



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EXPRESIÓN DE RECEPTORES A ESTRADIOL Y PROGESTERONA  
EN LAS VÍAS AÉREAS Y SU REGULACIÓN EN UN  
MODELO DE ASMA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

**JOSÉ ABRAHAM ZARAZÚA LOZADA**

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. MARÍA GUADALUPE CAMPOS LARA**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA, CMN SXXI, IMSS  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ, SS

COMITÉ TUTOR

**DRA. PATRICIA SEGURA MEDINA**

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

**DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ**

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIO SOCIAL DE LOS  
TRABAJADORES DEL ESTADO

CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# Agradecimientos

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al CONACYT por el otorgamiento de la beca 255775 para la realización de esta investigación.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por el otorgamiento de la beca 99093809 y el financiamiento FIS-IMSS-PROT-G09-773 para la realización de esta investigación.

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez por el apoyo económico para la publicación del artículo de esta investigación.

***“Do or do not. There is no try”***

Master Yoda

# Índice

	Página
<b>Tabla de Abreviaturas</b>	5
<b>Resumen</b>	7
<b>Introducción</b>	8
Las Hormonas Esteroides y sus Receptores	10
Regulación y Secreción de las Hormonas Esteroides	10
Síntesis de las Hormonas Esteroides	11
Receptores Nucleares	12
Receptor de Estrógenos	14
Receptor de Progesterona	15
Receptor de Andrógenos	16
Asma	16
Definición	16
Etiología y Clasificación	18
Fisiopatología del Asma	20
Hiperreactividad bronquial	20
Inflamación y remodelación	21
Características del Asma Alérgica	22
Alérgenos	22
Células	22
Mediadores químicos	22
Neurotransmisores	23
Alergia	23
El músculo liso de la vías aéreas y el asma	26
Las hormonas esteroides y el asma	29
Estrógenos	29
Progesterona	30
Andrógenos	31
Receptores de Hormonas Esteroides en las Vías Aéreas	32
<b>Hipótesis</b>	34
<b>Objetivo General</b>	35
<b>Objetivos Particulares</b>	35

<b>Animales, Material y Métodos</b>	36
Animales	36
Modelo de asma alérgica: sensibilización con ovoalbúmina	36
Comprobación de la sensibilización del MLVA	37
Tratamientos hormonales	37
Aislamiento del MLVA	38
Disgregación de las células del MLVA	38
Extracción de proteínas y Western blot	39
Densitometría	40
RT-PCR en tiempo real con MLVA	41
Citometría de Flujo	41
Análisis estadístico	43
<b>Resultados y discusión</b>	44
Comprobación del modelo de asma alérgica	44
Receptor de estrógenos $\alpha$	48
Receptor de estrógenos $\beta$	52
Receptores de progesterona	55
Receptor de andrógenos	58
<b>Referencias</b>	69

## Tabla de abreviaturas

Acrónimo	Significado
AF-1	Dominio de activación de la transcripción génica - 1
AF-2	Dominio de activación de la transcripción génica - 2
ANOVA	Análisis de varianza
AR	Receptor de andrógenos
CHRM2	Receptor colinérgico muscarínico 2
CMLVA	Células de músculo liso de las vías aéreas
DAG	Diacilglicerol
DBD	Dominio de unión al DNA
E+P	17- $\beta$ estradiol + progesterona
E2	17- $\beta$ estradiol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ER $\alpha$	Receptor de estrógenos $\alpha$
ER $\beta$	Receptor de estrógenos $\beta$
FAP	Factor activador de plaquetas
Fc $\epsilon$ RI	Receptor para la fracción constante $\epsilon$
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FSH	Hormona folículo estimulante
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
HRB	Hiperreactividad bronquial
HRE	Elementos de respuesta a hormonas
hsp 90	Proteína de choque térmico 90
HVA	Hiperreactividad de las vías aéreas
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular - 1
Ig	Inmunoglobulina (G, E)
IL	Interleucina
IP3	Inositol trifosfato
LH	Hormona luteinizante
ME	Matriz extracelular
MLVA	Músculo liso de las vías aéreas
MMP	Metaloproteasas
NAEPP	Programa nacional de educación para el Asma
NK	Linfocitos natural killers
NR	Receptor nuclear
OVA	Ovoalbúmina
P4	Progesterona
PC	Pruebas cutáneas
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEF	Pico máximo respiratorio

PIP2	Fosfatidil inositol bifosfato
PM	Peso molecular
PRA	Receptor de progesterona A
PRB	Receptor de progesterona B
q RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa
RB	Región bisagra
RTK	Receptores con actividad de tirosina cinasa
SHR	Receptores de hormonas esteroides
SNA	Sistema nervioso autónomo
T	Testosterona
TGF $\alpha$	Factor de crecimiento tumoral $\alpha$
tPR	Receptor total de progesterona (PRA + PRB)
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEF1	Volumen respiratorio máximo al final de 1 segundo

## Resumen

*Introducción:* Varios estudios han establecido el papel de las hormonas sexuales en las vías aéreas. No se han identificado receptores para estas hormonas directamente en las células del músculo liso de las vías aéreas (CMLVA), por lo que se desconocen su presencia, mecanismos de regulación y posibles cambios en condiciones basales y patológicas como el asma. El objetivo de este estudio fue determinar las diferencias de expresión y regulación de los receptores a hormonas esteroides en diferentes estadios hormonales. *Métodos:* Se utilizaron ratas gonadectomizadas hembras y machos, no sensibilizadas o sensibilizadas con ovoalbúmina (OVA) y divididas en grupos de 4 animales para ser tratadas con vehículo (aceite de maíz, control), 17 $\beta$ -estradiol (E2), progesterona (P4), 17 $\beta$ -estradiol + progesterona (E+P) o testosterona (T). Se determinó la presencia y regulación de los receptores de hormonas sexuales en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) por Western blot y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR), y en CMLVA por citometría de flujo. Los resultados se compararon con los del grupo control. *Resultados:* Se demostró la presencia de los receptores de estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), del receptor de progesterona A y B (PRA y PRB) y del receptor de andrógenos (AR) en el MLVA de ratas hembras y machos no sensibilizadas y sensibilizadas. En el MLVA se observó que las hormonas sexuales regulan la expresión proteica de sus receptores en ratas hembras y machos tanto no sensibilizadas como sensibilizadas; una regulación similar se encontró en la expresión de ESR1 (gen de ER $\alpha$ ) y PgR (gen del receptor total de progesterona (tPR)). Con el fin de asegurar que los receptores observados estaban presentes solamente en CMLVA, se disgregaron las células de los tejidos aislados y se analizaron por citometría de flujo con doble tinción con anticuerpo  $\alpha$ -actina de músculo liso y el anticuerpo correspondiente del receptor de hormonas esteroides. Se obtuvieron los siguientes resultados estadísticamente significativos comparados con los de los grupos control. El ER $\alpha$  aumentó en las hembras no sensibilizadas tratadas con E2 y T y disminuyó en las hembras no sensibilizadas tratadas con P4 y en los machos sensibilizados tratados con P4, E+P y T. El ER $\beta$  aumentó en las hembras sensibilizadas tratadas con E2 y P4 y disminuyó en todos los grupos de tratamiento de hembras no sensibilizadas, así como en los machos no sensibilizados tratados con E+P y T, y en los machos sensibilizados tratados con P4, E+P y T. El tPR aumentó en las ratas hembras sensibilizadas tratadas con E2 y disminuyó en las ratas hembras no sensibilizadas tratadas con P4, E+P y T. El AR aumentó en las ratas machos sensibilizadas tratadas con E+P y T y disminuyó en las hembras sensibilizadas tratadas con E+P y T, y en los machos no sensibilizados tratados con P4, E+P y T. *Conclusiones:* Se demostró la presencia de receptores de hormonas sexuales específicamente en las CMLVA y la regulación de tales receptores por las propias hormonas sexuales en ratas hembras y machos no sensibilizadas y sensibilizadas. La sensibilización con ovoalbúmina modificó la identificación de los receptores; el sexo solo muestra diferencias en ER $\beta$ , AR y tPR. La P4 es la hormona preponderante en inducir diferencias de expresión de los receptores.

# INTRODUCCIÓN

En México la prevalencia de asma aguda es entre 3.7 y 5.7 % de los pacientes pediátricos atendidos. En la actualidad, el asma se ubica entre el primer y tercer lugar de las causas de internamiento en los hospitales generales, mientras que en el Instituto Mexicano del Seguro Social ocupa el tercer lugar. En los últimos años las tasas de mortalidad y morbilidad han aumentado de 3.24 a 12.7 y de 0.34 a 1.23 por cada 100 000 derechohabientes pediátricos, respectivamente. La Clínica de asma del INER reporta que el asma afecta actualmente a más de 15 millones de mexicanos. [1]

El asma es un síndrome crónico que se caracteriza por:

- 1) Hiperreactividad de la musculatura lisa de las vías aéreas (MLVA), esto es, una respuesta excesiva a un estímulo determinado.
- 2) Obstrucción de las vías aéreas reversible por agonistas  $\beta$ 2-adrenergicos.
- 3) Inflamación crónica que presenta dos fases:
  - a) Una fase temprana que se presenta 15 a 30 minutos después de la exposición al estímulo y se caracteriza por una broncoconstricción generada por mediadores como histamina y  $\text{TNF}\alpha$ , y por mediadores sintetizados *de novo* principalmente a partir del ácido araquidónico como prostaglandinas y leucotrienos.
  - b) Una fase tardía que se presenta aproximadamente a las 4 horas y en la que participan eosinófilos, basófilos y monocitos.
- 4) Remodelación tisular del MLVA caracterizada por hiperplasia e hipertrofia de las células de músculo liso. [2]

EL MLVA es de gran importancia en el asma ya que, además de su

papel central en regular el tono broncomotor, tiene una gran actividad metabólica pues secreta una amplia gama de mediadores inmunomoduladores en respuesta a estímulos extracelulares; principalmente citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y metaloproteasas participantes en la remodelación tisular. [3]

Por otro lado, las hormonas esteroides sexuales participan activamente en diversos procesos pulmonares dando lugar a diferencias por sexo. Por ejemplo, en neonatos prematuros se ha observado que las mujeres presentan un mayor desarrollo pulmonar que los varones, [4] debido a la testosterona secretada por las células de Leydig del feto [5] que disminuye la producción de surfactante. Otro ejemplo de regulación de las hormonas sexuales en procesos pulmonares es la fibrosis pulmonar donde la prevalencia es mayor en hombres que en mujeres, y la hiperreactividad pulmonar está favorecida por el estradiol. [4]

La relación entre el asma y las hormonas esteroides sexuales es muy clara desde la infancia ya que, cuando se presenta el aumento de testosterona durante la adolescencia, la prevalencia, que hasta entonces es 70% en varones y 30% en mujeres, se invierte. [6]

En las mujeres la prevalencia de asma está relacionada con los niveles de estrógenos y progesterona. Durante la etapa reproductiva, los ataques asmáticos aumentan durante la fase lútea del ciclo menstrual, es decir, cuando existen altas concentraciones de estrógenos y progesterona. En el embarazo, las mujeres que presentan un cuadro clínico leve antes del mismo mejoran su condición; mientras que las que presentan un cuadro clínico grave pueden aumentar su gravedad. En la posmenopausia, cuando los niveles de estrógenos y progesterona son mínimos, algunas pacientes presentan una

mejoría mientras que otras, que no habían presentado la enfermedad, comienzan a presentarla.[7]

Hay escasos reportes de cómo las hormonas sexuales afectan el funcionamiento de las vías aéreas. Se sabe que la progesterona induce hiperventilación en humanos y ratas [8] e inhibe la contracción del MLVA [9]. Prácticamente no hay reportes sobre la presencia de receptores a esteroides sexuales en las CLMVA. Entre los escasos reportes, esta uno que señala que el contenido de las isoformas A y B del receptor a progesterona, así como del receptor beta a estrógenos, es mayor en homogeneizado de pulmón en ratas hembras que en machos [10]. La expresión del mRNA del receptor a progesterona se incrementa por el tratamiento con estrógenos y disminuye por el tratamiento con progesterona en homogeneizados de pulmón de conejas hembras ovariectomizadas; en este mismo trabajo se menciona que el mRNA del receptor a progesterona se incrementa durante el primer día de embarazo [11].

## **Las hormonas sexuales y sus receptores**

### **Regulación y secreción de las hormonas esteroides**

Las hormonas esteroides sexuales (estrógenos, progestágenos y andrógenos) son secretadas por las gónadas y las glándulas suprarrenales por la acción que ejercen las gonadotropinas a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada/suprarrenal. El núcleo arcuato del hipotálamo produce de manera pulsátil y controlada la liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que actúa sobre la adenohipófisis induciendo la liberación de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), que estimulan a las gónadas las que inducen a su vez la secreción de las hormonas esteroides. Estas regulan sus concentraciones

inhibiendo la liberación de la GnRH, LH y FSH. Otro mecanismo de regulación son las inhibinas, secretadas por los ovarios y los testículos en respuesta a las gonadotropinas y a factores de crecimiento locales [12], que actúan sobre la hipófisis (Figura 1) [13].

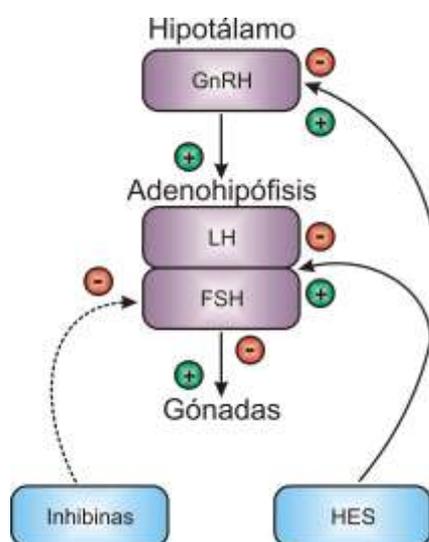


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que estimula a la hipófisis para la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH) para activar la secreción de las hormonas esteroides sexuales (HES).

⊕ Activación, ⊖ Inhibición.

### Síntesis de las hormonas esteroides

Las hormonas esteroides se originan a partir de un precursor común, el colesterol, el cual es captado de las lipoproteínas plasmáticas por las células esteroideogénicas (corteza suprarrenal, teca y granulosa ovárica, células de Sertoli y de Leydig testiculares) y utilizado como sustrato para la síntesis de las hormonas esteroides. De ser necesario, el colesterol puede ser sintetizado *de novo*. Las células no almacenan las hormonas esteroides sintetizadas para ser liberadas posteriormente, sino a su precursor, el colesterol esterificado, para su posterior síntesis a demanda. La ruta de biosíntesis de las hormonas esteroides es regulada por enzimas del citocromo P450 (Figura 2) [14].

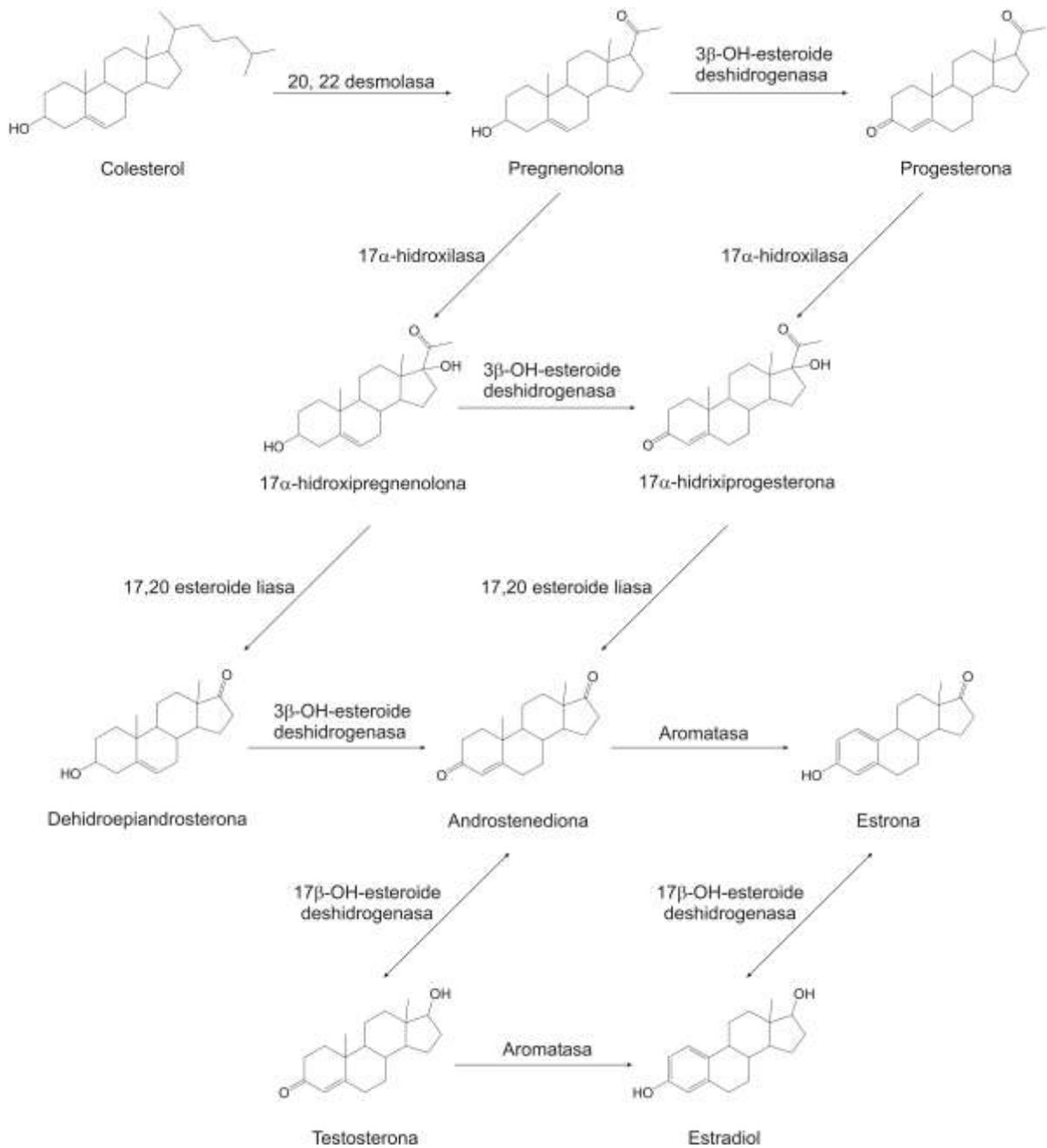


Figura 2. Biosíntesis de las hormonas esteroideas.

## Receptores nucleares

La acción que ejercen las hormonas esteroideas en diferentes células está dada principalmente por una respuesta genómica por los receptores a hormonas esteroideas pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares, de los cuales se han descrito al menos 48 hasta el momento. [15]

Los receptores nucleares tienen una estructura muy similar que consta de 4 dominios de estructura/función. 1) dominio N-terminal variable, que contiene una función de activación de la transcripción génica (Activation Function 1 o AF-1) y varios sitios de fosforilación (PS), que son importantes en el proceso de activación de la proteína, especialmente en los procesos donde el receptor es activado en ausencia de hormona. [15-17] 2) un dominio de unión al DNA (DBD), el más conservado entre los receptores nucleares, compuesto por nueve residuos de cisteínas invariablemente conservados entre los diferentes receptores esteroideos (formando dos dedos de zinc) y que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al DNA. La unión a una secuencia específica en el DNA está determinada por la composición de aminoácidos localizada entre los dedos de zinc, conocida como la caja P (P-box). [18] 3) Una región bisagra (RB), la cual no ha sido bien caracterizada y que participa en la unión a la proteína chaperona de choque térmico hsp90 (heat shock protein 90), la cual permanece unida al receptor mientras este se encuentre en un estado inactivo. 4) un dominio de unión al ligando (LBD), que a pesar de ser conservada entre los diferentes receptores esteroideos, es altamente específica para su hormona. Otras funciones de este dominio incluyen activación de la transcripción o AF-2 (Activation Function 2), dimerización, interacción con otras proteínas coactivadoras o correpresoras de la transcripción, fosforilación y localización nuclear (Figura 3). [19]



Figura 3. Organización de los receptores a hormonas esteroideas. Función de activación de la transcripción génica 1, (AF1), sitio de fosforilación (PS), dominio de unión al DNA (DBD), región bisagra (RB), dominio de unión del ligando (LBD) y función de activación de la transcripción génica 2 (AF2).

El mecanismo de acción de los receptores nucleares se puede describir de la siguiente forma: 1) Gracias a su gran liposolubilidad, las hormonas difunden a través de la membrana celular y se unen con su receptor, ya sea en el citoplasma o en el núcleo de la célula [19]; 2) dimerización y activación del receptor; 3) translocación del complejo ligando-receptor al interior del núcleo celular; 4) el complejo ligando receptor se une a elementos de respuesta a las hormonas en el DNA o a otros factores transcripcionales para regular la expresión génica. (Figura 4)

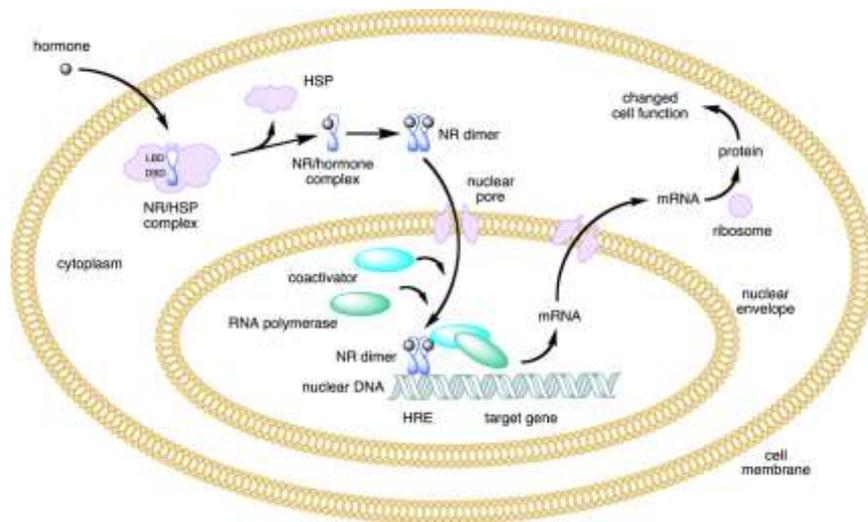


Figura 4. Mecanismo de acción de los receptores nucleares. Receptor nuclear (NR), proteína de choque térmico (HSP), elementos de respuesta a hormona (HRE)

### Receptor de estrógenos

El receptor de estrógenos (ER) fue identificado en 1962. Jensen et al. describieron la presencia de sitios de unión a estrógenos en diferentes tejidos de ratas [20]. Cuatro años más tarde, Toft y Gorski aislaron por primera vez receptores de estrógeno del útero de ratas. [21] Ambos grupos desarrollaron distintos modelos para explicar cómo el estradiol lleva a cabo su acción a nivel del núcleo al unirse al receptor específico de estrógenos. Hasta hace 20 años se pensaba que todos los efectos debidos a estrógenos eran mediados por un solo ER, sin embargo, en 1996 fue descubierto un nuevo receptor que compartía gran homología con el ER

conocido y se decidió denominarlo ER- $\beta$  [22] (al recientemente descubierto) y ER- $\alpha$  (al previamente conocido). Los dos genes del receptor de estrógenos están situados en cromosomas separados: ESR1 codifica el receptor a estrógenos  $\alpha$  (66 KDa) y ESR2 lo hace con el receptor  $\beta$  (56 KDa). Los dos receptores son factores de transcripción nuclear estrógeno dependientes que muestran diferentes distribuciones en tejidos y efectos reguladores transcripcionales en muy diversos tipos de genes destinatarios. [23] Ambos receptores humanos de estrógeno tienen una estructura idéntica en 44% de su secuencia global de aminoácidos.

### **Receptor de progesterona**

A principios de los 70 se reportó por primera vez un sitio de unión específico para la progesterona en útero humanos, conejos y cobayos; [24] se demostró que la progesterona se unía a un componente citosólico en células de útero de ratas y ratones, [25] y que el 17 $\beta$ -estradiol incrementaba los niveles del receptor a progesterona en útero de conejo. [26] Prácticamente desde el descubrimiento del receptor de progesterona (PR) se caracterizaron dos isoformas PRA y PRB del receptor a progesterona. [27] Actualmente se sabe que existen dos isoformas del PR llamadas A (PR-A) y B (PR-B) que derivan de promotores alternativos de un gen localizado en el cromosoma 11 q22-q23 humano. [28] El receptor B contiene 933 aminoácidos y un peso molecular (PM) de 116 kDa, mientras que el receptor A carece de los 164 aminoácidos iniciales teniendo un PM de 94 kDa. [29] Ambas isoformas se expresan en cantidades aproximadamente equimolares en aves y humanos, mientras que la isoforma A es la predominante en el ratón. [30] En aves, ambas proteínas son sintetizadas por traducción alternativa de un único mRNA; en humanos y ratón se generan a partir de dos mRNA distintos que se sintetizan por transcripción alternativa a partir de dos promotores. [31-32]

## **Receptor de andrógenos**

A finales de los 60s diferentes grupos demostraron la presencia de una proteína de unión para los andrógenos en el tejido de la próstata ventral y en el epidídimo [33, 34, 35, 36, 37, 38, 39]. El receptor fue originalmente descrito en testículos de ratas tratadas con testosterona. Chang et al. Caracterizaron en 1988 el receptor a andrógenos, demostrando que es blanco para la testosterona y la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, y que es una proteína intracelular perteneciente a la súper familia de receptores nucleares. [40, 41] El gen que codifica el receptor a andrógenos se encuentra en el cromosoma X. Existen dos isoformas del receptor de andrógenos (AR) A y B. [42] La isoforma A, de aproximadamente 87 KDa, contiene la porción carboxi-terminal intacta pero carece de la región N terminal normal presente en la isoforma AR-B. Al igual que los receptores a progesterona, ambas isoformas del receptor a andrógenos provienen de un mismo gen, generándose por empalme alternativo. [43]

## **Asma**

### **Definición**

Definir el asma es complejo, ya que es una enfermedad multifactorial (etiología, características morfológicas, cambios funcionales y manifestaciones clínicas) en la cual existe una interacción entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso autónomo. Sin embargo, la definición más completa es la que toma en cuenta tanto el punto de vista funcional como el celular. Es por eso que la definición que mejor se adapta es la propuesta por la Iniciativa Global para el asma (GINA 2006), [44] que propone al asma como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la cual muchas células y productos celulares juegan un papel importante. La inflamación crónica produce un incremento en la reactividad de las vías aéreas y

episodios recurrentes de sibilancias, dificultad respiratoria, tiraje intercostal, tos y opresión torácica, especialmente en la noche y en la mañana. Estos episodios se asocian con obstrucción del flujo aéreo, reversible espontáneamente o con tratamiento. La inflamación también causa un aumento en la respuesta bronquial a una gran variedad de estímulos. [45] Así entonces, en todos los casos se hace énfasis en que el asma es una alteración inflamatoria crónica de las vías aéreas, que puede asociarse en forma aguda o crónica con limitación del flujo aéreo como resultado de broncoconstricción, edema, secreción mucosa, inflamación y, en algunos pacientes, remodelación de las vías aéreas. La remodelación de las vías aéreas corresponde a los cambios estructurales caracterizados por engrosamiento de la lámina reticular con depósitos de fibrina subepitelial y perivascular, hiperplasia de las glándulas mucosas, músculo liso y vascular. Esto determina el engrosamiento de la pared de los bronquios de conducción mayor y también en las vías aéreas pequeñas. [46] El engrosamiento de la pared bronquial y su mayor rigidez, la disminución del área de sección transversal y el acortamiento de las vía aéreas, determina la pérdida de la función pulmonar observada en algunos pacientes asmáticos en estudios longitudinales. [47] Este mayor grosor y rigidez de las vías aéreas condiciona en parte la hiperreactividad bronquial (HRB) inespecífica (10 a 20 % de los asmáticos tendrán remodelación). La atopia es el factor predisponente identificable más importante de esta enfermedad, y se define como la predisposición genética para producir inmunoglobulina E (IgE) como una respuesta antígeno-específica a alérgenos comunes inocuos para la mayoría (polvo, epitelios de animales o pólenes). El asma es una enfermedad crónica de las vías aéreas producida por una compleja interacción entre obstrucción de las vías aéreas, HRB e inflamación, de manera variable y recurrente. [48] La interacción de estas tres características determina las manifestaciones clínicas, la gravedad del asma y

su respuesta al tratamiento.

### **Etiología y clasificación**

Se ha intentado clasificar el asma según sus causas, intensidad y obstrucción de las vías aéreas valorada por el volumen espiratorio máximo al final del primer segundo (VEF1) o el pico espiratorio máximo (PEF) y su respuesta al manejo. Esto no es apropiado, ya que el asma es multifactorial y contribuyen tanto factores genéticos como ambientales. Anteriormente, el asma se clasificaba en extrínseca, la cual tenía un componente alérgico, y en asma intrínseca, que representaba a un grupo de pacientes donde no se encontraba una causa justificada y con pruebas de laboratorio para alergia negativas. El asma puede clasificarse por los factores etiológicos, la gravedad o el tipo de limitación en el flujo aéreo. Dado que es una enfermedad heterogénea, existen múltiples factores causales tanto para su inducción como para su exacerbación, desde infecciones virales en la infancia hasta exposición ocupacional en los adultos. La gravedad se estima por una evaluación combinada de los síntomas, cantidad de agonistas broncodilatadores para controlar los síntomas y la función pulmonar. [49]

La clasificación etiológica divide al asma en asma extrínseco, intrínseco y mixto. El asma extrínseco se presenta en edades tempranas, con carga familiar de atopia, con pruebas cutáneas (PC) positivas a múltiples alérgenos e IgE total elevada. El asma intrínseco se presenta generalmente después de los 35 años de edad, sin carga familiar de atopia, con PC negativas e IgE total normal. Se presenta como consecuencia de infecciones, ejercicio, cambios hormonales, estímulos psicológicos, etc. El asma mixto consiste en una combinación de características de ambas; sin embargo, esta clasificación está limitada por la existencia de pacientes asmáticos en quienes el ambiente no tiene causa identificada. Aun así, en todo paciente asmático es necesario identificar factores

exacerbantes ambientales como parte inicial de la historia clínica, pues esto ayudará en la estrategia terapéutica. [50]

El Programa Nacional de Educación para el Asma (NAEPP) [47] ha propuesto una clasificación con base en la gravedad de este padecimiento, en donde se agrupan una serie de variables que incluyen: 1) la frecuencia de los síntomas durante el día y la noche, 2) su repercusión en las actividades cotidianas realizadas durante el día y la noche, 3) el uso, número de veces y la dosis en que se utiliza el agonista para tratar los síntomas, y 4) la función pulmonar. Esta clasificación es útil, ya que relaciona la inflamación de las vías aéreas con la clínica y con los índices de gravedad de síntomas según la intensidad del asma. Además, vincula los datos clínicos con el grado de obstrucción de las vías aéreas y la variabilidad de los parámetros clínicos que miden esta obstrucción (VEF 1 o PEF). De esta forma, se ha subdividido el asma crónica en: leve intermitente, leve persistente, moderada persistente y grave persistente. Este tipo de clasificación permite iniciar el tratamiento basado en la gravedad y establecer, posteriormente, un plan de tratamiento de acuerdo al control y estabilización de los síntomas. Así, la gravedad de los pacientes con asma puede clasificarse en uno de estos cuatro escalones antes del tratamiento y durante la vigilancia de este. Si el control de asma se mantiene, el grado de la enfermedad se reclasifica y se instala otro manejo de acuerdo a la intensidad. Otra forma para clasificar el asma es con base a los parámetros de función pulmonar que se correlacionan con obstrucción de las vías aéreas, así, con base al grado de obstrucción obtenido mediante el VEF1 o el PEF se cataloga la intensidad del asma. Este tipo de clasificación ayuda al manejo adecuado, que aunado a los síntomas matutinos y nocturnos es más útil.

## **Fisiopatología del asma**

El estrechamiento de las vías aéreas es la vía final común que desemboca en los síntomas y cambios fisiopatológicos del asma. Las principales alteraciones funcionales del asma son la obstrucción del flujo aéreo, la HRB y la inflamación y la remodelación de las vías aéreas.

La obstrucción de las vías aéreas de los asmáticos se presenta por un aumento de la masa del músculo liso bronquial, causado por hipertrofia e hiperplasia celular. Los miofibroblastos, fibroblastos y pericitos del endotelio vascular son células que poseen la capacidad de convertirse en células musculares a través de un proceso de diferenciación. El broncoespasmo es la respuesta súbita que tiene como vía efectora el músculo liso bronquial y genera contracción del mismo ante diversos estímulos, ocasionando el estrechamiento de las vías aéreas con disminución del flujo. Varios factores regulan el tono del músculo liso bronquial, destacando las células residentes (mastocitos, células epiteliales, macrófagos y células endoteliales) y las células inflamatorias (eosinófilos, linfocitos, neutrófilos, basófilos) capaces de liberar sustancias proinflamatorias (histamina, cisteinil-leucotrienos, prostaglandina D<sub>2</sub>, el factor activador de las plaquetas (FAP)), las cuales producen contracción del músculo liso y liberación de una mayor cantidad de mediadores. El estímulo neural del músculo liso bronquial y los estímulos directos, liberan acetilcolina de los nervios posganglionares produciendo broncoespasmos. La sustancia P y neurocinina A son también reguladores del tono muscular. [50]

## **Hiperreactividad bronquial**

La HRB es la respuesta exagerada que induce un broncoespasmo mucho más intenso del que se observa en los individuos normales que son expuestos a estímulos que afectan directamente al árbol bronquial (contaminantes, ejercicio).[50]

## **Inflamación y remodelación**

La inflamación es una de las principales características del asma y contribuye de manera significativa a la expresión de la enfermedad. El patrón inflamatorio dependerá del estado de la enfermedad. Algunos factores que contribuyen a la inflamación y a la remodelación son las infecciones virales, la sensibilización alérgica y la contaminación ambiental. El proceso inflamatorio produce edema de la submucosa con infiltrado celular, angiogénesis de los vasos con dilatación, congestión, hipertrofia e hiperplasia del músculo liso. [44] El aumento del número y tamaño de los vasos contribuye al engrosamiento de la pared bronquial y favorece la obstrucción de las vías aéreas.

El daño que produce la inflamación sobre el epitelio respiratorio se traduce en una pérdida de la barrera epitelial. La extensión del daño epitelial parece ser el resultado de la disfunción del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual regula al factor de crecimiento epidérmico (EGF) necesario para una reepitelización adecuada. Los EGF estimulan la proliferación epitelial y producción de metaloproteasas (MMP) que degradan la matriz extracelular (ME) y mantienen un balance con el factor de crecimiento tumoral –  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) que incrementa la síntesis de los componentes de la ME e inhibe la producción de MMP. El fibroblasto es una célula clave en el proceso de remodelación del asma, ya que produce una gran cantidad de citocinas y factores de crecimiento e induce la síntesis de ácido hialurónico y otros proteoglicanos de la ME. En la remodelación de las vías aéreas coexisten fenómenos que tienden a agravar la obstrucción y la HRB (incremento de la masa de músculo liso, reorganización de la elastina y cartílago), junto con mecanismos compensadores del daño inflamatorio bronquial (regeneración epitelial, depósito de colágeno subepitelial y entre las capas musculares). Hay angiogénesis durante la reconstrucción de las vías aéreas,

infiltración vascular y vasodilatación, estos cambios pueden ser resultado del daño directo sobre el epitelio y producir remodelación. [50]

## **Características del Asma alérgica**

### *Alérgenos*

Los alérgenos internos y externos son bien conocidos como causantes de exacerbaciones de asma; sin embargo, su papel en el desarrollo de esta enfermedad no está bien conocido. Estudios de cohorte al nacimiento revelaron que la sensibilización a ácaros, pelo de gato y perro y *Aspergillus* son factores independientes para síntomas de asma en niños de hasta tres años de edad. [51, 52] Sin embargo, la asociación entre sensibilización y desarrollo de asma no es directa y depende del alérgeno, la dosis, el tiempo de exposición, edad del niño y la herencia. En la fisiopatología del asma se debe tener en cuenta: inflamación bronquial (con o sin factor alérgico), obstrucción del flujo aéreo e HRB. En la inflamación intervienen células, mediadores químicos y neurotransmisores: (Figura 5)

### *Células*

La presencia de eosinófilos y mastocitos activados en el epitelio y en la luz bronquial, se traducen en el aumento de las concentraciones de los productos elaborados por estas células (histamina, prostaglandinas D2 y leucotrienos). [50] (Figura 5)

### *Mediadores químicos*

Los eosinófilos y mastocitos liberan numerosas sustancias químicas capaces de ocasionar edema y broncoconstricción de la mucosa respiratoria: histamina, eicosanoides (derivados del ácido araquidónico) y el FAP. [50] (Figura 5)

### *Neurotransmisores*

Las vías aéreas están reguladas por el sistema nervioso autónomo (SNA), que actúa sobre la musculatura lisa bronquial y las glándulas secretoras. El SNA está formado por el sistema adrenérgico o simpático (broncodilatador) y el colinérgico o parasimpático (broncoconstrictor). Los neurotransmisores son la noradrenalina y la acetilcolina, respectivamente. [50] (Figura 5)

### *Alergia*

La alergia es una hipersensibilidad inmediata mediada por una respuesta  $T_H2$  a través de anticuerpos IgE. Es activada por la entrada de un tipo de antígeno conocido como alérgeno al organismo, el cual es capturado, endocitado y procesado por células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas), las cuales lo transportan a los ganglios linfáticos donde lo presentan en el seno de una molécula de histocompatibilidad clase II al linfocito T CD4+. Este linfocito, una vez activado, secreta IL-4, la cual da lugar a una respuesta mayoritariamente de tipo  $T_H2$  característica de la atopia, con lo cual se produce el cambio de isotipo de cadena pesada y se sintetizan anticuerpos de tipo IgE. Esta unión también aumenta la secreción por parte del linfocito T de IL-5, la cual activa a los eosinófilos, y la IL-13, que estimula a las células epiteliales de las vías aéreas para aumentar la secreción de moco.

Una vez generados las IgE, estas son reconocidos por el receptor para la fracción constante  $\epsilon$  (Fc $\epsilon$ RI) presente en la superficie de los mastocitos, basófilos y eosinófilos, formando un complejo que reconoce a los alérgenos cuando se produce una re-exposición a este tipo de antígeno, con lo cual se produce un entrecruzamiento que activa la señalización del receptor y se liberan los gránulos

contenidos en los mastocitos, basófilos y eosinófilos. Estos gránulos contienen citocinas y mediadores como la histamina, tromboxanos, prostaglandinas y leucotrienos que ocasionan las manifestaciones clínicas típicas del asma. [53] En la fase temprana hay espasmo del músculo liso bronquial, y en la fase tardía, se presenta la inflamación. (Figura 5)

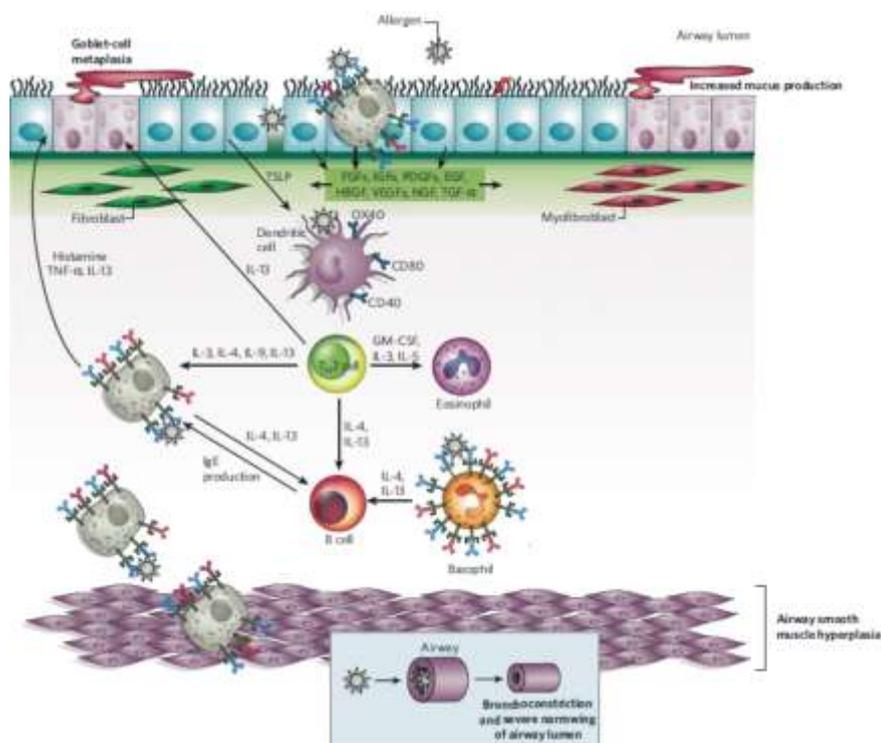


Figura 5. Mecanismo de producción de la alergia. Modificada de Galli, 2008. [54]

Muchas células participan en este proceso y liberan sustancias proinflamatorias o enzimas proteolíticas que dañan directamente el epitelio bronquial. El inicio de la respuesta origina la activación y liberación de mediadores, en un proceso que ha sido denominado como "cascada alérgica" [55]. El patrón característico de la inflamación encontrada en las enfermedades alérgicas es la del asma, con mastocitos activados, un número incrementado de eosinófilos activados, linfocitos

natural killers (NK) y linfocitos T<sub>H2</sub> que provocan la liberación de mediadores inflamatorios. El daño producido sobre el epitelio de las vías aéreas estimula la generación de factores de crecimiento fibrolinfoproliferativos y profibrogenéticos, los cuales promueven la proliferación y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, promueven la secreción de colágeno intersticial y actúan como mitógenos para el músculo liso y células endoteliales, causando remodelación pulmonar. En este proceso participan una variedad de células como los eosinófilos y los neutrófilos. Los eosinófilos son células que contienen en su interior gránulos con enzimas proteolíticas, como la proteína básica mayor, que daña el epitelio de las vías aéreas de manera directa y estimula la desgranulación de basófilos y mastocitos; producen leucotrienos, especialmente b<sub>4</sub>, que contrae el músculo liso, aumenta la permeabilidad vascular y puede reclutar más eosinófilos. [56] Los neutrófilos son células polimorfonucleares que contienen en su interior gránulos de proteasas, hidrolasas, mieloperoxidasas y enzimas, capaces de secretar citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), hematopoyéticas (IL-3, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)) y quimiocinas (IL-8), las cuales reclutan células inflamatorias y promueven una respuesta en cascada. [57, 58]

## **El músculo liso de las vías aéreas y el asma**

Las células músculo liso de las vías aéreas participan activamente en el asma, no solo en regular el tono broncomotor sino también en eventos tan relevantes como la remodelación de las vías aérea, ya que se sabe que la estimulación crónica de las células de músculo liso con agonistas contráctiles induce o aumenta la proliferación de las mismas. [59]

Se ha demostrado *in vivo* que las células de músculo liso de las vías aéreas de humanos secretan diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), que son efectivos y potentes mitógenos del músculo liso. Esta proliferación puede ser señalizada por dos vías: receptores con actividad de tirosina cinasa (RTK) y receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas que activan receptores citoplasmáticos sin actividad de tirosina cinasa. Ambas vías conllevan al aumento de la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular a través de la activación de la fosfolipasa C, la cual hidroliza el fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) en inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), lo cual lleva por efecto pleiotrópico a la activación de proto-oncogenes de la familia c-onc.

Otras moléculas secretadas por las células de músculo liso de las vías aéreas son las citosinas. Se ha descrito que la interleucina 1-b y la interleucina 6 estimulan la hiperplasia e hipertrofia en cultivos de células de músculo liso de las vías aéreas de cobayos; [60] sin embargo, en humanos no tienen efectos mitogénicos en células de músculo liso de humanos. [61] Se ha reportado que el factor de necrosis tumoral tiene un efecto mitogénico dosis dependiente (3-30 pM) en células de músculo liso de las vías aéreas de humanos, [62] pero a concentraciones altas como 300 pM el efecto es contrario.

Se ha reportado que las interleucinas secretadas por las células de músculo liso de las vías aéreas inducen la ciclooxigenasa-2, la cual produce la prostaglandina E2 la cual inhibe la síntesis de DNA. [61] Por lo tanto, las citocinas inducen proliferación de las células de músculo liso de las vías aéreas en condiciones de inhibición de la ciclooxigenasa y donde la expresión de la prostaglandina E2 es limitada. [63]

La principal característica de la remodelación es el depósito de proteínas de la matriz extracelular (colágena I, III y V, fibronectina, tenascina, hialuronan, versican y laminina 2/b2) en las vías aéreas, que son secretadas por células de músculo liso de las vías aéreas en respuesta a suero de pacientes asmáticos. [64] Se sabe que la fibronectina y la colágena I incrementan la mitogénesis del músculo liso de las vías aéreas en respuesta al PDGF-BB o trombina; la laminina inhibe la proliferación. [65] El aumento en la proliferación se acompaña de la disminución en la expresión de proteínas contráctiles como  $\alpha$ -actina, calponina y la cadena pesada de la miosina lo que sugiere que la matriz extracelular modula el fenotipo de las vías aéreas.

Existen reportes que demuestran que diferentes citocinas (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , la interleucina 1b y el interferón  $\gamma$ ) aumentan la expresión de moléculas de adhesión (molécula de adhesión intracelular – 1 (ICAM-1) y molécula de adhesión celular vascular (VCAM)) [66] en las células de músculo liso de las vías aéreas, las cuales al interactuar con leucocitos perpetúan la inflamación. También se sabe que el bloqueo de ICAM-1 con anticuerpos específicos inhibe la inducción de hiperrespuesta del alérgeno e inflamación en monos. [67] (Figura 6 y Figura 7)

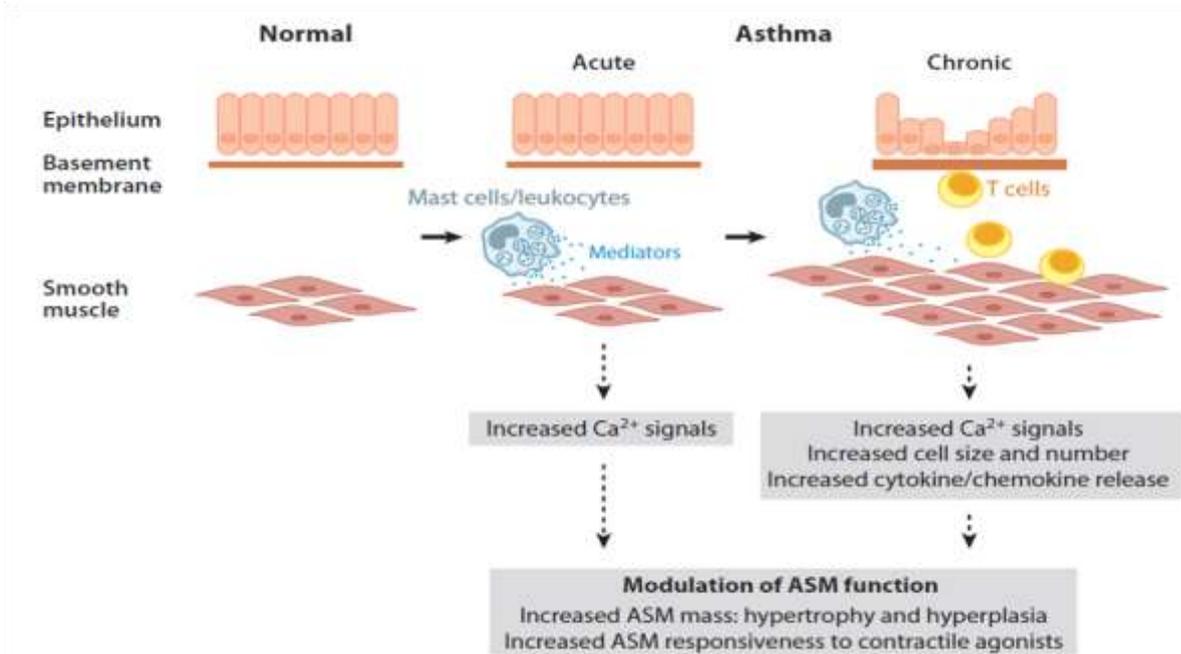


Figura 6. Modificaciones en el epitelio de las vías aéreas y aumento de la señalización de Ca<sup>++</sup> en el asma. ASM (músculo liso de las vías aéreas por sus siglas en inglés). Tomada de Tliba 2009. [68]

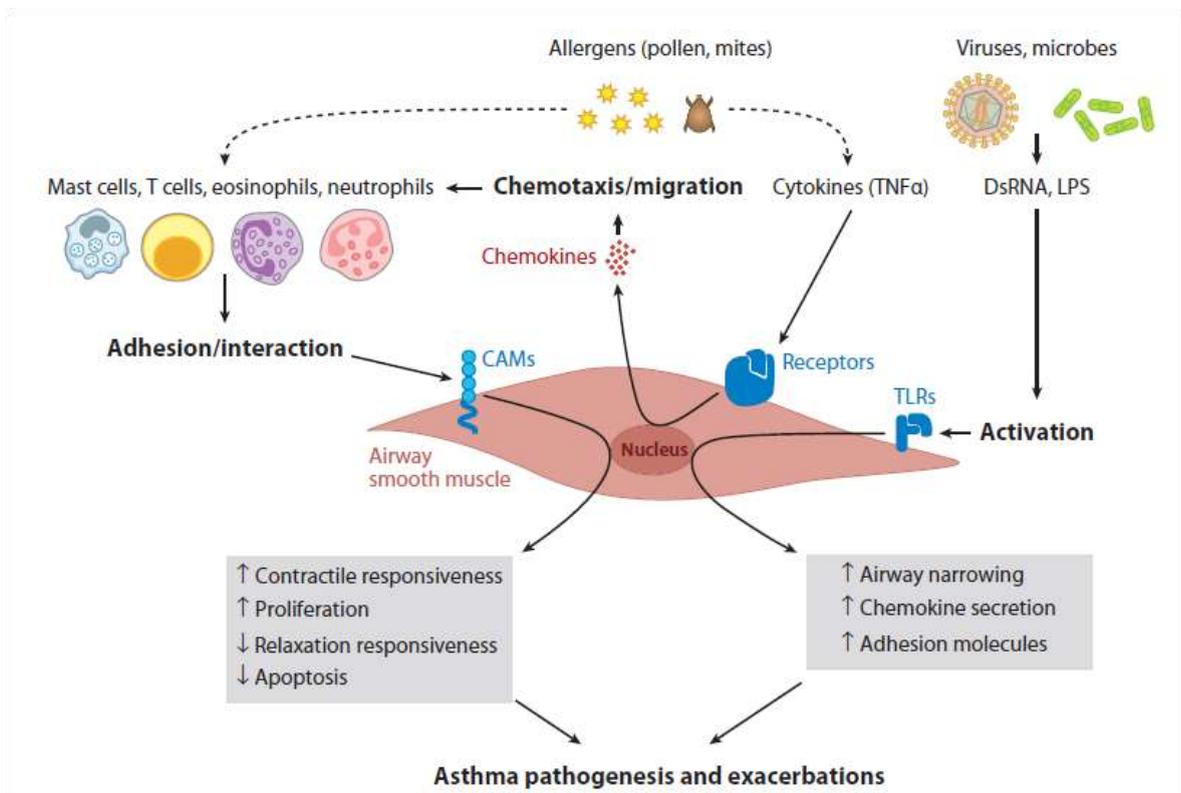


Figura 7. Expresión de diferentes receptores en las CMLVA en presencia de Asma alérgica. CAmS (Moléculas de adhesión celular, por sus siglas en inglés), TLRs (Receptores tipo Toll, por sus siglas en inglés), LPS (lipopolisacarido). Tomada de Tliba 2009. [68]

## Las hormonas esteroideas y el asma

### Estrógenos

Varias líneas de evidencia sugieren que los estrógenos, tales como estradiol, son broncoprotectores en el asma. Estudios donde se ha estudiado el papel del 17  $\beta$ -estradiol han observado que inhibe la contracción del MLVA inducida por acetilcolina [69], así como potencia la relajación inducida por agonistas adrenérgicos- $\beta$ 2 como adrenalina y noradrenalina. [70, 71] Los estrógenos también reducen el aumento de la contracción observada en MLVA de ratones pasivamente sensibilizados con el suero de asmáticos atópicos, [72] así como la capacidad de respuesta in vivo a una mezcla en forma de aerosol de espasmógenos. [67] El 17  $\beta$ -estradiol también es responsable de la diferencia entre sexos en el desarrollo de hiperreactividad de las vías aéreas (HVA) ante la exposición de alérgenos en ratones (Matsubara et al., 2008). [73] Por un lado, las hembras están protegidas de HVA inducida por inflamación alérgica, y esto se invierte ya sea por ovariectomía o por tratamiento con un antagonista de los estrógenos. Por otro lado, el tratamiento de machos con estrógenos los protegió de HVA inducida por la inflamación alérgica de las vías respiratorias. [73] La terapia de reemplazo de estrógenos en ratones ovariectomizados también atenúa el desarrollo de la disfunción de las vías respiratorias provocada por la inflamación alérgica de las vías respiratorias. [74] Además, los ratones hembra deficientes en el receptor-alfa a estrógenos son más sensibles a la metacolina en aerosol, ya sea en la presencia o ausencia de inflamación alérgica de las vías respiratorias. [75] Este fenotipo hipercontráctil en los ratones deficientes de receptor- $\alpha$  se asocia con una disminución de la expresión y la función del receptor colinérgico muscarínico 2 (CHRM2). [75] Por último, dosis bajas, pero no altas de estrógenos disminuyen la capacidad de respuesta de las

vías respiratorias en ratas ovariectomizadas en ausencia de inflamación de las vías respiratorias. [76] Esto ocurre en conjunto con la disminución de la capacidad de respuesta de MLVA aisladas a la acetilcolina, asociado con un aumento de la liberación de la acetilcolinesterasa del epitelio. [77] En contraposición, una alta dosis de 17  $\beta$ -estradiol aumenta la contractilidad de MLVA *in vitro* y disminuye la función pulmonar *in vivo*. [76] La dicotomía dependiente de la dosis de los estrógenos sobre la contractilidad MLVA puede ser responsable para el efecto deletéreo propuesto de los estrógenos sobre los resultados del asma en seres humanos. [78, 79] A pesar de estos estudios, la terapia de estrógenos en seres humanos es generalmente beneficiosa en el asma, ya que disminuye la capacidad de respuesta de las vías respiratorias [80, 81] y mejora la función pulmonar [82] y los síntomas. [83, 84]

### **Progesterona**

El efecto de la progesterona sobre la contractilidad de las vías respiratorias ha recibido menos atención. La progesterona y uno de sus derivados, 5 $\beta$ -pregnanolona, atenúan la contracción de MLVA aisladas. [9] La progesterona también aumenta la relajación inducida por agonistas  $\beta_2$ . [69] *In vivo*, la progesterona no afecta el nivel de capacidad de respuesta de las vías aéreas en ratones sanos, [85] pero amplifica el desarrollo de HVA en un modelo murino de asma. [85] El efecto perjudicial de la progesterona en HVA parece ser una consecuencia de la inflamación alérgica agravada de las vías aéreas. [85] Esto demuestra que el uso de un único mediador que relaja MLVA no garantiza un resultado beneficioso en un trastorno pulmonar tan complejo como el asma. Las hormonas, en particular, muestran efectos pleiotrópicos y pueden afectar de

maneras muy diferentes, y a veces en direcciones opuestas, las múltiples facetas del asma. In vivo, algunas evidencias sugieren que la progesterona puede ser beneficiosa en los seres humanos. Por ejemplo, la administración intramuscular de progesterona es beneficiosa en un subgrupo de asmáticos. [86] El efecto de las hormonas sexuales sobre el asma, la respuesta de las vías aéreas y la contractilidad MLVA ha recibido considerable interés. [87]

### **Andrógenos**

Los andrógenos como la testosterona tienen un efecto agudo, no genómico, y no estrogénico sobre la activación de MLVA. [88, 89, 90] La dirección del efecto depende del estado de activación de MLVA. Por un lado, los andrógenos relajan MLVA pre-contraídas [88, 89, 90] y potencian el efecto relajante de los agonistas  $\beta_2$ , [67, 89] lo que sugiere un efecto broncodilatador en general. Por otro lado, en las mismas preparaciones de MLVA y en las mismas concentraciones, los andrógenos potencian la respuesta contráctil a un espasmógeno, lo que sugiere un efecto constrictor. [89] La controversia también se observa in vivo. La administración i.v. de los andrógenos anula casi por completo el aumento de la resistencia pulmonar provocada por el reto con alérgeno en animales sensibilizados. [90] La terapia con testosterona también es saludable en el tratamiento de los síntomas de las mujeres que sufren de asma premenstrual. [91] Evidencias indirectas sugieren que los andrógenos fomentan la contracción. Por ejemplo, el mayor nivel de capacidad de respuesta de las vías respiratorias observada en ratones machos sanos en comparación con las hembras se elimina con la castración. [92] La administración de testosterona a hembras o machos castrados también aumenta la capacidad de respuesta de las vías respiratorias a la

metacolina. [93] Las diferencias entre sexos en la capacidad de respuesta de las vías respiratorias y el efecto potenciador de la testosterona sobre la capacidad de respuesta de las vías respiratorias son anuladas por la vagotomía bilateral, lo que sugiere que la testosterona aumenta la capacidad de respuesta de las vías respiratorias indirectamente in vivo, actuando a través de los nervios vagos. [92]

### **Receptores de hormonas esteroideas en las vías aéreas**

Ambas isoformas del ER se han detectado en el pulmón; siendo ER- $\beta$  la isoforma predominante detectada en este tejido. [93, 94, 95] Las fracciones citosólicas pulmonares de rata muestran actividades de unión a esteroideos androgénicos. [94] Se han reportado diferencias en el contenido pulmonar de los receptores de ER y PR durante el ciclo estral y entre machos y hembras. [10]

Tanto el RNA mensajero y la proteína de ER- $\alpha$  se han encontrado en bronquios humanos y células epiteliales bronquiales recién obtenidas de ovejas. [96]

La expresión de ER- $\beta$  (mRNA y proteína) en células de músculo liso de las vías aéreas y en células epiteliales también se ha observado. [97] La presencia de AR se ha demostrado en células epiteliales, mesenquimales, y de músculo liso que rodean arterias de pulmón en desarrollo de ratones machos y hembras. [98] Cuando ER ( $\alpha$  y  $\beta$ ) se examinó en el tejido pulmonar, se encontró que ambos receptores se localizan principalmente en el epitelio bronquial y bronquioalveolar: se detectó ER- $\alpha$ , principalmente en el citoplasma de células epiteliales, mientras que ER- $\beta$  se detectó en el núcleo. [99] Vegeto et al. [100] observaron en ratones con inflamación pulmonar, que ER- $\alpha$  se expresa en células inflamatorias residentes e infiltradas de pulmón, y que el tratamiento con E2 provoca reducción de la

inflamación [100]. Esta evidencia indica la participación clave de los receptores de esteroides en el proceso inflamatorio del árbol respiratorio.

# HIPÓTESIS

1. Existen receptores a estrógenos, progesterona y andrógenos en el músculo liso y en las células aisladas de músculo liso de las vías aéreas de ratas hembras y machos.
2. La expresión de estos receptores es regulada por los esteroides sexuales en el músculo liso y en las células de músculo liso de las vías aéreas.
3. Los esteroides sexuales regulan de manera diferente la expresión o el nivel de receptores a estrógenos, progesterona y andrógenos en ratas controles que en del modelo de asma alérgica.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia y regulación hormonal de los receptores intracelulares de estrógenos, progesterona y andrógenos en el músculo liso y en las células de músculo liso de las vías aéreas de ratas macho y hembra normales y en un modelo de asma alérgica.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

Determinar la presencia de receptores de estrógenos, progesterona y andrógenos a nivel de proteínas y mRNA por Western blot, citometría de flujo y qRT-PCR en el MLVA y en las CMLVA de ratas control y en un modelo de asma alérgica en hembras y machos.

Analizar la regulación hormonal de los receptores de estrógenos, progesterona y andrógenos en el MLVA y en las CMLVA en ratas control y en un modelo de asma alérgica, hembras y machos, mediante la cuantificación de receptores por Western blot y citometría de flujo en diferentes estadios hormonales.

# **ANIMALES, MATERIAL Y MÉTODOS**

## **Animales**

Ratas macho (240-260g) y hembra (190-210g) adultas de la cepa Sprague- Dawley fueron obtenidas del servicio de cirugía Experimental y Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de 12:12 h luz / oscuridad con libre acceso a agua y alimento. Los animales fueron gonadectomizados bajo anestesia con ketamina (90 mg/kg Anesket 1000 mg/10 ml, Pisa Agropecuaria, Atitalaquia, Hidalgo, México) y xilazina (10 mg/kg Procin, Pisa Agropecuaria, Atitalaquia, Hidalgo, México). Dos semanas más tarde las ratas se asignaron aleatoriamente a grupos de control y tratamiento hormonal. Los animales fueron tratados de acuerdo con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

Se tuvo especial cuidado para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados al mínimo necesario.

## **Modelo animal de asma alérgica: sensibilización con ovoalbúmina**

En el día 1 las ratas se inyectaron con 25mg de ovoalbúmina (OVA) y 2.5mg de Al(OH)<sub>3</sub> por vía intraperitoneal y subcutánea respectivamente; en el día 8 se realizó un reto antigénico con 5 mg/mL de OVA por 7 minutos con un nebulizador; en día 11 se realizó un segundo reto con 2 mg/mL de OVA por 3 minutos con el nebulizador. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a los grupos para los tratamientos hormonales que se administraron en los días 12, 13 y

14 y los animales se sacrificaron el día 15, lo que asegura la presencia de anticuerpos IgE. [101]

### **Comprobación de la sensibilización del MLVA**

A los 15 días de iniciado el procedimiento de sensibilización con ovoalbúmina las ratas control y del modelo de asma alérgica se anestesiaron con 95 mg/Kg de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal y se desangraron por medio de un corte de la aorta caudal. Una vez extirpada la tráquea, se limpió del tejido conectivo y se realizaron preparaciones cilíndricas de cuatro anillos traqueales. Cada preparación traqueal es colocada en un baño para órganos aislados con 5 mL de solución Krebs (NaCl 120 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM, glucosa 11 mM), a 37°C y burbujeada de manera constante con una mezcla de 5% de  $\text{CO}_2$ -95%  $\text{O}_2$ , con un pH = 7.4.

Se registró la tensión isométrica en un polígrafo modelo RP5312RM a través de un transductor de tensión FT03C (Grass Instruments). Los tejidos se colocaron bajo tensión de 1 gramo durante 60 minutos y se lavaron con solución Krebs fresca cada 15 minutos. Con el propósito de valorar viabilidad y reproducibilidad de la respuesta tisular se adicionó KCl 60 mM a las preparaciones dos veces consecutivas.

Una vez estabilizadas las preparaciones de tráquea aislada de ratas control y del modelo de asma alérgica, se administraron 3.74 mg/mL de ovoalbúmina en el baño de 5 mL de tejidos aislados. Se registró su efecto durante 60 minutos.

### **Tratamientos hormonales**

El control y los grupos de tratamientos hormonales fueron los siguientes: 1) vehículo (aceite de maíz, Jabón La Corona, Ecatepec, Estado de México, México) en el mismo volumen que los tratamientos hormonales, 2) 17  $\beta$ - estradiol 3-benzoato

(E2) (Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri, EE.UU.) 0,05 mg/Kg/dos días consecutivos, 3) de progesterona (P4) (Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri, EE.UU.) 4 mg/Kg/un día, 4) E2 dos días seguido de P4 en el tercer día (E2 + P4), (en las dosis mencionadas anteriormente) 5) propionato de testosterona (T) (Fluka, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EE.UU.) 1 mg/kg/tres días consecutivos. Las ratas con tratamiento hormonal fueron sacrificadas por una sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg l kg) (Sedalphorte, Salud y Bienestar Animal, Ciudad de México, México) veinticuatro horas después del tratamiento.

### **Aislamiento del MLVA**

La tráquea y los pulmones fueron removidos y colocados en solución de Krebs-Ringer bicarbonato (RKB) (mM): 120 NaCl (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.), 4.7 KCl (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.), 1.2 MgSO<sub>4</sub> (Caledon Laboratories Ltd, Georgetown, Canada), 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Técnica Química CA, México), 25 NaHCO<sub>3</sub> (Caledon Laboratories Ltd, Georgetown, Canadá), 2.5 CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.), y 11 glucosa (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, Missouri, EE.UU.), mantenida a 37°C y se burbujeó con una mezcla de 95% O<sub>2</sub>-5% de CO<sub>2</sub>, pH = 7.4. El tejido pulmonar se retiró cuidadosamente para exponer bronquios. El tejido conectivo se eliminó de la tráquea y los bronquios, y se aisló el músculo liso de las vías respiratorias.

### **Disgregación de las células del MLVA**

El músculo liso de las vías aéreas se colocó en una solución que contiene (mM): NaCl 137, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 1,1, NaHCO<sub>3</sub> 20, KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> 1, 11 glucosa, 25

HEPES (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.), 1,5% de colagenasa (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.), y 0,8 UI elastasa tipo IV Sigma-Aldrich Inc., St Louis, Missouri, EE.UU.), pH=7.4. El músculo liso se incubó a 37°C y se disgregó pipeteando arriba y abajo de tres o cuatro veces en una hora. Las células del músculo liso de las vías aéreas (CMLVA) fueron separadas del tejido completo y se centrifugaron (3500 rpm a 4°C durante 5 min).

### **Extracción de proteínas y Western blot**

Con el fin de detectar la expresión de la proteína de receptores de hormonas esteroides, CMLVA se lisaron en un buffer de Tris-HCl (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 10 mM, EDTA (Research Organics Inc., Cleveland, OH) 1 mM, NaCl (JT Baker, Xalostoc, México) 150 mM, 1% de Igepal CA-630 (Sigma- Aldrich, Inc., St. Louis, MO), y coctel de inhibidores de proteasas, que contiene AEBSF, bestatina, E-64, pepstatina A y fosforamidon (Calbiochem, EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA). Las proteínas totales se obtuvieron a partir de los sobrenadantes después de la centrifugación de los lisados celulares a 12000 rpm a 4°C durante 15 min, se corrieron (20 µg) en SDS-PAGE al 12% y transfirieron en membranas de PVDF (RPN303D, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). Las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada / 0.05% de Tween 20 (P1379, Sigma-Aldrich Inc., St Louis, Missouri, EE.UU.) en PBS pH = 7.4 durante 30 min a temperatura ambiente, y después se incubaron durante toda la noche con anticuerpos 1: 1000 para los receptores de hormonas esteroides (SHR) a 4°C. (anti-ER $\alpha$  (sc-542, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, EE.UU.), anti-ER $\beta$  (sc-6821, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, EE.UU.),

anti-PR (ab2764, Abcam, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.), anti-AR (ab74272, Abcam, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.) Dependiendo de la especie huésped de los anticuerpos primarios, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con una dilución 1: 10,000 de anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano (sc-2033, sc-2005, sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, EE.UU.), y detectado por quimioluminiscencia (ECL, Amersham ECL Western Blot Systems, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) en películas dentales Kodak (Eastman Kodak Company, Rochester, Nueva York, EE.UU.).

Para el ajuste de las posibles diferencias en la proteína total cargada en cada carril, las membranas fueron rebloteadas tratándolas con glicina durante toda la noche (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA) (0.1 M, pH 2.5, en SDS al 0.5%) a 4°C e incubadas posteriormente con anticuerpo 1: 1000 cabra anti-deshidrogenasa gliceraldehido-3-fosfato (GAPDH) (sc-166545, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, EE.UU.) durante toda la noche a 4°C. Las membranas se incubaron durante 1 h con 1: 10,000 anticuerpos de burro con anti-IgG de cabra marcado con HRP y detectados por ECL. Los niveles de expresión de todas las proteínas analizadas se normalizaron a los de GAPDH y se examinaron por densitometría como se describe en el manual del software.

## **Densitometría**

Las bandas de las membranas obtenidas de una n=4 para cada grupo experimental se cuantificaron utilizando el software Kodak 1D Image Analysis Software versión 3.5 de Windows utilizando la corrección de fondo (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EE.UU.). El área de la banda que se cuantifica se ajustó

manualmente para incluir la mayoría de cada banda sin fondo. Las intensidades netas en unidades de luz de Kodak se utilizaron para calcular los cocientes de proteína problema/GAPDH. Los resultados representan los valores obtenidos para cada banda corregidos para la media de todas las bandas de la misma proteína divididos entre su valor GAPDH correspondiente calculado de la misma manera.

### **RT-PCR tiempo real del MLVA**

Las células disgregadas enzimáticamente y no usadas en el Western blot, se les extrajo el RNA total por el método con trizol (Chomczynski y Sacchi, 1987).

Se cuantificó y verificó la pureza e integridad del RNA total por espectrofotometría y un gel de agarosa, respectivamente. A partir del mRNA, se sintetizó cDNA en un termociclador y se realizó una corrida en tiempo real en la cual se colocó el cDNA, las sondas de los receptores y el control de expresión (rRNA 18s) para observar el patrón de expresión génica a nivel de RNA mensajero. Los cálculos se llevaron a cabo de acuerdo al método  $\Delta\Delta Ct$  (Applied Biosystems User Bulletin No. 2, P/N 4303859). Para las gráficas, los valores de los animales tratados con vehículo para cada tratamiento hormonal, no sensibilizados y sensibilizados, hembras y machos se consideraron como 1, mientras el valor de la expresión génica de los grupos corresponde a los resultados obtenidos de los cálculos.

### **Citometría de flujo**

Para poder determinar la expresión de los receptores a hormonas esteroideas (SHR) exclusivamente en las células del músculo liso, se realizó una doble tinción de las células por medio de la  $\alpha$ -actina de músculo liso y el receptor a hormona

esteroide que se está analizando en ese momento. CMLVA se incubaron con 200  $\mu$ l de buffer 1X Perm/Wash (BD Biosciences, San Diego, California, EE.UU.) durante 20 minutos a 4°C. Después de eso, las CMLVA se incubaron por separado con los anticuerpos anti-SHR (1: 1000 anti-ER $\alpha$  (sc-542, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, EE.UU.), anti-ER $\beta$  (sc-6821, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, EE.UU.), anti-tPR (ab2764, Abcam, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.), anti-AR (ab74272, Abcam, Cambridge, Massachusetts, EE.UU.)) durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente las CMLVA se incubaron con anti-IgG específica marcados con Alexa Fluor® 647 (A21443 Alexa Fluor® 647 de conejo anti-IgG de pollo, A21463 Alexa Fluor® 647 de pollo anti-IgG de ratón, Alexa Fluor® 647 A21469 de pollo anti-IgG de cabra, Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) durante 20 minutos a 4°C. Finalmente, las CMLVA se incubaron con 1: 1000 anticuerpo anti- $\alpha$ -actina músculo liso (FITC) (GTX72521, GeneTex Inc., San Antonio, Texas, EE.UU.) durante 20 minutos a 4°C. Entre cada incubación, las CMLVA se lavaron con buffer FACS (en mM: 140 NaCl, 2.1 KCl, 0.1 Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> (83264, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.), 1.5 KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>, 0,5% de albumina de suero bovino (BAH64, Equitech-Bio Inc., Kerrville, Texas, EE.UU.), pH = 7,4) y se centrifugaron durante 2 min (1500 rpm a 4°C). Las CMLVA se resuspendieron en buffer FACS, y se analizaron por inmunofluorescencia de dos colores mediante citometría de flujo (FACS Calibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Las células con alta expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso fueron seleccionadas a partir de una dispersión lateral vs  $\alpha$ -actina de músculo liso/FITC gráfico de puntos. A partir de esta región acotada, se seleccionaron las células que expresan  $\alpha$ -actina de músculo liso/FITC y SHR/Alexa Fluor® 647. Se analizaron al menos 10,000 eventos en la región alta

de  $\alpha$ -actina de músculo liso. Se realizó el análisis de datos utilizando el software FlowJo versión 8.7 para obtener el índice de expresión de los diferentes receptores a hormonas esteroides.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos colas y la prueba de Bonferroni como prueba "*pos hoc*". El límite de confianza se fijó en 95% y una significancia de  $p < 0,05$ . Los valores de probabilidad se calcularon por el software Prism 5.0 (GraphPad, California, EE.UU.). Todos los cálculos estadísticos se realizaron en comparación con el grupo control (vehículo).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Comprobación del modelo de asma alérgica en ratas

El primer objetivo fue analizar si nuestro modelo de asma alérgica respondía al reto *"in vitro"* con OVA. Inicialmente los animales no respondieron al reto con OVA por lo cual se modificó la forma en la que se hacían los retos con OVA, realizando los retos en cámaras individuales con movimientos restringidos. (Figura 8)



Figura 8. Cámara individual con movimientos restringidos para sensibilización de animales con OVA.

Para comprobar que los animales estaban sensibilizados a OVA se realizó un reto *"in vitro"* al músculo liso de las vías aéreas (aislado como se describió en los métodos), con lo cual comprobamos que el MLVA de los animales sensibilizados respondió a OVA, mientras que el MLVA del grupo control (que se inyectó y se retó con solución salina) no respondió al reto con OVA. (Figura 9).

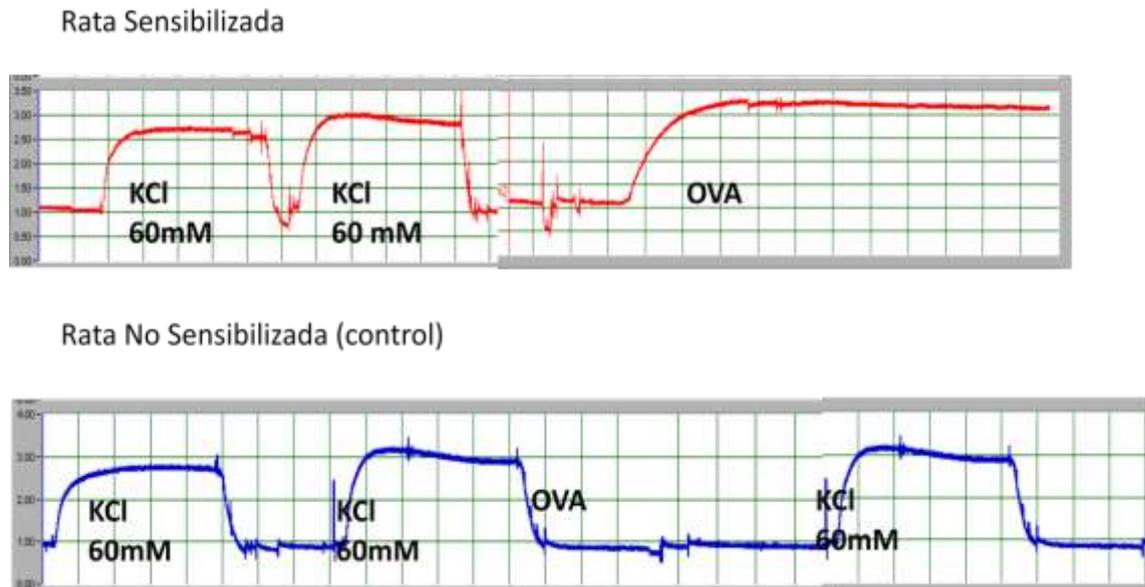


Figura 9. Reto *in vitro* con ovoalbúmina (OVA). La rata no sensibilizada no respondió al reto con OVA mientras que la rata sensibilizada si respondió al reto con OVA, se comprobó la viabilidad del tejido con la adición de KCl 60mM.

Una vez estandarizado el modelo de asma alérgica, se procedió a comprobar y estandarizar la presencia de los receptores de  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , PRA y PRB en el MLVA aislados de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo, se utilizó un control positivo de expresión bien conocido para cada receptor; para el  $ER\alpha$  se utilizaron proteínas extraídas de útero de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo, para el  $ER\beta$  proteínas extraídas de ovario de ratas sin tratamiento hormonal, y para PRA y PRB proteínas extraídas de útero de ratas ovariectomizadas tratadas con  $17\beta$  estradiol. (Figura 10)

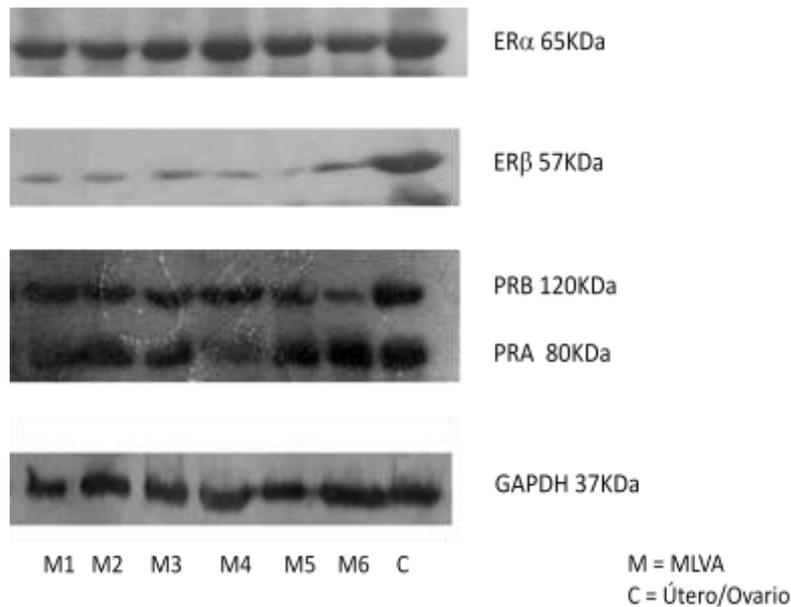


Figura 10. Detección de ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PRA y PRB en las MLVA. M 1-M6 proteínas extraídas de MLVA de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo. C= control, se utilizó diferentes proteínas como control para cada receptor; para ER $\alpha$  útero de rata ovariectomizada tratada con vehículo, para ER $\beta$  ovario de rata y para PRA y PRB útero de rata ovariectomizada tratada con 17 $\beta$ -estradiol.

Debido a que la separación del músculo liso del cartílago de la tráquea era muy complicado por el tamaño, surgió la duda si el cartílago expresaba o no los receptores a hormonas esteroides o si se podía analizar la tráquea completa para no perder tejido del MLVA. Para lo cual se hizo una extracción de proteínas del MLVA y del cartílago de la tráquea (asegurando que no hubiera músculo liso) y se realizó la detección del ER $\alpha$  encontrado que este se expresa tanto en el cartílago como en el MLVA. Se utilizó como control positivo de expresión útero de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo. (Figura 11)

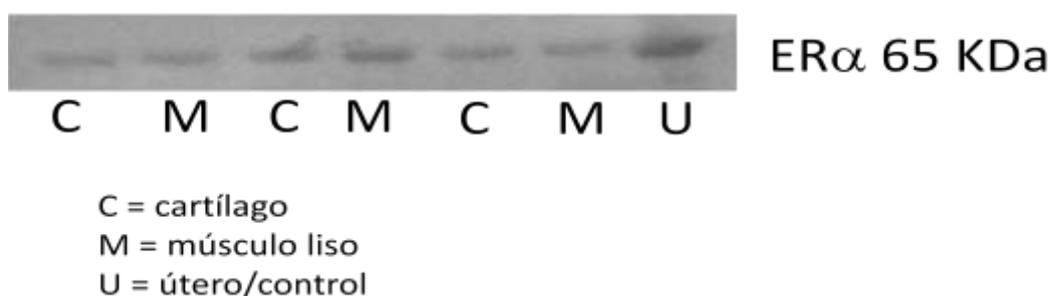


Figura 11. Medición de ER $\alpha$  en proteínas extraídas de MLVA y cartílago en tres ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo.

Al notar que tanto el cartílago como el MLVA expresan ER $\alpha$  se procedió a realizar la eliminación del cartílago al extraer la muestra y se comenzó con la disgregación del tejido de las CMLVA como se describió en los métodos.

Se ha detectado con claridad una relación entre el tratamiento exógeno con hormonas esteroides y los niveles de los receptores de hormonas sexuales en el músculo liso de las vías aéreas, tanto en ratas hembra como macho; el cual es diferente cuando se sensibilizan los animales a OVA. En aras de la claridad, en esta sección MLVA se refiere a los niveles de los receptores por Western blot en las células disociadas enzimáticamente de vías aéreas de rata, y CMLVA a las células específicas de músculo liso de las vías aéreas que muestran la doble tinción para  $\alpha$ -actina de músculo liso y receptores de hormonas sexuales detectada por citometría de flujo.

La citometría de flujo nos permitió separar la CMLVA del resto de las células y asegurarnos que la medición de los receptores a hormonas esteroides se realizó solo en CMLVA, así evitamos la presencia de células que expresan los receptores a hormonas esteroides que pueden estar infiltradas como las células que participan en la inflamación y otras células nativas del tejido como fibroblastos, macrófagos, mastocitos y cartílago. (Figura 12)

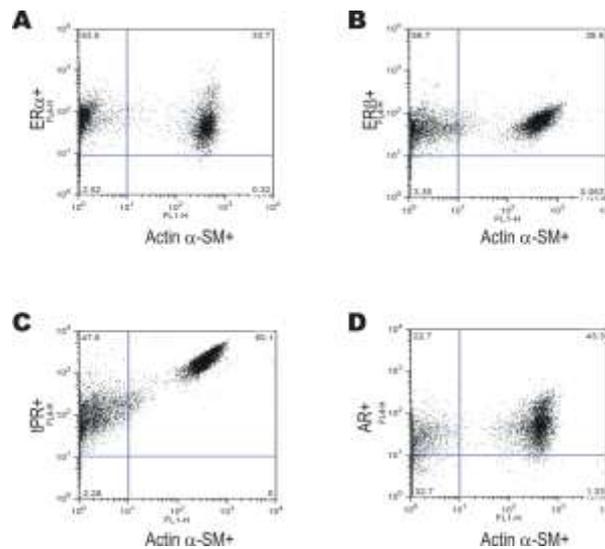


Figura 12. Citometría de flujo con tinción doble positiva para  $\alpha$ -actina de músculo liso y el receptor a hormonas esteroides correspondiente donde se muestra la presencia de otras células positivas a los receptores a hormonas esteroides. A) Receptor de estrógenos  $\alpha$ , B) Receptor de estrógenos  $\beta$ , C) Receptor de progesterona, D) Receptor de andrógenos.

## Receptor de estrógenos $\alpha$

En el MLVA de ratas hembras no sensibilizadas, los niveles de ER $\alpha$  se incrementaron por los tratamientos con P4 y T, mientras que el tratamiento E2 no tuvo efecto sobre los niveles de ER $\alpha$  en comparación con el vehículo. Sin embargo, E2 bloqueó el efecto de P4 sobre la expresión de ER $\alpha$ , sin embargo las ratas hembras sensibilizadas a OVA presentaron una disminución en la expresión del ER $\alpha$  en todos los tratamientos hormonales comparados con el vehículo (Figuras 13(A) y 13(B)). En cuanto a las ratas macho no sensibilizadas, el contenido de ER $\alpha$  en MLVA se incrementó por P4 y E + P ( $p < 0.01$  y  $0.05$ , respectivamente). Los tratamientos con E2 o T no tuvieron efecto sobre los niveles de ER $\alpha$ . Mientras que en las ratas sensibilizadas se presenta una disminución en la expresión del ER $\alpha$  en los tratamientos con E2, P4 y con el tratamiento conjunto de ambas hormonas

(Figuras 13(A) y 13(C)). En resumen, los niveles de ER $\alpha$  se incrementaron por P4 en ambos sexos en ratas no sensibilizadas, mientras que se elevaron por el tratamiento T en ratas hembras y no tuvieron ningún cambio en machos. En cuanto a las ratas sensibilizadas las hormonas provocan la disminución de los niveles del ER $\alpha$  tanto en machos como en hembras con excepción del tratamiento con T en ratas macho. Estos resultados sugieren que, en MLVA, P4 regula los niveles de ER $\alpha$  en machos y hembras de una manera similar. Sin embargo, la regulación con el tratamiento con T podría estar influenciada por otras variables en función del sexo; por ejemplo, AR está altamente expresado en machos no sensibilizados a nivel proteico, mientras que en hembras es indetectable en MLVA (Figuras 16(A), 16(B) y 16(C)).

En cuanto a la expresión de ER $\alpha$  en el mRNA de ratas hembras no sensibilizadas podemos apreciar que al igual que a nivel de las proteínas la P4 y T tienen una regulación a la alta del receptor ( $p < 0.001$ ), sin embargo en las ratas hembras sensibilizadas solo se aprecia una regulación en la expresión a la baja con el tratamiento de T ( $p < 0.05$ ). Mientras que en las ratas macho no sensibilizadas se presentó un aumento en la expresión en los tratamientos con E+P y T ( $p < 0.001$ ), mientras que en las sensibilizadas se presentó una disminución en la expresión del receptor con los tratamientos hormonales excepto con la T ( $p < 0.001$ ) (Figura 13(H) y 13(I)).

En cuanto a CMLVA, se encontró que la T incrementó el contenido de ER $\alpha$  en ratas hembras no sensibilizadas pero disminuyó el contenido de este receptor en ratas macho no sensibilizadas (Figuras 13(D) y 13(E)). En la corteza cerebral de ratones hembra y macho se ha demostrado que T reduce el nivel de ER $\alpha$ . [102] Sin

embargo, la diferencia entre este hallazgo y el nuestro podría ser debido a factores específicos de tejido que regulan los niveles de ER $\alpha$ , como la concentración del factor epidermal o las vías de activación de la proteína cinasa C (PKC). [103, 104]

En ratas hembra no sensibilizadas, E2 y P4 ejecutaron un efecto opuesto; es decir, E2 incrementó, mientras que P4 disminuyó los niveles de ER $\alpha$ . El tratamiento simultáneo con P4 y E2 no tuvo efecto sobre los niveles de ER $\alpha$  en comparación con vehículo. En ratas macho no sensibilizadas, P4 disminuyó los niveles de ER $\alpha$ , mientras que el tratamiento con E2 no tuvo ningún efecto. El tratamiento simultáneo con P4 y E2 disminuyó los niveles de receptores, lo cual puede indicar que P4 juega un papel clave en la regulación a la baja ER $\alpha$  ( $p < 0.05$  en comparación con el vehículo en todos los casos) (Figuras 13(F) y 13(G)).

Townsend et al. [24] mostró la presencia de ER $\alpha$  y ER $\beta$  en CMLVA de humanos aisladas de bronquios de mujeres adultas. Sin embargo, este estudio no utilizó el tratamiento hormonal exógeno, más aun los autores mencionan que los pacientes no fueron seleccionados por edad, estadio hormonal, o enfermedad de las vías aéreas. En términos metodológicos, Townsend et al. [105] basaron sus observaciones en Western blot de músculo liso bronquial aislado, sin el uso de  $\alpha$ -actina para confirmar que la muestra que usaron para obtener proteínas para el análisis por Western blot fuera exclusivamente CMLVA. En las ratas sensibilizadas hembra y macho no se encontró una diferencia significativa de los niveles de receptores con los diferentes tratamientos hormonales y el vehículo.

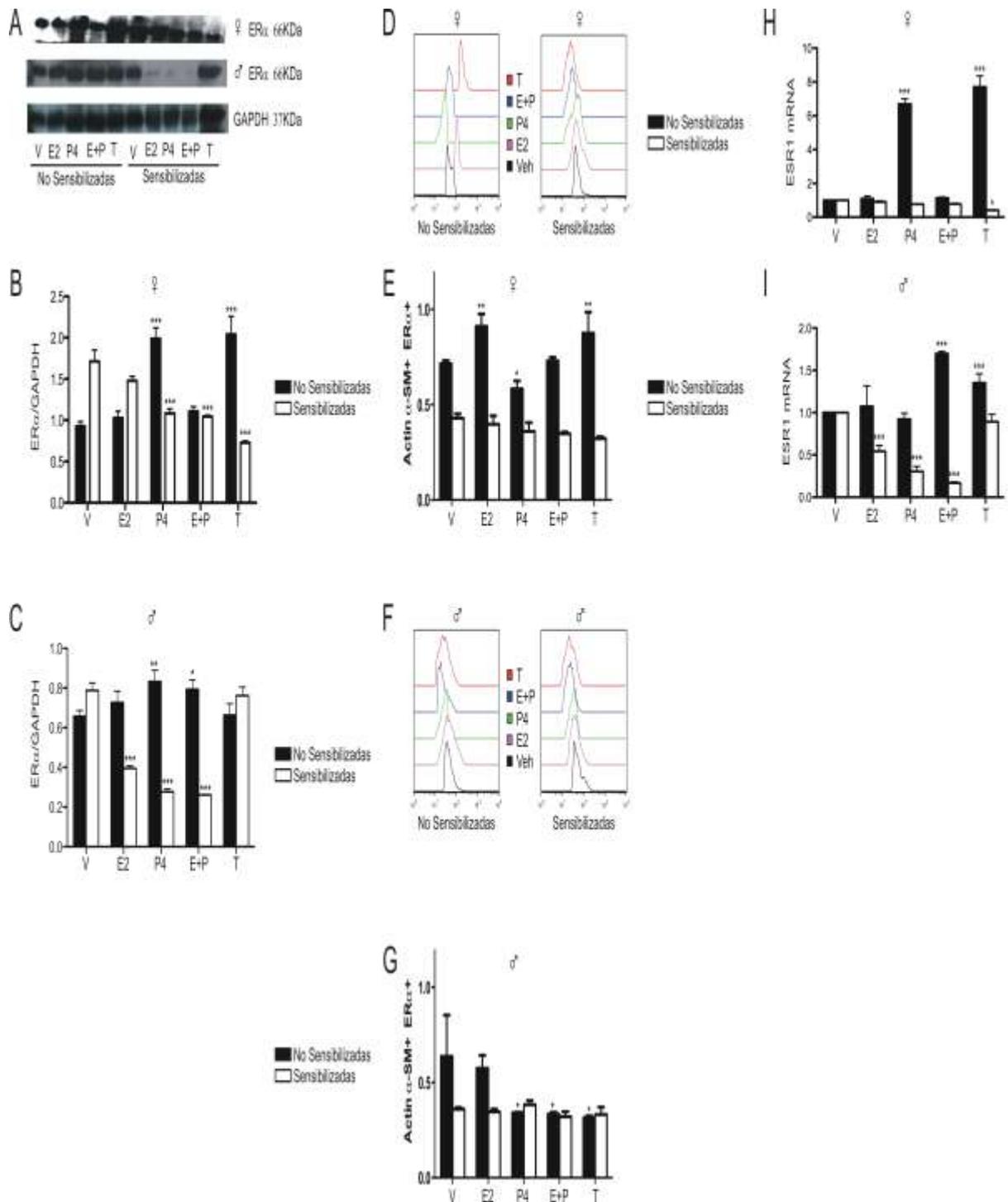


Figura 13. A) Membrana representativa de la detección de ER $\alpha$  en MLVA y GAPDH como control de carga. B) Gráfica representativa del análisis densitométrico del Western blot de las ratas hembra. C) Gráfica representativa del análisis densitométrico del Western blot de las ratas macho. D) Histogramas representativos de la expresión de ER $\alpha$  en CMLVA por citometría de flujo en ratas hembra. E) Gráfica representativa del índice de expresión del ER $\alpha$  en CMLVA por citometría de flujo en ratas hembra F) Histogramas representativos de la expresión de ER $\alpha$  en CMLVA por citometría de flujo en ratas macho. G) Gráfica representativa del índice de expresión del ER $\alpha$  en CMLVA por citometría de flujo en ratas macho. H) Representación gráfica de la expresión génica de ER $\alpha$  en las MLVA de ratas hembra. I) Representación gráfica de la expresión génica de ER $\alpha$  en las MLVA de ratas macho. La n para cada tratamiento hormonal fue de 4 ratas hembra y 4 ratas macho no sensibilizadas y sensibilizadas a OVA respectivamente. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, vs el tratamiento con vehículo (V).

## Receptor de estrógenos $\beta$

Los niveles de ER $\beta$  se incrementaron en ratas hembra no sensibilizadas por los tratamientos con E2, P4 y E + P en MLVA, pero no por T en comparación con el tratamiento con vehículo ( $p < 0.001$ ) (Figuras 14(A) y 14(B)). Por el contrario, en las ratas macho no sensibilizadas, P4 ( $p < 0.01$ ), E + P y T ( $p < 0.05$ ) disminuyeron ER $\beta$  (Figuras 14(A) y 14(C)). En cuanto a las ratas hembra sensibilizadas todos los tratamientos hormonales produjeron un aumento en la expresión de ER $\beta$  mientras que en los machos sensibilizados produjeron una disminución del receptor ( $p < 0.001$ , Figuras 14(A) y 14(B)). Los cuatro tratamientos hormonales fueron capaces de regular negativamente la expresión de ER $\beta$  en CMLVA de ratas hembra no sensibilizadas (E2:  $p < 0.001$ ; P4 y T:  $p < 0.01$ ; E + P:  $p < 0.05$ , Figuras (14(D) y 14(D)). En las ratas macho no sensibilizadas, solamente E + P y T disminuyeron ER $\beta$  ( $p < 0.05$ ) (Figuras 14(A) y 14(C)). Los tratamiento con E2 ( $p < 0.001$ ), P4 ( $p < 0.05$ ) (Figuras 14(F) y 14(G)) aumentaron la expresión de ER $\beta$  en CMLVA de ratas hembra sensibilizadas, mientras que los tratamientos con P4, E + P, T ( $p < 0.05$ ) disminuyeron la expresión de ER $\beta$  en CMLVA de ratas macho sensibilizadas. (Figuras 14(D) y 14(E))

Se ha reportado que ER $\beta$  es disminuido por E2 en el pulmón de ratas hembras ovariectomizadas tratadas con E2 durante 48 h. [106] En ratas macho, E2 y P4 disminuyeron ligera, pero no significativamente el contenido de ER $\beta$  en CMLVA. Este hallazgo podría explicarse si se mostrara un efecto sinérgico cuando ambas hormonas se administran de forma concomitante con la consecuente disminución del contenido del receptor.

Catley et al. [94] han demostrado la presencia de niveles de mRNA de ER $\beta$  en pulmón completo de rata y células epiteliales de vías aéreas, macrófagos, monocitos y células de músculo liso de vías aéreas humanas cultivadas (CMLVAH) de ambos sexos. La selección de tejido de un sólo sexo y la certeza de trabajar únicamente con las células de músculo liso claramente definidas son cruciales para plantear inferencias en cuanto a la regulación sexual y los receptores de hormonas sexuales. En cuanto a efecto de T, esta hormona reduce los niveles de ER $\beta$  en corteza cerebral de ratones hembras y machos. [107]

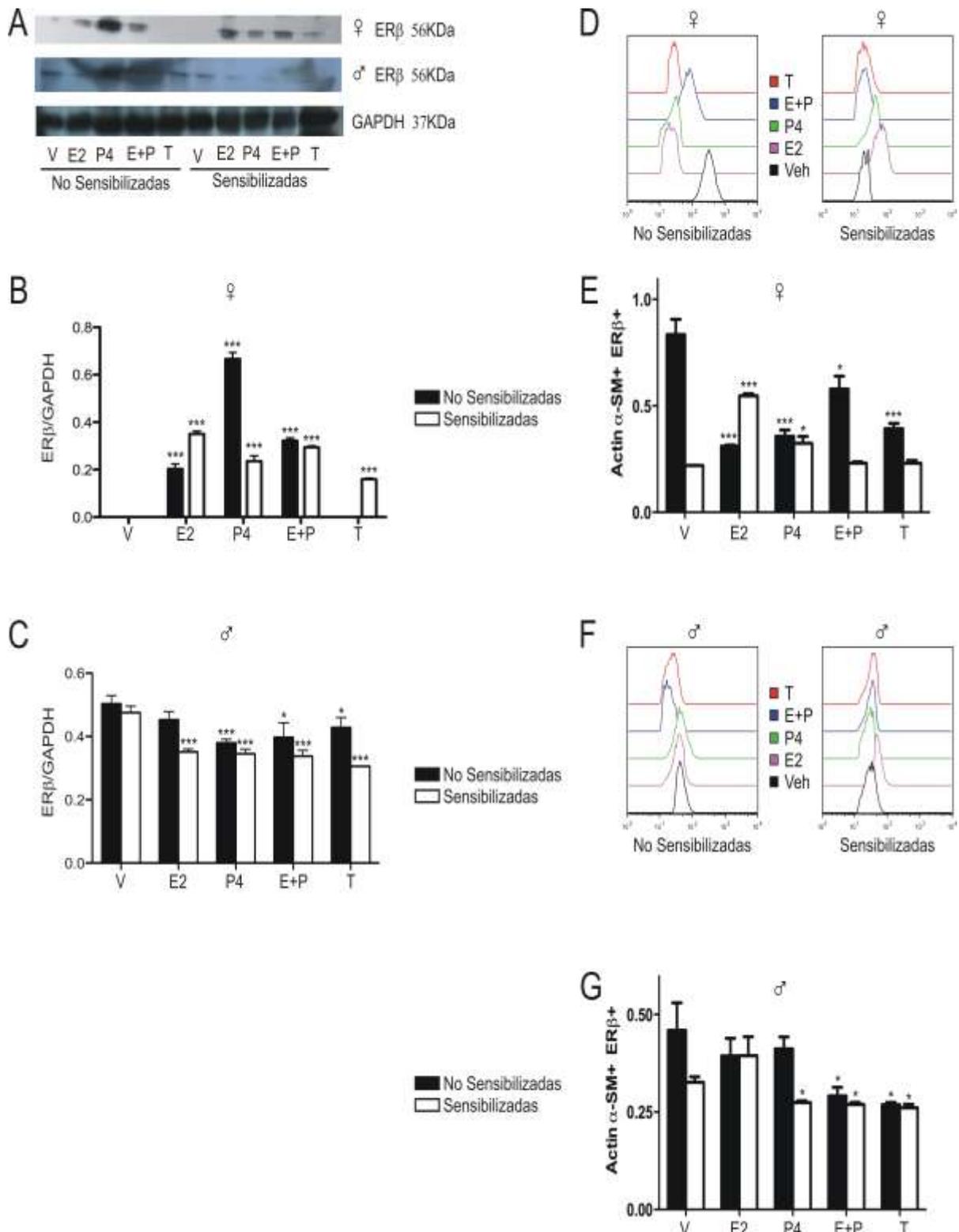


Figura 14. A) Membrana representativa de la detección de ERβ en MLVA y GAPDH como control de carga. B) Gráfica representativa del análisis densitométrico del Western blot de las ratas hembra. C) Gráfica representativa del análisis densitométrico del Western blot de las ratas macho. D) Histogramas representativos de la expresión de ERβ en CMLVA por citometría de flujo en ratas hembra. E) Gráfica representativa del índice de expresión del ERβ en CMLVA por citometría de flujo en ratas hembra F) Histogramas representativos de la expresión de ERβ en CMLVA por citometría de flujo en ratas macho. G) Gráfica representativa del índice de expresión del ERβ en CMLVA por citometría de flujo en ratas macho. La n para cada tratamiento hormonal fue de 4 ratas hembra y 4 ratas macho no sensibilizadas y sensibilizadas a OVA respectivamente. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, vs el tratamiento con vehículo (V)

## Receptores de progesterona

PR-B en MLVA de ratas macho aumentó por E2 ( $p < 0.05$ ), E + P ( $p < 0.01$ ), y T ( $p < 0.01$ ) (Figuras 3 (a) y 3 (b)). En diferentes tejidos y líneas celulares de PR-B está regulada positivamente por E2. González-Arenas et al. [106] encontraron un aumento de contenido proteico de PRA y PRB por E2 en pulmón completo homogeneizado de ratas hembras. Como se mencionó anteriormente, el pulmón total homogeneizado está compuesto por numerosos linajes celulares. Esta regulación a la alta por E2 está mediada por elementos de respuesta a estrógeno situados en el promotor PR. [108]

El tratamiento con E2 mostró una regulación a la baja estadísticamente significativa en PR-A en MLVA de ratas de ambos sexos ( $p < 0.001$  y  $p < 0.05$ , respectivamente) (Figuras 3 (a) y 3 (b)). PRA y PRB se incrementaron de manera similar por P4 y T en MLVA de ratas hembras ( $p < 0.001$ ). Las ratas hembra sensibilizadas presentan una disminución en la expresión de PRA y PRB con todos los tratamientos hormonales ( $p < 0.001$ , Figuras). Las ratas machos sensibilizadas presentan una disminución con el tratamiento de E2, P4 y E + P ( $p < 0.001$  y  $p < 0.05$  respectivamente, Figuras) sin embargo el tratamiento con T produce un aumento en la expresión de PRA y PRB ( $p < 0.001$ , Figuras).

A nivel de mRNA de MLVA el tratamiento con P4, E + P y T ( $p < 0.001$ ) produce una disminución en los niveles de tPR en ratas hembra y macho no sensibilizadas, esto se ve invertido en ratas hembras sensibilizadas con todos los tratamientos hormonales ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  respectivamente, Figuras ) y en ratas machos sensibilizadas tratadas con E2 y E + P ( $p < 0.01$ , Figura), de manera interesante el

tratamiento con T aumentó los niveles de tPR en ratas machos sensibilizadas ( $p < 0.001$ , Figura)

En cuanto a las CMLVA, en ratas hembras no sensibilizadas, P4 ( $p < 0.05$ ) y T ( $p < 0.01$ ) disminuyó el contenido total de PR (tPR) (Figura), mientras que en las ratas hembra sensibilizadas el tratamiento con E2 aumentó los niveles de tPR ( $p < 0.01$ , Figura). Se ha reportado que P4 disminuye su propio receptor en diferentes tejidos y líneas celulares. [106, 109, 110] Esta regulación a la baja está inducida por la fosforilación de PR dependiente de ligando, que resulta en su ubiquitinación que marca al receptor para su degradación en el proteasoma 26S. [110, 111] Ningún tratamiento hormonal tuvo efecto sobre tPR en ratas macho no sensibilizadas y sensibilizadas. Los niveles de tPR se han localizado en los pulmones totales, como lo demostraron González-Arenas et al.; [106] probablemente este hallazgo corresponde con otros tipos de células de pulmón diferentes a las de músculo liso.

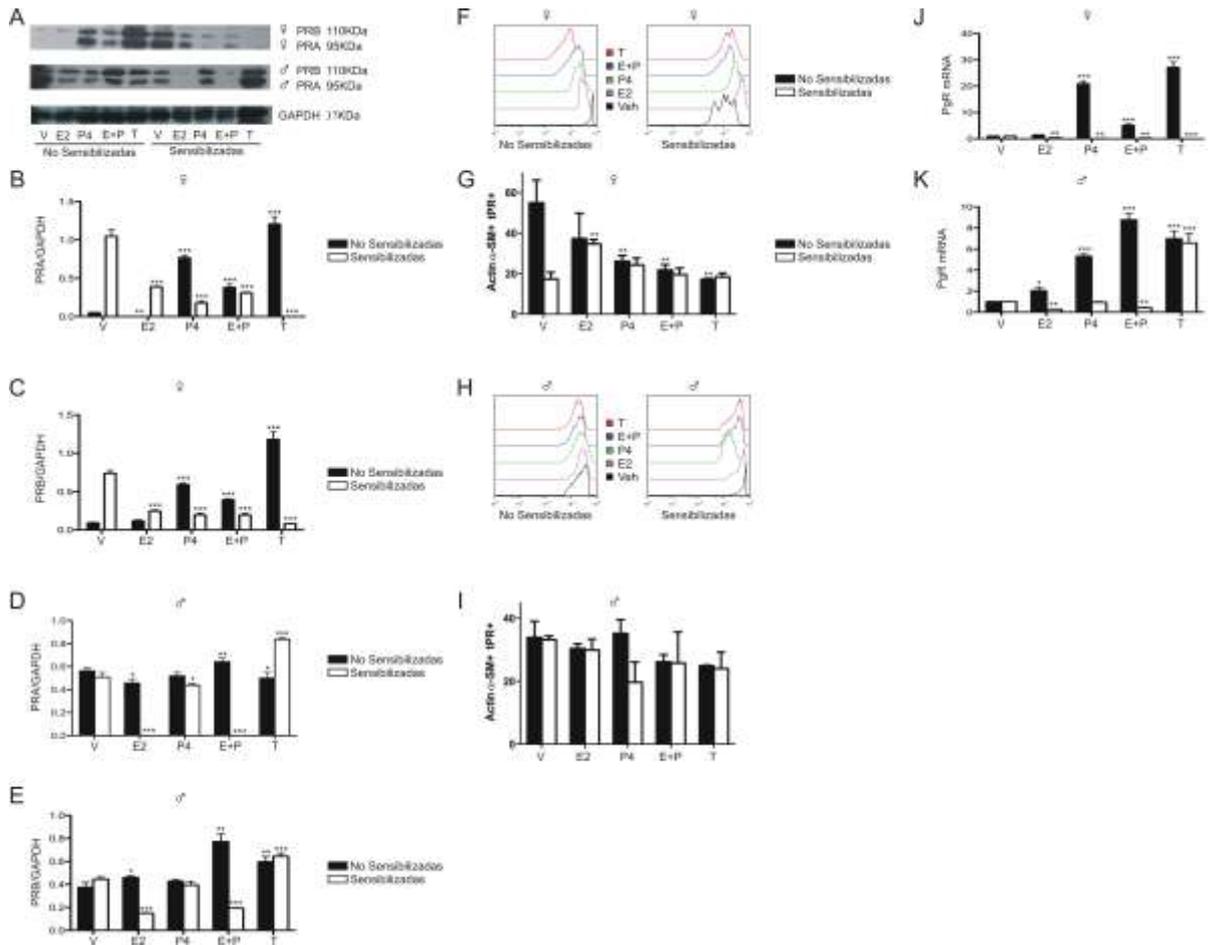


Figura 15. A) Membrana representativa de la detección de PRA y PRB en MLVA y GAPDH como control de carga. B) Gráfica representativa del análisis densitométrico del Western blot de las ratas hembra de PRA. C) Gráfica representativa del análisis densitométrico del Western blot de las ratas macho. D) Histogramas representativos de la expresión de tPR en CMLVA por citometría de flujo en ratas hembra. E) Gráfica representativa del índice de expresión del tPR en CMLVA por citometría de flujo en ratas hembra F) Histogramas representativos de la expresión de tPR en CMLVA por citometría de flujo en ratas macho. G) Gráfica representativa del índice de expresión del tPR en CMLVA por citometría de flujo en ratas macho. H) Representación gráfica de la expresión génica de tPR en las MLVA de ratas hembra. I) Representación gráfica de la expresión génica de tPR en las MLVA de ratas macho. La n para cada tratamiento hormonal fue de 4 ratas hembra y 4 ratas macho no sensibilizadas y sensibilizadas a OVA respectivamente.

## Receptor de andrógenos

No se detectó expresión de AR a nivel de proteína en hembras sensibilizadas y no sensibilizadas en MLVA (Figura 4 (a)). Sin embargo, cuando se analizaron las CMLVA con la expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso por citometría de flujo, se detectaron los niveles de AR en ratas hembra no sensibilizadas, pero no se encontró diferencia estadística con ninguno de los cuatro diferentes tratamientos hormonales administrados comparados con el vehículo (Figura 4 (d)), sin embargo el tratamiento con E + P y T ( $p < 0.01$ ) disminuyó la expresión del AR en ratas hembras sensibilizadas. Se han reportado diferencias en los niveles de AR entre sexos en los pulmones. Boucher et al. [112] reportaron que la expresión de AR en el pulmón de ratas hembra es menor en comparación con los machos, incluso si estaban castrados.

En ratas macho no sensibilizadas, los niveles de AR a nivel de proteína en MLVA incrementaron por los tratamientos P4, E + P y T ( $p < 0.001$ ) (Figuras 4 (a) y 4 (b)). Este resultado es coherente con un reporte donde el tratamiento con testosterona aumenta los niveles de proteína de AR en células de pulmón de ratones machos castrados [111]. Mientras que los tratamientos con E + P y T ( $p < 0.001$ ) disminuyeron la expresión de AR en MLVA ratas de machos sensibilizadas.

En CMLVA, E + P y T disminuyeron los niveles de AR ( $p < 0.05$ ) (Figuras 4 (c) y 4 (d)). Como en el caso del contenido de ER $\beta$ , E2 y P4 disminuyeron ligera pero no significativamente el contenido de AR. Probablemente porque el tratamiento simultáneo con ambas hormonas actúa de una manera sinérgica disminuyendo el contenido del receptor.

En comparación con E2 y P4, hay pocos informes acerca de la presencia de AR en las vías aéreas. Kimura et al. [113] han reportado la expresión de AR en el núcleo de las células epiteliales de las vías aéreas de ratones. Del mismo modo, AR se ha encontrado en pulmón en desarrollo temprano, epitelio bronquial, y los neumocitos tipo II. [112, 114, 115] Sin embargo, ninguno de estos estudios investigó particularmente AR en CMLVA o su regulación hormonal. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en ratas macho sensibilizadas.

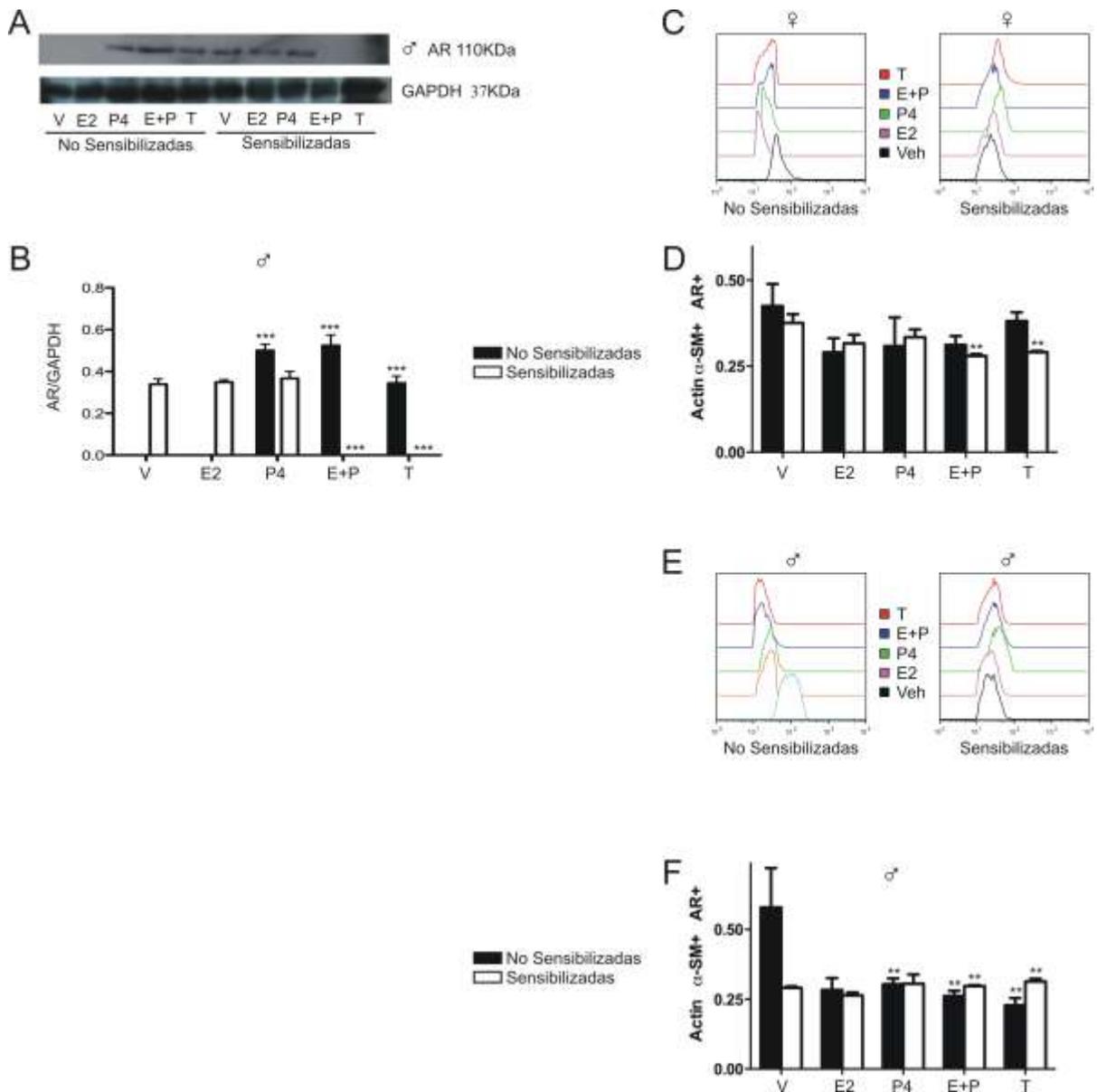


Figura 16. A) Membrana representativa de la detección de AR en MLVA y GAPDH como control de carga. B) Gráfica representativa del análisis densitométrico del Western blot de las ratas hembra. C) Gráfica representativa del análisis densitométrico del Western blot de las ratas macho. D) Histogramas representativos de la expresión de AR en CMLVA por citometría de flujo en ratas hembra. E) Gráfica representativa del índice de expresión del ER $\alpha$  en CMLVA por citometría de flujo en ratas hembra F) Histogramas representativos de la expresión de AR en CMLVA por citometría de flujo en ratas macho. G) Gráfica representativa del índice de expresión del ER $\alpha$  en CMLVA por citometría de flujo en ratas macho. H) Representación gráfica de la expresión génica de AR en las MLVA de ratas hembra. I) Representación gráfica de la expresión génica de AR en las MLVA de ratas hembra. La n para cada tratamiento hormonal fue de 4 ratas hembra y 4 ratas macho no sensibilizadas y sensibilizadas a OVA respectivamente.

Los receptores de esteroides estudiados en este trabajo muestran diferencias en el contenido proteico entre la detección por Western blot y la citometría de flujo. En este sentido, hay dos puntos que deben ser considerados. En primer lugar, la citometría de flujo es una técnica altamente sensible que permite la detección de cambios sutiles que no pueden ser detectados por Western blot. En segundo lugar, en MLVA pueden encontrarse diferentes tipos de células: las propias células de músculo lisas, fibroblastos, y células madre. [116] Todos estos tipos de células expresan receptores a esteroides. [117] Es probable que la regulación de estos receptores nucleares sea diferente en cada linaje celular. Esto podría explicar las diferencias en los niveles de ER, PR y AR entre los resultados en MLVA y CMLVA, de ahí la importancia de estudiar las poblaciones celulares por separado para determinar los cambios celulares específicos en MLVA.

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de la regulación de PR por la testosterona y la regulación de AR por la progesterona en CMLVA. En este trabajo se demuestra que la expresión en pulmón de ER $\alpha$  y ER $\beta$  está regulada positivamente en hembras por P4, ER $\beta$  por E2, y ER $\alpha$  por T, lo que sugiere que las hormonas sexuales podrían inducir un ambiente de protección a la inflamación y la contracción de las vías aéreas en células pulmonares. Sin embargo, estos resultados no están de acuerdo con la evidencia que sugiere que las mujeres tienen asma más grave que los hombres. Una explicación plausible de este fenómeno es que la expresión no sólo de ER $\beta$  sino también de PR y AR en músculo liso de vías aéreas en hembras está regulada a la baja por las hormonas sexuales. ER $\alpha$  fue el único receptor que incrementó su expresión por su propio ligando, E2, y también por T. Este aumento de ER $\alpha$  probablemente reduce los

efectos negativos de la regulación a la baja ejercida por otros receptores hormonales.

Paradójicamente, hemos observado que el receptor de AR también fue regulado a la baja por su ligando, la testosterona y otras hormonas sexuales. Este es un hallazgo controvertido en vista de que la testosterona y los estrógenos contribuyen a regular el tono del músculo liso. [118] Una posible explicación de nuestros hallazgos podría estar asociada con la regulación endocrinológica de las hormonas sexuales. Las hormonas femeninas presentan cambios de nivel cíclicos, pero las hormonas sexuales masculinas no lo hacen. En este contexto, el estrógeno y la progesterona son "retirados" en las mujeres, por ejemplo, durante los ciclos menstruales, empeorando de los síntomas en enfermedades como el asma, ya que, como se ha observado en nuestros resultados, los receptores de la hormona están regulados a la baja.

Potvin et al. han determinado el papel del receptor de progesterona nuclear mediante el uso de ratones intactos (WT) y knock-out PR (PRKO) en los días postnatales 1, 4 y 10. Midieron la respuesta ventilatoria hipóxica (14 y 12% de O<sub>2</sub>, 20 min cada uno) y la frecuencia de la apnea en los ratones machos y hembras usando pletismografía de cuerpo entero. Ellos concluyeron que PR es un elemento clave para la respuesta ventilatoria hipóxica en ratones neonatos, pero la eliminación de PR no aumenta la frecuencia de la apnea durante la normoxia o hipoxia. [119]

Varios estudios indican que las hormonas sexuales, en particular los estrógenos, tienen efectos protectores contra la bronco-obstrucción y la inflamación. Por ejemplo, la estimulación de los receptores ER $\alpha$  y  $\beta$  en células epiteliales

bronquiales humanas con estrógeno induce la producción de óxido nítrico, lo que resulta en broncodilatación. [120] Además, los receptores de estrógenos acoplados a proteína G se han asociado con funciones inmunorreguladoras mediante el aumento de la producción de IL-10 en las vías aéreas. [121] En un estudio reciente, los ratones tratados con estrógenos mostraron una mayor expresión del mediador anti-inflamatorio inhibidor secretor de la leucoproteasa. [122] En cuanto a músculo liso, la estimulación con estrógenos tiene un importante papel al relajar este tejido. [105]

Los resultados de esta tesis son numerosos y complejos. Por ello hemos tratado de resumirlos en las tablas 1-3 al final del escrito, y en general observamos los diferentes grupos estudiados: ratas machos y hembras, sensibilizados o no a ovoalbúmina, músculo liso ó células del músculo liso de las vías aéreas, 6 receptores a hormonas sexuales incluyendo tPR, analizados por tres diferentes expresiones: proteína por Western blot y citometría de flujo, así como mRNA.

Analizando estas tablas podemos concluir:

1. La importancia de que en este trabajo se haya analizado la población de receptores a hormonas sexuales específicamente en células aisladas del músculo liso de las vías aéreas y no en homogeneizados del pulmón o el propio MLVA, pues existe un gran número de células de estirpes diferentes en la vías aéreas, en las cuales se ha descrito la presencia de receptores a hormonas sexuales. Muchas de estas células aumentan en número en presencia de un proceso inflamatorio, como el que ocurre en el asma, durante el cual el número de células inmunes infiltradas a las vías aéreas aumenta y, debido a que estas células también expresan receptores a hormonas esteroides, el número de estos también se eleva. Debido a lo

anterior, el asegurarnos de que las mediciones se realizaron específicamente en las células de músculo liso de las vías aéreas, por el doble marcaje anti- $\alpha$ -actina y el propio del anticuerpo al receptor buscado, garantiza que la población de receptores y su regulación ocurre en estas células y no en otras.

2. Al comparar animales sensibilizados y no sensibilizados a ovoalbúmina se aprecia que el proceso de sensibilización modifica significativamente la regulación de la expresión de la mayoría de los receptores a hormonas esteroideas en el músculo liso de las vías aéreas, ya sea en el MLVA o en específico en las CMLVA.
3. En cuanto al sexo de las ratas, se puede afirmar que en el análisis de la expresión de ER $\beta$  y AR encontramos diferencia entre machos y hembras, mientras que en los demás receptores estos cambios son no significativos o inexistentes. La expresión de tPR en las hembras y los machos presenta significancia opuesta en el análisis de proteína de CMLVA de animales no sensibilizados.
4. En general, se puede apreciar que la P4 realiza un papel muy importante en la regulación de la expresión de los receptores, ya que en los animales tratados con P4 o su combinación con E2, se observa una regulación de los receptores ya sea aumento o disminución de su expresión.
5. En cuanto a la expresión de ER $\alpha$  y PR a nivel proteico y de mRNA, los resultados son consistentes, en cuanto a que la regulación existente es a nivel genético y se mantiene a nivel de la traducción proteica. Sin embargo, estos resultados requieren de mayor estudio debido a que el RNA no proviene de células específicamente del músculo liso de las vías aéreas.

Estamos conscientes de que nuestros hallazgos tienen implicaciones en procesos pulmonares tales como la inflamación, remodelación e hiperreactividad, que son síntomas patognomónicos de enfermedades en las se ha propuesto un papel para las hormonas sexuales, como el asma, la fibrosis pulmonar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La regulación de los receptores de hormonas sexuales por las mismas hormonas sexuales en el músculo liso es relevante en la interacción de todos los tipos celulares que participan en los procesos fisiológicos de pulmón, ya sea en la salud o en la enfermedad.

Estamos conscientes de que nuestros hallazgos tienen implicaciones en procesos pulmonares tales como la inflamación, remodelación e hiperreactividad, que son síntomas patognomónicos de enfermedades en las se ha propuesto un papel para las hormonas sexuales, como el asma, la fibrosis pulmonar y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La regulación de los receptores de hormonas sexuales por las mismas hormonas sexuales en el músculo liso es relevante en la interacción de todos los tipos celulares que participan en los procesos fisiológicos de pulmón, ya sea en la salud o en la enfermedad.

ER $\alpha$										ER $\beta$																	
Hembras					Machos					Hembras					Machos												
MLVA										MLVA																	
		Tx	R	p			Tx	R	p			Tx	R	p			Tx	R	p								
Proteína	No sens	E2			Proteína	No sens	E2			Proteína	No sens	E2	■	<0.001	Proteína	No sens	E2			Proteína							
		P4	■	<0.001			P4	■	<0.01			P4	■	<0.001			P4	■	<0.001								
		E+P					E+P	■	<0.05			E+P	■	<0.001			E+P	■	<0.05		E+P	■	<0.05				
		T	■	<0.001			T					T					T				T	■	<0.05				
	Sens	E2				E2	■	<0.001	E2		■	<0.001	E2	■		<0.001	E2	■	<0.001		E2	■	<0.001	E2	■	<0.001	
		P4	■	<0.001		P4	■	<0.001	P4		■	<0.001	P4	■		<0.001	P4	■	<0.001		P4	■	<0.001	P4	■	<0.001	
		E+P	■	<0.001		E+P	■	<0.001	E+P		■	<0.001	E+P	■		<0.001	E+P	■	<0.001		E+P	■	<0.001	E+P	■	<0.001	
		T	■	<0.001		T	■	<0.001	T		■	<0.001	T	■		<0.001	T	■	<0.001		T	■	<0.001	T	■	<0.001	
mRNA	No sens	E2			mRNA	No sens	E2			mRNA	No sens	E2			mRNA	No sens	E2			mRNA	No sens	E2					
		P4	■	<0.001			P4					P4					P4					P4					
		E+P					E+P	■	<0.001			E+P					E+P					E+P			E+P		
		T	■	<0.001			T	■	<0.001			T					T					T			T		
	Sens	E2				E2	■	<0.001	E2				E2				E2				E2			E2			
		P4				P4	■	<0.001	P4				P4				P4				P4			P4			
		E+P				E+P	■	<0.001	E+P				E+P				E+P				E+P			E+P			
		T	■	<0.05		T			T				T				T				T			T			
CMLVA										CMLVA																	
		Tx	R	p			Tx	R	p			Tx	R	p			Tx	R	p			Tx	R	p			
Proteína	No sens	E2	■	<0.01	Proteína	No sens	E2			Proteína	No sens	E2	■	<0.001	Proteína	No sens	E2			Proteína	No sens	E2					
		P4	■	<0.05			P4	■	<0.05			P4	■	<0.001			P4					P4					
		E+P					E+P	■	<0.05			E+P	■	<0.05			E+P	■	<0.05			E+P	■	<0.05	E+P	■	<0.05
		T	■	<0.01			T	■	<0.05			T	■	<0.001			T	■	<0.05			T	■	<0.05	T	■	<0.05
	Sens	E2				E2			E2		■	<0.001	E2	■		<0.001	E2				E2			E2			
		P4				P4			P4		■	<0.05	P4	■		<0.05	P4	■	<0.05		P4	■	<0.05	P4	■	<0.05	
		E+P				E+P			E+P				E+P				E+P				E+P	■	<0.05	E+P	■	<0.05	
		T				T			T				T				T	■	<0.05		T	■	<0.05	T	■	<0.05	

**Tabla 1.** Resumen de resultados de la regulación de los diferentes tratamientos hormonales sobre la expresión del ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Los valores de  $p$  se obtuvieron comparando una  $n=4$  de cada tratamiento hormonal contra los resultados obtenidos en el grupo control (tratamiento con vehículo). MLVA = músculo liso de las vías aéreas, CMLVA = células del músculo liso de las vías aéreas, No Sens = No sensibilizados con ovoalbúmina, Sens = sensibilizados con ovoalbúmina, Tx = tratamiento hormonal, R = regulación, □ sin regulación, ■ regulación a la baja, ■ regulación a la alta,  $p$  = probabilidad.

PRA										PRB													
Hembras					Machos					Hembras					Machos								
MLVA										MLVA													
		Tx	R	p			Tx	R	p			Tx	R	p			Tx	R	p				
Proteína	No sens	E2	■	<0.01	Proteína	No sens	E2	■	<0.05	Proteína	No sens	E2	□		Proteína	No sens	E2	■	<0.05				
		P4	■	<0.001			P4	□				P4	■	<0.001									
		E+P	■	<0.001			E+P	■	<0.01			E+P	■	<0.001			E+P	■	<0.01				
		T	■	<0.001			T	■	<0.05			T	■	<0.001			T	■	<0.01				
	Sens	E2	■	<0.001		Sens	E2	■	<0.001		Sens	E2	■	<0.001		Sens	E2	■	<0.001	Sens	E2	■	<0.001
		P4	■	<0.001			P4	■	<0.05			P4	■	<0.001			P4	□					
		E+P	■	<0.001			E+P	■	<0.001			E+P	■	<0.001			E+P	■	<0.001				
		T	■	<0.001			T	■	<0.001			T	■	<0.001			T	■	<0.001				
<b>tPR</b>																							
MLVA										CMLVA													
Hembras					Machos					Hembras					Machos								
		Tx	R	p			Tx	R	p			Tx	R	p			Tx	R	p				
mRNA	No sens	E2	□		mRNA	No sens	E2	■	<0.05	Proteína	No sens	E2	■	<0.01	Proteína	No sens	E2	□					
		P4	■	<0.001			P4	■	<0.001			P4	□				P4	■	<0.01				
		E+P	■	<0.001			E+P	■	<0.001			E+P	□				E+P	■	<0.01				
		T	■	<0.001			T	■	<0.001			T	□				T	■	<0.01				
	Sens	E2	■	<0.01		Sens	E2	■	<0.01		Sens	E2	□			Sens	E2	□					
		P4	■	<0.01			P4	□				P4	□				P4	□					
		E+P	■	<0.01			E+P	■	<0.01			E+P	□				E+P	□					
		T	■	<0.001			T	■	<0.001			T	□				T	□					

**Tabla 2.** Resumen de resultados de la regulación de los diferentes tratamientos hormonales sobre la expresión del PRA, PRB y tPR (PRA + PRB). Los valores de  $p$  se obtuvieron comparando una  $n=4$  de cada tratamiento hormonal contra los resultados obtenidos en el grupo control (tratamiento con vehículo). MLVA = músculo liso de las vías aéreas, CMLVA = células del músculo liso de las vías aéreas, No Sens = No sensibilizados con ovoalbúmina, Sens = sensibilizados con ovoalbúmina, Tx = tratamiento hormonal, R = regulación, □ sin regulación, ■ regulación a la baja, ■ regulación a la alta,  $p$  = probabilidad.

AR																										
Hembras				Machos				Hembras				Machos														
MLVA								CMLVA																		
		Tx	R	<i>p</i>			Tx	R	<i>p</i>			Tx	R	<i>p</i>												
Proteína	No sens	E2			Proteína	No sens	E2			Proteína	No sens	E2			Proteína	No sens	E2									
		P4					P4					P4					P4									
		E+P					E+P					E+P					E+P			E+P			E+P			
		T					T					T					T			T			T			
	Sens	E2				Sens	E2				Sens	E2				Sens	E2			Sens	E2					
		P4					P4					P4					P4				P4			P4		
		E+P					E+P					E+P					E+P				E+P			E+P		
		T					T					T					T				T			T		
		Tx	R	<i>p</i>			Tx	R	<i>p</i>			Tx	R	<i>p</i>			Tx	R	<i>p</i>							

**Tabla 3.** Resumen de resultados de la regulación de los diferentes tratamientos hormonales sobre la expresión del AR. Los valores de *p* se obtuvieron comparando una n=4 de cada tratamiento hormonal contra los resultados obtenidos en el grupo control (tratamiento con vehículo). MLVA = músculo liso de las vías aéreas, CMLVA = células del músculo liso de la vías aéreas, No Sens = No sensibilizados con ovoalbúmina, Sens = sensibilizados con ovoalbúmina, Tx = tratamiento hormonal, R = regulación, □ sin regulación, ■ regulación a la baja, ■ regulación a la alta, *p* = probabilidad.

## REFERENCIAS

- [1] Z. I. Ceballos, M. E. Peralta, L. Sandoval and J. E. Contla, “Costo directo de la atención por crisis aguda de asma en el servicio de urgencia pediátrica”, *Revista Alergia México*, vol. 51, no. 4, pp. 134-148, 2004.
- [2] National Asthma Education and Prevention Program, “Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the diagnosis and management of asthma, Summary Report 2007”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 120 no. 5, pp. s94-s138, 2007.
- [3] O. Tliba and R. A. Panettieri, “Noncontractile functions of airway smooth muscle cells in asthma”, *Annual Review of Physiology*, vol. 71, pp. 509-35, 2009.
- [4] M. A. Carey, J. W. Card, J. W. Voltz, S. J. et al., “It's all about sex: gender, lung development and lung disease”, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 18, no. 8, pp. 308-313, 2007.
- [5] Nef S and Parada LF, “Hormones in male sexual development”, *Genes & Development*, vol. 14, no. 24, pp. 3075-3086, 2000.
- [6] N. K. Ostrom, “Women with asthma: a review of potential variables and preferred medical management”, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, vol. 96 no. 5, pp. 655-665, 2006.
- [7] G. Balzano, S. Fuschillo, G. Melillo and S. Bonini, “Asthma and sex hormones”, *Allergy European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 56, no. 1, pp. 113-20, 2001.

- [8] J. G. Regensteiner, R. G. McCullough, R. E. McCullough, C. K. Pickett and L. G. Moore, "Combined effects of female hormones and exercise on hypoxic ventilator response", *Respiration Physiology*, vol. 82, no. 1, pp. 107-114, 1990.
- [9] M. Perusquía, R. Hernández, L. M. Montaña, C. M. Villalón and M. G. Campos, "Inhibitory effect of sex steroids on guinea pig airway smooth muscle contraction", *Comparative Biochemistry and Physiology: C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, vol. 118, no. 1, pp. 5-10, 1997.
- [10] A. González-Arenas, T. Neri-Gómez, C. Guerra-Araiza and I. Camacho-Arroyo, "Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors in the lung of adult rats", *Steroids*, vol. 69, no. 5, pp.351-356, 2004.
- [11] I. Camacho-Arroyo, S. T. Méndez-Cruz, C. Guerra-Araiza and M. A. Cerbón, "Changes in progesterone receptor mRNA content in rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment", *Journal of Endocrinology*, vol. 157, no.1, pp. 71-74, 1998.
- [12] L. M. Bilezikjian, A. L. Blount, C. J. Donaldson and W. W. Vale, "Pituitary actions of ligands of the TGF-beta family: Activins and inhibins", *Reproduction*, vol. 132, no. 2, pp. 207–215, 2006.
- [13] K. L. Parker and B. P. Schimer, "Introducción a la Endocrinología: Eje Hipotálamo-Hipófisis", en: L. L. Brunton, editor, *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Ciudad de México:

*McGraw-Hill*, pp 1103-1128, 2012.

- [14] E. R. Levin and S. R. Hammes, "Estrógenos y progestágenos", en: L. Brunton, editor, *Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Ciudad de México: *McGraw-Hill*, pp 1164-1194, 2012.
- [15] C. Klinge, C. Rao, "The Steroid Hormone Receptors" en: *The Global Library of Women's Medicine*, 2008.
- [16] D. M. Ignar-Trowbridge, K. G. Nelson, M. C. Bidwell, Curtis, et al., "Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor", *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, vol. 89, no. 1, pp. 4658-4662
- [17] S. Kato, H. Endoh, Y. Masuhiro, et al., "Activatin of the estrogen through phosphorylation by mitogen-activated protein kinasa", *Science*, vol. 270, no. 5241, pp.1491-1494
- [18] L. P. Freedman, "Anatomy of the steroid receptor zinc finger region", *Endocrine reviews*, vol. 13, no. 2, pp. 129-145.
- [19] Y. Zheng and L. C. Murphy, "Regulation of steroid hormone receptors and coregulators during the cell cycle highlights potential novel function in addition to roles as transcription factors", *Nuclear receptor signaling*, Vol. 14, no. 1, pp 1-12, 2016.
- [20] A. Jensen, and H. Jacobson, "Basic guides of the mechanism of estrogen action", *Recent progress in hormone research*, vol. 18, pp. 387-414, 1962.

- [21] D. Toft, and J. Gorski, "A Receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization", *Proceedings of the national academy of science of the United States of America*, vol. 55, no. 6, pp. 1574-1581, 1966.
- [22] G. G. Kuiper, E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, and J. A. Gustafsson, "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary" *Proceedings of the national academy of science of the United States of America*, vol. 93, no. 12, pp. 5925-5930, 1996.
- [23] B. Hanstein, S. Djahansouzi, P. Dall, et al., "Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer", *European journal of endocrinology*, vol. 150, no. 3, pp. 243–255, 2004.
- [24] D. Philibert, and J. P. Raynaud, "Progesterone binding in the immature rabbit and guinea pig", *Endocrinology*, vol. 94, no. 3, pp. 627-632, 1974.
- [25] D. Philibert, and J. P. Raynaud, "Progesterone binding in the immature mouse and rat uterus", *Steroids*, vol. 22, no. 1, pp. 89-98, 1973.
- [26] R. K. Rao, W. G. Wiest, and W. H. Allen, "Progesterone "receptor" in rabbit uterus. I. Characterization and estradiol-17 $\beta$  augmentation", *Endocrinology*, vol. 92, no. 4, pp. 1229-1240, 1973.
- [27] W. T. Schrader, R. W. Kuhn, and B. M. O'malley, "Progesterone-binding components of chick oviduct: receptor  $\beta$  subunit protein purified to apparent homogeneity from laying hen oviducts", *The*

*Journal of biological chemistry*, vol. 252, no. 1, pp. 299-307, 1977.

- [28] M. F. Rousseau-Merck, M. Misrahi, H. Loosfelt, E. Milgrom and R. Berger, "Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23", *Human genetics*, vol. 77, no. 3, pp. 280-282, 1987.
- [29] P. Kastner, A. Krust, B. Turcotte, et al., "Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B", *The EMBO Journal*, vol. 9, no. 5, pp. 1603-1614, 1990.
- [30] W. Schneider, C. Ramachandran, P. G. Satyaswaroop, and G. Shyamala, "Murine progesterone receptor exists predominantly as the 83-kilodalton 'A' form", *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 38, no. 3, pp. 285-291, 1991.
- [31] Conneely OM, Kettelberger DM, Tsai MJ, Schrader WT and O'Malley BW, "The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, no. 24, pp. 14062-14064, 1989.
- [32] Kastner P, Bocquel MT, Turcotte B, Garier JM, Horwitz KB, et al., "Transient expression of human and chicken progesterone receptors does not support alternative translational initiation from a single mRNA as the mechanism generating two receptor isoforms", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 21, pp. 163-167, 1990.
- [33] Bruchofsky N and Wilson JD, "The intranuclear binding of testosterone and 5 $\alpha$ -androstane-17 $\beta$ -ol-3-one by rat prostate", *Journal*

- of *Biological Chemistry*, vol. 243, no. 22, pp. 5953-5960, 1968.
- [34] Uhnjem O and Tveter KJ, "Localization of an androgen binding substance from the rat ventral prostate", *Acta endocrinologica (Copenhagen)*, vol. 60, no. 4, pp. 571-578, 1969.
- [35] Mainwaring WIP, "The binding of [1,2-3H]testosterone within nuclei of the rat prostate", *Journal of endocrinology*, vol. 44, no. 4, pp. 323-333, 1969.
- [36] Blaquier JA "Selective uptake and metabolism of androgens by rat epididymis. The presence of a cytoplasmic receptor", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 45, no. 4, pp. 1076-1082, 1971.
- [37] Tindall DJ, French FS and Nayfeh SN "Androgen uptake and binding in rat epididymal nuclei in vivo", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 49, no. 6, pp. 1391-1397, 1972.
- [38] Tindall DJ, Hansson V, Sar M, Stumpf WE, French FS et al., "Further studies on the accumulation and binding of androgen in rat epididymis", *Endocrinology*, vol. 95, no. 4, pp. 1119-1128, 1974.
- [39] Hansson V, Djoseland O, Reusch E, Attramadal A and Torgersen O, "Intracellular receptors for 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone in the epididymis of adult rats. Comparison with the androgenic receptors in the ventral prostate and the androgen-binding protein (ABP) in the testicular and epididymal fluid", *Steroids*, vol. 22, no. 1, pp. 19-33, 1973.
- [40] Chang C, Kokontis J and Liao ST, "Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors", *Science*, vol. 240, no. 4850, pp. 324-326, 1988.

- [41] Chang C, Kokontis J and Liao ST, "Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 19, pp. 7211-7215, 1988.
- [42] Wilson CM and McPhaul MJ, "A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 4, pp. 1234-1238, 1994.
- [43] Zoppi S, Wilson CM, Harbison MD, Griffin JE, Wilson JD, et al., "Complete testicular feminization caused by aminoterminal truncation of the androgen receptor with downstream initiation", *Journal of clinical investigation*, vol. 91, no. 3, pp. 1105-1112, 1993.
- [44] Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, NHLBI/WHO Workshop report. Bethesda: National Institutes of Health; National Heart, Lung and Blood Institute; 2006.
- [45] Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, NHLBI/WHO Workshop report. Bethesda: National Institutes of Health; National Heart, Lung and Blood Institute; 2002.
- [46] Jeffery P, "Inflammation and remodeling in the adult and child with asthma", *Pediatric pulmonology supplement*, vol. 21, pp. 3-16, 2001.
- [47] Rasmussen F, Taylor R and Flannery E, "Risk factors for airway remodeling in asthma manifested by a low post bronchodilator FEV1/vital capacity ratio", *American journal of respiratory critical care medicine*, vol. 165, no. 11, pp. 1480-1488, 2002.

- [48] NAEPP 2007.
- [49] Lemanske RF Jr and Busse WW, "Asthma", *Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 111, pp. S502-S19, 2003.
- [50] del Río-Navarro BE, Hidalgo-Castro EM and Sienra-Monge J JL, "Asma", *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, vol. 66, no. 1, 2009.
- [51] Holgate ST, Davies DE, Lacke PM, Wilson SJ, Puddicombe SM, et al., "Epithelial-mesenchymal interactions in the pathogenesis of asthma", *Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 105, no. 2, pp. 193-204, 2000.
- [52] Wahn U, Lau S, Bergmann R, Kulig M, Forster J, et al., "Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life", *Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 99, no. 2, pp. 763-769, 1997.
- [53] Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA and Cogswell JJ, "Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study", *New England journal of medicine*, vol. 323, no. 8, pp. 502-507, 1990.
- [54] Galli SJ, Tsai G and Piliponsky AM, "The development of allergic inflammation", *Nature*, vol. 454, no. 7203, pp. 445-454, 2008.
- [55] Pearlman DS, "Pathophysiology of the inflammatory response", *Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 104, no. 4, pp. S132-137, 1999.
- [56] Lemanske RF, "Inflammatory events in asthma: An expanding equation", *Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 105, no. 6,

pp. S633-636, 2000.

- [57] Boris L and Steinkes JW, "Cytokines and chemokines", *Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 111, no. 3, pp. S460-475, 2003.
- [58] Rosenwasser LJ, "New immunopharmacologic approaches to asthma: Role of cytokine antagonism", *Journal of allergy and clinical immunology*, vol. 105, no. 2, pp. S586-592, 2000.
- [59] Panettieri RA Jr and Kotlikoff MI, "Cellular and molecular mechanisms regulating airway smooth muscle cell physiology and pharmacology" In *Pulmonary Diseases and Disorders*, ed. AP Fishman, JA Elias, JA Fishman, MA Grippi, LR Kaiser, et al., pp. 107–117, New York: McGraw-Hill, 1998.
- [60] De S, Zelazny ET, Souhrada JF and Souhrada M, "IL-1 $\beta$  and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells", *Journal of applied physiology*, vol. 78, no. 4, pp. 1555-1563, 1995.
- [61] Belvisi MG, Saunders M, Yacoub M and Mitchell JA, "Expression of cyclo-oxygenase-2 in human airway smooth muscle is associated with profound reductions in cell growth", *British journal of pharmacology*, vol. 125, no. 5, pp. 1102–1108, 1998.
- [62] McKay S, Hirst SJ, Bertrand-de Haas M, de Jonste JC, Hoogsteden HC, et al., "Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances mRNA expression and secretion of interleukin-6 in cultured human airway smooth muscle cells", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 125, no. 5, pp.103–111, 2000.

- [63] Stewart AG, Tomlinson PR, Fernandes DJ, Wilson JW and Harris T, "Tumor necrosis factor  $\alpha$  modulates mitogenic responses of human cultured airway smooth muscle", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 12, no. 1, pp. 110–119, 1995.
- [64] Johnson PRA, Black JL, Cralin S, Ge Q and Underwood PA, "The production of extracellular matrix proteins by human passively sensitized airway smooth-muscle cells in culture: the effect of beclomethasone", *American journal of respiratory critical care medicine*, vol. 162, no. 6, pp. 2145–2151, 2000.
- [65] Hirst SJ, Twort CHC and Lee TH, "Differential effects of extracellular matrix proteins on human airway smooth muscle cell proliferation and phenotype", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 23, no. 3, pp. 335–344, 2000.
- [66] Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, et al., "Interleukin-4, -5, and -6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 10, no. 4, pp. 471–480, 2000.
- [67] Wegner CD, Gundel RH, Reilly P, Haynes N, Letts LG, et al., "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma", *Science*, vol. 247, no. 4941, pp.456–59, 1990.
- [68] Tliba O and Panettieri RA, "Noncontractile functions of airway smooth muscle cells in Asthma", *Annual review of physiology*, vol. 71, no. , pp. 509-535, 2009.

- [69] Pang JJ, Xu XB, Li HF, Zhang XY, Zheng TZ et al., "Inhibition of beta-estradiol on trachea smooth muscle contraction in vitro and in vivo", *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 23, no. 3, pp. 273–277, 2002.
- [70] Foster PS, Goldie RG and Paterson JW, "Effect of steroids on b-adrenoceptor-mediated relaxation of pig bronchus", *British Journal of Pharmacology*, vol. 78, no. 2, pp. 441-445, 1983.
- [71] Townsend EA, Sathish V, Thompson MA, Pabelick CM and Prakash YS, "Estrogen effects on human airway smooth muscle involve cAMP and protein kinase A", *American Journal of Physiology and lung cellular and molecular physiology*, vol. 303, no. 10, pp. L923–L928, 2012.
- [72] Dimitropoulou C, White RE, Ownby DR and Catravas JD, "Estrogen reduces carbachol-induced constriction of asthmatic airways by stimulating large-conductance voltage and calcium-dependent potassium channels", *American Journal of Physiology and lung cellular and molecular physiology*, vol. 32, no. 3, pp. 239–247, 2005.
- [73] Matsubara S, Swasey CH, Loader JE, Dakhama A, Joetham A, Ohnishi H, Balhorn A, Miyahara N, Takeda K and Gelfand EW, "Estrogen determines sex differences in airway responsiveness after allergen exposure", *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 38, no. 5, pp. 501–508, 2008 .
- [74] Dimitropoulou C, Drakopanagiotakis F, Chatterjee A, Snead C and Catravas JD, "Estrogen replacement therapy prevents airway dysfunction in a murine model of allergen-induced asthma", *Lung*, vol. 187, no. 2, pp 116–127, 2009.

- [75] Carey MA, Card JW, Bradbury JA, Moorman MP, Haykal-Coates N, et al., "Spontaneous airway hyperresponsiveness in estrogen receptor-deficient mice", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 175, no. 2, pp. 126–135, 2007.
- [76] Degano B, Mourlanette P, Valmary S, Pontier S, Prevost MC et al., "Differential effects of low and high-dose estradiol on airway reactivity in ovariectomized rats", *Respiratory Physiology & Neurobiology*, vol. 138, no. 2, pp. 265–274, 2003.
- [77] Degano B, Prevost MC, Berger P, Molimard M, Pontier S, et al., "Estradiol decreases the acetylcholine-elicited airway reactivity in ovariectomized rats through an increase in epithelial acetylcholinesterase activity", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 164, no. 10, pp. 1849–1854, 2001.
- [78] Lieberman D, Kopernik G, Porath A, Lazer S and Heimer D, "Sub-clinical worsening of bronchial asthma during estrogen replacement therapy in asthmatic post-menopausal women", *Maturitas*, vol. 21, no. 2, pp. 153–157, 1995.
- [79] Troisi RJ, Speizer FE, Willett WC, Trichopoulos D and Rosner B, "Menopause, postmenopausal estrogen preparations, and the risk of adult-onset asthma. A prospective cohort study", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 152, no. 4, pp. 1183-1188. 1995.
- [80] Villa MP, Bernardi F, Burnaccini M, Tura A, Martelli M, et al., "Bronchial reactivity and sex hormone: study in a Turner's population", *Pediatric Pulmonology*, vol. 9, no. 4, pp. 199–205, 1990.

- [81] Lieberman D, Kopernic G, Porath A, Levitas E, Lazer S, et al., "Influence of estrogen replacement therapy on airway reactivity", *Respiration*, vol. 62, no. 2, pp. 205–208, 1995.
- [82] Carlson CL, Cushman M, Enright PL, Cauley JA, Newman AB et al., "Hormone replacement therapy is associated with higher FEV1 in elderly women", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 163, no. 2, pp. 423–428, 2001.
- [83] Myers JR and Sherman CB, "Should supplemental estrogens be used as steroid-sparing agents in asthmatic women?", *Chest*, vol. 106, no. 2, pp. 318–319, 1994.
- [84] Chandler MH, Schuldheisz S, Phillips BA and Muse KN, "Premenstrual asthma: the effect of estrogen on symptoms, pulmonary function, and b2-receptors", *Pharmacotherapy*, vol. 17, no. 3, pp. 224-234, 1997.
- [85] Hellings PW, Vandekerckhove P, Claeys R, Billen J, Kasran A et al., "Progesterone increases airway eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic asthma", *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 33, no. 4, pp. 1457-1463, 2003.
- [86] Beynon HL, Garbett ND and Barnes PJ, "Severe premenstrual exacerbations of asthma: effect of intramuscular progesterone", *Lancet*, vol. 2, no. 8607, pp. 370–372, 1988.
- [87] Townsend EA, Miller VM and Prakash YS, "Sex differences and sex steroids in lung health and disease", *Endocrine Reviews*, vol. 33, no. 1, pp. 1–47, 2012.

- [88] Kouloumenta V, Hatziefthimiou A, Paraskeva E, Gourgoulisanis K and Molyvdas PA, "Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle", *British Journal of Pharmacology*, vol. 149, no. 2, pp. 1083-1091, 2006.
- [89] Bordallo J, de Boto MJ, Meana C, Velasco L, Bordallo C, et al., "Modulatory role of endogenous androgens on airway smooth muscle tone in isolated guinea-pig and bovine trachea; involvement of  $\beta_2$ -adrenoceptors, the polyamine system and external calcium", *European Journal of Pharmacology*, vol. 601, no. 1, pp. 154–162, 2008.
- [90] Montaña LM, Espinoza J, Flores-Soto E, Chavez J and Perusquia M, "Androgens are bronchoactive drugs by relaxing airway smooth muscle and preventing bronchospasm", *Journal of Endocrinology*, vol. 222, no. 1, pp. 1–13, 2014.
- [91] Wulfsohn NL, Politzer WM and Henrico JS, "Testosterone therapy in bronchial asthma", *South African Medical Journal*, vol. 38, no. 3, pp. 170-172, 1964.
- [92] Card JW, Voltz JW, Ferguson CD, Carey MA, DeGraff LM, et al., "Male sex hormones promote vagally mediated reflex airway responsiveness to cholinergic stimulation", *American journal of physiology, lung cellular and molecular physiology*, vol. 292, no. 4, pp. L908–L914, 2007.
- [93] JF Couse, J Lindzey, K Grandien, A Gustafsson and KS Korach, "Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in

- the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse”, *Endocrinology*, vol. 138, no. 11, pp. 4613–4621, 1997.
- [94] WK Morishige and CA Uetake, “Receptors for androgen and estrogen in the rat lung”, *Endocrinology*, vol. 102, no. 6, pp. 1827–1837, 1978.
- [95] PTK Saunders, SM Maguire, J Gaughan and MR Millar, “Expression of oestrogen receptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry”, *Journal of Endocrinology*, vol. 154, no. 3, pp. R13–R16, 1997.
- [96] EA Kirsch, IS Yuhanna, Z Chen, Z German, TS Sherman and PW Shaul, “Estrogen acutely stimulates endothelial nitric oxide synthase in H441 human airway epithelial cells”, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 20, no. 4, pp. 658–666, 1999.
- [97] MC Catley, MA Birrell, EL Hardaker, et al., “Estrogen receptor  $\beta$ : expression profile and possible anti-inflammatory role in disease”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 326, no. 1, pp. 83–88, 2008.
- [98] J Plante, M Simard, P Rantakari, et al., “Epithelial cells are the major site of hydroxysteroid (17 $\beta$ ) dehydrogenase 2 and androgen receptor expression in fetal mouse lungs during the period overlapping the surge of surfactant”, *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, vol. 117, no. 4-5, pp. 139–145, 2009.
- [99] SI Meireles, GH Esteves, R Hirata Jr., et al., “Early changes in gene expression induced by tobacco smoke: evidence for the importance of estrogen within lung tissue”, *Cancer Prevention Research*, vol. 3, no.

6, pp. 707–717, 2010.

- [100] E Vegeto, S Cuzzocrea, C Crisafulli, et al., “Estrogen receptor- $\alpha$  as a drug target candidate for preventing lung inflammation”, *Endocrinology*, vol. 151, no. 1, pp. 174–184, 2010.
- [101] Fernandez J, Reyes R, Ponce H, Oropeza M, VanCalsteren M, et al., “Isoquercitrin from *Argemone platyceras* inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways”, *European journal of pharmacology*, vol. 522, no. 2, pp. 108-115, 2005.
- [102] MK Thakur and PK Sharma, “Transcription of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in mouse cerebral cortex: effect of age, sex,  $17\beta$ -estradiol and testosterone”, *Neurochemistry International*, vol. 50, no. 2, pp. 314-321, 2007.
- [103] M Saceda, C Knabbe, RB Dickson, Lippman ME, Bronzert D, et al., “Post-transcriptional destabilization of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 27, pp. 17809-17814, 1991.
- [104] Stoica A, Saceda M, Doraiswamy VL, Coleman C and Martin MB, “Regulation of estrogen receptor- $\alpha$  gene expression by epidermal growth factor”, *Journal of Endocrinology*, vol. 165, no.2, pp. 371-378, 2000.
- [105] EA Townsend, MA Thompson, CM Pabelick and YS Prakash, “Rapid effects of estrogen on intracellular  $Ca^{2+}$  regulation in human airway smooth muscle”, *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 298, no. 4, pp. L521–L530, 2010.

- [106] González-Arenas O, Villamar-Cruz C, Guerra-Araiza C, and Camacho-Arroyo I, "Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung", *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 85, no. 1, pp. 25–31, 2003.
- [107] WL Kraus, MM Montano and BS Katzenellenbogen, "Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene", *Molecular endocrinology*, vol. 8, no. 8, pp. 952–969, 1994.
- [108] JL Turgeon and DW Waring, "Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes", *Endocrinology*, vol. 141, no. 9, pp. 3422–3429, 2000.
- [109] CA Lange, T Shen and KB Horwitz, "Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogenactivated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 3, pp. 1032–1037, 2000.
- [110] González-Arenas MA, Peña-Ortiz V and Hansberg-Pastor, "PKC $\alpha$  and PKC $\delta$  activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in human astrocytoma cells", *Endocrinology*, vol. 156, no. 3, pp. 1010–1022, 2015.
- [111] Mikkonen L, Pihlajamaa P, Sahu B, Zhang FP and Jänne OA, "Androgen receptor and androgen-dependent gene expression in lung", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 317, no. 1-2, pp. 14-24, 2010.

- [112] Boucher E, Provost PR, Plante J and Tremblay Y, "Androgen receptor and  $17\beta$ -HSD type 2 regulation in neonatal mouse lung development", *Molecular and cellular endocrinology*, vol. 311, no. 1-2, pp. 109-119, 2009.
- [113] Kimura Y, Suzuki T and Kaneko C, "Expression of androgen receptor and  $5\alpha$ -reductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung: a possible correlation with branching morphogenesis", *Clinical science*, vol. 105, no. 6, pp. 709-713, 2003.
- [114] Sajjad Y, Quenby S, Nickson P, Lewis-Jones DI and Vince G, "Androgen receptors are expressed in a variety of human fetal extragenital tissues: an immunohistochemical study", *Asian Journal of Andrology*, vol. 9, no. 6, pp. 751-759, 2007.
- [115] Murphy J, Summer R and Fine A, "Stem cells in airway smooth muscle state of the art", *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 5, no. 1, pp. 11-14, 2008.
- [116] Mukudai S, Matsuda KI, Nishio T, et al., "Differential responses to steroid hormones in fibroblasts from the vocal fold, trachea, and esophagus", *Endocrinology*, vol. 156, no. 3, pp. 1000-1009, 2015.
- [117] Finlay-Schultz J and Sartorius CA, "Steroid hormones, steroid receptors, and breast cancer stem cells", *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, vol. 20, no. 1-2, pp. 39-50, 2015.
- [118] Suárez L, Pipa M and Granda J, "Sex hormones modulate salbutamol-elicited long-term relaxation in isolated bovine tracheal strips", *Pharmacology*, vol. 87, no. 5-6, pp. 249-256, 2011.

- [119]Potvin C, Rossignol O, Uppari N, Dallongeville A, Bairam A, et al., “Reduced hypoxic ventilatory response in newborn mice knocked-out for the progesterone receptor”, *Experimental Physiology*, vol. 99, no. 11, pp. 1523–1537, 2014.
- [120]Townsend EA, Meuchel LW, Thompson MA, Pabelick CM and Prakash YS, “Estrogen increases nitric-oxide production in human bronchial epithelium”, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 339, no. 3,pp. 815–824, 2011.
- [121]Itoga M, Konno Y and Moritoki Y, “G-protein-coupled estrogen receptor agonist suppresses airway inflammation in a mouse model of asthma through IL-10”, *PLoS ONE*, vol. 10, no. 3, 18 pages, 2015.
- [122]Draijer C, Hylkema MN and Boorsma CE, “Sexual maturation protects against development of lung inflammation through estrogen”, *American journal of physiology lung cellular and molecular physiology*, vol. 310, no. 2, pp. L166–L174, 2016.