick. U.S.A..

-Fuller P.J. 1991. The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *FASEB Journal*. **5**: 3092.

-Ganong, W. Fisiología Médica. Manual moderno. Decimacuarta edición. 1994. pp 693-750.

-Giannopoulos G, Phelps D and Munowitz P. 1982. Heterogeneity and ontogenesis of progestin receptors in rabbit lung. *Journal of Steroid Biochemistry*. **17**: 503-510.

-Goodland RL & Pommerenke WT. 1952. Cyclic fluctuations of the alveolar carbon dioxide tension during the normal menstrual cycle. *Fertility and Sterility*. **3**: 394-401.

-Gorbman A., Bern H. 1962. Steroid hormones and steroidogenesis. In: A textbook of comparative endocrinology. **9**: 230-246. Wiley J. and Sons. Inc. New York, USA.

- Gore-Langton, R. E., Armstrong, D.T. 1988. Follicular steroidogenesis and its control. In: *Physiology of Reproduction*. Knobil E., Neil, J. D. et al (Eds) Vol. 1. pp. 331-335. Raven Press Ed. New York.
- Graham, D. and Clarke, C. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*. **18** (4): 502-519.
- Gronemeyer H, Turcotte B, Quirin-Stricker C, Bocquet MT, Meyer ME, Krozowski Z, Jeltsch JM, Leriuge T, Garnier JM, Chambon P. 1987. The chicken progesterone receptor sequence expression and functional analysis. *EMBO Journal*. **6**: 3985-94.
- Gronemeyer H. 1991. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annual Review of Genetics*. **25**: 89-123.
- Groyer-Piccard MT, Vu Hai MT, Jolivet A, Milgrom E & Perrot-Applanat M. 1990. Monoclonal antibodies for immunocytochemistry of progesterone receptors (PR) in various laboratory rodents, livestock, humans and chicken: Identification of two epitopes conserved in PR of all these species. *Endocrinology*. **126**: 1485-1491.
- Gutierrez R, Pérez G, Langley E, Pasapera A, Castro I & Cerbón MA. 1993. Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. *Molecular Reproduction and Development*. **34**: 244-249.

- Guyton AC. Fisiología Humana. Interamericana. 6a. edición. México. 1987. pp 519-603.
- Haendler B, Hoefler-Waerbinek R & Hofer E. 1987. Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO Journal*. **6**: 947-950.
- Hannhart B, Pickett C, Weil J and Moore LG. 1989. Influence of pregnancy on ventilatory and carotid body neural output responsiveness to hypoxia in cats. *Journal of Applied Physiology*. **67**(2): 797-803.
- Hicks Gómez JJ, Díaz Zagoya JC. 1988. Bioquímica e Inmunología II. Ed. Fac. Medicina. UNAM. México, D.F.
- Hilliard J & Eaton LWM. 1971. Estradiol-17 β , progesterone and 20, 5 α -hydroxypregn-4en-3-one in rabbit ovarian venous plasma.II. From mating through implantation. *Endocrinology*. **89**: 522-527.
- Jeltsch J.M., Turcotte B., Garnier J.M., Lerouge T., Krozowski Z., Gronemeyer H. & Chambon P. 1990. Characterization of multiple mRNAs originating from the chicken progesterone receptor gene. *Journal of Biological Chemistry*. **265**: 3967-3974.
- Katzenellenbogen J. & Katzenellenbogen B. 1996. Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chemistry & Biology*. **3**: 529-536.

-Kraus, W.L. & Katzenellenbogen, B.S. 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology*. **132**: 2371-2379.

-Landers J. & Spelsberg T. 1992. New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. **2**(1): 19-63.

-Loosfelt H, Logeat F, Vu-Hai MT, Milgrom E. 1984. The rabbit progesterone receptor. Evidence for a single steroid-binding and characterization of receptor mRNA. *Journal of Biological Chemistry*. **259**: 14196-14202.

-Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E. 1986. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone receptor complementary DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **83**: 9045-9049.

-Lydon J, DeMayo F, Funk C, Mani S, Hughes A, Montgomery C, Shyamala G, Conneely O and O'Malley B. 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*. **9**: 2266-2278.

-Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F and Milgrom E. 1987. Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **143**(2): 740-748.

-Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Mériel C, Zerah V, Dessen P & Milgrom E. 1988. Organisation of the entire rabbit progesterone receptor mRNA and of the promoter and 5' flanking region of the gene. *Nucleic Acids Research*. **16**: 5459-5472.

-Misrahi M, Venencie P, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P and Milgrom E. 1993. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1216**: 289-292.

-Ohori P, Yousem S, Sonmez-Alpan E and Colby T. 1991. Estrogen and progesterone receptors in lymphangiomyomatosis, epithelioid hemangioendothelioma and sclerosing hemangioma of the lung. *American Journal of Clinical Pathology*. **96**: 529-535.

-Perrot-Appianat M, Groyer-Picard MT, García E, Lorenzo F & Milgrom E. 1988. Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbit and humans. *Endocrinology*. **123**: 1712-1720.

- Press M & Greene G. 1988. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor. *Endocrinology*. **122**: 1165-1175.
- Ramirez V, and Beyer C. The physiology of reproduction. Chapter 44: The ovarian cycle of the rabbit: Its Neuroendocrine control. Raven Press, New York. 1988. pp 1873-1892.
- Savouret JF, Misrahi M and Milgrom E. 1990. Molecular action of progesterone. *International Journal of Biochemistry*. **22** (6): 579-594.
- Savouret JF, Bailly A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A & Milgrom E. 1991. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO Journal*. **10**: 1875-1883.
- Shymala G, Schneider W, Schoot D. 1990. Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology*. **126**: 2882-2889.
- Staples, R.E. 1967. Behavioural induction of ovulation in the oestrus rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. **13**: 429-435.

- Syväälä H, Pekki A, Bläuer M, Pasanen S, Mäkinen E, Ylikomi T and Tuohimaa P. 1996. Hormone-dependent changes in A and B forms of progesterone receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **58** (5/6): 517-524.

-Syväälä H, Vienonen A, Yikomi T, Bläuer M, Zhuang Y, and Tuohimaa P.1997. Expression of the chicken progesterone receptor forms A and B is differentially regulated by estrogen *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **231**: 573-576.

-Tortora G & Anagnostakos N. Principios de Anatomía y Fisiología. Capítulo 23: Sistema respiratorio. Harla. Tercera edición. 1980. pp 1034.

-Turcotte B, Meyer MC, Bellard M, Dretzen G, Gronemeyer H & Chambon P. 1991. Control of transcription of the chicken progesterone receptor gene. *In vitro* and *in vivo* studies. *Journal of Biological Chemistry*. **266**: 2582-2589.

-Vegeto E, Shahbaz M, Wen D, Goldman M, O'Malley B and McDonnell D. 1993. Human progesterone receptor A form is a cell -and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Endocrinology*. **7**: 1244-1255.

-Yamamoto, K. R. 1985. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annual Review of Genetics*. **19**:209.

11. APENDICE

* 1 ml de TRIzol Reactivo para la extracción de RNA (Gibco BRL) por cada 100 mg de tejido:

Tiocianato de guanidina

Fenol

β -mercaptoetanol

*H₂O-DEPC

Mezclar 1.5 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) en 13.5 ml de alcohol etílico absoluto y aforar a 1500 ml con H₂O destilada. Incubar a 37°C por dos horas y esterilizar por autoclave.

*MOPS 12X.

Disolver 24.72 g de ácido 3-(N-morfolino)propanensulfónico (MOPS) en 400 ml de Acetato de Sodio 50 mM, ajustar el pH a 7.0. Añadir 5 ml de EDTA 0.5 M. Ajustar el volumen a 500 ml con H₂O con DEPC, y filtrar en membranas Millipore 0.45 μ m.

*SSC 20X

Disolver 175.3 g de NaCl y 88.2 g de Citrato de Sodio en 800 ml de H₂O destilada. Ajustar el pH 7.0. Aforar a 1000 ml y esterilizar por autoclave.

*SDS 10%

Disolver 100 g de Dodecil Sulfato de Sodio en 900 ml de H₂O destilada. Incubar a 68°C hasta que se disuelva completamente. Ajustar el pH a 7.0. Aforar a 1000 ml. Distribuir en alícuotas.

***EDTA 0.5 M**

Agregar 186.1g de Etilendiaminotetraacetato (EDTA) a 800 ml de H₂O destilada. Agitar hasta que se disuelva. Ajustar el pH a 8.0, aforar a 1000 ml y esterilizar por autoclave.

***Amortiguador de carga para RNA 6X (Loading Buffer).**

50% Glicerol

1 mM EDTA (pH 8.0)

0.25% azul de bromofenol

0.25% Xilen Cianol.

***PB 0.6 M pH 6.5**

Disolver 21.3 g de Na₂HPO₄ en 250 ml de H₂O. Aparte disolver 20.7 g de NaH₂PO₄ en 250 ml de H₂O. A la solución de fosfato dibásico adicionar poco a poco la solución de fosfato monobásico hasta alcanzar el pH deseado.

***Reactivo Denhardt 100X**

10 g de Ficoll tipo 400

10 g de polivinilpirrolidona

10 g de albúmina de suero bovino.

Mezclar y esterilizar por filtración en membranas Millipore de 0.45 μm.

Guardar a -20°C.

***Tris-HCl 1M (pH 7.4)**

157.64 g Tris-HCl en 800 ml de H₂O. Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1000 ml. Esterilizar por autoclave.

***TE (Tris-EDTA)**

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

1 mM EDTA (pH 8.0)

1 ml de Tris-HCl 1 M (pH 7.4) más 200 μ l de EDTA 0.5 M en 100 ml de H₂O. Esterilizar.

***Sephadex G-50**

10 g de sephadex G-50 se lavan varias veces con 160 ml de H₂O para eliminar el dextran soluble. Se equilibra la resina con TE (pH 8) y se esteriliza por autoclave.