

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
CIENCIAS BIOMEDICAS

ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LAS ISOFORMAS DEL  
RECEPTOR A PROGESTERONA EN EL PULMON DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOMEDICAS)

P R E S E N T A :

**M. EN C. ALIESHA ARACELI GONZALEZ ARENAS**

DIRECTOR DE TESIS: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

## DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/104Jur/2003

**ING. LEOPOLDO SILVA**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACION  
ESCOLAR DE LA UNAM.  
PRESENTE.

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 27 de agosto del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la M. en C. ALIESHA ARACELI GONZALEZ ARENAS, con número de expediente 5981702 y número de cuenta 9353989-6 con la tesis titulada: "**ESTUDIO DE LA EXPRESION DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR A PROGESTERONA EN EL PULMON DE LA RATA**", dirigida por el Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

PRESIDENTE: DR. MOISES SELMA LAMA  
SECRETARIO: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO  
VOCAL: DRA. MARIA ESTHER CRUZ BELTRAN  
VOCAL: DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA  
VOCAL: DR. ANGEL ZARAIN HERZBERG  
SUPLENTE: DRA. MARTHA ROBLES FLORES  
SUPLENTE: DRA. CRISTINA FERNANDEZ MEJIA

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D. F., a 1 de septiembre del 2003.

**Dr. Gabriel Roldán Roldán**  
Responsable  
Facultad de Medicina

**Dr. J. Javier Espinosa Aguirre**  
Coordinador  
Doctorado en Ciencias Biomédicas.

C.c.p. Biol. Francisco Javier Incera, Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado.  
Tutor(a) Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

**La percepción, sin comprobación  
ni fundamento, no es garantía  
suficiente de la verdad.**

**Bertrand Russell,  
*Misticismo y lógica*  
(1929)**



## **DEDICATORIA**

A mi **CLAUDIO**, por que aunque eres muy pequeñito eres lo mejor, lo más grande y maravilloso que tengo en la vida. Te amo infinitamente hijito.

A mi **ESPOSO** por tu amor, por enseñarme lo maravilloso de la vida en pareja y por la hermosa familia que hemos formado juntos, te amo José.

A mi **MAMÁ** por tu cariño, tu compañía y apoyo incondicional. Te quiero muchísimo MA'.

A mi **PAPÁ** por tu cariño y apoyo. Acuérdate que no importa donde estés yo te quiero y te pienso.

A mi **HERMANITO** por ser mi compañero, mi cómplice, mi amigo y mi aliado estos 30 años. Te quiero mucho Luis.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por todo lo que me ha dado.

A mis abuelitos Moy y Rome, por tanto amor y tanto apoyo.

A mi abuelita Mago donde quiera que estés, por los bellos momentos que me regalaste cuando estuviste aquí.

A Oscar, por tu fuerza, tu compañía y tu cariño.

A mi abuelito Luis y a Tavo, por su compañía.

A Gelita y familia, por su enorme apoyo, sus cuidados y su compañía.

A mis tíos y primos, especialmente a Mari y a mi madrina (Tía Mago), por el afecto, las buenas comilonas y largas tertulias.

A la familia Agramonte-Hevia, especialmente a Zeltzin, Zoila, Servando, mis cuñis Tere y Eduardo, por las buenas energías y por ser mi familia cubana.

A mis amigos de la Fac. Marco, Mariana, Gina, Mike, Mayra, especialmente a Diana (te quiero mucho), por estos 10 años de amistad, esperando que sean muchísimos más.

A mis compañeros del Lab. Christian y Olga por el apoyo, las buenas charlas, los buenos momentos y la amistad.

A mis compañeros del Lab. Andrea Reyna (gracias por tantas atenciones), Tere (gracias por tu apoyo), Edith, Andrea II, Gaby, Iván, Angélica y Emanuelle, por su compañía y por hacer que el trabajo del laboratorio fuera productivo y divertido.

A toda la gente del Labo, por colaborar en la realización de éste proyecto, especialmente a Isabel , al Dr. Cerbón, Luciano y Adriana por los buenos consejos y las buenas pláticas.

## **AGRADECIMIENTOS ESPECIALES**

Al Dr. Camacho, por su apoyo, sus enseñanzas y buenos consejos.

A mi comité tutorial: Dra. Martha Robles Flores y Dra. Christina Fernández, por las sugerencias y comentarios que ayudaron al avance de este proyecto semestre a semestre.

Al Dr. Moisés Sélman Lama, Dr. Rogelio Arellano Ostoa, Dra. Christina Fernández Mejía, muy especialmente a la Dra. Martha Robles Flores, Dra. María Esther Cruz Beltrán y al Dr. Angel Zaráin Herzberg, por la revisión realizada a este trabajo.

A la UNAM por la formación académica que me ha brindado.

Al CONACYT y a la DGEP por la beca otorgada durante mis estudios.

**Este proyecto de investigación se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo con el apoyo del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP), Facultad de Química, U.N.A.M. No. 6190-07 y del Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP), U.N.A.M. No. 202317, así como una beca de estudios de doctorado del CONACyT (Reg. No. 121714) y la DGEP.**

# ÍNDICE

I. ORGANIZACIÓN DE LA TESIS.....	6
II. RESUMEN .....	7
III. ABSTRACT.....	9
IV. INTRODUCCIÓN.....	11
V. ANTECEDENTES	
1. Generalidades de la progesterona.....	11
2. Mecanismos de acción de la progesterona .....	13
3. Acciones generales de la progesterona.....	18
A. Acciones de la progesterona en el pulmón.....	19
4. Características del receptor a progesterona.....	21
A. Isoformas del receptor a progesterona.....	26
5. Regulación del receptor a progesterona y sus isoformas .....	30
6. El receptor a progesterona en el pulmón.....	33
VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
VII. HIPÓTESIS.....	36
VIII. OBJETIVOS	
1. Objetivo general.....	37
2. Objetivos Particulares.....	37

## IX. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación.....	38
2. Obtención del RNA total.....	39
3. Cuantificación del RNA.....	40
4. Integridad del RNA.....	40
5. Diseño de oligonucleótidos.....	41
6. Amplificación de las isoformas del receptor a progesterona por transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.....	43
7. Extracción de proteínas.....	47
8. Detección de las isoformas del receptor a progesterona por Western blot.....	47

## X. RESULTADOS

1. Expresión del mRNA de las isoformas del receptor a progesterona.....	50
2. Contenido de la proteína de las isoformas del receptor a progesterona.....	54
3. Contenido del receptor a estrógenos beta.....	54
4. Contenido de SRC-1 y SMRT.....	58
5. Contenido de las isoformas del receptor a progesterona en el pulmón de ratas adultas intactas.....	58
6. Contenido del receptor a estrógenos beta en el pulmón de ratas adultas intactas.....	60
7. Contenido de SRC-1 y SMRT en el pulmón de ratas adultas intactas.....	60

8. Concentraciones séricas de estradiol y progesterona.....	64
---	----

## **XI. DISCUSIÓN GENERAL**

1. Regulación diferencial de la expresión del gen (mRNA) y de la proteína de las isoformas del receptor a progesterona en el pulmón por estradiol y progesterona.....	65
2. Regulación tejido- específica de las isoformas del receptor a progesterona.....	69
3. Regulación del receptor a estrógenos beta y cofactores.....	69
4. Regulación de la isoformas del receptor a progesterona en el modelo farmacológico y en el modelo fisiológico.....	72
5. Dimorfismo sexual de las isoformas del receptor a progesterona en el pulmón .....	72
6. Posible papel de la progesterona y de su receptor en el pulmón.....	73

<b>XII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
-------------------------------	-----------

<b>XIII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>76</b>
--------------------------------	-----------

<b>XIV. REFERENCIAS.....</b>	<b>77</b>
------------------------------	-----------

XV. ARTÍCULOS.....94

. \* González-Arenas A, Villamar-Cruz O, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I, 2003. Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85: 25-31.

\* González-Arenas A, Neri-Gómez T, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I, 2003. Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors and their cofactors in the lung of adult rats.



## ORGANIZACIÓN DEL ESCRITO

Este trabajo está dividido en tres secciones principales. En la primera de ellas se revisan los mecanismos de acción de la progesterona (P4), los antecedentes más relevantes sobre las acciones de esta hormona, así como las características generales de las isoformas de su receptor y su localización en el pulmón. Esta sección también incluye el planteamiento del problema, la hipótesis, los objetivos generales y particulares, así como la metodología empleada para cumplirlos.

En la segunda sección se presentan los resultados obtenidos del trabajo experimental, la discusión general del trabajo, las conclusiones, las perspectivas de estudio en esta área y las referencias utilizadas en el mismo.

En la última sección se presentan los dos artículos derivados de éste proyecto, en ellos se detallan los materiales y métodos utilizados, los resultados obtenidos, así como la discusión de estos resultados. Uno de estos artículos "Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung" ya fue publicado en la revista indexada, arbitrada y de circulación internacional *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (índice de impacto 2.6) en el volumen 85 número 1 páginas 25-31. El segundo "Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors and their cofactors in the lung of adult rats" se envió recientemente a la revista *Steroids* (índice de impacto 2.5) para su publicación.

## II. RESUMEN

En este trabajo se determinó el patrón de expresión y la regulación hormonal de las isoformas del receptor a progesterona (RP) en el pulmón de ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol (E2) y progesterona (P4), de ratas hembras intactas durante el ciclo estral y de machos intactos. Se evaluó también el contenido de tres proteínas involucradas en la regulación y en las acciones del RP: 1) el receptor a estrógenos  $\beta$  (RE- $\beta$ ), que es la isoforma del RE predominante en el pulmón; 2) el coactivador SRC-1 y 3) el correpresor SMRT. El RNA y las proteínas se aislaron del pulmón y se procesaron para la realización de experimentos de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y Western blot, respectivamente. En el pulmón la regulación de la expresión del mRNA y de las proteínas de las isoformas del RP (RP-A y RP-B) por E2 fue positiva. La regulación de la expresión del mRNA de las isoformas del RP por P4 fue negativa, sin embargo el contenido de la proteína no se modificó con esta hormona. En el útero la regulación de RP-A y RP-B por E2 fue positiva y negativa por su ligando, la P4. RP-A fue la isoforma más abundante en el pulmón. En este tejido, la regulación del RE- $\beta$  por E2 fue negativa, mientras que la P4 no tuvo efecto en su expresión. La regulación por P4 de SMRT y a SRC-1 fue positiva a las 3 y a las 12 h de tratamiento respectivamente; la expresión de estos cofactores disminuyó a las 6 h (SMRT) y a las 24 h (SRC-1) del mismo tratamiento. Por otro lado, el contenido más alto de las isoformas del RP durante el ciclo estral se alcanzó en el día del proestro, cuando son altas las concentraciones séricas del E2, mientras que el más bajo se observó durante el día del estro. De manera contraria a lo observado con el RP, el menor contenido del RE- $\beta$  se observó en el día del proestro y se incrementó en el día del estro. El contenido de SRC-1 y SMRT incrementó en el día del diestro. El contenido de SRC-1 disminuyó en el proestro y en el estro, mientras que el contenido de SMRT disminuyó durante el proestro e

incrementó nuevamente en el estro. El contenido de las isoformas del RP, RE- $\beta$  y SMRT en el pulmón de los machos fue menor al de las hembras, mientras que el contenido de SRC-1 fue similar en ambos sexos.

Nuestros resultados indican que la isoforma predominante del RP en el pulmón de la rata es RP-A y que la expresión del mRNA y de la proteína está regulada diferencialmente por P4. También sugerimos que la regulación positiva de las isoformas del RP en el pulmón está mediada por el RE- $\beta$  y que existe un dimorfismo sexual en el contenido del RP, RE- $\beta$  y SMRT en este tejido.

### III. ABSTRACT

In this work we determined the expression pattern and the hormonal regulation of progesterone receptor (PR) isoforms in the rat lung of ovariectomized rats after estradiol (E2) and progesterone (P4) treatments, in intact female rats during the estrous cycle and in intact males. We also evaluated the content of three proteins involved in the regulation and actions of PR expression: 1) estrogen receptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) which is the predominant ER isoform expressed in the lung; 2) the coactivator SRC-1, and 3) the corepressor SMRT. RNA and proteins were extracted from the lung and processed for reverse transcription coupled to polymerase chain reaction and Western blot, respectively. The expression of both PR isoforms (PR-A and PR-B) in the lung at mRNA and at protein levels was up-regulated by E2 while P4 down-regulated it only at mRNA level. P4 did not modify PR isoforms protein content unlike its effect in the uterus where both PR isoforms were down-regulated by their ligand at mRNA and protein levels. PR-A was the predominant isoform in the lung. In this tissue ER- $\beta$  was down-regulated by E2 while P4 did not regulate its expression. P4 up regulates SMRT and SRC-1 at 3 and 12 h respectively; these cofactors decreased again at 6 h (SMRT) and 24 (SRC-1). The highest content of both PR isoforms was observed on the day of proestrus when E2 levels are the highest, whereas the lowest one was found on the day of estrus. In contrast, the lowest content of ER- $\beta$  was found on the day of proestrus and it increased at estrus. The content of SRC-1 and SMRT increased on the day of diestrus. SRC-1 content decreased at proestrus and estrus, while SMRT content decreased at proestrus and increased again at estrus. In the lung of adult male rats the content of PR isoforms, ER- $\beta$  and SMRT was lower than in the lung of females, whereas the content of SRC-1 was similar in both sexes.

Our results indicate that the predominant PR isoform in the rat lung is PR-A, and that their expression can be differentially regulated at mRNA and at

protein levels by P4. We also suggest that the up-regulation of PR isoforms by E2 in the lung should be mediated by ER- $\beta$ , and the existence of a sexual dimorphism in the content of PR, ER- $\beta$  and SMRT in this tissue.

## IV. INTRODUCCIÓN

En los mamíferos las hormonas esteroideas están involucradas en la regulación de diversas funciones respiratorias. Muchas de las acciones de la progesterona (P4) están mediadas por su receptor intracelular (RP). Este receptor presenta dos isoformas, una larga denominada RP-B y una corta denominada RP-A, que en diferentes tejidos como el útero y el cerebro, difieren en función, distribución y en sus mecanismos de regulación. Hasta el momento se desconoce el patrón de expresión y la regulación de las isoformas del RP en el pulmón de la rata. El conocimiento de los mecanismos de regulación de las isoformas del RP permitirá conocer algunos de los mecanismos moleculares por los cuales la P4 ejerce sus efectos en el pulmón.

## V. ANTECEDENTES

### 1. Generalidades de la progesterona

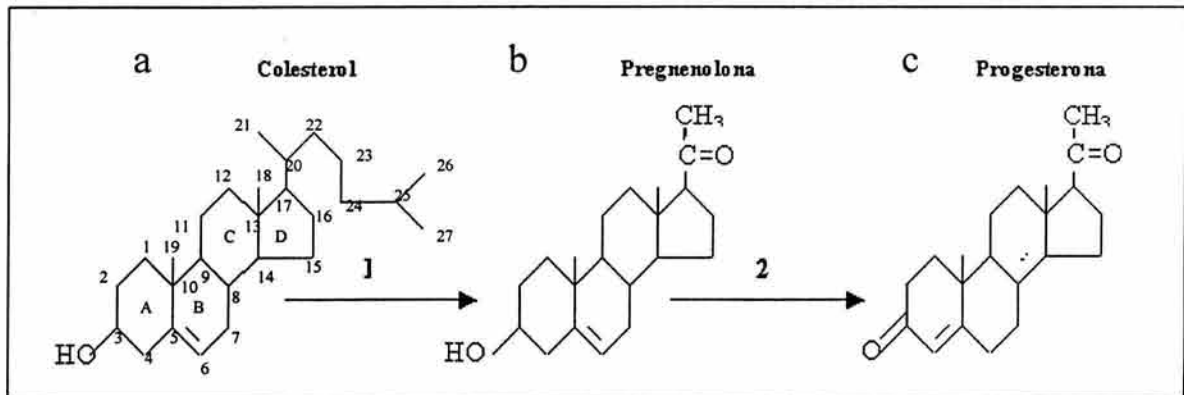
La progesterona (P4) (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroideas, su nombre se deriva del latín: *pr*=a favor y *gestare*=llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción (Pérez-Palacios, et al., 1985).

La estructura química de la P4 y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21; Fig. 1). La P4 se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo del ovario, durante el ciclo menstrual (Hsueh et al., 1984; Hutchison et al., 1986); otros órganos donde también se ha demostrado su síntesis son la corteza adrenal, la placenta (Goroscope et al.,

1985; Perrot-Applanat et al., 1982), el testículo, (Weisz et al., 1980; Dalkin et al., 1992) y el cerebro (Zwain y Yen, 1999; Ukena, et al., 1999).

Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y la adrenalina (Graham et al., 1997).

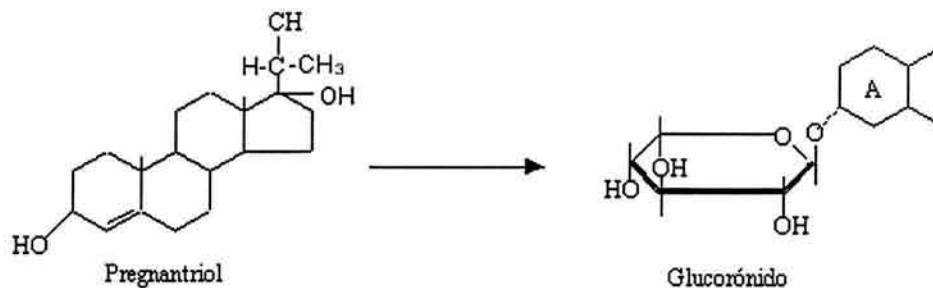
La síntesis de P4 se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a P4 (Fig. 1), por medio de distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.



**Figura 1. Biosíntesis de la P4.** La biotransformación de colesterol a P4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17 por medio de la enzima 20,22 esteroide liasa (1), b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3 por medio de la enzima 3 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa (2) y c) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A. 1) (Gore-Langton , 1988).

Una vez que la P4 y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

1. La reducción en el carbono 20 lo que da lugar a la formación de  $20\alpha$  y  $20\beta$  dihidroprogesterona (con actividad biológica, que puede ser similar o diferente a la de progesterona); posteriormente se reduce el anillo A en los carbonos 3 y 5 dando lugar a la formación de ocho pregnandioles o pregnantrioles.
2. La reducción de los pregnandioles forma glucuronidos, lo que incrementa la polaridad de la molécula formándose así compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción por la orina (Fig. 2).

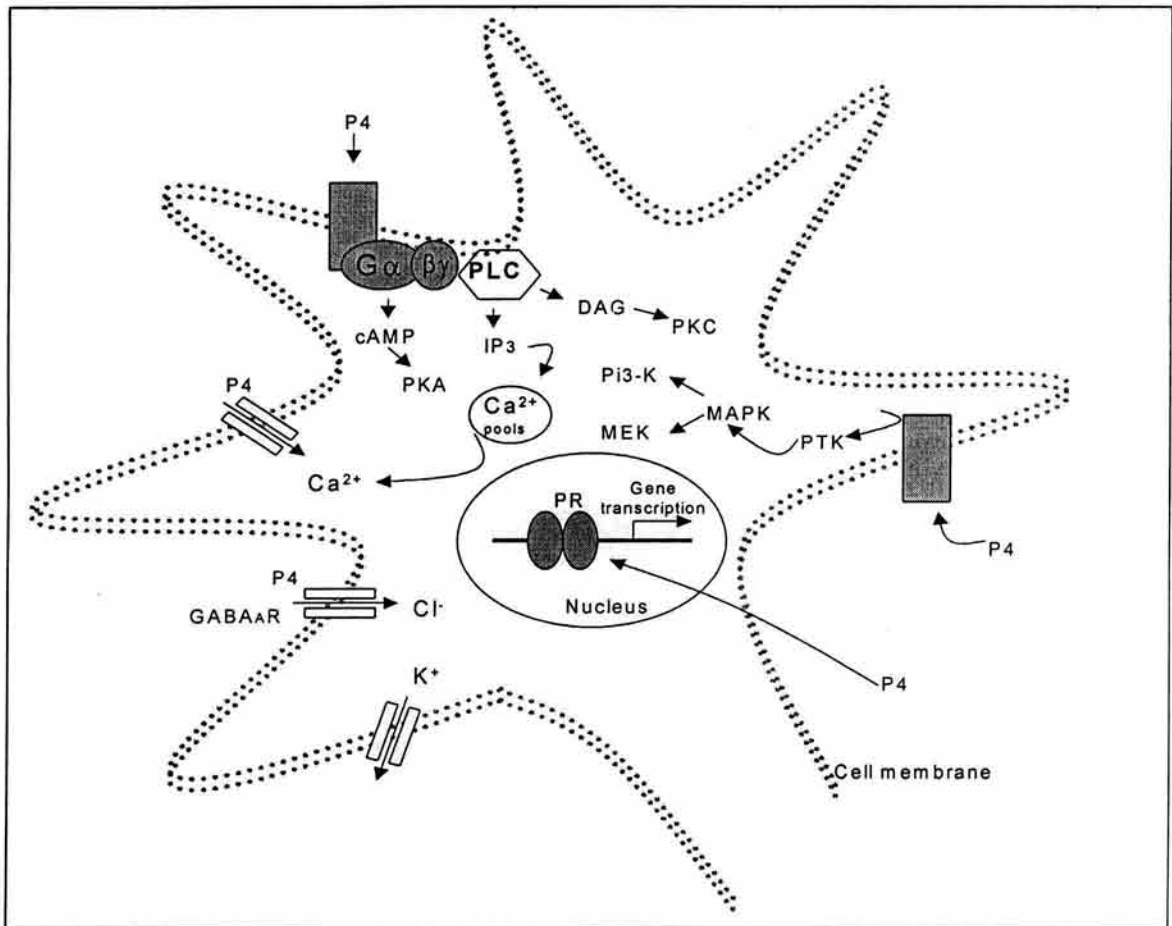


**Figura 2. Principales catabolitos de la P4 (Renwick 1970.).**

## 2. Mecanismos celulares de acción de la progesterona

Los mecanismos celulares mediante los cuales la P4 puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: genómico y no genómico (Bramley 2003). El primero involucra la interacción de la P4 con sus receptores nucleares específicos (RP) (Evans 1988), mientras que el segundo requiere la interacción de la P4 con receptores membranales o sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores como el  $GABA_A$ , canales iónicos, receptores de tipo tirosina cinasa y receptores de siete dominios transmembranales (Fig. 3) (Camacho-Arroyo 2003).



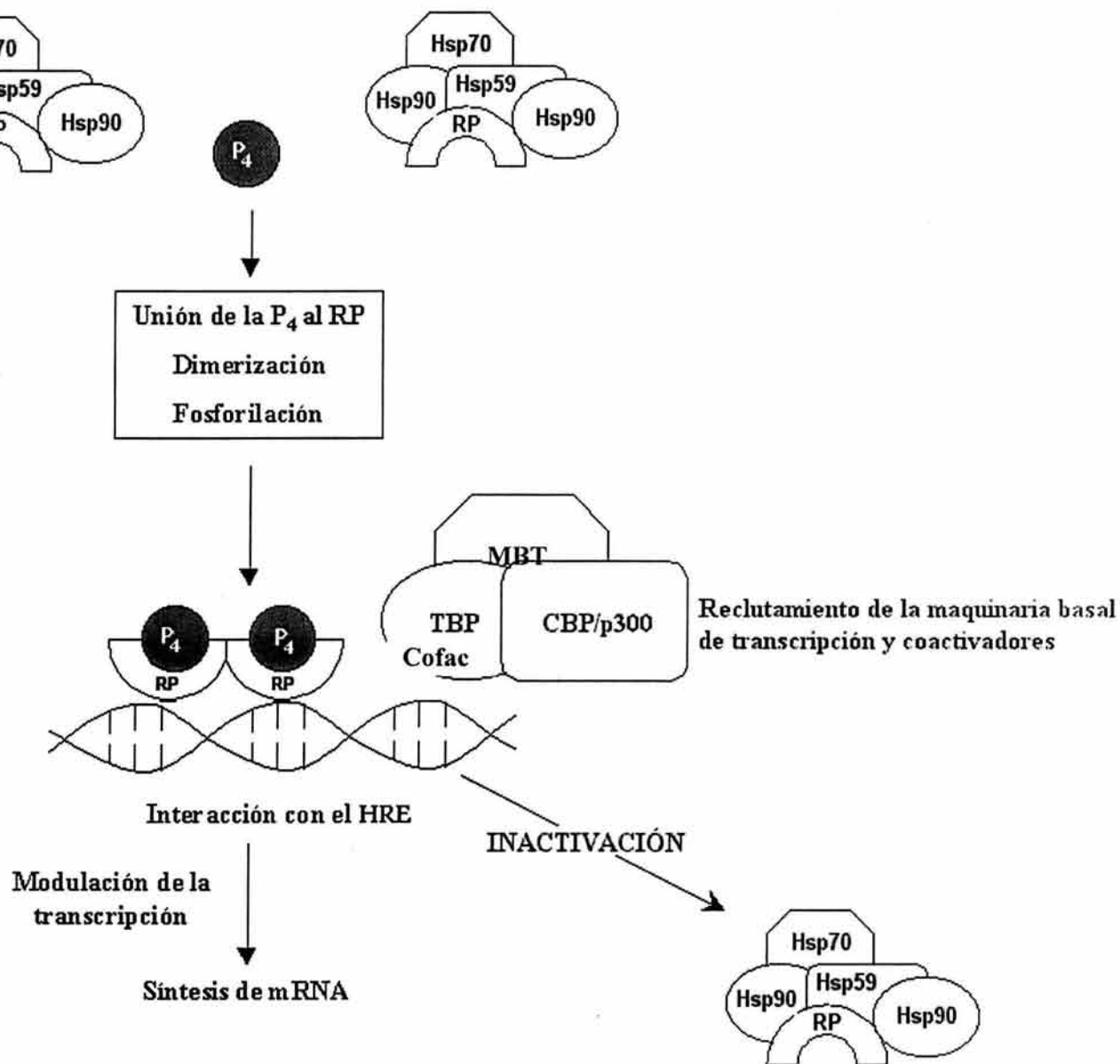


**Figura 3. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de la P4.** Los efectos de la P4 ocurren por 2 diferentes mecanismos celulares: 1) en la membrana, incluyen receptores membranales y canales, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares; 2) en el núcleo donde receptores a P4 (PR) que son moduladores directos de la expresión génica, mediante la interacción del complejo hormona-receptor con elementos de respuesta a hormonas, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA. G: Proteína G,  $\alpha\beta\gamma$ : Subunidades de la proteína G, PKA: Proteína Cinasa A, RGABA<sub>A</sub>: Receptor a GABA tipo A, RP: Receptor a P4, PLC: Fosfolipasa C, IP3: Inositol Trifosfato, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PTK: Proteína de Tirosina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, MEK: Cinasa de MAPK, Cl<sup>-</sup>: Cloro, Ca<sup>2+</sup>: Calcio, K<sup>+</sup>: Potasio (Camacho-Arroyo 2003).

Mediante el mecanismo no genómico se modifican la conductancia iónica, la formación de segundos mensajeros y la activación de cascadas de fosforilación (Bramley 2003). De esta manera la P4 puede regular diferentes funciones en el pulmón a corto (milisegundos), mediano (minutos) y largo plazo (horas y días).

Por medio del mecanismo genómico se generan cambios en la transcripción de genes específicos después de la interacción de la P4 con el RP. En general, el mecanismo de acción del RP se lleva a cabo de la siguiente manera (Fig. 4) (Giagrande et al., 1997):

1. Unión de la P4 al RP, el cual se encuentra transcripcionalmente inactivo formando complejos oligoméricos con proteínas de choque térmico (HSP) como las HSP (70, 90, 59) (Beato, 1987; Chambraud et al., 1990; Schowalter et al., 1991).
2. Transformación, activación y fosforilación del RP.
3. Dimerización del RP y aumento en su afinidad por secuencias reguladoras en el DNA, denominadas elementos de respuesta a P4 (ERP).
4. Unión del RP activado a su elemento de respuesta, el reclutamiento de cofactores de transcripción hacia la región promotora que junto con la maquinaria basal de transcripción inician y regulan la síntesis del mRNA (Mahesh et al., 1996; Rowan et al., 2000).
5. Una vez que se ha llevado a cabo la transcripción del gen, el RP y la maquinaria transcripcional se desensamblan del gen blanco y el receptor regresa a la fase de inactivación.



**Figura 4. Mecanismo general de activación del RP por su ligando.** El RP está presente en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico (HSP); cuando la  $P_4$  se une al RP las HSP se disocian y el RP sufre cambios conformacionales que le permiten unirse a un elemento de respuesta hormonal (HRE), reclutar a cofactores (Cofac) y a la maquinaria basal de transcripción (MBT), lo cual modifica la transcripción del gen blanco. El complejo formado puede reclutar otros cofactores al promotor como el CBP/p300 que pueden 1) abrir la estructura de la cromatina a través de su actividad de histona acetil transferasa (HAT) y 2) contribuir a la estabilización del complejo de pre-iniciación (Giagrande et al., 1997).

Los coactivadores de receptores nucleares como el RP son una clase de proteínas co-reguladoras que interactúan con estos receptores de manera ligando específica, para potenciar su efecto en la transcripción de genes blanco. Funcionalmente los coactivadores sirven como puentes moleculares que unen al receptor con la maquinaria basal de transcripción (McKenna et al., 1999). Se ha observado que algunos coactivadores tienen actividades enzimáticas que contribuyen a potenciar la transcripción de genes. Los coactivadores de receptores a esteroides (SRC-1, SRC-2, SRC-3), y el factor asociado a p300/CBP (p300/CBP y PCAF) tienen actividad de histona acetiltransferasa (HAT), mientras que miembros del complejo SWI/SNF presentan actividad de ATPasa (Lemon y Tjian 2000). La actividad HAT modifica la estructura de la cromatina, neutralizando la carga positiva de las histonas, interrumpiendo las interacciones iónicas entre las histonas cargadas positivamente y cargando negativamente el esqueleto del DNA.

La actividad HAT es la primera función enzimática implicada en la transcripción que depende de receptores hormonales (Spencer et al., 1997). Físicamente los coactivadores que contienen actividad ATPasa son capaces de abrir la estructura local de la cromatina permitiendo un fácil acceso de otras proteínas auxiliares de la transcripción (Jenster et al., 1997).

Así como los coactivadores interactúan con el RP de manera específica para potenciar su efecto en la transcripción de genes, existen proteínas llamadas correpresores que ejercen el efecto contrario, ya que al asociarse con los receptores nucleares son capaces de reprimir la transcripción de un gen. El silenciador mediador para el receptor a ácido retinoico y a hormonas tiroideas (SMRT) y el correpresor de receptores nucleares (NcoR) son dos de los correpresores que comúnmente se unen a los receptores nucleares para inhibir la transcripción. Estas proteínas correpresoras median el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDAC) como HDCA1, HDCA2, mSin3A y mSin3B (Heinz et al., 1997), lo que trae por consecuencia la represión génica. La unión del RP con SMRT y/o NcoR se

da cuando el receptor está unido a antagonistas o incluso agonistas (Heinzel et al., 1997, Jackson et al., 1997). La existencia de coactivadores y correpresores aumenta aún más el nivel de complejidad de la regulación de la actividad del RP.

### 3. Acciones generales de la Progesterona

La P4 participa en muchas de las actividades biológicas de diferentes tejidos (Tabla 1). Sus efectos pueden ser estimuladores, como en el caso de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Ke et al., 1987), de la dopamina (Dluzen et al., 1991), en la inducción de la lordosis (Schaeffer et al., 1990), que es una conducta de receptividad sexual durante la cual la hembra flexiona su espina dorsal en forma de arco al ser montada por un macho para darle acceso a la cavidad vaginal; en la síntesis de uteroglobina (Beier et al., 1968), en la reacción acrosomal y en el flujo de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide (Meizel et al., 1991; Tesarik et al., 1992). Los efectos de la P4 también pueden ser inhibidores, como en la contractilidad uterina (Csapo et al., 1979) y en la síntesis de noradrenalina inducida por AMPc en el hipotálamo (Petitti et al., 1992).

Otro de los efectos estudiados de la P4 es su participación en el ciclo celular y, para ello se han utilizado como modelo células en cultivo de cáncer de mama T47-D (las cuales son positivas para RP). Cuando se tratan estas células con P4 se observa aumento en la progresión del ciclo celular, lo que está relacionado con la inducción de genes asociados a este proceso, como las ciclinas (CD-1; Musgrove et al., 1991, 1993), los factores de crecimiento (EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ; Murphy et al., 1986, Musgrove et al., 1993) y los protooncogenes asociados con la actividad proliferativa (c-myc, c-fos) (Wong et al., 1991; Musgrove et al., 1991).

**TABLA 1. Acciones fisiológicas de la P<sub>4</sub>.**

Tejido	Función
Útero/Ovario	Liberación del ovocito (1) Facilitación de la implantación (2) Mantenimiento del embarazo (3) Estimulación de la regeneración del estroma (4)
Glándula mamaria	Aumento del desarrollo alveolar (5) Regulación de la síntesis de leche durante el embarazo (6)
Cerebro	Regulación de la respuesta sexual (7) Reducción de la excitabilidad neuronal y aumento de sueño (8) Neuroprotección (9, 10)
Timo	Involución del timo (11)
Hueso	Prevención de la pérdida de la masa ósea (12)

(1) Susuki et al., 1994, (2) Graham y Clarke, 1997, (3) Rotchild et al., 1983, (4) Clarke, 1993, (5) Topper et al., 1980, (6) Savouret et al., 1990, (7) Camacho-Arroyo et al., 1995, (8) Camacho-Arroyo et al., 1999, (9) González, et al., 1998, (10) Vongher y Frye, 1999, (11) Shinoyima et al., 1991, (12) Wei et al., 1993.

La inducción del ciclo celular por P<sub>4</sub> se ve reflejada en un aumento del número de células que entran a la fase S. La inducción del ciclo celular puede ser bloqueada con un antagonista del RP, el RU486. La P<sub>4</sub> puede inhibir también la expresión de genes involucrados en la supresión del crecimiento celular como el gen p53 (Hurd et al., 1995).

### 3A. Acciones de la progesterona en el pulmón

La P<sub>4</sub> participa en la regulación de diversas funciones pulmonares. La administración de esta hormona por períodos de tiempo que van de 1 a 28 días, a cobayos (administración diaria de P<sub>4</sub> por 28 días), ratas machos y hembras

(administración diaria de P4 por 4 días para ratas hembra y por 5 días para rata macho) y seres humanos (una dosis de P4 diaria por 1 semana) induce hiperventilación (Brodeur 1986, Hosenpud et al., 1983, Regeinster et al., 1989, Tatsumi et al., 1991). En el ser humano además de incrementar la ventilación, la P4 reduce la tensión alveolar del bióxido de carbono en la fase lútea del ciclo menstrual y durante el embarazo (Goodland y Pommerenke 1952, Goodland et al., 1954). También se ha observado que en mujeres con fibrosis quística su respiración mejora notablemente en la fase lútea del ciclo menstrual, esto es cuando las concentraciones de P4 son altas (Johannesson et al., 2000).

En infantes humanos prematuros, el tratamiento con E2 y con P4 disminuye notablemente la incidencia de enfermedades pulmonares crónicas (Trotter et al., 1999 y 2001); en fetos de conejo la administración de estas hormonas induce la maduración pulmonar (Khosla et al., 1983). También se ha descrito que en fetos del sexo femenino el riesgo de adquirir una patología respiratoria es mucho menor comparado con infantes del sexo masculino, esto se correlaciona con un mayor índice de maduración pulmonar en fetos del sexo femenino (Torday et al., 1981). Durante la etapa fetal de la rata, el desarrollo del pulmón depende del sexo (Adamson y King 1984).

En el pulmón del conejo el tratamiento con P4 incrementa la actividad de la prostaglandina  $\omega$  hidroxilasa (CYP4A4), y el contenido de la isoforma B de la mono-oxigenasa que contiene flavina (McCabe et al., 2001, Lee et al., 1993). La hidroxilasa está involucrada en el metabolismo de prostaglandinas, las cuales participan en la vasodilatación del músculo liso y la mono-oxigenasa en la desintoxicación de fármacos.

La P4 es capaz de regular la respuesta inflamatoria en el pulmón de la rata. En ratas con granulomatosis pulmonar la P4 disminuye la inflamación, lo cual correlaciona con una reducción en los niveles de interferón gama y en la población de linfocitos CD4 (Shirai et al., 1995).



En el pulmón del conejo la P4 regula la actividad del receptor  $\beta$ -adrenérgico. El E2 incrementa la actividad del receptor  $\beta$  adrenérgico, mientras que la P4 la disminuye (Moawad et al., 1982). Este último dato se correlaciona con lo observado en el pulmón de la rata, donde los niveles de AMPc disminuyen después del tratamiento con P4 (Nabishah et al., 1991).

#### 4. Características del receptor a progesterona

El RP pertenece a la familia de receptores a hormonas esteroides; cuyos miembros regulan la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando (Kastner et al., 1990). El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de genes a través de la interacción con secuencias específicas en el DNA (elementos de respuesta hormonal). Este receptor presenta dos isoformas: una larga denominada B (108-120 KDa) y una corta denominada A (80-94 KDa) (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Ambas isoformas se generan a partir del mismo gen pero son reguladas por distintas regiones promotoras (Fig. 5); las características de estas isoformas se describirán más adelante.

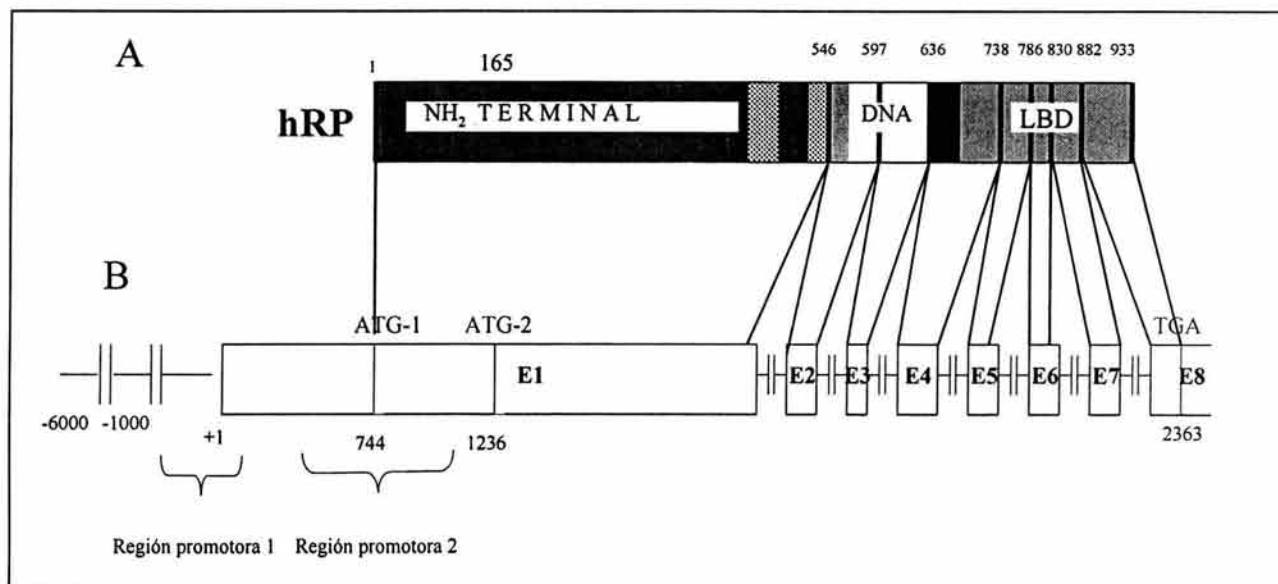
En los mamíferos y específicamente en el humano el gen del RP está localizado en el cromosoma 11p22-23, el tamaño de éste es de aproximadamente 90 kb y comprende 8 exones y 7 intrones (Fig. 5) (Misrahi et al., 1993).

La homología entre los genes del RP de humano y el de rata es de un 85% y la identidad entre las proteínas es de un 96% (Park-Sarge y Mayo, 1994).



Estructuralmente, las isoformas del RP están compuestas por cuatro dominios que llevan a cabo las siguientes funciones:

- 1) **Dominio NH<sub>2</sub> terminal (A/B):** Se codifica a partir del exón 1 (2380 pb). Participa en la regulación de la transcripción de genes blanco ya que contiene funciones de transactivación.
- 2) **Dominio de unión al DNA (C):** Se codifica a partir de los exones 2 (152 pb) y 3 (117 pb). Participa en la dimerización con otro receptor y en la unión al DNA a través de la presencia de dedos de Zinc.
- 3) **Dominio bisagra (D):** Se codifica a partir del exón 4 (306 pb). Participa en procesos de estabilización del receptor por unión a proteínas de choque térmico como Hsp90 y en la localización nuclear ya que contiene el péptido señal de localización nuclear (NLS).
- 4) **Dominio de unión al ligando (E):** Se codifica a partir de los exones 5 (145), 6 (131), 7 (158) y 8 (153 pb). Participa en la interacción con el ligando y en la regulación de la transcripción ya que contiene una función de transactivación.



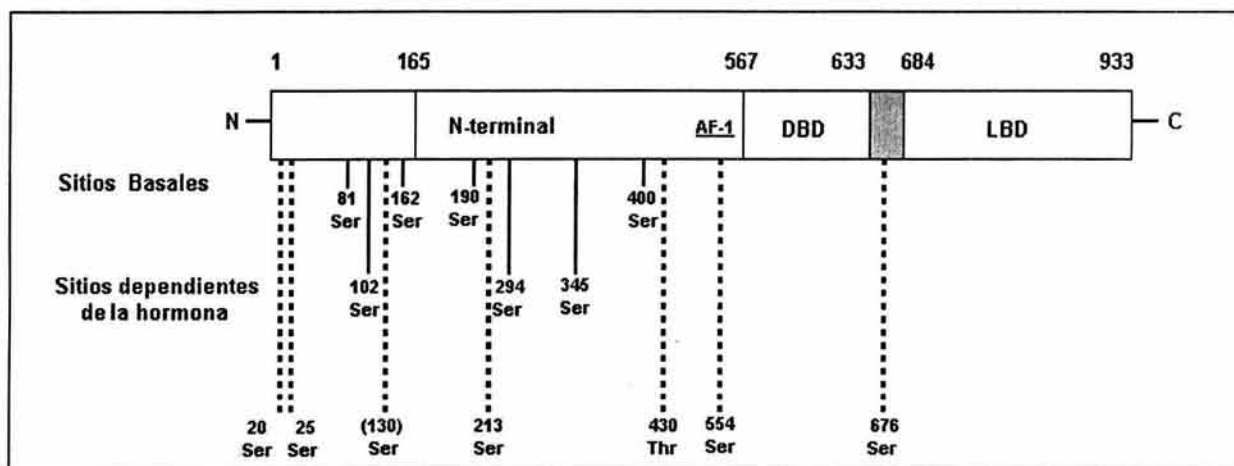
**Figura 5. Estructura del gen del RP humano.** A) Se esquematiza el RP del humano (hRP). La secuencia de aminoácidos del hRP está dividida en 4 dominios: el dominio amino terminal señalado en color gris oscuro, el dominio de unión al DNA señalado en color blanco, el dominio bisagra señalado en color negro y el dominio de unión al ligando (LBD) señalado en color gris claro. Las funciones de cada uno de estos dominios se describe en el texto. Las dos regiones altamente conservadas entre el RP del humano, el pollo y la rata están señaladas con puntos. Los límites de los exones están indicados con líneas verticales gruesas de color negro que corresponden a las posiciones de los aminoácidos, los cuales están señalados con números en la parte superior. B) Se esquematiza el gen del hRP que contiene dos regiones promotoras, 8 exones y 7 intrones, en donde los exones del 1 al 8 están señalados con la letra E mayúscula y el número correspondiente a cada exón. El tamaño de cada exón está indicado en el texto. Los intrones están señalados como líneas interrumpidas entre cada exón. La región promotora 1 se encuentra ubicada de la posición -711 a +31 y la 2 en la posición +464 a +1105. Se señalan las dos posiciones de inicio de la traducción (ATG) y la de término (TGA) (Misrahi et al., 1993).

El RP es una fosfoproteína cuya actividad puede ser regulada por fosforilación (Sheridan et al., 1998; Zhang et al., 1997). Existe evidencia de que la regulación de distintas vías de señalización celular alteran la actividad y la fosforilación del RP (Beck et al., 1992; Takimoto et al., 1996), así como de otros receptores a hormonas esteroideas (Ignar-Trowbirdge et al., 1992; Rogatsky et al., 1999). Algunos de estos cambios se deben a alteraciones directas en la fosforilación

del RP, mientras que otros parecen afectar a proteínas asociadas (Rowan et al., 2000). La fosforilación es un evento muy importante para que se lleve a cabo la transactivación de genes mediada por P4. El hRP contiene 14 sitios de fosforilación (fig. 6), de los cuales 10 han sido identificados mediante ensayos de fosforilación *in vitro e in vivo* (Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>162</sup>, Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>213</sup>, Ser<sup>294</sup>, Ser<sup>346</sup>, Ser<sup>400</sup>, Ser<sup>676</sup>) y cuatro únicamente por fosforilación *in vitro* (Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>130</sup>, Ser<sup>430</sup>, Ser<sup>554</sup>) (Zhang et al., 1994 y 1995, Lang et al., 2000, Knotts et al., 2001). Hasta ahora se sabe que la P4 induce la fosforilación del RP en tres residuos que son la Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>294</sup> y Ser<sup>345</sup> y que los residuos Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>162</sup>, Ser<sup>190</sup> y Ser<sup>400</sup> son sitios basales que incrementan su fosforilación después del tratamiento con la hormona (Zhang et al., 1994 y 1995). Hasta el momento se conoce que tres diferentes cinasas son capaces de fosforilar estos residuos; el residuo Ser<sup>81</sup> puede ser fosforilado por la caseína cinasa II (CKII) (Zhang et al., 1994), los residuos Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>213</sup>, Ser<sup>294</sup>, Ser<sup>430</sup>, Ser<sup>554</sup>, Ser<sup>676</sup> por la cinasa 2 dependiente de ciclina (Cdc2) (Zhang et al., 1997, Knotts et al., 2001), y los residuos Ser<sup>162</sup> y Ser<sup>294</sup> por las proteínas cinasas activadas por mitógenos 44 y 42 (MAPK-44 y MAPK-42) (Lang et al., 2000). Las cinasas que fosforilan los sitios restantes aún se desconocen.

En la rata hasta el momento no se han hecho estudios sobre los sitios de fosforilación y las cinasas que pudieran fosforilarlos, sin embargo a través de diversos programas de computo (Mac. Vector y NetPhos 2.0) hemos identificado 37 residuos de serina en el RP de la rata que podrían ser fosforilados por cinasas tales como la proteína cinasa C (PKC) para los residuos Ser<sup>94</sup>, Ser<sup>399</sup>, Ser<sup>575</sup>, Ser<sup>577</sup>, Ser<sup>857</sup>, la proteína cinasa A (PKA) para los residuos Ser<sup>98</sup>, Ser<sup>170</sup>, Ser<sup>276</sup>, Ser<sup>281</sup>, Ser<sup>344</sup>, Ser<sup>488</sup>, Ser<sup>539</sup>, caseína cinasa I (CK I) para los residuos Ser<sup>15</sup>, Ser<sup>26</sup>, Ser<sup>43</sup>, Ser<sup>50</sup>, Ser<sup>98</sup>, Ser<sup>130</sup>, Ser<sup>166</sup>, Ser<sup>202</sup>, Ser<sup>232</sup>, Ser<sup>276</sup>, Ser<sup>394</sup>, Ser<sup>397</sup>, Ser<sup>443</sup>, Ser<sup>450</sup>, Ser<sup>468</sup>, Ser<sup>542</sup>, Ser<sup>576</sup>, Ser<sup>747</sup>, Ser<sup>786</sup> y Ser<sup>888</sup>, la CK II para los residuos Ser<sup>80</sup>, Ser<sup>89</sup>, Ser<sup>113</sup>, Ser<sup>122</sup>, Ser<sup>166</sup>, Ser<sup>450</sup>, Ser<sup>829</sup> y Ser<sup>869</sup>, la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3) para los residuos Ser<sup>43</sup>, Ser<sup>94</sup>, Ser<sup>162</sup>, Ser<sup>166</sup>, Ser<sup>439</sup>, Ser<sup>443</sup>, Ser<sup>703</sup>, la cinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII)

para los residuos Ser<sup>98</sup>, Ser<sup>170</sup>, Ser<sup>539</sup>, Ser<sup>829</sup>, la Cdc2 para el residuo Ser<sup>190</sup> y la proteína cinasa G para el residuo Ser<sup>98</sup>.



**Figura 6. Sitios de fosforilación en el RP humano (hRP).** Residuos de fosforilación en el hRP identificados hasta la fecha. Tomado de Knotts et al.; 2001.

El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por los elementos de respuesta P4 (ERP), (Mahesh et al., 1996; Beato et al., 1989). Se ha observado que la fosforilación del RP en el residuo Ser294 del humano es una señal para la ubiquitinación del receptor y su degradación por el proteosoma 26S ( Lange, et al., 2000).

Se ha detectado la presencia del RP en diferentes tejidos del aparato reproductivo de distintos grupos de vertebrados; en las células de la granulosa en del ovario (Milgrom et al., 1970) en las trompas de falopio, en la vagina, en el testículo (Turner et al., 1977); en las células de músculo de arterias uterinas (Perrot-Appanat et al., 1988); así como en el oviducto y bolsa de Fabricio de pollo (Ylikomi et al., 1985; González-Morán et al., 1998). También el RP se ha localizado tanto en tejido normal como neoplásico de glándula mamaria (Pollow et al., 1977; Horwitz et al., 1975) así como en distintas áreas del cerebro tales como el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza cerebral (Camacho-Arroyo et al., 1998b).

También se encuentra en el timo (Pearce et al., 1983), islotes pancreáticos (Green et al., 1978); en células osteoblásticas (Gunn et al., 1999) y en el pulmón (Camacho-Arroyo et al., 1994).

#### 4A. Isoformas del receptor a progesterona

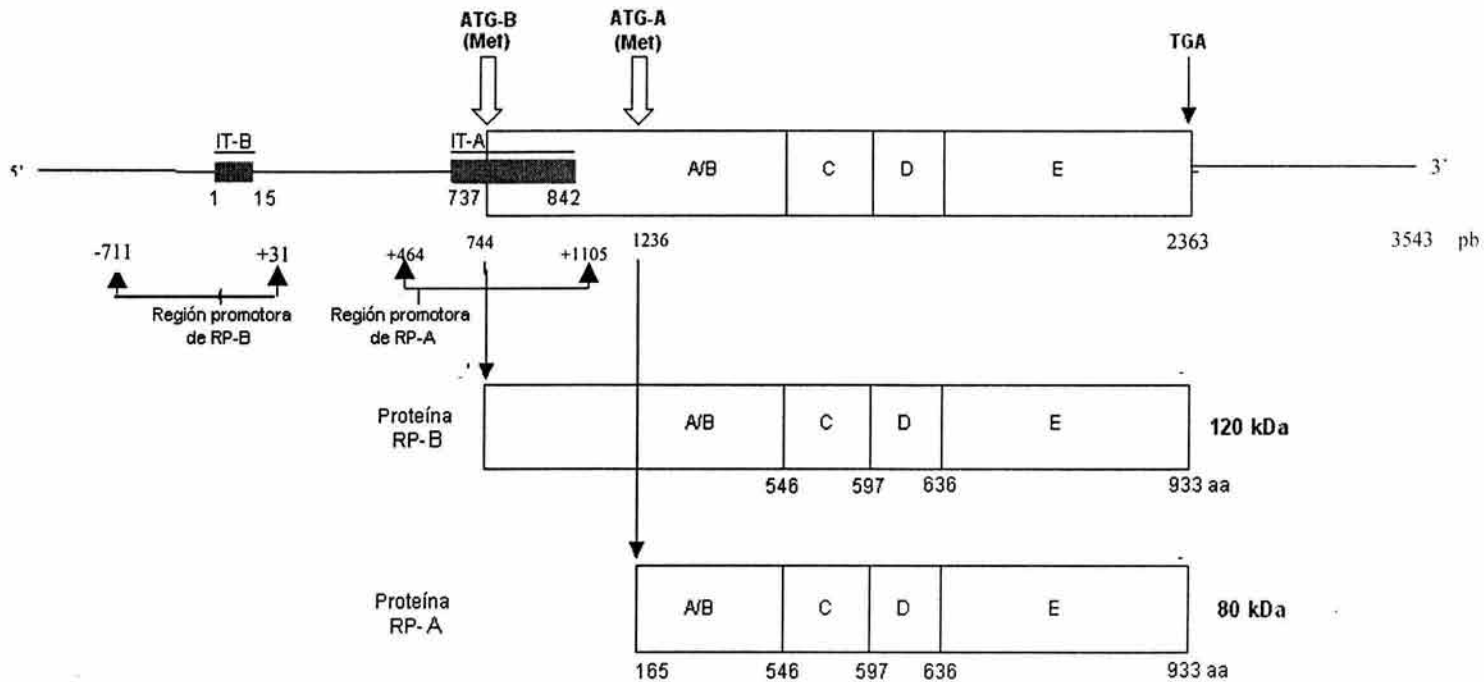
Como ya se mencionó anteriormente se han identificado dos isoformas del RP, las cuales se han denominado A (80-94 KDa) y B (108-120 KDa) (Fig. 7). La isoforma A es la forma truncada de la isoforma B, ya que no contiene 164 aminoácidos en la región amino terminal que si contiene RP-B. Ambas isoformas se han identificado en diversas especies de roedores, primates y aves (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo; 2000), con excepción del conejo en el cual solo se ha detectado la isoforma B (Loosfelt et al., 1986).

En el ser humano y en la rata ambas isoformas del RP son codificadas por el mismo gen pero se transcriben a partir de dos secuencias promotoras distintas, una distal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-B) y otra proximal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-A, que dan lugar a diferentes mRNA (Kastner et al., 1990, Kraus et al., 1993) (Figs. 7 y 8).

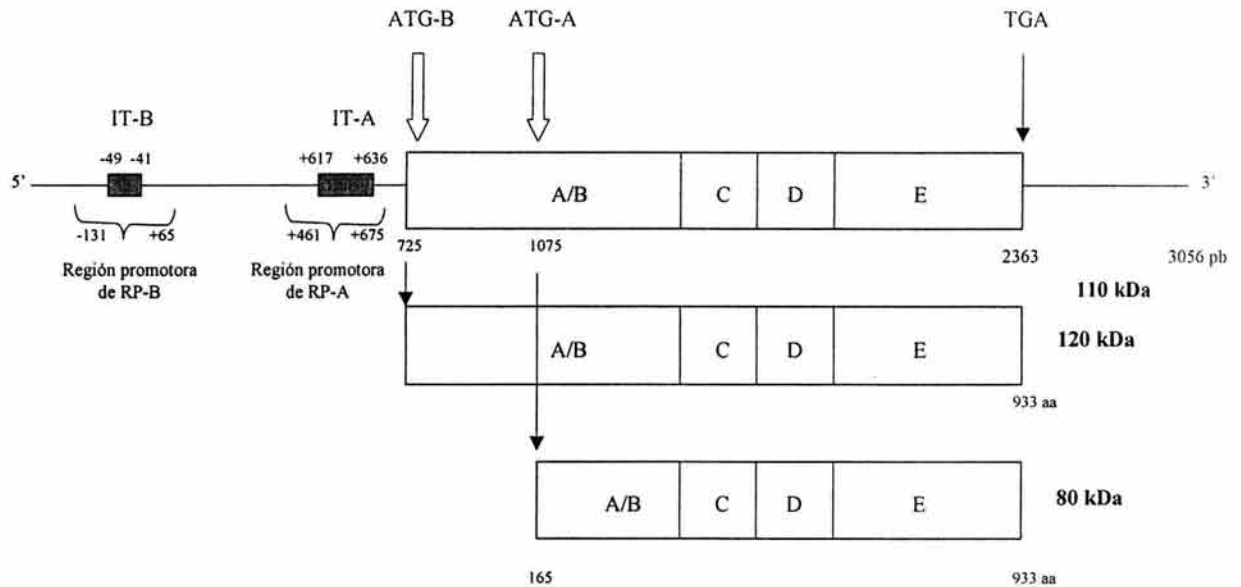
Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad tanto por la P4 como por el ERP (Christensen et al., 1991). El RP tiene la capacidad de unirse al DNA como tres especies diméricas: AA, AB, BB. Se ha demostrado que la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman homodímeros o heterodímeros e interactúan con agonistas y antagonistas (Leonhardt et al., 1998).

Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo de célula, del gen blanco y del promotor (Tung et al., 1993). En muchos sistemas celulares la isoforma RP-B actúa como un activador transcripcional, mientras que el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por RP-B como por otros receptores a hormonas esteroides (Vegeto et al., 1993; Tung et al., 1993; Sartorius et al., 1994; Clemm et al., 1995). En el útero del

ratón se demostró que RP-A regula a los genes de la calcitonina y anfiregulina, mientras que RP-B a los de histidina descarboxilasa y lactoferrina (Mulac-Jericevic et al. 2000). En células T47D, derivadas de cáncer de mama, se observó que de 94 genes regulados por P4, 65 se regulan por medio del RP-B, 4 por el RP-A y 25 por ambas isoformas (Richer et al., 2002).



**Figura 7. Organización de las isoformas del RP humano.** Los números indican la posición de las bases y de los aminoácidos en el gen y en las proteínas de las isoformas de RP respectivamente. IT-B e IT-A: Sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; A-E: dominios funcionales del RP; ATG-B y ATG-A: Inicio de la traducción de RP-B y RP-A respectivamente; Met: Metionina; TGA: Codón de término de la traducción (Kastner et al., 1990; Fujimoto et al., 1997).



**Figura 8. Organización de las isoformas del RP de la rata.** Los números indican la posición de las bases y de los aminoácidos en el gen y en las proteínas de las isoformas de RP respectivamente. IT-B e IT-A: Sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; A-E: dominios funcionales del RP; ATG-B y ATG-A: Sitios de inicio de la traducción de RP-B y RP-A respectivamente; TGA: Codón de término de la traducción (Park-Sarge y Mayo 1994; Kraus et al., 1993).

Se han detectado seis sitios de fosforilación que son exclusivos para la isoforma B del RP de humano (hRP) en los residuos Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>130</sup> y Ser<sup>162</sup> y ocho sitios de fosforilación que son comunes para ambas isoformas en los residuos Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>213</sup>, Ser<sup>294</sup>, Ser<sup>345</sup>, Ser<sup>400</sup>, Thr<sup>430</sup>, Ser<sup>554</sup> y Ser<sup>676</sup> (Knotts et al., 2001).

Se ha determinado que las diferencias en la actividad transcripcional de las isoformas del RP se deben a distintos factores:

1.- La isoforma A carece de los primeros 165 aminoácidos presentes en la isoforma B (Graham et al., 1995).



2.- La existencia de tres regiones con funciones de activación (AF1, AF2 y AF3). Las dos primeras están presentes en ambas isoformas, mientras que AF3 solamente se encuentra en el RP-B (Giagrande et al., 1999) (Fig. 9).

3.- La presencia de una región con función inhibidora localizada en la región adyacente a AF que sólo es funcional en RP-A. Estudios recientes han demostrado que esta región bloquea la activación de la transcripción mediada por AF1 y AF2, pero no por AF3, presente en RP-B (Huse et al., 1998; Wen et al., 1994).

4. Los homodímeros son más estables que los heterodímeros. En cuanto a la actividad los homodímeros B:B son mejores activadores de la transcripción que los heterodímeros B:A, mientras que los homodímeros A:A son los que presentan la menor actividad transcripcional (Leonhardt et al., 1998).

5.- El RP humano es fosforilado al menos en catorce residuos, seis de estos sitios sólo se encuentran en el RP-B mientras que los otros ocho los comparten ambas isoformas (Knotts et al., 2001).

La diferente distribución y regulación de estos sitios de fosforilación en las isoformas del RP puede conferirles diferentes estados conformacionales que los pueden hacer más o menos afines por las secuencias blanco y regular la transcripción de un gen.

6.- RP-A presenta mayor afinidad por el correpresor SMRT mientras que RP-B tiene mayor afinidad por el coactivador SRC-1. Por otro lado, RP-A es incapaz de reclutar eficientemente a los coactivadores transcripcionales como la proteína que interactúa con el receptor a glucocorticoides-1 (GRIP-1) y SRC-1 (Giagrande et al., 1999).

Estas observaciones llevan a sugerir que una alteración en la expresión o actividad de las isoformas del RP puede tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la P4.

La tasa de expresión de las dos isoformas varía en diferentes órganos y tejidos blanco (Ing et al., 1993, Graham y Clarke, 1997 et al., 1990, Camacho-



Arroyo, 2003), lo que sugiere que la expresión diferencial puede ser crítica para la respuesta celular a la P4 (Camacho-Arroyo et al., 1998).

El RP-A es predominante en el útero de roedores (Ilenchuck y Walters 1987) así como en el sistema reproductivo de monos y humanos (Duffy et al., 1997, Mote et al., 1999), mientras que RP-B es más abundante en el área preóptica de la rata (Guerra-Araiza et al., 2003).



**Figura 9. Organización estructural de las isoformas del RP.** La organización general de las proteínas de las isoformas del RP están esquemáticamente ilustrada. AF-1 , AF-2 y AF-3 indican las funciones de activación, IF la función de inhibición, DBD el dominio de unión al DNA y HBD el dominio de unión a la hormona (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo 2000).

### 5. Regulación del receptor a progesterona y sus isoformas

El RP es regulado de manera positiva por estrógenos y de manera negativa por P4 en muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo (Graham et al., 1997, Camacho-Arroyo et al., 1994, 1996, Mendoza-Rodríguez et al., 1999).

La regulación positiva del RP por estrógenos se debe a que en el promotor del gen de este receptor se han determinado elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Por ejemplo en la rata se ha determinado que en la región del promotor para RP-A existen 2 ERE, uno completo que contiene una secuencia palíndrome que varía en dos nucleótidos de la secuencia consenso, ubicado en la posición +615/637 del gen del RP y otro sitio más que únicamente contiene la mitad del

ERE en la posición +462/+466 (Kraus et al., 1993). En la región del promotor para RP-B no se han detectado ERE, sin embargo se han determinado sitios de unión al factor de transcripción conocido como proteína específica 1 (Sp1) en la posición -49/-41 (Kraus et al., 1993), que puede actuar junto con el RE (Salvatori et al., 2003, Khan et al., 2003) para promover la transcripción del RP.

En la rata los mecanismos moleculares involucrados en la regulación negativa de la transcripción del gen del RP por P4 son hasta el momento desconocidos. Es posible que en tal regulación participen otras proteínas, dada la carencia de ERP en el gen del RP. (Kraus, et al., 1993a y Savouret, et al., 1991).

La tasa de expresión de las isoformas del RP varía en función del tipo de tejido, en respuesta a los estímulos hormonales y de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se encuentre el organismo. En ratas recién nacidas se ha reportado una expresión diferencial de las isoformas del RP en la corteza cerebral, en el área preóptica y en el hipotálamo, ya que la isoforma predominante es la RP-B, pero esta expresión se modifica alrededor del día 12, después del nacimiento, cuando la isoforma predominante es la RP-A (Kato, et al., 1993). En el cerebro del pollo, el contenido de ambas isoformas del RP aumenta durante los días 8 y 13 del desarrollo embrionario y en recién nacidos (Camacho-Arroyo et al., 2003). La expresión de RP-A en el hipotálamo es mayor en las ratas macho adultas intactas que la observada en los animales prepúberes, mientras que en el área preóptica, el cerebelo, la corteza frontal, el hipocampo y el bulbo olfatorio ambas isoformas se expresaron de manera similar (Guerra-Araiza et al., 2001).

En el útero de roedores y primates la tasa de expresión de RP-A varía durante los ciclos reproductivos (Ilenchuk y Walters., 1987., Mangal, et al., 1997 y Duffy, et al., 1997, Mote et al., 1999 ). Para el caso de la mujer se sabe que la expresión de ambas isoformas alcanza su máximo durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual cuando las concentraciones de E2 son elevadas y las de P4 bajas, sin embargo, la tasa de expresión RP-A:RP-B es de 10:1 durante la primera semana del ciclo (niveles de E2 y P4 bajos); en los días 9 a 13 es aproximadamente de 5:1

(niveles de E2 altos y P4 bajos ); en los días 14-16 es 2:1 (niveles altos de P4 y E2) y hacia el final del ciclo RP-B es prácticamente indetectable (niveles bajos de E2 y P4) (Mangal, et al., 1997).

En la hipófisis de la rata se han reportado cambios en la expresión de las isoformas del RP durante el ciclo estral, siendo notorio el aumento de la expresión de ambas isoformas en la mañana del proestro (Szabo, et al., 2000).

El ciclo estral es el ciclo reproductivo de la rata y está constituido por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro, en los cuales varían las concentraciones de E2 y P4( Fig. 10)

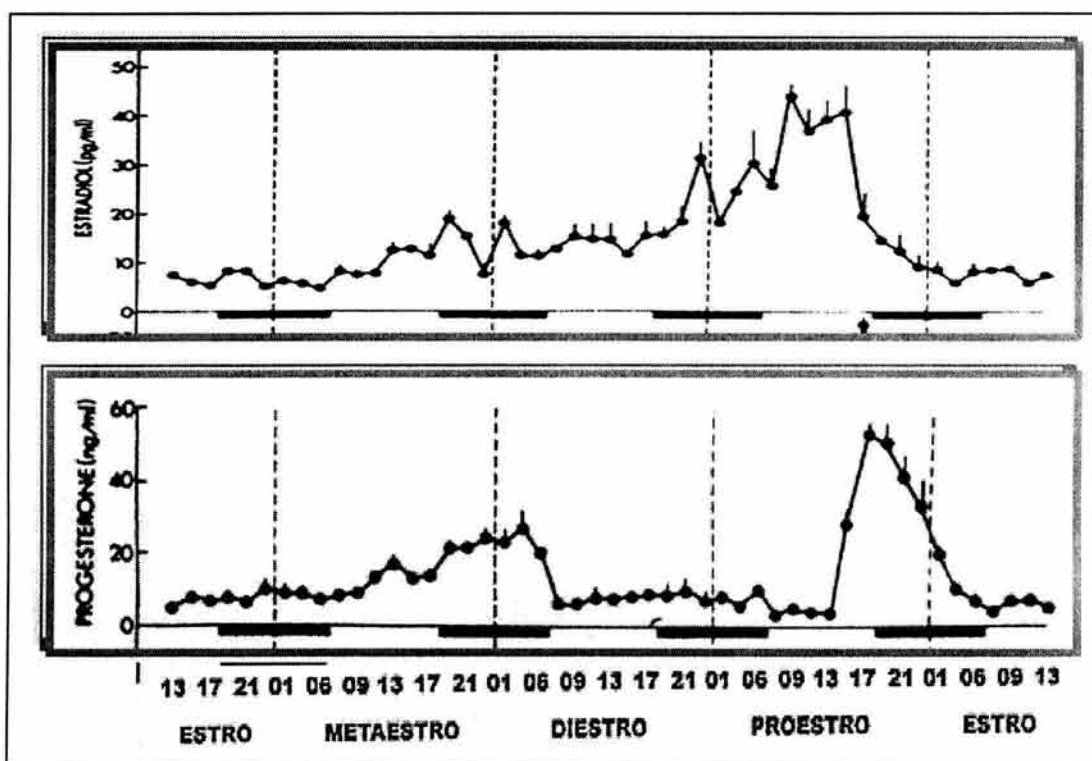


Figura 10. Niveles plasmáticos de E2 y P4 durante el ciclo estral de la rata (Freeman, 1988).

Se han observado claras diferencias en la regulación de la expresión del mRNA de las isoformas del RP (Camacho-Arroyo, et al., 1998; Guerra-Araiza, et al., 2000). En el hipotálamo de ratas ovariectomizadas, la expresión del mRNA de ambas isoformas del RP fue inducida por estrógenos y reducida por la P4, y en el área preóptica estos cambios sólo se presentaron en RP-B, mientras que en el hipocampo la isoforma que presentó inducción con estrógenos fue RP-A sin que la P4 tuviera efectos en la expresión de ambas isoformas (Camacho-Arroyo, et al., 1998b). La proteínas de ambas isoformas se regularon positivamente por E2 en el hipotálamo y en el área preóptica, mientras que la P4 reguló negativamente a ambas isoformas en el hipotálamo más no en el área preóptica. En el hipocampo sólo el contenido de RP-A se incrementó por E2 y disminuyó por P4 (Guerra-Araiza et al., 2003). En condiciones fisiológicas como el ciclo estral de la rata el mRNA del RP-B fue predominante en el hipotálamo en el día del proestro, mientras que el contenido más bajo de la proteína de ambas isoformas se detectó durante el diestro. En el hipocampo no se detectó una diferencia importante entre la expresión del mRNA y de las proteínas de las isoformas del RP (Guerra-Araiza, et al., 2000 y 2003).

## 6. El receptor a progesterona en el pulmón

Por medio de ensayos de unión específica el RP total se ha detectado en el pulmón de animales intactos como la rata, el ratón y el conejo. En estudios en conejos intactos se determinó que la Kd del RP en el pulmón fue de  $1.1 \times 10^{-7}$  M al utilizar un agonista sintético del receptor, el R5020 (Moser y Daxenbichler 1982). En conejas ovariectomizadas el RP se ha localizado por inmunohistoquímica en diferentes tipos de células como las endoteliales, las alveolares, las musculares, los fibroblastos, los neumocitos, los neutrófilos y los eosinófilos (Press y Greene 1988, Camacho-Arroyo et al., 1994). En conejas ovariectomizadas el tratamiento con E2 incrementa el número de células inmunoreactivas al RP en el pulmón comparado con los animales

ovariectomizados tratados con vehículo (Camacho-Arroyo et al., 1994). Por estudios de Northern blot se ha observado que en el pulmón de la coneja la expresión de los transcritos del RP varía en etapas tempranas del embarazo. La máxima expresión del RP se encontró en el día 1 y disminuyó progresivamente hasta el día 5 de la gestación conforme se incrementaron los niveles de P4. Aquí también, el E2 reguló positivamente la expresión del RP y la P4 la reguló negativamente (Camacho-Arroyo et al., 1998).

En el humano con cáncer de pulmón el RP se ha detectado por medio de técnicas de inmunohistoquímica (Canver et al., 1994, Kaiser et al., 1996, Matsui et al., 2000, Pelosi et al., 2002). Canver y cols observaron que el RP solo fue detectable en el 22% de los casos. En pequeños tumores pulmonares como los nódulos meningoteliales el RP también ha sido detectado (Pelosi et al., 2002). En estudios *in vitro*, utilizando líneas celulares derivadas de cáncer de pulmón, el RP se ha determinado por ensayos de PCR, inmunohistoquímica y unión específica. En estos estudios se encontró que la expresión y la Kd del RP variaba dependiendo de la línea celular utilizada (Kaiser et al., 1996).

Con respecto a la ontogenia del RP en el pulmón, se ha observado (por RT-PCR) que en fetos de ratón de 15 a 18 días el mRNA del RP es abundante y posteriormente disminuye al nacimiento y en el adulto (Beyer et al., 2003). En el pulmón del conejo por medio de ensayos de unión específica se encontraron dos sitios de unión a P4, uno de alta y otro de baja afinidad denominados tipo I y tipo II respectivamente. El sitio I aumentó su valor de Kd a medida que avanzó el desarrollo del animal (días 20 y 29 de desarrollo embrionario), hasta alcanzar un valor máximo de 0.39 nM en el animal adulto. En el sitio II el valor de Kd disminuyó del día 20 al día 29, volviendo a aumentar en el animal adulto cuando se observa un valor máximo de 73 nM (Giannopoulos et al., 1982). En la rata se ha reportado que las concentraciones de P4 disminuyen de 15,000 pg/ml a 500 pg/ml desde el día 17 de gestación hasta el día del nacimiento (Weisz y Ward 1980). Se ha observado que en el recién nacido las concentraciones de E2 y P4 disminuyen 100 veces en el día 1

postnatal con respecto al día del alumbramiento (Trotter et al 1999). Lo anterior sugiere que los cambios en la expresión del RP en el pulmón del ratón y en los sitios de afinidad a P4 en el pulmón del conejo durante el desarrollo embrionario podrían deberse a cambios en las concentraciones de E2 y P4.

Hasta ahora el RP total se ha detectado en el pulmón de diversos mamíferos y los trabajos realizados para estudiar la regulación del receptor por E2 y P4 en conejo abarcan únicamente la regulación de la proteína y de los transcritos de la isoforma B (Camacho-Arroyo et al., 1994 y 1998) ya que hasta el momento esta es la única isoforma que se ha detectado y descrito en este animal ( Loosfelt et al., 1986). Por lo anterior se desconoce tanto el patrón de expresión como la regulación de las isoformas del RP en el pulmón por E2 y por su propio ligando, la P4. Por otro lado también se desconoce la expresión de proteínas que podrían participar en la regulación de este receptor como el RE- $\beta$ , el coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT. Esta información es fundamental para llegar a establecer los mecanismos por los cuales la P4 ejerce múltiples efectos en el pulmón ya que las isoformas del RP regulan diferentes genes y por lo tanto distintas funciones.

## **VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El papel de las isoformas del RP en la regulación de las acciones de la P4 es fundamental ya que éstas difieren en su función al regular distintos genes. Por lo anterior el conocimiento de la expresión de las isoformas del RP y de los mecanismos involucrados en su regulación, es básico para comprender los diversos procesos fisiológicos en los que participa la P4 en el pulmón.

En el pulmón de la rata se desconoce el patrón de expresión de ambas isoformas del RP, así como su regulación por E2 y P4 y en condiciones donde existen cambios fisiológicos en los niveles de estas hormonas.

Con el fin de caracterizar la regulación y la expresión del RP en el pulmón, en este proyecto se estudió el patrón de expresión del gen y de la proteína de las isoformas de este receptor, así como el contenido de moléculas que participan en su regulación y su actividad como: el RE- $\beta$ , y los cofactores SMRT y SRC-1 en el pulmón de la rata.

## **VII. HIPÓTESIS**

La expresión de mRNA de las isoformas RP estará regulada por E2 y por P4.

El patrón de expresión de las isoformas del RP en el pulmón de la rata será tejido-específica.

La expresión de las proteínas de las isoformas del RP, del RE- $\beta$ , y de los cofactores SRC-1 y SMRT estará regulada por el E2 y por la P4 y presentará



cambios durante el ciclo estral debido a las fluctuaciones en las concentraciones de estas hormonas.

La expresión de las isoformas del RP, del RE- $\beta$ , y de los cofactores SRC-1 y SMRT será diferente en el pulmón de la rata hembra con respecto a la del macho.

## **VIII. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo General**

Estudiar el patrón de la expresión de las isoformas del RP en diferentes condiciones hormonales en el pulmón de la rata.

### **2. Objetivos Particulares**

- A. Determinar la expresión de las isoformas del RP en el pulmón de la rata a nivel del RNAm, en ratas ovariectomizadas tratadas con E2 y P4, por la técnica de semicuantitativa de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).
- B. Analizar la expresión de las isoformas del RP, del RE- $\beta$ , del coactivador SRC-1 y del correpresor SMRT en el pulmón de ratas ovariectomizadas tratadas con E2 y P4, en ratas intactas durante el ciclo estral y en ratas macho por medio de la técnica de Western blot.



## IX. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Animales de experimentación.

A lo largo de este estudio se utilizaron ratas adultas machos y hembras de 6 semanas de 250 g de peso, que se mantuvieron con agua y comida *ad libitum*, en un ciclo luz oscuridad de 14:10 h (luz de 6:00-20:00 h).

#### Grupos experimentales y técnicas quirúrgicas:

Se ovariectomizaron ratas bajo anestesia general, utilizando ketamina (80mg/kg i.p.). Diez días después de la cirugía fueron tratadas por vía subcutánea con: **a)** vehículo (aceite de maíz/etanol 10% : v/v) que representó al grupo testigo; **b)** 17- $\beta$  estradiol (17- $\beta$  E2) en una dosis de 5  $\mu$ g/100 g de peso corporal durante dos días consecutivos; **c)** 17- $\beta$  E2 bajo el esquema mencionado anteriormente suplementado por P4 al tercer día de iniciado el tratamiento en una dosis de 400  $\mu$ g/100 g; **d)** 17- $\beta$  E2 bajo el esquema antes mencionado suplementado por vehículo al tercer día.

El útero y los pulmones de las ratas de los grupos a y b se disecaron 24 h después del último tratamiento, mientras que en el caso del grupo c la obtención de los tejidos se realizó a las 3, 6, 12, 24 y 48 h después del tratamiento con P4. En el caso del grupo d se disecó el pulmón 24 y 48 horas después del último tratamiento con vehículo.

#### Determinación del ciclo estral

Se determinó la etapa del ciclo estral en la cual se encontraban las ratas intactas por medio del análisis citológico de frotis vaginales. El día del proestro se distinguió por la presencia de células epiteliales nucleadas, el día del estro por

células epiteliales cornificadas, el día del metaestro por células epiteliales cornificadas y leucocitos, y finalmente el día del diestro por pocas células epiteliales cornificadas y leucocitos en abundancia. Las ratas que presentaron 3 ciclos consecutivos fueron sacrificadas a las 12:00 h del día del proestro, del estro, del metaestro ó del diestro para diseccionar los pulmones.

Para llevar a cabo los experimentos en ratas macho, éstas fueron decapitadas a la misma hora que las ratas hembra.

### Determinación de los niveles séricos de E2 y P4

Los niveles séricos de E2 y P4 se determinaron mediante radioinmunoensayo (Camacho-Arroyo et al. 1998b), utilizando el kit Coat-A-Count (Diagnostics Products Corporation) con base en la técnica de fase sólida con  $^{125}\text{I}$ , siguiendo el protocolo del fabricante. La sensibilidad de este método para la detección del E2 fue de 5 pg/ml y de 0.02 ng/ml para la P4. Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de 4.8% y 10.7% para el E2; y de 3.4% y 7.7% para la P4 respectivamente.

## **2. Obtención del RNA total.**

A los pulmones y úteros se les extrajo el RNA total utilizando la técnica del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol (Chomczynski 1987). Los tejidos se homogenizaron con un politrón en TRIzol (reactivo que contiene tiocianato de guanidina y fenol) a 4°C (1 ml de TRIzol por cada 100 mg de tejido) en tubos estériles prelavados con agua destilada y con solución de dietil pirocarbonato (DEPC) (inhibidor de RNAsas) al 0.1%. Para la extracción del RNA con cloroformo a partir del homogenado (200 µl de cloroformo por cada ml del homogenado) se realizó lo siguiente: la preparación de RNA más

cloroformo se agitó 30 segundos en vortex, posteriormente se dejó reposar por 5 minutos en hielo y se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos. A la fase acuosa que contiene el RNA (el DNA y las proteínas se mantienen en la interfase y la fase orgánica) se le agregó un volumen igual de isopropanol y se almacenó a 4°C durante toda la noche para precipitar el RNA.

Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos, se removió el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó 2 veces con etanol al 80%, después de cada lavado las muestras se centrifugaron a 7,500 rpm a 4°C durante 8 minutos.

Se quitó el exceso de humedad de la pastilla de RNA y finalmente ésta se resuspendió en agua-DEPC.

### **3. Cuantificación del RNA**

Para la cuantificación del RNA se leyó la absorbancia de las muestra a la longitud de onda de 260 nm, posteriormente se utilizó el factor de conversión de 1 unidad de densidad óptica (UDO) a 260 nm = 40 µg de RNA/ml. Además se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de absorbancias obtenidas de las lecturas de las muestras a las longitudes de onda 260 y 280 nm. Si el RNA no está contaminado esta relación debe ser alrededor de 2.

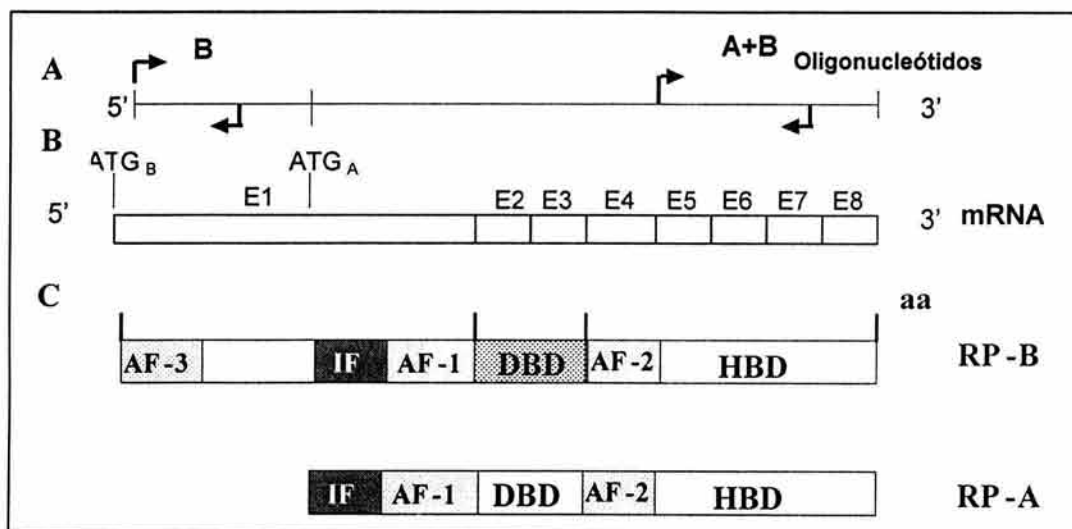
### **4. Integridad del RNA**

Para conocer las condiciones del RNA extraído, éste se desnaturalizó con formamida al 50% más formaldehído al 6.5% a 65°C durante 15 minutos y se le añadió MOPS 1X, buffer de carga para RNA 1X y bromuro de etidio (5 µg de bromuro de etidio por cada 3 µg de RNA) . Las muestras se corrieron en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes (formaldehído al 6% y MOPS al 1X). El gel se analizó en un transiluminador de luz U.V. El RNA se consideró

íntegro (no degradado) y sin contaminación de DNA genómico siempre y cuando en el gel se observaran claramente las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 18S y 28S sin encontrarse un barrido a lo largo del carril.

## 5. Diseño de oligonucleótidos.

Debido a las características estructurales de las isoformas del RP de rata cuya única diferencia son 164 aminoácidos de la región amino terminal, únicamente se pueden diseñar oligonucleótidos específicos para RP-B y no para RP-A. Por lo anterior se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 293 pb del Dominio de Unión a la Hormona (HBD) que comparten ambas isoformas y un fragmento de 244 pb de la región amino terminal que únicamente está presente en RP-B (Fig. 11).



**Figura 11. Diseño de oligonucleótidos para amplificar las isoformas del RP.** (A) se señalan los sitios en la secuencia del mensajero de donde se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar por PCR los fragmentos del gen del RP. Se esquematiza la organización general de los transcritos (B) y de las proteínas (C) de las isoformas del RP. Se señalan: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 y E8: exones del 1 al 8; ATG: sitios de inicio de traducción de RP-B y RP-A; AF-1, AF-2 y AF-3: funciones de activación; IF: función de inactivación; DBD: dominio de unión al DNA; HBD: dominio de unión a la hormona.

También se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por RT-PCR un fragmento de 220 pb del gen que codifica para la  $\beta$  actina de la rata. Las secuencias para los tres fragmentos fueron analizadas con el programa OLIGO 4.1 y así determinar la presencia de secuencias homólogas internas que formaran asas o se sobrelaparan, así como para que la temperatura de unión de los oligonucleótidos con el cDNA fuera la misma (60°C) y poder realizar la RT-PCR en las mismas condiciones para los tres genes.

A continuación en el cuadro 1 se presentan las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos correspondientes a las isoformas del RP y  $\beta$ -actina.

**Cuadro 1**

mRNA	SECUENCIAS	Tamaño del fragmento amplificado
RP-A+B	Sentido 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT G]-3' Antisentido 5'-[CCC GAA TAT AGC TTG ACC TC]-3'	293 pb
RP-B	Sentido 5'-[ACT GAG CTG CAG GCA AAG]-3' Antisentido 5'-[CGG ACA GCG ACT GCT GA]-3'	244 pb
$\beta$ - actina	Sentido 5'- [GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG]-3' Antisentido 5'-[GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG]-3'	220 pb

## 6. Amplificación de las isoformas del RP por RT-PCR.

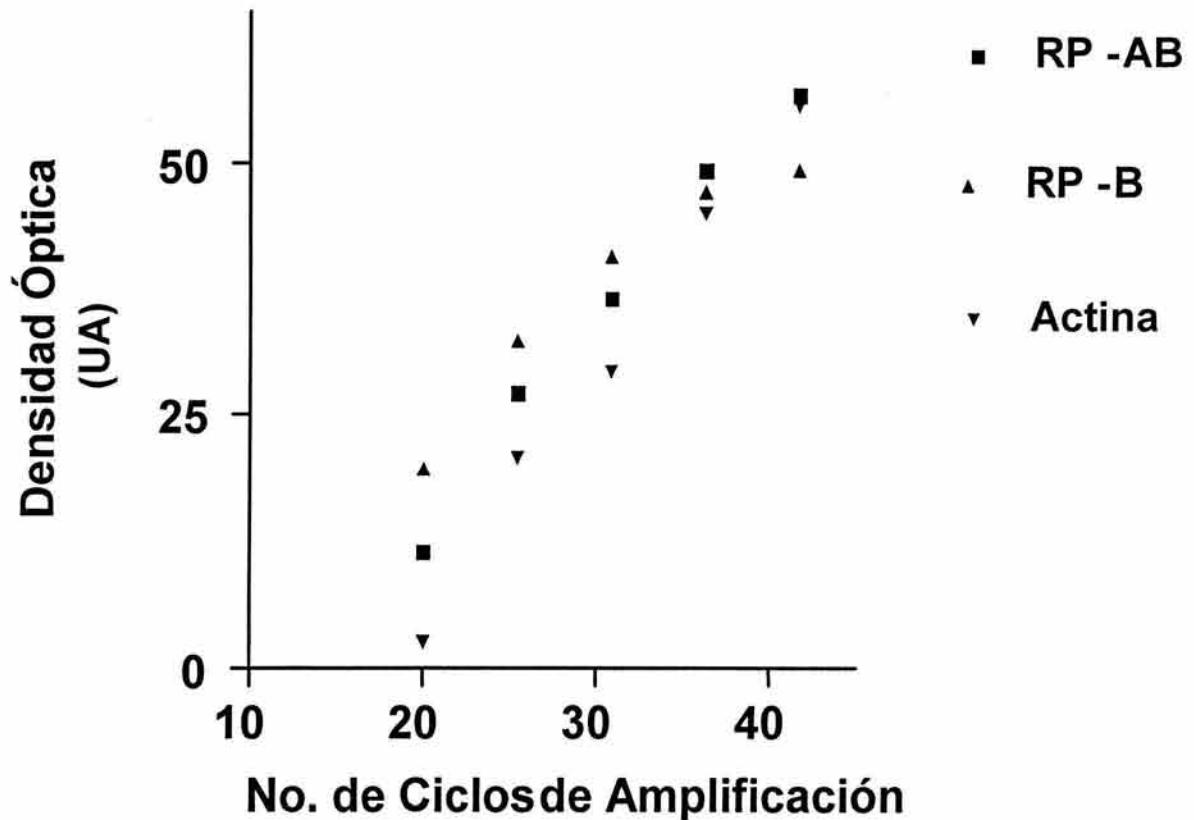
Una vez que se comprobó que el RNA se encontraba íntegro, se procedió a determinar las condiciones óptimas para realizar las amplificaciones por RT-PCR de un fragmento de la región HBD que comparten ambas isoformas, de la región N-terminal que sólo está presente en RP-B y de un fragmento del gen que codifica para la proteína  $\beta$  actina que se utilizó como un control interno .

Las concentraciones de los reactivos en la técnica de transcripción reversa (RT) fueron las siguientes:

	<b>Concentración final</b>
RNA total	10 $\mu$ g (pulmón) 5 $\mu$ g (útero)
Buffer RT	50 mM Tris-HCl (pH 8.3) 75 mM KCl 3 mM MgCl <sub>2</sub>
DTT	10 mM
dNTPs	0.5 mM de cada dNTP
RTM-MLV	400 unidades
Oligo dT	50 ng

La reacción se incubó a 37°C por 60 min. y posteriormente los productos obtenidos se congelaron a -20°C.

Para determinar el número de ciclos óptimo para realizar las amplificaciones de los fragmentos de RP-A+B, RP-B y  $\beta$  actina por PCR, éstas se llevaron a cabo a 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos. Lo anterior llevó a realizar la técnica de PCR a 30 ciclos, ya que con estos ciclos las amplificaciones obtenidas se encuentran en la fase exponencial de la curva (fig. 12).



**Figura 12.** Determinación del número de ciclos de amplificación para las isoformas del RP. Se realizó la técnica de RT-PCR para RP-A+B, RP-B y  $\beta$  actina a partir del RNA total de pulmones de ratas hembra adultas ovariectomizadas tratadas con E2. La reacción de PCR se realizó a diferente número de ciclos (20-40) y la intensidad de las bandas del RP fue cuantificada por un análisis densitométrico.

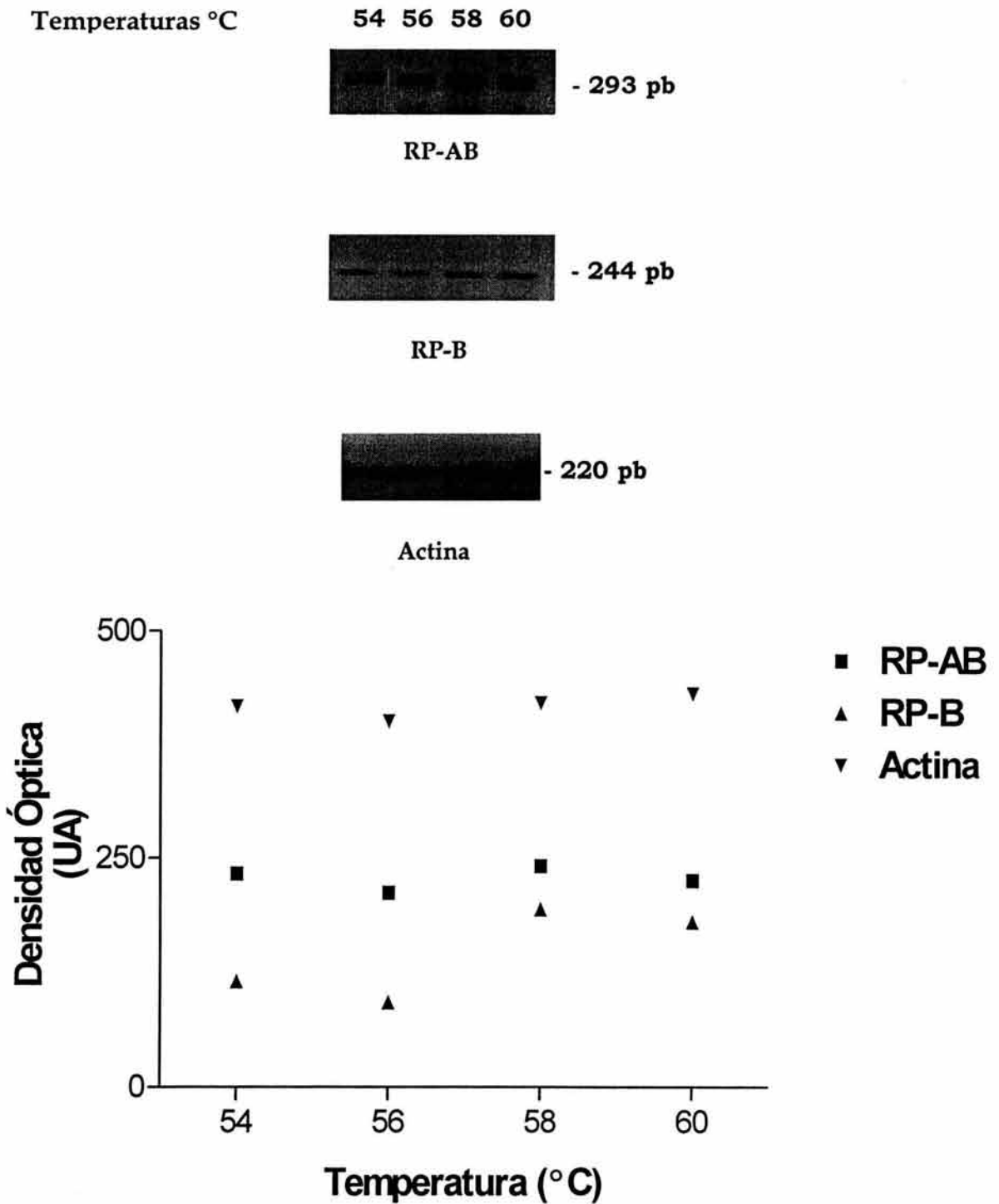
Las concentraciones de los reactivos utilizados en el PCR utilizadas en todos los experimentos fueron las siguientes:

	<b>Concentración Final</b>
Buffer PCR	20 mM Tris-HCl (pH=8.4)
	50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub>	1mM
dNTPs	0.2 mM
Oligo sentido	0.5 μM
Oligo antisentido	0.5 μM
TAQ DNA polimerasa (TECNOLOGÍAS UNIVERSITARIAS)	2.5 unidades

Los pasos para amplificar los genes de RP y  $\beta$  actina fueron los siguientes: 1) etapa de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 2) 30 ciclos a 95°C por 1 min; 60°C, por 1 min; 72°C, por 1 min; 3) un paso de extensión final fue realizado a 72°C por 5 min.

También se desarrolló una curva de amplificación para ambas isoformas (RP-AB) y otra para RP-B a diferentes temperaturas (54 a 60°C), con la finalidad de conocer cuál de ellas era la óptima de hibridación ( $T_m$ ) del templado con los oligonucleótidos diseñados para RP-AB y RP-B. Como se observa en la figura 13, después de dos experimentos se observó que la  $T_m$  de hibridación óptima fue de 60°C.





**Figura 13.** Amplificación de RP-AB, RP-B y actina a diferentes temperaturas. Se realizó un ensayo de RT-PCR para RP-AB, RP-B y  $\beta$  actina a partir de RNA total del pulmón de una rata ovariectomizada tratada con E<sub>2</sub>. La reacción de PCR se realizó a diferentes temperaturas (54-60°C). Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio. La imagen de los productos de PCR se obtuvo mediante luz U.V. La intensidad de las bandas se cuantificó por medio de un análisis densitométrico.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, se observaron en un transiluminador de rayos UV y se fotografiaron e imprimieron en una película Polaroid 665. La intensidad de las bandas de RP-A+B, RP-B y  $\beta$  actina fue cuantificada mediante un análisis densitométrico usando un digitalizador Scan Jet 3C. La expresión de las isoformas del RP fue normalizada con la de  $\beta$  actina. Los datos fueron analizados utilizando un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de t-Student. El programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) fue utilizado para calcular las diferencias significativas de los datos obtenidos.

## **7. Extracción de proteínas**

Se homogenizaron los tejidos en buffer de lisis TDG con un coctel de inhibidores de proteinasas (Tris-HCl 10 mM, ditioneitol 1mM, glicerol al 30%, tritón al 1%, azida de sodio 15 mM, EDTA 1mM, leupeptina 4  $\mu$ g/ml, aprotinina 22  $\mu$ g/ml, PMSF 1mM, ortovanadato de sodio 1mM), en una relación de 1 ml de buffer/1 g de tejido a 4°C.

Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 15,000 rpm, durante 15 min, a 4°C y se separó el sobrenadante. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

## **8. Western Blot.**

Las proteínas obtenidas de los tejidos (100  $\mu$ g) se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7.5% a 75 volts durante 2 horas. Cada muestra se preparó con Buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%,  $\beta$ -mercapto-etanol 5%) en un volumen 1:1 y se hirvieron durante 5 min para depositarse en los geles antes mencionados.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 20 volts, durante 1 hora en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% y albúmina al 0.5% en TBS 1X.

Las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos, dependiendo de la proteína que se fuera a detectar: anticuerpo primario monoclonal anti RP (Santa Cruz sc-810) y anticuerpo policlonal anti RE- $\beta$  (Santa Cruz sc- 6820 ) en una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; anticuerpos policlonales anti SRC-1 (Santa Cruz sc- 6097) o anti SMRT (Santa Cruz sc- 1612) en una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween (TBS (pH=7.4) +Tween al 0.1%) 3 veces por 5 minutos. Para detectar al RP las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Santa Cruz sc-2005). Para detectar al RE- $\beta$ , SRC-1 y SMRT, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-cabra (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Santa Cruz sc-2033). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido de luminol y un potenciador son sustrato de la peróxidasa acoplada al anticuerpo secundario que cuando reacciona se genera una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada, las membranas en las cuales se detectaron las proteínas de interés (RP-B, RP-A, RE- $\beta$ , SRC-1 y SMRT) se lavaron con glicina ácida (glicina 0.1M, SDS 0.5%, pH 2.5) toda la noche a 4 °C y 30 min. a 37°C para posteriormente incubarlas con un anticuerpo primario anti-actina en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Santa Cruz sc-1615) durante 2 horas a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos; después se incubaron 1 hora con un anticuerpo secundario

anti-cabra acoplado a peroxidasa en una concentración de 0.24  $\mu\text{g/ml}$  (Santa Cruz sc-2033) y posteriormente se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

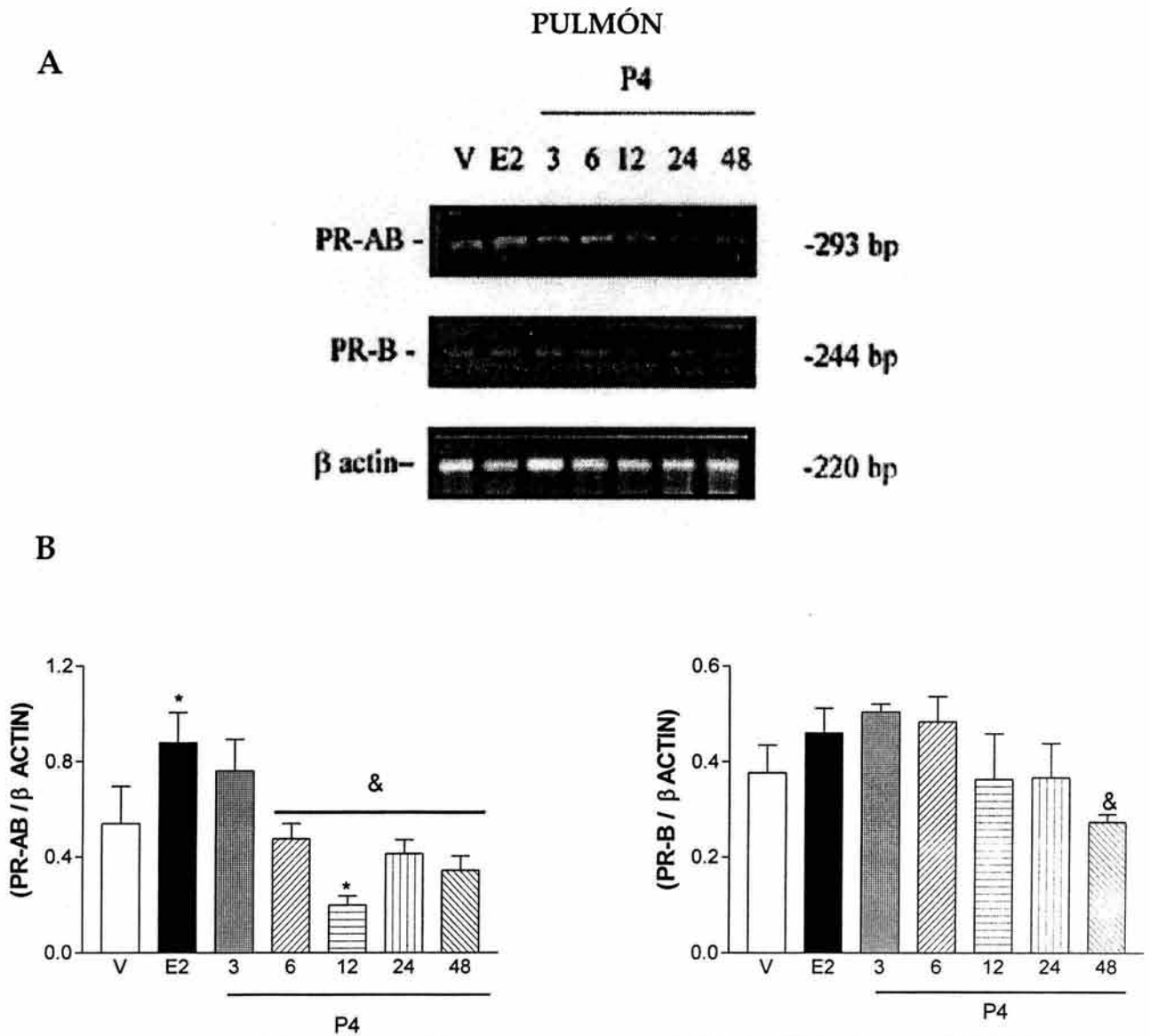
Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico utilizando un aparato Scan Primax 600p (Colorado) y el programa Scion Image (Scion. Corp.), para cuantificar la expresión de las isoformas del RP, RE- $\beta$ , SRC-1, SMRT y  $\beta$ -actina, de acuerdo a la intensidad de cada banda. Para cada experimento los datos obtenidos de las isoformas del RP, RE- $\beta$ , SRC-1 y SMRT se normalizaron con los de  $\beta$ -actina. A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza de una o dos vías (dependiendo del estudio) y una prueba de t-Student. Se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) para calcular los valores de probabilidad.

## X RESULTADOS

### 1. Expresión del RNAm de las isoformas del RP

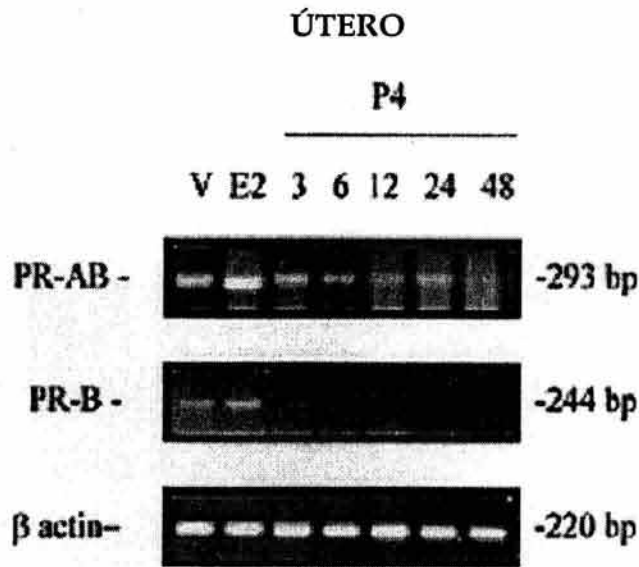
La expresión del RNAm de las isoformas del RP se determinó por medio de la técnica de RT-PCR en el pulmón y en el útero de ratas ovariectomizadas tratadas con E2 y P4. En todas las amplificaciones se detectaron bandas únicas de 293, 244 y 220 pb correspondientes a los fragmentos de RP-A, RP-B y  $\beta$  actina (Fig. 14 y 15). Los análisis de RT-PCR muestran que en el pulmón y en el útero de la rata la expresión total del RP es regulada positivamente por E2 mientras que es regulada negativamente por P4 después de las 6 h de tratamiento (Figs. 14 y 15). En el pulmón el E2 induce un ligero incremento en la expresión del RNAm de RP-B que no es significativo, mientras que sí lo es en el útero (Figs. 14B y 15B). La expresión del RNAm de RP-B en el pulmón no se modifica después de 3 h de tratamiento con P4 y se observa una reducción significativa después de 48 h de tratamiento (Fig. 14). En el útero, el RP-B se regula negativamente por P4 a partir de las 3 h (Fig. 15).

El incremento en la expresión de las isoformas del RP inducido por E2 no se modificó después del tratamiento con vehículo (Fig. 16). Por lo anterior la disminución significativa en el contenido de ambas isoformas se debe a la acción de la P4 y no a la reducción en el efecto del E2 después de 24 y 48 h de su administración.

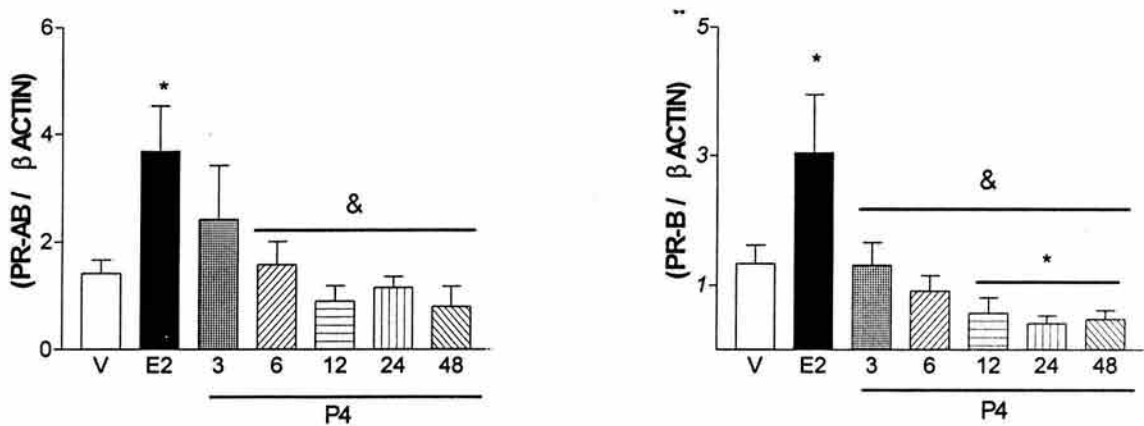


**Figura 14. Expresión del RNAm de las isoformas del RP en el pulmón de la rata.** (A) Ensayo de RT-PCR representativo de 4 experimentos independientes para amplificar RP-AB (PR-AB), RP-B (PR-B) y  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN) a partir del RNA total del pulmón de ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo (V), E2 y E2+P4. Los animales tratados con V y E2 se sacrificaron 24 h después del último tratamiento, mientras que los tratados con E2+P4 se sacrificaron a las 3, 6, 12, 24 y 48 h después del último tratamiento con P4. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio para ser detectados con luz UV. (B) Análisis densitométrico de la expresión del RNAm de las isoformas del RP en el pulmón de la rata. Se realizó el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes de RT-PCR para amplificar RP-AB (PR-AB), RP-B (PR-B) y  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN) en el pulmón de la rata, los datos obtenidos se corrigieron con respecto a los valores de expresión de  $\beta$  actina. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. \* $p$ <0.05 comparado con V y & $p$ <0.05 comparado con E2.

A



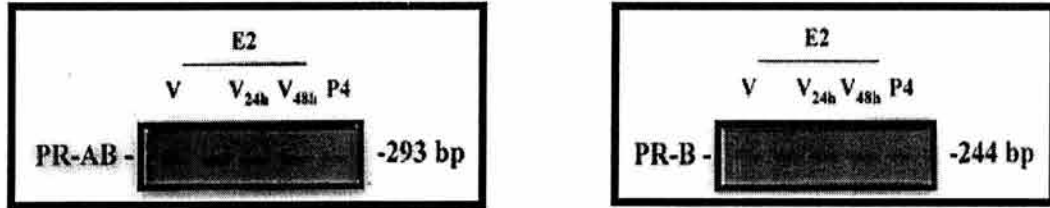
B



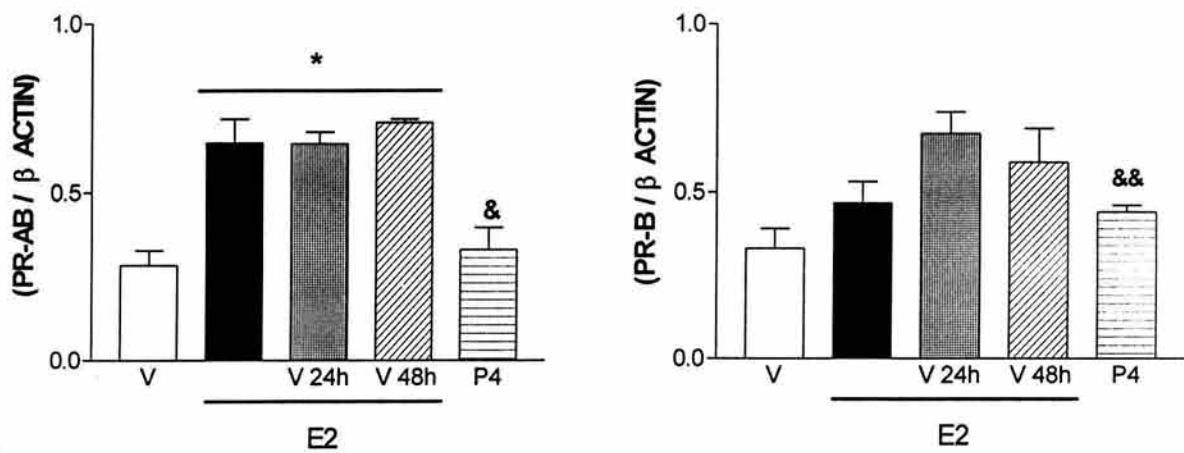
**Figura 15.** Expresión del RNAm de las isoformas del RP en el útero de la rata. (A) Ensayo de RT-PCR representativo de 4 experimentos independientes para amplificar RP-AB (PR-AB), RP-B (PR-B) y  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN) a partir del RNA total del útero de ratas ovariectomizadas tratadas en las condiciones descritas en la figura 14. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio para ser detectados con luz UV. (B) Análisis densitométrico de la expresión del RNAm de las isoformas del RP en el útero de la rata. Se realizó el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes de RT-PCR para amplificar RP-AB (PR-AB), RP-B (PR-B) y  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN) en el útero de la rata, los datos obtenidos se corrigieron con respecto a los valores de expresión de  $\beta$  actina. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. \* $p < 0.05$  comparado con V y & $p < 0.05$  comparado con E2.

## PULMÓN

A



B



**Figura 16. Expresión del RNAm de las isoformas del RP en el pulmón de ratas ovariectomizadas pretratadas con E2 y tratadas con V y P4.** (A) Ensayo de RT-PCR representativo de 4 experimentos independientes para amplificar RP-AB (PR-AB), RP-B (PR-B) y  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN) a partir del RNA total del pulmón de ratas ovariectomizadas tratadas con V, E2, E+V y E2+P4. Los animales se sacrificaron 24 h después del último tratamiento. Un grupo adicional de E2+V se sacrificó 48 h después del último tratamiento. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio para ser detectados con luz UV. (B) Se realizó el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes de RT-PCR para amplificar RP-AB, RP-B y  $\beta$  actina en el pulmón de la rata, los datos obtenidos se corrigieron con respecto a los valores de expresión de  $\beta$  actina. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. \* $p < 0.05$  comparado con V, & $p < 0.05$  comparado con E2+V y && $p < 0.05$  comparado con E2+V24h.

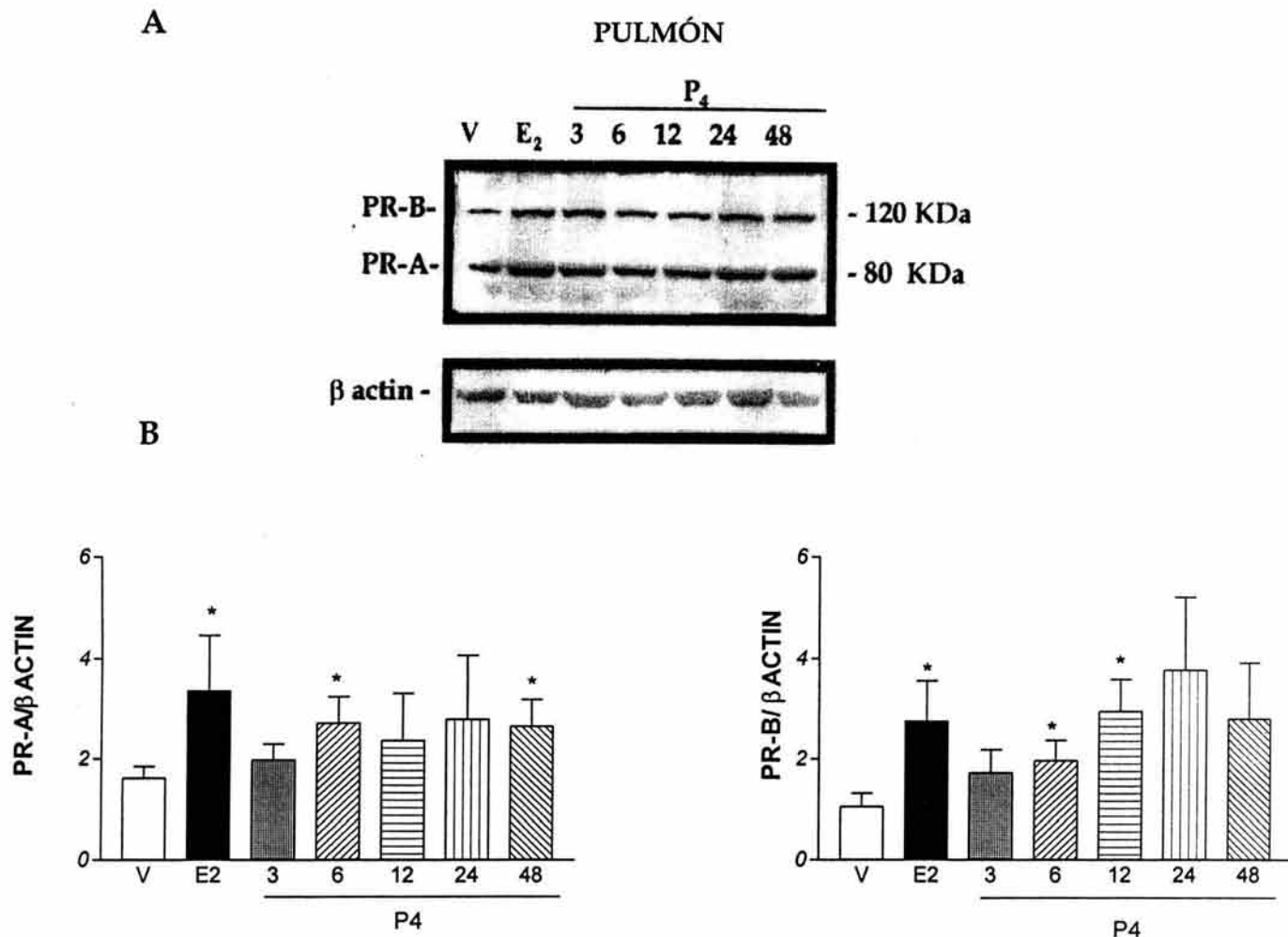


## 2. Contenido de la proteína de las isoformas del RP

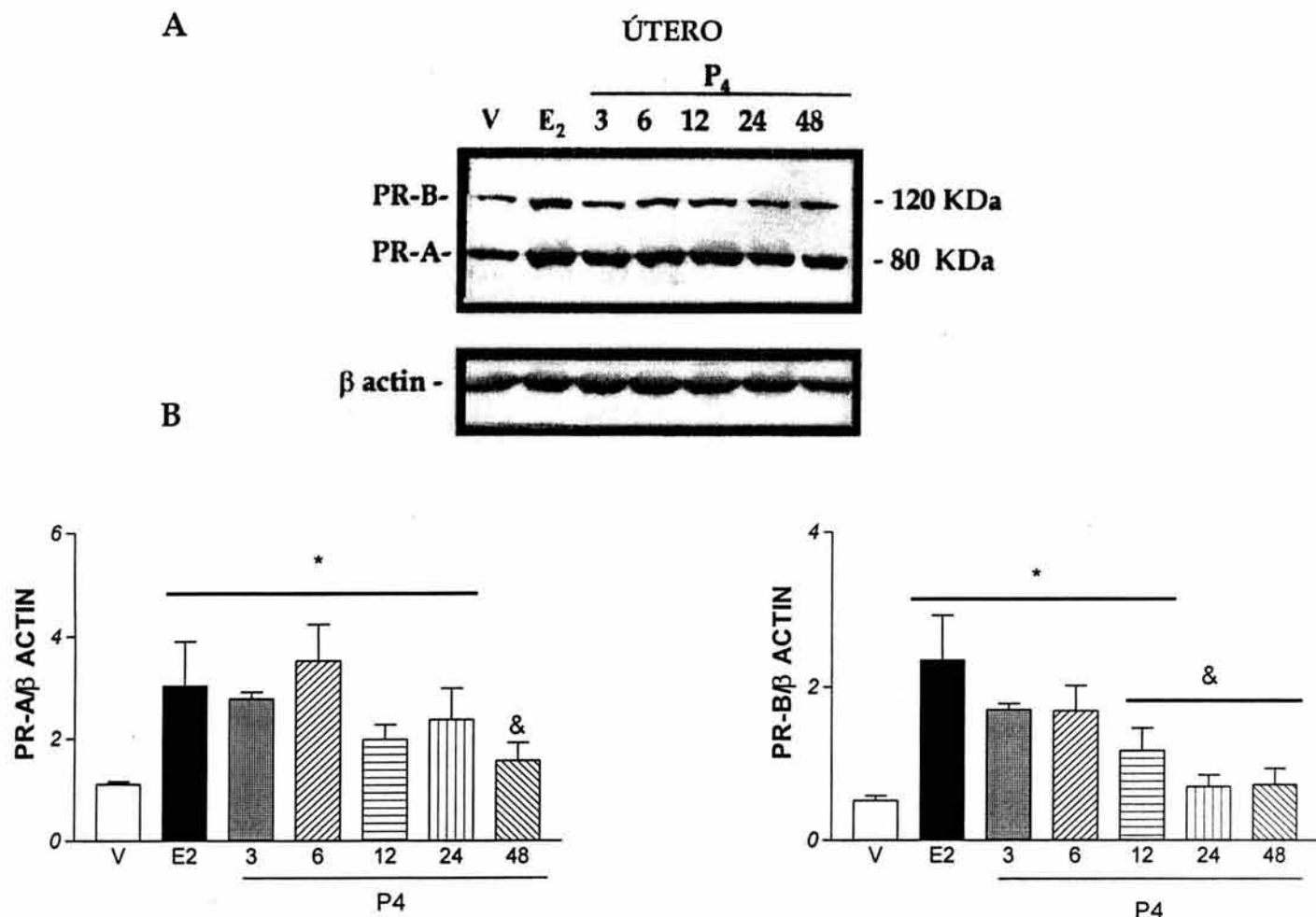
El contenido de la proteínas de las isoformas del RP se determinó en el pulmón y en el útero de ratas ovariectomizadas por medio de la técnica de Western blot. En todos los experimentos se detectaron dos bandas de 120 y 80 KDa correspondientes a RP-B y a RP-A. La  $\beta$ -actina se utilizó como un control de carga de las proteínas y se reconoció como una banda de 40 KDa. En el análisis por Western blot se observa que ambas isoformas del RP se regulan positivamente por E2 tanto en el pulmón como en el útero (Figs. 17 y 18). En el pulmón la P4 no modifica significativamente el efecto del E2 sobre las isoformas del RP en ningún período de tiempo (Fig. 17), mientras que en el útero la P4 regula negativamente a ambas isoformas; a RP-A a las 48 h y a RP-B a partir de las 12 h (Fig. 18). La isoforma abundante en el pulmón y en el útero es RP-A (relación RP-A:RP-B de 2:1 en el pulmón y de 3:1 en el útero).

## 3. Contenido de la proteína del RE- $\beta$

El contenido de la proteína del RE- $\beta$  se determinó en ratas ovariectomizadas tratadas con E2 y P4. En todos los experimentos se detectó una banda de 56 KDa correspondiente a RE- $\beta$  (Fig. 19A). El ensayo de Western blot muestra que en contraste con lo observado en el caso de las isoformas del RP, el RE- $\beta$  se regula negativamente después del tratamiento con E2 (Fig. 19). La P4 no modifica el efecto del E2 en el pulmón en ninguno de los tratamientos.

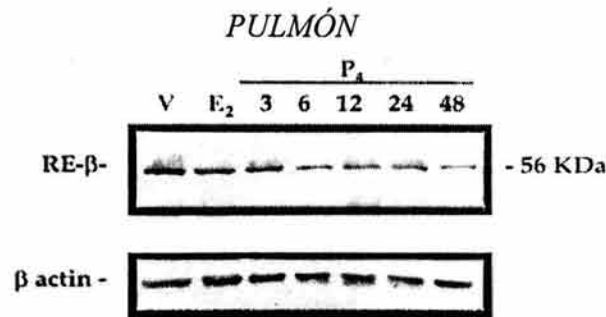


**Figura 17. Contenido de las isoformas del RP en el pulmón de la rata.** (A) Ensayo de Western blot representativo de 4 experimentos independientes de ratas ovariectomizadas tratadas en las condiciones descritas en la figura 14. Las proteínas del pulmón (100  $\mu$ g) se separaron por electroforesis en un gel de SDS-PAGE. Los gels se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo anti-RP, que reconoce a ambas isoformas del RP (PR-A y PR-B) con la misma afinidad. El complejo RP-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (ECL). La proteína  $\beta$ -actina ( $\beta$ -ACTIN) se utilizó como control de carga. (B) Se realizó el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes de Western blot para la determinación del contenido de las isoformas del RP (PR) en el pulmón de la rata, los datos obtenidos se corrigieron con respecto a los valores de  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN). Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. \* $p < 0.05$  comparado con V.

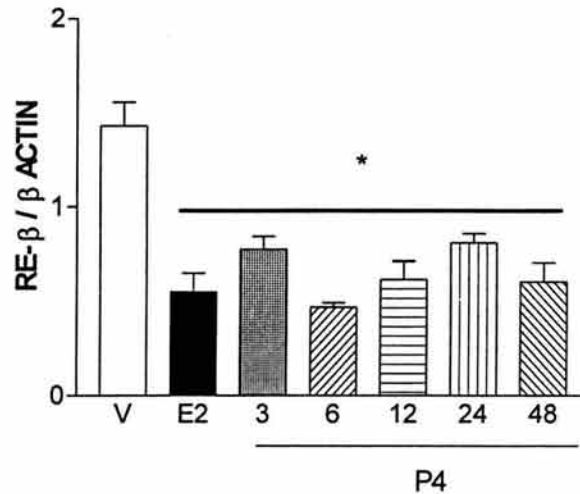


**Figura 18. Contenido de las isoformas del RP en el útero de la rata. (A)** Ensayo de Western blot representativo de 4 experimentos independientes de ratas ovariectomizadas tratadas en las condiciones descritas en la figura 12. Las proteínas del del útero (100  $\mu$ g) se separaron por electroforesis en un gel de SDS-PAGE. Los gels se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo anti-RP, que reconoce a ambas isoformas del RP (PR-A y PR-B) con la misma afinidad. El complejo RP-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (ECL). La proteína  $\beta$ -actina ( $\beta$ -ACTIN) se utilizó como control de carga. **(B)** Se realizó el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes de Western blot para la determinación del contenido de las isoformas del RP (PR) en el útero de la rata, los datos obtenidos se corrigieron con respecto a los valores de  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN). Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. \* $p$ <0.05 comparado con V y & $p$ <0.05 comparado con E2.

A



B



**Figura 19. Contenido y análisis densitométrico del RE-β en el pulmón de ratas ovariectomizadas.** (A) Ensayo de Western blot representativo de 4 experimentos independientes de ratas ovariectomizadas tratadas con V, E2 y E2+P4. Los animales tratados con V y E2 se sacrificaron 24 h después del último tratamiento, mientras que los tratados con E2+P4 se sacrificaron a las 3, 6, 12, 24 y 48 h después del último tratamiento con P4. Las proteínas del pulmón y del útero (100 µg) se separaron por electroforesis en un gel de SDS-PAGE. Los gels se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo anti RE-β (ER-β). El complejo RE-β-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (ECL). La proteína β-actina se utilizó como control de carga. (B) Se realizó el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes de Western blot para el RE-β en el pulmón de la rata, los datos obtenidos se corrigieron con respecto a los valores de expresión de β actina (β-ACTIN). Las gráficas muestran el promedio ± E.S. En todos los paneles \*p<0.05 comparado con V.

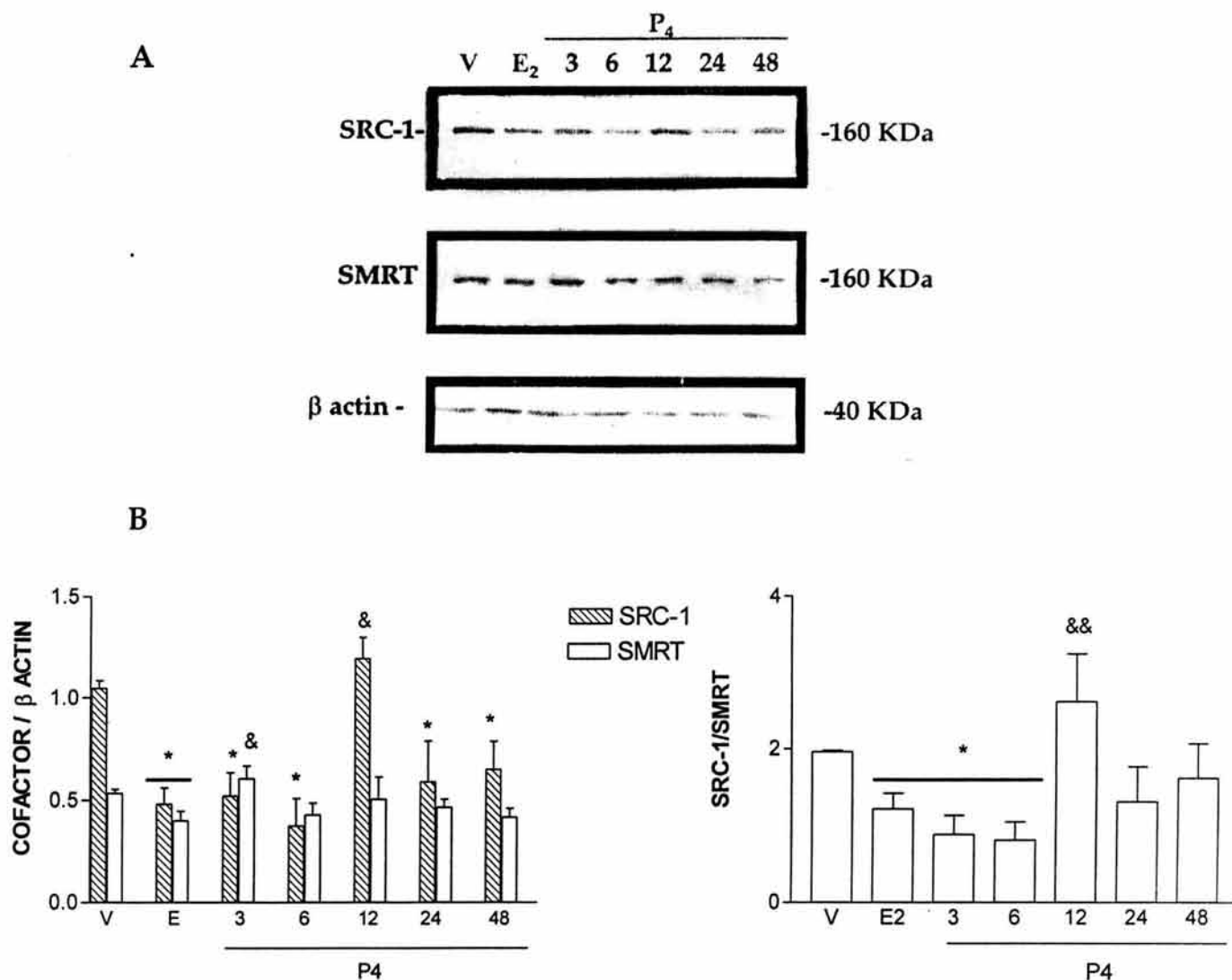
#### 4. Contenido de SRC-1 y SMRT

El contenido de las proteínas de SRC-1 y SMRT se determinó en el pulmón de ratas ovariectomizadas tratadas con E2 y P4. El análisis del Western blot muestra que SRC-1 y SMRT se regulan negativamente por E2 (Fig. 20,). P4 regula positivamente a SRC-1 y a SMRT a las 12 h y a las 3 h respectivamente; ambos cofactores disminuyen nuevamente a las 24 h (SRC-1) y a las 6 h (SMRT) (Fig. 20). La tasa SRC-1/SMRT disminuye con el tratamiento con E2 y aumenta a las 12 h de tratamiento con P4, debido a la regulación positiva de SRC-1 por esta última (Fig. 20 B) disminuyendo nuevamente a las 24 h.

#### 5. Contenido de las isoformas del RP en el pulmón de ratas adultas intactas

El contenido de las proteínas de las isoformas del RP se determinó en el pulmón de ratas hembras durante el ciclo estral y en machos intactos por medio de la técnica de Western blot. En todos los experimentos se detectaron dos bandas de 120 y 80 KDa correspondientes a PR-B y PR-A respectivamente (Fig 21). El análisis de los experimentos de Western blot mostró que el contenido más alto de ambas isoformas se observó durante el proestro mientras que el más bajo se encontró durante el estro (Fig. 22A). El contenido de ambas isoformas fue significativamente menor en el pulmón de los machos que en el de las hembras (Figs. 21 y 22A). El contenido de RP-A fue mayor al de RP-B en el pulmón de machos y hembras (relación A:B; media  $\pm$  ES: metaestro  $1.60 \pm 0.33$ ; diestro  $1.22 \pm 0.08$ ; proestro  $1.10 \pm 0.066$ ; estro  $1.83 \pm 0.49$ ; machos  $2.50 \pm 0.60$ ).

## PULMÓN



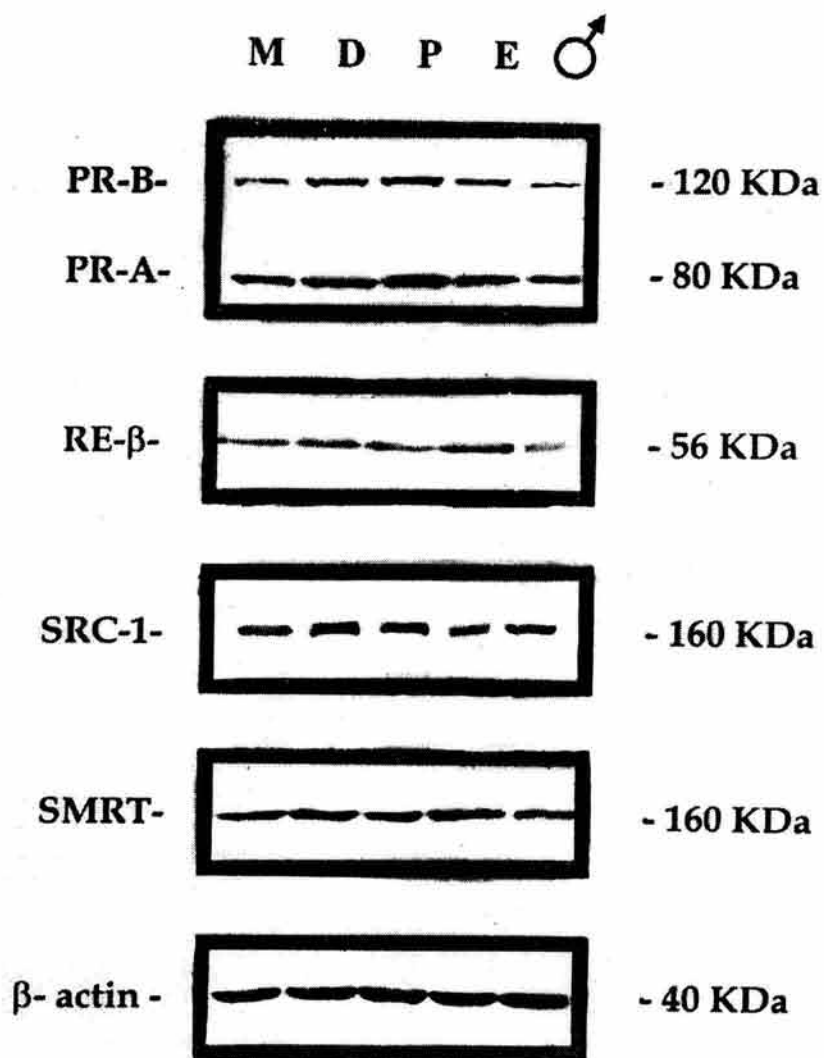
**Figura 20. Contenido de SRC-1 y SMRT en el pulmón de ratas ovariectomizadas.** (A) Ensayo de Western blot representativo de 4 experimentos independientes de ratas ovariectomizadas tratadas como se señaló en la figura 14. Las proteínas del pulmón (100  $\mu$ g) se separaron por electroforesis en un gel de SDS-PAGE. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos anti SRC-1 y anti SMRT. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (ECL). La proteína  $\beta$ -actina ( $\beta$ -ACTIN) se utilizó como control de carga. (B) Se realizó el análisis densitométrico de los 4 experimentos independientes de Western blot para SRC-1 y SMRT en el pulmón de la rata, los datos obtenidos se corrigieron con respecto a los valores de  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN) y se calculó la relación SRC-1/SMRT en las diferentes condiciones experimentales. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. \* $p < 0.05$  comparado con V. & $p < 0.05$  comparado con E2. &&  $p < 0.05$  comparado con 3 y 6 h después del tratamiento con P4.

## 6. Contenido del RE- $\beta$ en el pulmón de ratas adultas intactas

En todos los experimentos una banda de 56 KDa correspondiente a RE- $\beta$  se detectó en el pulmón de ratas intactas por medio de la técnica de Western blot (Fig. 21). En contraste a lo observado para las isoformas del RP, el menor contenido de la proteína del RE- $\beta$  se encontró en el día del proestro e incrementó en el día del estro (Fig. 22B). Así como en el caso de las isoformas del RP, el contenido del RE- $\beta$  en los machos fue significativamente menor que en las hembras.

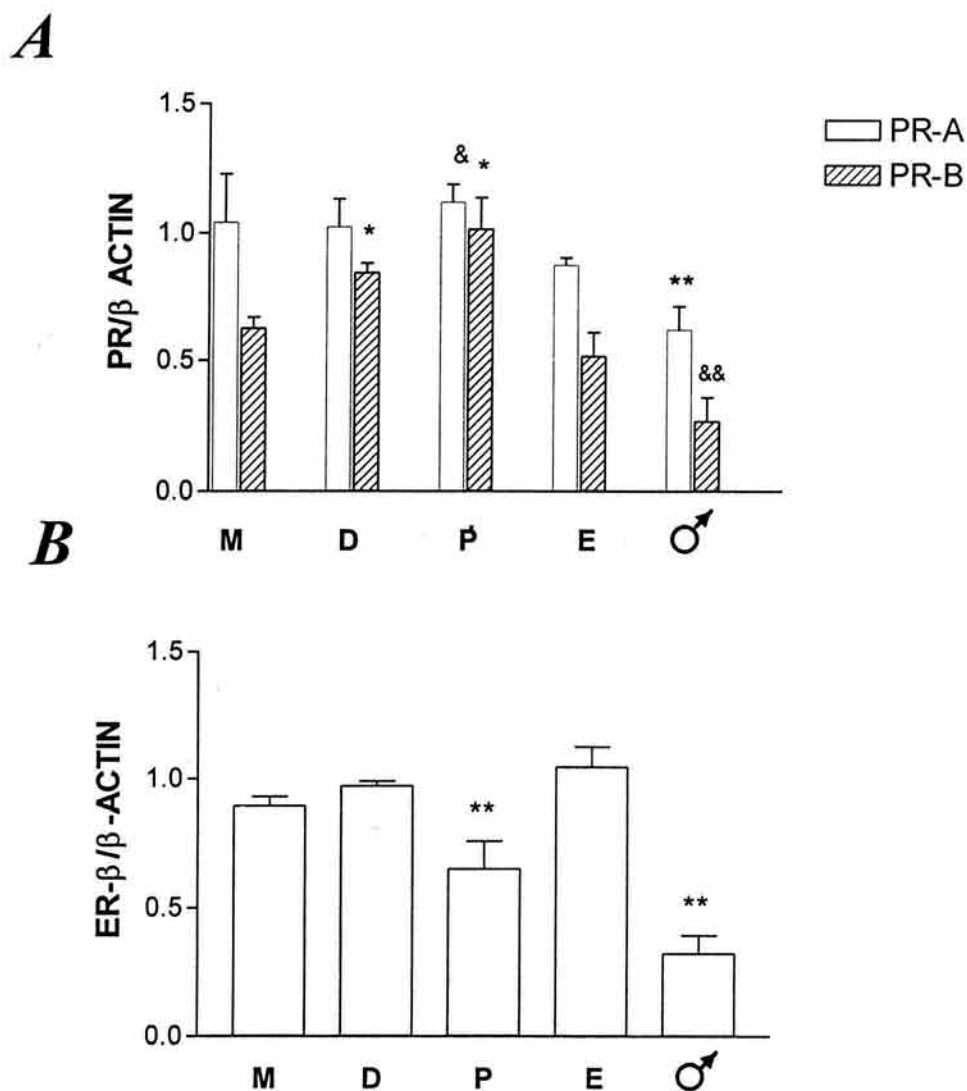
## 7. Contenido de SRC-1 y SMRT en el pulmón de ratas adultas intactas

SRC-1 y SMRT se detectaron en el pulmón de ratas adultas intactas como bandas únicas de 160 KDa. El contenido de SRC-1 y SMRT se incrementó durante el diestro (Fig. 21). SRC-1 disminuyó en los días del proestro y del estro, mientras que el contenido de SMRT disminuyó en el día proestro e incrementó nuevamente en el día del estro (Fig. 23A). El contenido de SRC-1 fue similar en machos y hembras mientras que el de SMRT fue menor en los machos que en las hembras. La relación SRC-1/SMRT aumentó significativamente en el día del diestro y disminuyó en el estro (Fig. 23B). De manera interesante, esta relación fue mayor en machos que en hembras (Fig. 23B). En todos los experimentos la  $\beta$ -actina se determinó como una banda de 40 Kda.

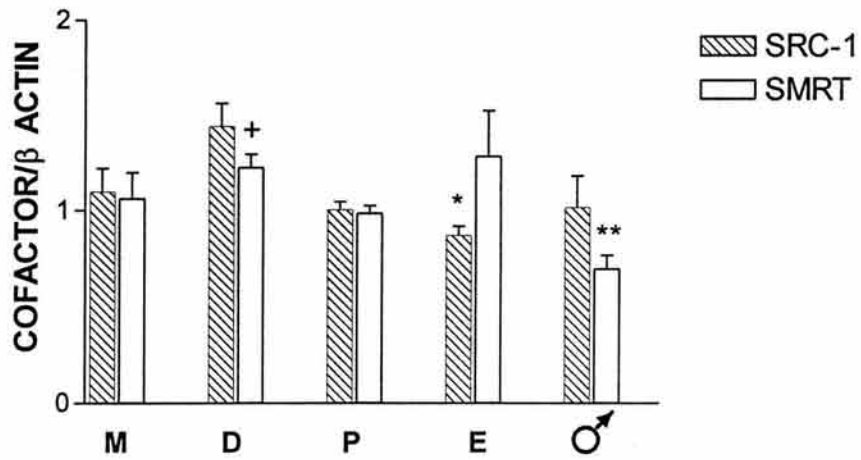
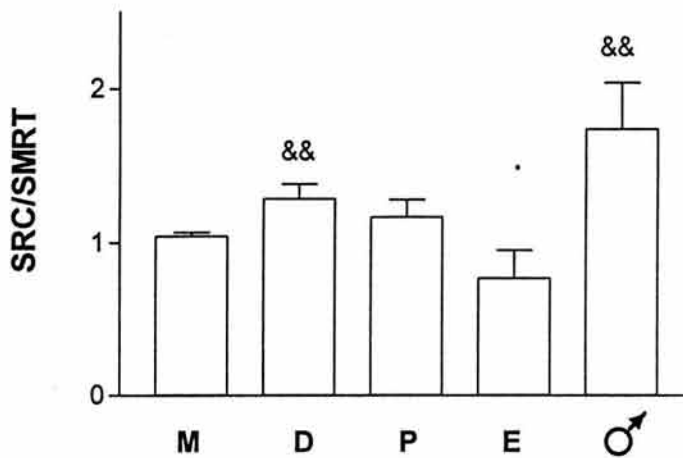


**Figura 21.** Contenido de las isoformas del RP, RE-β, SRC-1 y SMRT en el pulmón de ratas adultas intactas. Ensayo de Western blot representativo de 4 experimentos independientes. Las proteínas del pulmón (100 µg) se separaron por electroforesis en un gel de SDS-PAGE. Los gels se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos que reconocen a las diferentes proteínas en estudio: RP (PR), RE-β (ER-β), SRC-1 y SMRT. Los complejos antígeno-anticuerpo se detectaron por quimioluminiscencia (ECL). La proteína β-actina se utilizó como control de carga. Metaestro (M), diestro (D), proestro (P), estro (E) y machos intactos (♂).





**Figura 22. Análisis densitométrico del contenido de las isoformas del RP y del RE- $\beta$  en el pulmón de la rata.** Se realizó el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes de Western blot para la determinación del contenido de las isoformas del RP (PR) y del RE- $\beta$  (ER- $\beta$ ) en el pulmón de la rata, los datos obtenidos se corrigieron con respecto a los valores de  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN). Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. n=4. \*p<0.05 comparado con metaestro y estro. &p<0.05 comparado con estro. \*\*p<0.05 comparado con los otros grupos. &&p<0.05 comparado con metaestro, diestro y proestro. Metaestro (M), diestro (D), proestro (P), estro (E) y machos intactos ( $\text{♂}$ ).

**A****B**

**Figura 23. Análisis densitométrico del contenido de SRC-1 y SMRT en el pulmón de ratas intactas.** (A) Se realizó el análisis densitométrico de 4 experimentos independientes de Western blot para la determinación del contenido de SRC-1 y SMRT en el pulmón de la rata. (B) Se determinó la relación SRC-1/SMRT utilizando los resultados obtenidos del análisis del Western blot. Los datos obtenidos se corrigieron con respecto a los valores de  $\beta$  actina ( $\beta$ -ACTIN). Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S.  $n=4$ . <sup>+</sup> $p<0.05$  comparado con proestro. <sup>\*</sup> $p<0.05$  comparado con diestro y proestro. <sup>\*\*</sup> $p<0.05$  comparado con los otros grupos. <sup>&&</sup> $p<0.05$  comparado con metaestro y estro. Metaestro (M), diestro (D), proestro (P), estro (E) y machos intactos (♂).

### 8. Concentraciones séricas de E2 y P4

Las concentraciones séricas más altas de E2 y P4 se observaron en los días del proestro y el metaestro respectivamente. La concentración de P4 en los machos fue significativamente menor que en las hembras, mientras que la concentración de E2 fue significativamente menor comparada con las hembras en los días del metaestro y proestro (tabla 2).

**Tabla 2. Niveles séricos de E2 y P4 en ratas hembras durante el ciclo estral y en machos intactos.**

Día	E2 (pg/ml)	P4 (ng/ml)
Metaestro	15.64 ± 1.01*	12.83 ± 2.33&
Diestro	8.04 ± 2.63	10.47 ± 4.73
Proestro	38.57 ± 4.77*	5.90 ± 2.57
Estro	6.82 ± 1.33	4.63 ± 1.37
Machos	10.45 ± 1.45**	1.30 ± 0.20*

Las concentraciones de esteroides se determinaron por radioinmunoensayo. Los datos expresan el promedio ± E.S. de 4 animales/grupo. \* p<0.05 comparado con los otros grupos. \*\*p<0.05 comparado con metaestro, proestro y estro. & p<0.05 comparado con proestro, estro y machos.

## XI. DISCUSIÓN

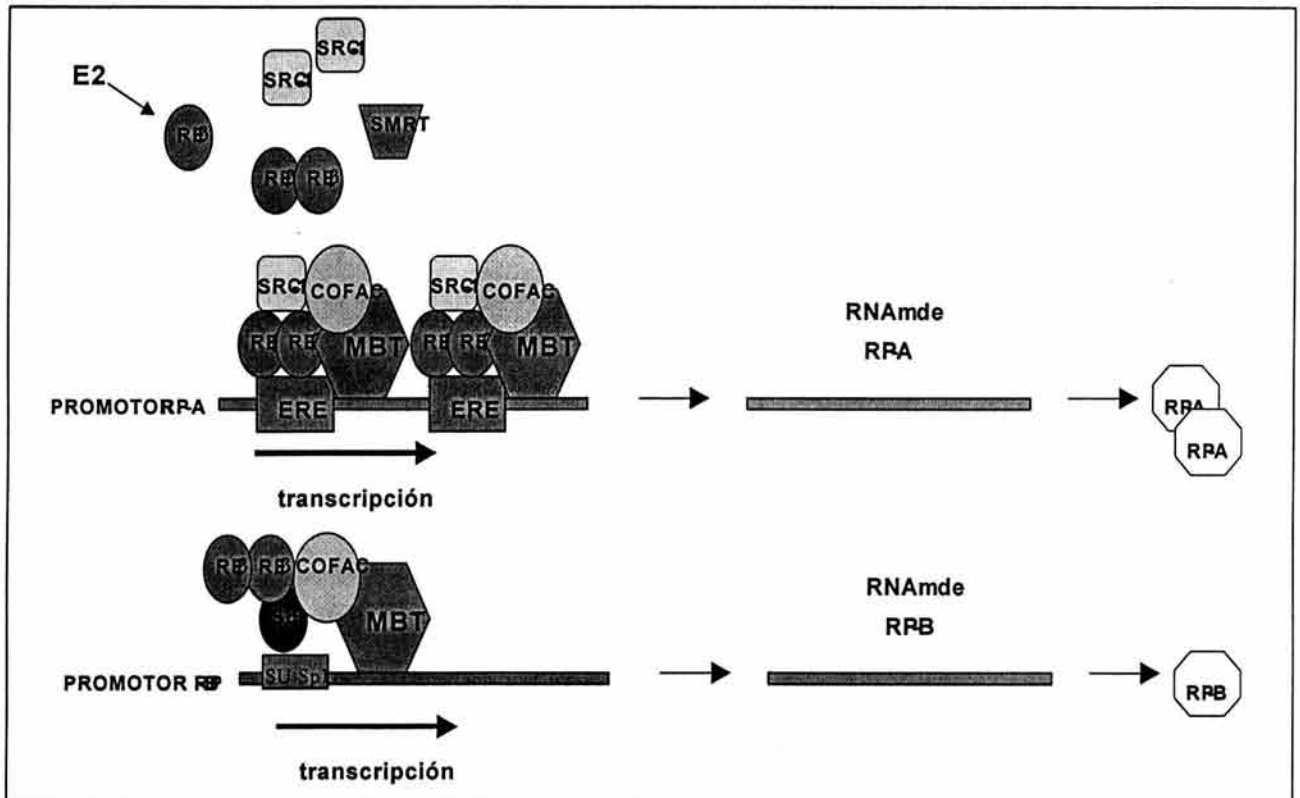
### 1. Regulación diferencial en la expresión del gen (mRNA) y de la proteína de las isoformas del RP en el pulmón por E2 y P4.

Los trabajos realizados para el estudio de la regulación del RP en el pulmón del conejo abarcan la regulación de la proteína y de los transcritos solo de la isoforma B ya que hasta el momento esta es la única isoforma que se ha detectado y descrito en este animal (Loosfelt et al., 1986). Por lo anterior es importante señalar que antes de la realización de este trabajo de investigación no había ningún estudio sobre la regulación de ambas isoformas del RP en el pulmón por tratamientos hormonales de E2 y P4 o en condiciones fisiológicas como el ciclo estral de la rata en donde ocurren cambios en las concentraciones de E2 y P4. En los estudios realizados en conejo se observó que el E2 reguló positivamente la expresión de la proteína del RP-B (Camacho-Arroyo et al., 1994), lo que correlaciona con los resultados obtenidos en este trabajo en donde se observó que en el pulmón de la rata no solo la proteína de la isoforma B tuvo una regulación positiva por E2 sino también RP-A. En el trabajo sobre los transcritos del RP en el pulmón de la coneja, se observó que los transcritos del RP disminuyeron a medida que transcurrieron los días del embarazo (1 al 5) cuando los niveles de P4 aumentan en cada día (Camacho-Arroyo et al., 1998). Lo anterior correlaciona con los datos que se obtuvieron en esta investigación en donde el mRNA no solo de RP-B sino de ambas isoformas del RP en el pulmón de la rata presentó una regulación negativa por P4.

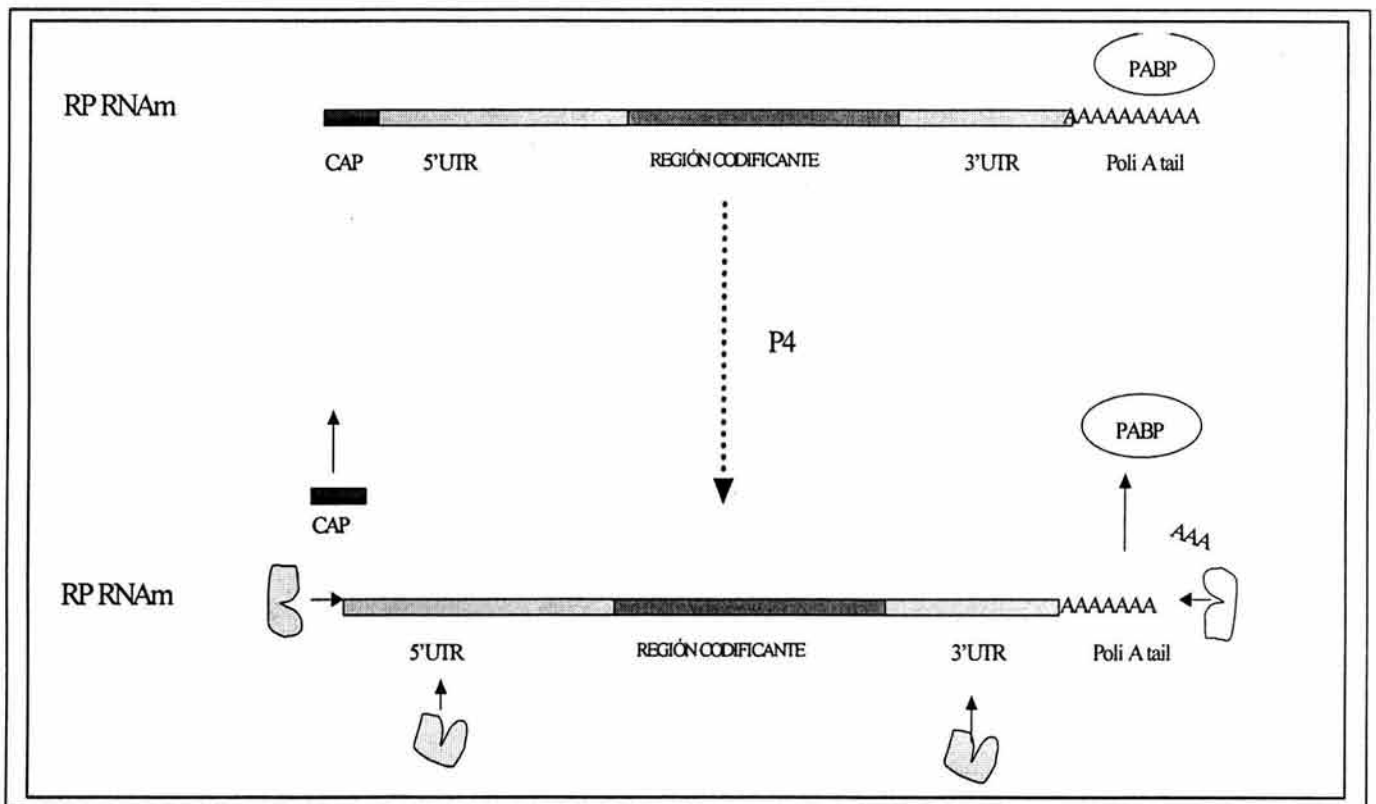
La diferencia en la regulación por E2 que resultó significativa para RP total (A+B) más no para RP-B sugiere que RP-A es la isoforma más susceptible a ser regulada por E2, esto podría deberse a las diferencias en los ERE ubicados en el promotor de RP-A que no están en el de RP-B. En la rata se ha determinado que en el promotor de RP-A [posición del promotor de RP-A en el gen del RP: +461/675]


existen dos ERE uno completo que contiene una secuencia palindrónica que varía en dos nucleótidos de la secuencia consenso, ubicado en la posición +615/637 del gen del RP y otro sitio más que únicamente contiene la mitad del ERE en la posición +462/+466. En el promotor de RP-B [posición del promotor de RP-B en el gen del RP -131/65] no se han detectado ERE, sin embargo se han determinado sitios de unión a Sp1 en la posición -49/-41 (Kraus et al., 1993), que puede actuar con el RE (Salvatori et al., 2003, Khan et al., 2003) para regular la transcripción del RP. En la figura 24 se muestra como el RE- $\beta$  al unirse a su ligando (E2) se activa, asociándose entonces con proteínas coactivadoras como el SRC-1 que aumentan la actividad transcripcional del RE- $\beta$ , todo este complejo de moléculas se suma al conjunto de proteínas que conforman la maquinaria basal de transcripción, en los elementos de respuesta a estrógenos induciendo así la transcripción del RP-A o RP-B (Fig. 24).

Las diferencias en la regulación de las isoformas del RP por su ligando con respecto al RNAm se podría explicar por medio del siguiente mecanismo: La P4 podría disminuir la estabilidad del RNAm del RP (Fig. 25), modificando el Cap (guanina ubicada al extremo 5' que le brinda estabilidad al RNAm), los UTRs (regiones no traducidas que contienen elementos cis que le confieren estabilidad al RNAm) o la cola de poli A (secuencia de adeninas en el extremo 3' que le brinda estabilidad al RNAm) que juegan un papel importante en la traducción y estabilidad del RNAm (Wilson y Brewer 1999, Wickens y Stephenson 1984). Existen estudios que demuestran la influencia de la P4 en el aumento de la estabilidad del mRNA de la hormona luteinizante (Park et al 1995). También se conoce que diferentes ligandos pueden regular la estabilidad del RNAm de su propio receptor, por ejemplo, el receptor a andrógenos aumenta al doble su estabilidad en presencia del ligando dihidrotestosterona (Yeap et al.,1999) .



**Figura 24. Regulación de la expresión de las isoformas del RP.** el RE- $\beta$  al unirse a su ligando (E2) se activa, asociándose entonces con proteínas coactivadoras como el SRC-1 que aumentan la actividad transcripcional del RE- $\beta$ , todo este complejo de moléculas se suma al conjunto de proteínas que conforman la maquinaria basal de transcripción en los elementos de respuesta a estrógenos induciendo así la transcripción del RP-A. Para la expresión del RP-B, Sp1 se puede asociar con el RE $\beta$  activado por E2, cofactores y con la maquinaria basal de transcripción, en el sitio de unión a Sp1 induciendo así la transcripción de este receptor. E2: estradiol; SRC-1: coactivador de receptores a esteroides 1; SMRT: corepresor (mediador del silenciamiento del receptor a ácido retinóico y al receptor de la hormona tiroidea) RE- $\beta$ : Receptor a estógenos  $\beta$ ; COFAC: cofactores; ERE : elemento de respuesta a estrógenos; MBT: Máquinaria basal de transcripción; RP-A isoforma A del RP, RP-B isoforma B del RP; Sp1: factor de transcripción conocido como proteína específica 1; SU Sp1: sitio de unión a Sp1.



**Figura 25. Disminución de la estabilidad del RNAm del RP por P4.** A nivel transcripcional la P4 podría disminuir la estabilidad del RNAm del RP, modificando el Cap (guanina ubicada al extremo 5' que le brinda estabilidad al RNAm), las UTRs (regiones no traducidas que contienen elementos cis que le confieren estabilidad al RNAm) o la cola de poli A (secuencia de adeninas en el extremo 3' que le brinda estabilidad al RNAm). PABP: proteína de unión a la cola de poli A;  : RNA asas; UTR: regiones no traducidas ; CAP: estructura CAP (GpppG); Poli A tail: cola de poli A; P4: progesterona.

## 2. Regulación tejido específica de las isoformas del RP

Las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) como la ERK 42 y la ERK 44 fosforilan al RP en residuos de serina, lo que marca al receptor para su posterior ubiquitinación y degradación por medio de la maquinaria del proteosoma 26S. Las fosfatasas de serina defosforilan al RP, lo que disminuye la degradación del receptor. Existen estudios que demuestran la distribución tejido específica de ERK 44 y ERK 42 en el cerebro de rata (Ortiz et al., 1995), así como la distribución diferencial de la fosfatasa de serina PP2C  $\alpha$  en tejidos humanos (Lifschitz-Mercer et al 2001). La diferencia en la regulación del RP por P4 sobre la proteína en el pulmón y el útero pudiera deberse a la expresión tejido específica de ERKs o fosfatasas de serina; por ejemplo las fosfatasas de serina podrían ser más abundantes en el pulmón, disminuyendo así la degradación del RP a través del proteosoma 26S, mientras que en el útero ERK 44 y ERK 42 pudieran ser más abundantes y así inducir la degradación de las isoformas del RP (fig. 26).

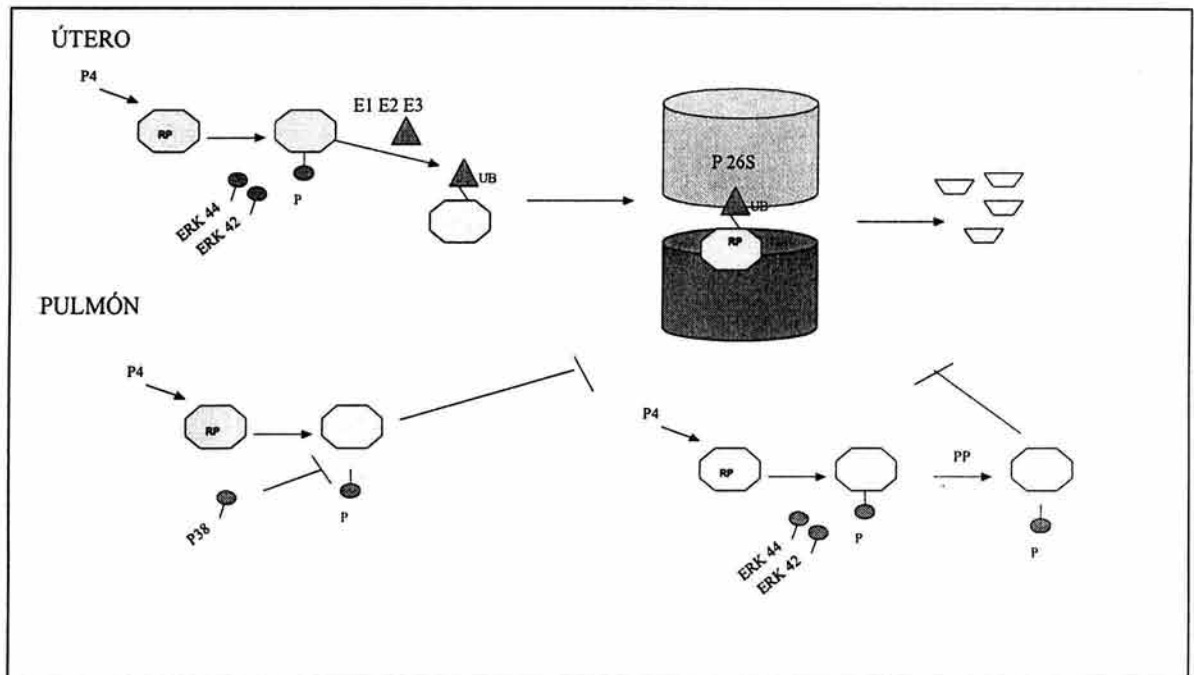
## 3. Regulación del RE- $\beta$ y cofactores

La disminución del RE- $\beta$  por el tratamiento con E2 y durante el proestro (día del ciclo estral en donde la concentración plasmática de este esteroide es el más alto) está relacionada con la degradación del receptor (dependiente de ligando) por la maquinaria del proteosoma 26S, pues una vez que el E2 se une al RE- $\beta$ , se induce la fosforilación de éste por ERKs 44 y 42, que marcan al receptor para que sea ubiquitinado y posteriormente degradado por el proteosoma.

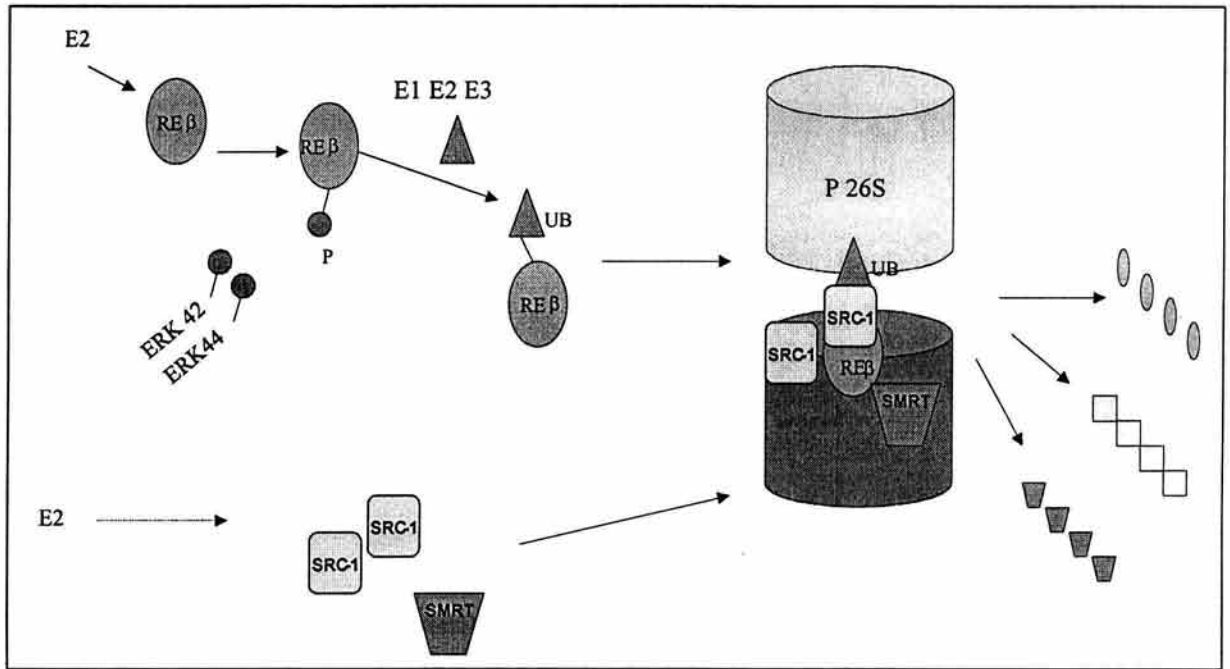
Por otro lado los cofactores también pueden ser fosforilados [Rowan et al., 2000] y degradados por el proteosoma 26S [Lonard et al., 2000], entonces la disminución en el contenido de ambos cofactores (SRC-1) y (SMRT) por los tratamientos con E2 y durante el proestro podrían deberse a que esta hormona



indujera algún mecanismo por medio del cual estos cofactores pudieran ser fosforilados y degradados (Fig. 27).



**Figura 26. Diferencias tejido específicas en la degradación del RP en el pulmón y el útero.** La ERK 42 y la ERK 44 fosforilan al RP en residuos de serina, induciendo su degradación a través del proteosoma 26S, mientras que fosfatasas de serina desfosforilan al RP disminuyendo su degradación por la misma vía. La distribución de ERKs o fosfatasas de serina es tejido específica, lo cual puede influir en la degradación del RP. ERK 44 y ERK 42: proteínas cinasas activadas por mitógenos de 44 y 42 KDa; E1, E2 y E3: enzimas encargadas de la ubiquitinación; P26S: proteosoma 26S; p 38: proteína cinasa activada por mitógenos de 38 KDa; RP: receptor a progesterona; PP: fosfatasa; P: fosfato.



**Figura 27. Regulación negativa de RE-β y de los cofactores SRC-1 y SMRT por E2.** El E2 se une al RE-β, lo que induce la fosforilación de éste por ERKs 44 y 42, que marcan al receptor para que sea ubiquitinado y posteriormente degradado por el proteosoma. Los cofactores también pueden ser fosforilados y degradados por el proteosoma 26S. Todas las abreviaturas incluidas en esta figura fueron descritas en las figuras 23 y 25.

La relación de SRC-1/SMRT se modificó en los diferentes días del ciclo estral. Los cambios en esta relación son importantes ya que pueden modular la actividad transcripcional tanto del RP como del RE-β, pues se ha observado que en líneas tumorales como HeLa y T47D el antagonista de la P4, el RU486, actúa como agonista cuando el factor SRC-1/NcoR (represor) + SMRT es de 2.4 y actúa como antagonista cuando este factor es de 0.8 [Liu et al.,2002]

#### 4. Regulación de las isoformas del RP en el modelo farmacológico y en el modelo fisiológico

Establecer una comparación entre un modelo fisiológico y un modelo farmacológico resulta complejo, pues aunque el objetivo que se persigue es simular farmacológicamente lo que sucede en condiciones fisiológicas, existen elementos en los animales intactos que participan en la regulación del RP como la LH, FSH, prostaglandinas y catecolaminas [Graham y Clarke 1997] entre otros, cuyas concentraciones y acciones se modifican en el animal ovariectomizado. Sin embargo en ambos modelos se pudo observar una regulación muy similar del RP por E2, ya que en el pulmón de ratas ovariectomizadas tratadas con E2 y de ratas intactas durante el proestro (día en el cual las concentraciones plasmáticas de E2 son más altas) el contenido de las isoformas del RP se reguló positivamente. En cuanto a la regulación del RP por su ligando no se pudo establecer una comparación entre ambos modelos, ya que en el ciclo estral se presentan dos incrementos en las concentraciones plasmáticas de P4, durante el proestro (entre las 6:00 y las 9:00 p.m.) y al mediodía del metaestro. Los animales utilizados en los experimentos se sacrificaron a las 12:00 h de cada día del ciclo, por lo que no fue posible comparar los resultados obtenidos del ciclo con los diferentes tratamientos con P4.

#### 5. Dimorfismo sexual de las isoformas del RP en el pulmón

En los machos se observa que el contenido de las isoformas del RP, RE- $\beta$  y SMRT fue menor que en las hembras, mientras que el de SRC-1 fue similar en ambos sexos. Diferencias de género han sido reportadas para las isoformas del RE en el pulmón del humano en condiciones normales y en cáncer de pulmón [Fasco et al 2002]. Se ha demostrado que la expresión del RNAm del RE- $\beta$  fue mayor en las mujeres que en los hombres, tanto en condiciones normales como en

situaciones de cáncer de pulmón (Fasco et al., 2002). También se han reportado diferencias dependientes del sexo en la maduración pulmonar, la cual es mayor en infantes, conejos y ratas hembras en comparación con los machos [Torday et al 1981, Nielsen & Torday 1981, Adamson & King 1984]. La maduración de este tejido podría estar relacionada con diferencias en el contenido de RP entre otros factores.

Resultaría interesante estudiar el papel de la testosterona en la regulación del RP, RE- $\beta$  y SMRT para tratar de explicar la diferencia en el contenido de estas proteínas en los machos, el cual resultó menor al de las hembras.

## 6. Posible papel de la P4 y el RP en el pulmón

La expresión de ambas isoformas del RP en el pulmón sugiere la acción genómica de la P4 en este tejido, que puede ocurrir cuando el RP activo se une a los elementos de respuesta a P4 en genes regulados por este ligando. Lo anterior se puede apoyar en el hecho de que los procesos regulados por la P4 en el pulmón ocurren a tiempos largos de 24 h al menos y usualmente los efectos no genómicos o “rápidos” ocurren en minutos o segundos. Un efecto directo de la P4 en el pulmón también puede ser apoyada por los estudios realizados por Waddell y cols. en los cuales se ha demostrado la presencia de esta hormona en el pulmón de la rata en una mayor proporción, en comparación con sus metabolitos (la relación de P4 con respecto a sus metabolitos fue de 6:1). Sin embargo no se descarta la posibilidad de que tanto la acción genómica como la no genómica participen en la regulación de las funciones de P4 en el pulmón.

La P4 podría regular proteínas involucradas en el proceso de la ventilación. Por ejemplo se ha observado que en el ser humano incrementa la ventilación en la fase lútea del ciclo menstrual y durante el embarazo, cuando las concentraciones plasmáticas de P4 son altas (Goodland y Pommerenke 1952, Goodland et al.,1954). Por otro lado se ha visto que en el pulmón de la rata el factor insulínico de crecimiento 1 (IGF-1) aumenta cuando hay condiciones de hiperoxia y disminuye

cuando hay hipoxemia (Han et al.,1998). El IGF-1 es regulado en el endometrio por la P4 por medio de la regulación de la proteína de unión a este factor (IGFBP-1) (Graham y Clarke 1997). Lo anterior sugiere que la P4 podría regular los efectos del IGF- en el pulmón. Otro gen que en el pulmón es regulado por P4 es el *CYP4A4* (McCabe et al 2001) el cual participa en el metabolismo de prostaglandinas que regulan la contracción muscular.

## XII. CONCLUSIONES

- ◆ En la regulación del mRNA de las isoformas del RP en el pulmón de la rata participan el E2 y la P4.
- ◆ RP-A fue la isoforma predominante en el pulmón de la rata en una proporción de 2:1 con respecto a la isoforma RP-B.
- ◆ La regulación de las proteínas de las isoformas del RP por su ligando es tejido-específica.
- ◆ En el pulmón de la rata la regulación de RP-A y RP-B en condiciones fisiológicas depende, entre otros factores, de las concentraciones séricas de E2 y P4.
- ◆ Existen variaciones en la expresión de las proteínas de las isoformas del RP, RE- $\beta$  y de los cofactores SRC-1 y SMRT en condiciones fisiológicas.
- ◆ Existe dimorfismo sexual en la expresión de la proteína de las isoformas del RP, RE- $\beta$  y SMRT en el pulmón de la rata.

### XIII. PERSPECTIVAS

- ◆ Investigar el papel de la testosterona en la regulación de la expresión del RP y algunas proteínas involucradas con su regulación.
- ◆ Estudiar en el pulmón de la rata la expresión de las isoformas del RP en fetos de machos y hembras.
- ◆ Caracterizar en el pulmón de la rata a los posibles genes regulados por el RP después de la administración de E2 y P4.
- ◆ Estudiar la asociación del RE  $\beta$  con los cofactores SRC-1 y SRMT, además de la interacción de éstos con las isoformas del RP.

#### XIV. REFERENCIAS

1. Adamson IY, King GM, 1984. Sex differences in development of fetal rat lung. Autoradiographic and biochemical studies. *Lab Invest* 50:456-460.
2. Beato M, 1987. Induction of transcription by steroid hormones. *Biochem Biophys Acta* 910:95-102.
3. Beato M, 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344.
4. Beck CA, Weigel NL, Edwards DP, 1992. Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 6:607-620.
5. Beier HM, 1968. Uteroglobin a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochem Biophys Acta* 160:289-291.
6. Beyer C, Kuppers E, Karolczak M, Trotter A, 2003. Ontogenetic expression of estrogen and progesterone receptors in the mouse lung. *Biol Neonate* 84:59-63.
7. Bramley T, 2003. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary:some unresolved issues. *Reproduction* 125:3-15.
8. Brodeur P, Mockus M, McCullough R, Moore LG, 1986. Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. *J Appl Physiol* 60:590-595.
9. Camacho-Arroyo I, 2003. Progesterone receptor isoforms and progesterone actions in the brain. In *Recent Research Developments in Life Sciences*, edn 1., Gayathri A (ed). Research Signpost, Kerala, India, pp 221-242.
10. Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA, 1998b. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9:3993-3996.
11. Camacho-Arroyo I, Hernández Gollas R, Manjarrez J, Alvarado R, 1999. Progesterone microinjections into the pontine reticular formation modify sleep in male and female rats. *Neurosci Lett* 269:9-12.



12. Camacho-Arroyo I, Mendez-Cruz ST, Guerra-Araiza C, Cerbon MA, 1998. Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J Endocrinol* 157:71-74.
13. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA, 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev Invest Clin* 47:329-340.
14. Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM, Cerbón MA, 1994. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and cerebral cortex of the rabbit. *J Steroid Biochem Molec Biol* 50:299-303.
15. Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA, 1994. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J Endocrinol* 142:311-316.
16. Canver CC, Memoli VA, Vanderveer PL, Dingivan CA, Mentzer RM Jr, 1994. Sex hormone receptors in non-small-cell lung cancer in human beings. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108:153-157.
17. Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE, 1990. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of heat shock protein-90 complex. *J Biol Chem* 265:20686-20691.
18. Chomczynski P, Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
19. Christensen K, Estes PA, Onate SA, Beck CA, DeMarzo A, Altman M, Liberman BA, St John J, Nordeen SK, Edwards DP, 1991. Characterisation and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol Endocrinol* 5:1755-1770.

20. Clarke CL, 1993. Ovarian steroid hormone receptors and their mechanism of action. In: Molecular Aspects of Placental and Fetal Autacoids. Rice GE, Brennecke SP (eds). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp 27-54.
21. Clemm DL, Macy BL, Santiso-Mere D, McDonell DP, 1995. The critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol* 53:487-495.
22. Conneely OM, Keffelberger DM, Tsa W, Scrader WT, O'Maley B, 1989. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of alternative translation initiation event. *J Biol Chem* 264:14062-14064.
23. Csapo AI, Resch BA, 1979. Induction of preterm labor in the rat by antiprogesterone. *Am J Obstet Gynecol* 134:823-827.
24. Dalkin AC, Paul SJ, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Yasin M, Marshall JC, 1992. Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J Endocrinol* 132:39-45.
25. Denner LA, Weigel NL, Maxwell BL, Schrader WT, O'Malley BW, 1990. Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science* 250:1740-1743.
26. Dluzen DE, Ramírez VD, 1991. Modulatory effects of progesterone upon dopamine release from the corpus striatum of ovariectomized estrogen-treated rats are sterea-specific. *Brain Res* 538:176-179.
27. Duffy MD, Wells TR, Haluska JG, Stouffer RL, 1997. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod* 57:693-699.
28. Evans R, 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.
29. Fasco MJ, Hurteau GJ, Spivack SD, 2002. Gender-dependent expression of alpha and beta estrogen receptors in human nontumor and tumor lung tissue. *Mol Cell Endocrinol* 188:125-140.

30. Freeman ME, 1988. In :The ovarian cycle of the rat. The Physiology of Reproduction. Knobil E, Neill J (eds). Raven Press, Ltd, New York, pp1893.
31. Ganong WF, 1993. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of pituitary gland. *Front Neuroendocrinol* 14:233-239.
32. Giangrande PH, McDonnell DP, 1999. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* 54:291-313.
33. Giangrande PH, Pollio G, McDonnell, 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 272: 32889-32900.
34. Giannopoulos G, Phelps DS, Munowitz P, 1982. Heterogeneity and ontogenesis of progestin receptors in rabbit lung. *J Steroid Biochem* 17:503-510.
35. González-Morán G, Camacho-Arroyo I, 1998. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat Histol Embryol* 27:277-282.
36. Goodland RL, Pommerenke WT, 1952. Cyclic fluctuations of the alveolar carbon dioxide tension during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 3:394-401.
37. Goodland RL, Reynolds JG, McCoord AB, Pommerenke WT, 1954 Alveolar carbon dioxide tension levels during pregnancy and early puerperium. *J Clin Endocrinol Metab* 14:522-530.
38. Gore-Langton RE, 1988. Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 57:187-198.
39. Graham JD, Clarke CL, 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-519.

40. Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL, 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* 55:5063-5068.
41. Green IC, Howell SL, El Seifi S, Perrin D, 1978. Binding of 3h-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetol* 15:349-355.
42. Guerra-Araiza C Camacho-Arroyo I, 2000 Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev In Clin* 52:686-691.
43. Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I, 2000. Progesterone receptor isoforms expresión pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci* 73:1743-1752.
44. Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, Camacho-Arroyo I, 2002. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 59:105-109.
45. Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Salazar AM, Cerbon MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I, 2001. Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. *Brain Res Bull* 54:13-17.
46. Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I, 2003. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after estradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol* 15:1-7.
47. Gunnet JW, Granger K, Cryan E, Demarest KT, 1999. Characterization of the progestin receptors in the human TE85 and murine MC3T3-E1 osteoblast-like cell lines. *J Endocrinol* 163:139-47.
48. Han RN, Han HK, Buch S, Freeman BA, Post M, Tanswell AK, 1998. Insuline-like growth factor binding protein in air and 85% oxygen exposed adult rat lung. *Am J Physiol* 274:L647-L656.

49. Heinzl T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie Jr, Seto E, Einsenman RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG, 1997. A complex containing NcoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* 387:43-48
50. Horwitz KB, McGuire WL, 1975. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids* 25:497-505.
51. Hosenpud JD, Hart MV, Morton MJ, Hohimer AR, Resko JA, 1983. Progesterone induced hyperventilation in the guinea pig. *Resp Physiol* 52:259-264.
52. Hsue AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr, 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5:76-127.
53. Hurd C, Khatteree N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK, 1995. Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47-D human breast carcinoma cell line. *J Biol Chem* 270:28507-28510.
54. Huse B, Verca SB, Matthey P, Rusconi S, 1998. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 12:1334-1342.
55. Hutchison JS, Nelson PB, Zeleznik AJ, 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology* 119:1964-1971.
56. Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS, 1992. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4658-4662.
57. Ilenchuk T, Walters M, 1987. Rat uterine Progesterone receptor analyzed by [<sup>3</sup>H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology* 120:1449-1456.

58. Ing NH, Beekman JM, Kessler DJ, Murphy M, Jayaraman K, Zendegui JG, Hogan ME, O'Malley BW, Tsai MJ, 1993. In vivo transcription of a progesterone responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic Acids Res* 21:2789-9276.
59. Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB, 1997. The partial agonist activity of antagonist occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain binding coactivator L7/SPA and the corepressors NcoR or SMRT. *Mol Endocrinol* 11:693-705.
60. Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW, 1997. Steroid receptor induction of gene transcription a two step model. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7879-7884.
61. Johannesson M, Ludviksdottir D, Janson C, 2000. Lung function in relation to menstrual cycle in females with cystic fibrosis. *Resp Med* 94:1043-1046.
62. Kaiser U, Hofmann J, Schilli M, Wegmann B, Klotz U, Wedel S, Virmani AK, Wollmer E, Branscheid D, Gazdar AF, Havemann K, 1996 Steroid-hormone receptors in cell lines and tumor biopsies of human lung cancer. *Int J Cancer* 67: 357-364.
63. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P, 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9:1603-1614.
64. Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N, 1993. The ontogeny of gene expression of progestine receptors in the female rat brain. *J Steroid Biochem Molec Biol* 47:173-182.
65. Ke FC, Ramírez VD, 1987. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalami in vitro. *Neuroendocrinol* 45:514-517.



66. Khan S, Abdelrahim M, Samudio I, Safe S, 2003. Estrogen receptor/Sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells. *Endocrinology* 144:2325-2335.
67. Khosla SS, Brehier A, Eisenfeld AJ, Ingleson LD, Parks PA, Rooney SA, 1983. Influence of sex hormones on lung maturation in the fetal rabbit. *Biochim Biophys Acta* 750:112-126.
68. Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, Weigel NL, 2001 Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem* 276:8475-8483.
69. Kraus WL, Katzenellenbogen BS, 1993a. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone end sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132:2371-2396.
70. Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS, 1993. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 7:1603-1616.
71. Lange CA, Shen T, Horwitz KB, 2000. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1032-1037
72. Lee MY, Clark JE, Williams DE, 1993. Induction of flavin-containing monooxygenase (FMO B) in rabbit lung and kidney by sex steroids and glucocorticoids. *Arch Biochem Biophys* 302: 332-336.
73. Lemon B, Tjian R, 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Develop* 14:2551-2569.
74. Leonhardt SA, Altmann M, Edwards DP, 1998. Agonist and antagonists induce homodimerization and mixed ligand heterodimerization of human progesterone receptors in vivo by a mammalian two-hybrid assay. *Mol Endocrinol* 12:1914-1930.

75. Lifschitz-Mercer B, Sheinin Y, Ben-Meir D, Bramante-Schreiber L, Leider-Trejo L, Karby S, Smorodinsky NI, Lavi S, 2001. Protein phosphatase 2 Calpha expression in normal human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 116:31-39.
76. Liu Z, Auboeuf D, Wong J, Chen JD, Tsai SY, Tsai MJ , O'Malley BW, 2002. Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7940-7944.
77. Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW, 2000. The 26 proteome is required for estrogen receptor- $\alpha$  and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor- $\alpha$  transactivation. *Mol Cell* 5:939-948.
78. Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E, 1986. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9045-9049.
79. Mahesh V, Brann D, Hendry L, 1996. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Molec Biol* 56:209-219.
80. Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, Weigel LN, 1997. Differential expression of uterine progesterone receptors forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Molec Biol* 63:195-202.
81. Matsui K, Takeda K, Yu ZX, Valencia J, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ, 2000. Downregulation of estrogen and progesterone receptors in the abnormal smooth muscle cells in pulmonary lymphangioliomyomatosis following therapy. An immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1002-1009.
82. McCabe TJ, Roman LJ , Masters BS, 2001. Induction of rabbit lung CYP4A4 prostaglandin  $\omega$ -hydroxylase by various steroid hormones. *Arch Biochem Biophys* 393:78-86.
83. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW, 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344.



84. Meizel S, Turner KO, 1991. Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol Cell Endocrinol* 77:R1-5.
85. Mendoza-Rodríguez CA, Camacho-Arroyo I, García GA, Cerbón MA, 1999. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception* 59:339-343.
86. Milgrom E, Baulieu EE, 1970. Progesterone in uterus and the plasma. II. The role of hormone availability and metabolism on selective binding to uterus protein. *Biochem Biophys Res Commun* 40:723-730.
87. Misrahi M, Venencie PY, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E, 1993. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochem Biophys Acta* 1216:289-292.
88. Moawad AH, River LP, Kilpatrick SJ, 1982 The effect of oestrogen and progesterone on  $\beta$  adrenergic receptor activity in rabbit lung tissues. *Am J Obstet Gynecol* 144:608-613.
89. Moser EH, Daxenbichler G, 1982. Detection of a heat- and acid-stable progesterone-binding protein in the rat lung. *FEBS Letters* 150:347-353.
90. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL, 1999. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2963-2971.
91. Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP , Conneely OM, 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289:1751-1754.
92. Murphy LJ, Sutherland RL, Stead B, Murphy LC, Lazarus L, 1986. Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 46:728-734.

93. Musgrove EA, Hamilton JA, Lee Cs, Sweenwy KJ, Watts CK, Sutherland RL, 1993. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation on cyclin gene expression associated with changes in T47-D human breast cancer cell progression. *Mol Cell Biol* 13:3577-3587.
94. Musgrove EA, Lee Cs, Sutherland RL, 1991. Progestins both stimulate and inhibit breast cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, c-fos and c-myc genes. *Mol Cell Biol* 11:5032-5043.
95. Nabishah BM, Khalid BAK, Morat PB, Alias AK, Zainuddin M, 1992. Effects of steroid hormones on cyclic adenosine 3', 5-monophosphate levels in rat lung. *J Endocrinol* 134:73-76.
96. Nielsen HC, Torday JS, 1981 Sex differences in fetal rabbit pulmonary surfactant production. *Pediatric Res* 15:1245-1247.
97. Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ, 1995. Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine. *J Neurosci* 15:1285-1297.
98. Park D, Cheon M, Kim C, Kim K, Ryu K, 1995. Progesterone together with estradiol promotes luteinizing hormone beta-subunit mRNA stability in rat pituitary cells cultured in vitro. *Eur J Endocrinol* 134:236-242.
99. Park OK, Mayo KE, 1991. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol* 5:967-978.
100. Park-Sarge OK, Mayo KE, 1994. Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134:709-718.
101. Pearce PT, Khalid BAK, Funder JW, 1983. Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology* 113:1287-1291.

102. Pelosi G, Maffini F, Decarli N, Viale G, 2002. Progesterone receptor immunoreactivity in minute meningothelioid nodules of the lung. *Virchows Arch* 440: 543-546.
103. Pérez-Palacios, 1985. Mecanismos de acción de hormonas esteroides en bioquímica e inmunología. Vol 2. Cap VI, Ed. Hicks, J y Díaz-Agaya J.C. UNAM. México. 346-370.
104. Perrot-Applanat M, David-Ferreira JF, 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. *Cell Tissue Res* 223:1511-1519.
105. Petitti N, Etgen AM, 1992. Progesterone promotes rapid desensitization of alpha 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* 55:1-8.
106. Poletti A, Conneely OM, McDonnell DP, Schrader WT, O'Malley BW, Weigel NL, 1993. Chicken progesterone receptor expressed in *Saccharomyces cerevisiae* is correctly phosphorylated at all four Ser-Pro phosphorylation sites. *Biochemistry* 32:9563-9569.
107. Pollow K, Boquoi E, Baumann J, Schmidt-Gollwitzer M, Pollow B, 1977. Comparison of the in vitro conversion of estradiol-17 beta to estrone of normal and neoplastic human breast tissue. *Mol Cell Endocrinol* 6:333-348.
108. Press MF, Greene GL, 1988. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *Endocrinology* 122: 1165-1175.
109. Regensteiner JG, Woodard WD, Hagerman DD, Weil JV, Pickett CK, Bender PR, Moore LG, 1989. Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women. *J Appl Physiol* 66:808-813.
110. Renwick AG, 1970. Metabolism and function of ovarian and testicular hormones. *J Reprod Fertil Suppl* 12:55-64.

111. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB, 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 277:5209-5218.
112. Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ, 1999. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* 274:22296-22302.
113. Rotchild I, 1983. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin CW, Milgrom E, Mauvais-Jarvis P (eds) *Progesterone and progestins*. Raven Press, New York, pp 219-229.
114. Rowan B, Garrison N, Weigel NL, O'Malley BW, 2000. 8-bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 20:8720-8730.
115. Salvatori L, Pallante P, Ravenna L, Chinzari P, Frati L, Russo MA, Petrangeli E, 2003. Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human ER alpha and beta subtypes via an Sp1 site. *Oncogene* 22:4875-4881.
116. Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB, 1994. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol Endocrinol* 8:1347-1360.
117. Savouret JF, Baily A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A, Milgrom E, 1991. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J* 10:1875-1883.
118. Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E, 1990. Molecular action of progesterone. *Int J Biochem* 22:579-594.

119. Schaeffer C, Roos J, Aron C, 1990. Lordosis behavior in intact male rats: effects of hormonal treatment and/or manipulation of the olfactory system. *Horm Behav* 24:50-61.
120. Schowalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson ADW, Soneely , O'Malley BW, Toft DO, 1991. Characterization of progesterone receptor binding to the 90 and 70-kDA heat shock proteins. *J Biol Chem* 266:21165-21173.
121. Sheridan PL, Evans RM, Horwitz KB, 1989. Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J Biol Chem* 264:6520-6528.
122. Shinoyima N, Tsuru S, Tsugita M, Katsura Y, Takemura T, Rokutanda M, Nomoto K, 1991. Thymic depletion in pregnancy: kinetics of thymocytes and immunologic capacities of the hosts. *J Clin Lab Immunol* 34:11-22.
123. Shirai M, Sato A, Chida K, 1995. The influence of ovarian hormones on the granulomatous inflammatory process in the rat lung. *Eur Respir J* 8:272-277.
124. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389: 194-198.
125. Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H, 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum Reprod* 9:1589-1595.
126. Szabo M, Kilen SM, Nho SJ, Schwartz NB, 2000. Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. *Biol Reprod* 62:95-102.
127. Takimoto GS, Hovland AR, Tasset DM, Melville MY, Tung L, Horwitz KB, 1996. Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors *J Biol Chem* 271:13308-13316.
128. Tatsumi K, Mikami M, Kuriyama T , Fukuda Y, 1991. Respiratory stimulation by female hormones in awake male rats. *J Appl Physiol* 71:37-42.

129. Terner C, 1977. Progesterone and progestins in the male reproductive system.  
Ann NY Acad Sci 286:313-320.
130. Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Fenichel P, Fehlmann M, 1992. progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane. FEBS Lett 1308:116-120.
131. Theveny B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E, 1987. Association of DNA-bound progesterone receptors. Nature 329:79-81.
132. Topper YJ, Freeman CS, 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. Physiol Rev 60:1049-1106.
133. Torday JS, Nielsen HC, Fencel M de M, Avery ME, 1981. Sex differences in fetal lung maturation. Am Rev Resp Dis 123:205-208.
134. Trotter A, Maier L, Grill HJ, Kohn T, Heckmann M, Pohlandt F, 1999. Effects of postnatal estradiol and progesterone replacement in extremely preterm infants. J Clin Endocrinol Metab 84:4531-4535.
135. Trotter A, Maier L, Pohlandt F, 2001. Management of the extremely preterm infant: is the replacement of estradiol and progesterone beneficial? Paediatric Drugs 3:629-637.
136. Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horowitz KB, 1993. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. Mol Endocrinol 7:1256-1265.
137. Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K, 1999. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. Endocrinology 140:805-813.

138. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP, 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7:1244-1255.
139. Vongher JM, Frye CA, 1999. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav* 64:777-785.
140. Waddell BJ , O'Leary PC, 2002. Distribution and metabolism of topically applied progesterone in a rat model. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:449-455.
141. Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM, 1993. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195:525-532.
142. Weisz J, Ward IL, 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106:306-316.
143. Wickens M, Stephenson P, 1984. Role of the conserved AAUAAA sequence: for AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation. *Science* 226: 1045-1051.
144. Wilson GM, Brewer G, 1999. Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* 19:4056-4064.
145. Wong MSJ, Murphy LC, 1991. Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T47-D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:39-44.
146. Yeap BB, Krueger RG, Leedman PJ, 1999. Differential posttranscriptional regulation of androgen receptor gene expression by androgen in prostate and breast cancer cells. *Endocrinology* 140:3282-3291.



147. Ylikomi T, Gasc JM, Isola J, Baulieu EE, Tuohimaa P, 1985. Progesterone receptor in the chick bursa of fabricius: characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology* 117:155-160.
148. Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK, 1998. A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 12:513-524.
149. Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL, 1994. Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II. *J Biol Chem.* 269:31034-1040.
150. Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL, 1995. Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 9:1029-1040.
151. Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement JP 4th, Prendergast P, Yip TT, Hutchens TW, Edwards DP, Weigel NL, 1997. Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol* 11:823-832.
152. Zwain IH, Yen SS, 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140:3843-3852.



## **XV. ARTÍCULOS**



## Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung

Aliesha González-Arenas, Olga Villamar-Cruz, Christian Guerra-Araiza,  
Ignacio Camacho-Arroyo\*

*Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,  
Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, DF, Mexico*

Received 14 October 2002; accepted 31 January 2003

### Abstract

In this work, we determined the expression pattern and the hormonal regulation of progesterone receptor (PR) isoforms in the rat lung of ovariectomized female rats after estradiol (E2) and progesterone (P4) treatments. We also evaluated the content of estrogen receptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) which is the ER isoform expressed in the lung. RNA and proteins were extracted and processed for reverse transcription (RT) coupled to polymerase chain reaction (PCR) and Western blot, respectively. The expression of both PR isoforms in the lung at mRNA and at protein levels was up-regulated by E2 while P4 down-regulated it at mRNA level. P4 did not modify PR isoforms protein content unlike its effect in the uterus where both PR isoforms were down-regulated by their ligand at mRNA and protein levels. PR-A was the predominant isoform, both in the lung and in the uterus. In the lung, ER- $\beta$  was down-regulated by E2 while P4 did not significantly modify the effect of E2. These results suggest that both PR isoforms should be expressed in the rat lung, and that their expression should be differentially regulated at mRNA and at protein levels by P4. We also suggest that the up-regulation of PR isoforms by E2 in the lung is mediated by ER- $\beta$ .

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Progesterone receptor; Isoforms; Progesterone; Estradiol; Lung

### 1. Introduction

Progesterone (P4) participates in the regulation of many pulmonary functions. The administration of this steroid hormone to several species including humans induces hyperventilation [1–4]. P4 mediates the increase in ventilation and the reduction in alveolar carbon dioxide tension observed in the luteal phase of the menstrual cycle and during pregnancy in humans [5,6]. In the rabbit, the treatment with P4 and dexamethasone increases CYP4A4 prostaglandin- $\omega$  hydroxylase activity, whose metabolites have been involved in the regulation of blood flow in the lung [7]. In preterm infants, the treatment with P4 and estradiol (E2) diminishes the incidence of chronic lung disease [8,9]. In female infants, the risk of respiratory distress syndrome is lower than in males since the former exhibit a higher degree of fetal pulmonary maturity [10]. Sex differences in lung maturity have also been reported in rats [11]. In

women with cystic fibrosis lung function improves during the luteal phase of the menstrual cycle when P4 levels are high [12].

Many P4 actions are mediated by specific intracellular P4 receptors (PR), which in various tissues are up-regulated by E2 and down-regulated by P4 [13,14]. Two PR isoforms have been described in the rat: a full length form (PR-B 110 kDa) and the N-terminally truncated one (PR-A, 86 kDa) [15]. Both PR isoforms are derived from a single gene and are generated from either alternative transcriptional or translational start sites [16,17]. The up-regulation of PR by E2 is associated with the presence of estrogen responsive elements located in the promoter regions of both PR isoforms [18].

E2 acts through the interaction with its intracellular receptors (ER), which are negatively regulated by their ligand [19,20]. There are also two ER isoforms: ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ , with a molecular weight of 66 and 54 kDa, respectively. Each isoform is codified by different genes and has different functions [21,22]. ER- $\beta$  is the ER isoform expressed in the rat lung [23].

PR isoforms expression ratio varies among target tissues [24] and under different hormonal conditions such as those

\* Corresponding author. Tel.: +52-55-5622-3098;

fax: +52-55-5616-2010.

E-mail address: igcamacho55@hotmail.com (I. Camacho-Arroyo).

presented during the menstrual and estral cycles [25,26], suggesting that the differential expression of PR isoforms is critical for appropriate cellular response to P4 [27]. Indeed, it has been shown that PR isoforms are functionally distinct in terms of their ability to activate different target genes in the same cell and regulate distinct physiological processes [28,29].

PR have been localized in human lung cancer cells [30], and in the rat and the rabbit lung by binding assays [31,32], immunohistochemical analysis [33] and Northern blot [34]. However, the expression pattern and the hormonal regulation of PR isoforms in the rat lung is unknown. Therefore, we studied the effects of E2 and P4 on PR isoform expression in the rat lung by reverse transcription (RT) coupled to polymerase chain reaction (PCR) and Western blot. We also evaluated the content of ER- $\beta$  which is involved in the regulation of PR expression.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult female Sprague-Dawley rats (250 g) maintained under a 12h:12h light/dark cycle (lights on 6:00h–18:00h), with food and water ad lib were ovariectomized under ketamine anesthesia (80 mg/kg). Two weeks later they were randomly assigned to the following s.c. treatments: (1) daily administration of vehicle (corn oil) alone for 2 days; (2) E2 (5  $\mu$ g/100 g) for 2 days; (3) E2 administered as above followed by P4 (400  $\mu$ g/100 g) on day 3. These steroid doses produce similar physiological serum levels to those found on proestrus day [26]. In the case of treatments (1) and (2), lung and uterus were obtained 24 h after the last dose. In the case of treatment (3), these tissues were obtained 3, 6, 12, 24 and 48 h after the administration of P4.

### 2.2. Total RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated from the rat lung and uterus with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIZOL reagent (Gibco-BRL Inc., Maryland) [35]. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA as previously described [14]. Ten microliters of RT reaction were subjected to PCR in order to simultaneously amplify PR gene isoforms and  $\beta$ -actin gene. This was used as an internal control. The sequences of the specific primers unique for PR-B amplification fragment (from +4 to +247) were 5'-[ACT GAG CTG CAG GCA AAG]-3' in the sense primer and 5'-[CGG ACA GCG ACT GCT GA]-3' in the antisense [36]. The primers used for common PR-A and PR-B amplification region (from +2229 to +2745) corresponding

to the hormone binding domain were 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT GGT G]-3' in the sense and 5'-[CAC CAT GCC CGC CAG GAT CTT G]-3' in the antisense [36]. The 50  $\mu$ l PCR reaction included: 10  $\mu$ l of previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP, 0.5  $\mu$ M of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. After an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, PCR reaction was performed for 30 cycles. The cycle profile for PR and  $\beta$ -actin genes amplification was: 95 °C, 1 min; 60 °C, 1 min; and 72 °C, 1 min. A final extension cycle was performed at 72 °C for 5 min. The number of performed cycles was within the exponential phase of the amplification process. All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The image was captured under a UV transilluminator with a Type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA). The intensity of PR or  $\beta$ -actin bands was quantified by densitometry using a Scan Primax 600p apparatus (Colorado) and the Scion Image software (Maryland). PR isoforms expression level was normalized to that of  $\beta$ -actin.

### 2.3. Protein extraction and Western blotting

The rat lung and uterus were homogenized in TDG lysis buffer with protease inhibitors (10 mM Tris-HCl, 1 mM dithiothreitol, 30% glycerol, 1% Triton X-100, 15 mM sodium azide, 1 mM EDTA, 4  $\mu$ g/ml leupeptin, 22  $\mu$ g/ml aprotinin, 1 mM PMSF, 1 mM sodium ortovanadate). Proteins were obtained by centrifugation for 15 min at 20,000 g at 4 °C and quantified by the method of Bradford (GIBCO/BRL, Maryland). Proteins (100  $\mu$ g) were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE. Pre-stained and chemiluminescent (ECL) markers (BIORAD, CA, USA and GIBCO/BRL, Maryland) were included for size determination. Gels were transferred overnight at 30 mV and at 4 °C to nitrocellulose membranes (Amersham, NJ, USA), which were blocked 2 h at room temperature with 5% non-fat dry milk and 0.5% albumin. They were incubated with antibodies against PR (1  $\mu$ g/ml of mouse monoclonal anti-PR) and ER- $\beta$  (0.5  $\mu$ g/ml of goat polyclonal anti-ER- $\beta$ ) for 2 h at room temperature. Blots were incubated 1 h with a 1:1500 dilution of goat antimouse or rabbit antigoat IgG conjugated to horseradish peroxidase and detected by chemiluminescence (Amersham, NJ, USA).

In order to correct differences in the amount of total protein loaded in each lane, blots were stripped with glycine (0.1 M, pH 2.5, 0.5% SDS) overnight at 4 °C and 30 min at 37 °C, and reprobed with 1  $\mu$ g/ml of goat anti  $\beta$ -actin polyclonal antibody for 2 h at room temperature. Blots were incubated 1 h with a 1:1500 dilution of donkey antigoat IgG conjugated to horseradish peroxidase and detected by chemiluminescence. PR isoforms expression level was normalized

to that of  $\beta$ -actin. All the antibodies were purchased from Santa Cruz, CA.

#### 2.4. Statistical analysis

Data were analyzed by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Dunnett's *t*-test. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values.

### 3. Results

#### 3.1. mRNA expression of PR isoforms

PR isoforms expression at mRNA level was assessed in the lung and uterus of ovariectomized rats treated with E2 and P4 by RT-PCR. In all amplifications single bands of 293, 244 and 220 bp corresponding to the expected size fragments of PR-AB, PR-B and  $\beta$ -actin were obtained (Fig. 1). No bands were observed in negative controls. RT-PCR analysis showed that in the rat lung and uterus the expression of total PR was up-regulated by E2 whereas P4 down-regulated it after 6 h of treatment (Figs. 1 and 2a–c). E2 induced a slight non-significant increase in PR-B mRNA content in the lung. In the uterus this increase was

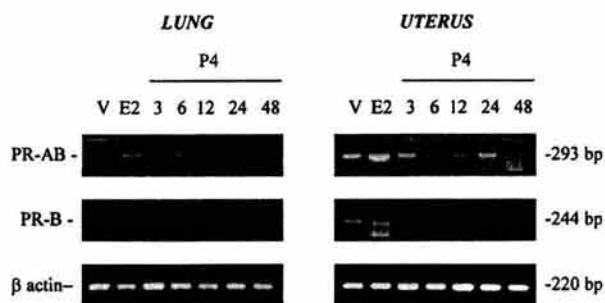


Fig. 1. PR isoforms gene expression in the lung and the uterus of the rat assessed by RT-PCR. A representative assay of 4 simultaneous PR-AB, PR-B and  $\beta$ -actin RT-PCR from total RNA of the lung and the uterus of ovariectomized rats treated with V, E2 and E2 + P4. The animals treated with V and E2 were sacrificed 24 h after the last treatment, while the animals treated with E2 + P4 were sacrificed 3, 6, 12, 24 and 48 h after the treatment with P4. PCR products were separated on 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and detected with UV light.

clearly significant (Fig. 2b and d). PR-B mRNA content in the lung was maintained after 3 h of P4 treatment, but a significant reduction in PR-B expression was observed after 48 h of P4 treatment (Figs. 1 and 2b). In the uterus P4 down-regulated PR-B expression after 3 h of treatment (Figs. 1 and 2d).

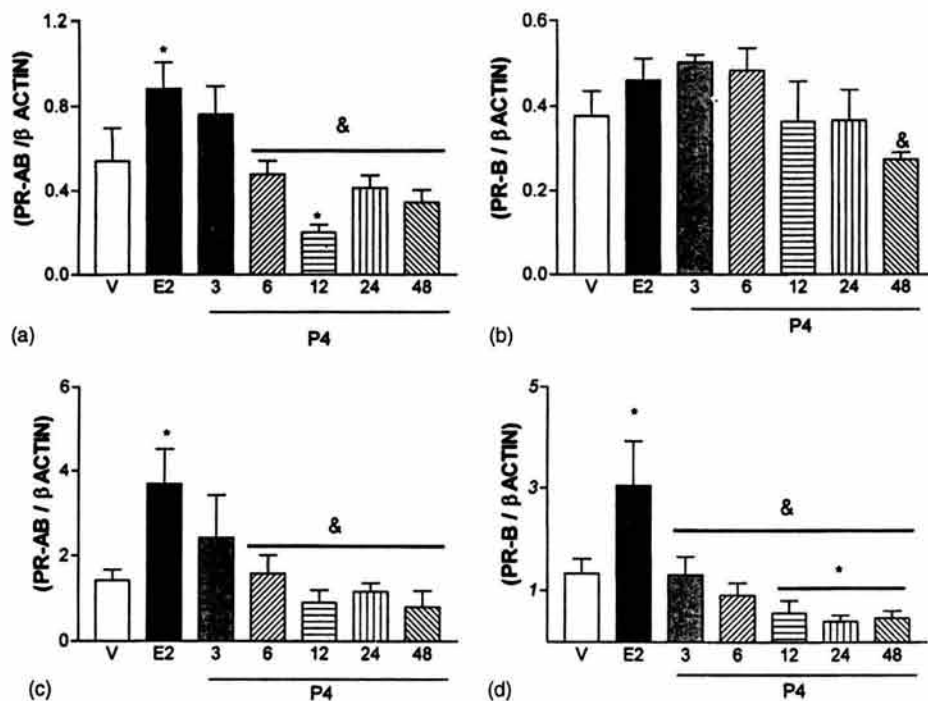


Fig. 2. Densitometric analysis of PR isoforms mRNA expression in the lung and the uterus of the rat. PCR products for the lung (a and b) and the uterus (c and d) were quantified by densitometric analysis and corrected by using data of  $\beta$ -actin mRNA values. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$ ). In all panels (\*)  $P < 0.05$  compared with V and (&)  $P < 0.05$  compared with E2. This latter significant difference was observed after 6 h of P4 treatment in panels a and c and after 3 h of treatment in panel d.

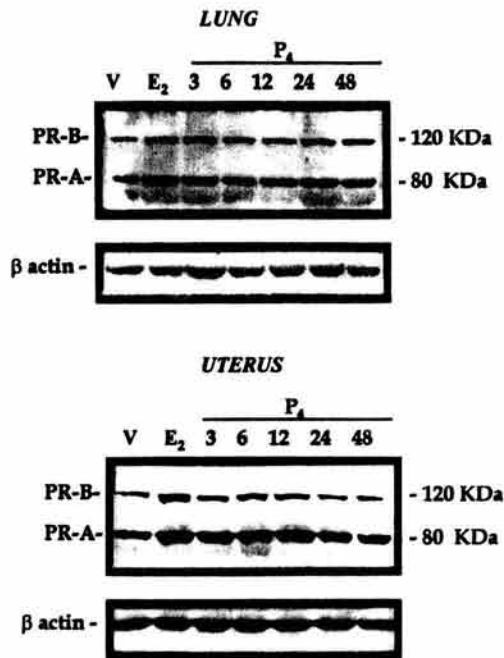


Fig. 3. PR isoforms protein content in the lung and the uterus of the rat. A representative assay of five Western blot experiments is shown. Ovariectomized rats were treated with V, E<sub>2</sub> and E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>. The animals treated with V and E<sub>2</sub> were sacrificed 24 h after the last treatment, while the animals treated with E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> were sacrificed 3, 6, 12, 24 and 48 h after the treatment with P<sub>4</sub>. Proteins from the rat lung and the uterus (100 µg) were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE. Gels were transferred to nitrocellulose membranes and then incubated with an anti-PR antibody, which recognizes both isoforms with the same affinity. PR-antibody complex was detected by chemiluminescence (ECL). Blots were stripped, reprobed with anti-β-actin polyclonal antibody and detected by ECL. β-Actin was used to correct differences in the amount of total loaded protein.

### 3.2. Protein content of PR isoforms

PR isoforms expression at protein level was assessed in the lung and uterus of ovariectomized rats by Western blot. In all experiments two bands of 112 and 80 KDa corresponding to PR-B and PR-A were detected. β-Actin was recognized as a band of 40 KDa. Western blot analysis showed that in the rat lung and uterus both PR isoforms were up-regulated by E<sub>2</sub> (Figs. 3 and 4). Interestingly, P<sub>4</sub> did not significantly modify the effect of E<sub>2</sub> in the lung at any time (Fig. 4a and b). In contrast with the lung, in the uterus PR-A was down-regulated by P<sub>4</sub> after 48 h of treatment (Figs. 3 and 4c) whereas the down-regulation of PR-B occurred earlier (12 h) (Fig. 4d). PR-A was the predominant isoform in the lung (A:B ratio, 2:1), and in the uterus (A:B ratio, 3:1).

### 3.3. Protein content of ER-β

In all experiments, a band of 56 KDa corresponding to ER-β was detected (Fig. 5a). The Western blot data analysis showed that in contrast to PR isoforms ER-β was

down-regulated by E<sub>2</sub> (Fig. 5a and b). P<sub>4</sub> did not significantly modify the effect of E<sub>2</sub> in the lung at any time (Fig. 5a and b).

## 4. Discussion

Our study demonstrates the regulation of both PR isoforms expression at mRNA and at protein levels by E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> in the lung of female rats.

In the lung, E<sub>2</sub> up-regulates mRNA and protein levels of total PR (Figs. 1–4) and down-regulates ER-β (Fig. 5). Several studies, including this one, support the up-regulation of PR by E<sub>2</sub> in other tissues such as the rat uterus [13]. This sensitivity to E<sub>2</sub> is associated with the presence of estrogen responsive elements located in the promoter regions of both PR isoforms [37]. Our data suggest that ER-β should interact with its ligand to regulate PR transcription in the lung. It has been reported that the proteasome 26S degrades ER in a ligand dependent manner [38]. It is possible that the decrease in the content of ER-β produced by E<sub>2</sub> (Fig. 5a and b) could be due to its degradation by the proteasome.

Our data give information about changes in the relative abundance of each PR isoform at mRNA and protein levels in relation to the time of treatment with P<sub>4</sub>. Interestingly, in the lung P<sub>4</sub> exerted its maximal effect at mRNA level over total PR and PR-B at 12 and 48 h, respectively (Fig. 1a and b), while at protein level it did not significantly down-regulate PR isoforms at any time (Fig. 4a and b). These data showed that the regulation of PR isoforms in the lung at mRNA and protein levels is different, suggesting that PR isoforms expression should be regulated both at transcriptional and at translational levels.

At protein level, PR-A was the predominant isoform in the rat lung and uterus, in an A:B ratio of 2:1 and 3:1, respectively, in animals treated with vehicle. PR-A predominance has also been reported in the mouse uterus [15]. The differences between ratios could be related to different physiological functions of each PR isoform in each tissue. In the lung P<sub>4</sub> did not significantly modify the effect of E<sub>2</sub> over PR isoforms content at any time (Fig. 4a and b). In contrast with the lung, in the uterus both PR isoforms were down-regulated by P<sub>4</sub> treatment (Fig. 4c and d). Phosphorylation of serine sites in PR that depends on ligand binding and function as a signal for proteasome degradation has been reported [39]. It is possible that in uterus the down-regulation of both PR isoforms by P<sub>4</sub> could be influenced by phosphorylation of these sites. The difference in the regulation of PR isoforms by P<sub>4</sub> between lung and uterus could be due to the differential tissue expression of mitogen activated protein kinases (MAPKs) 42 and 44 [40], which phosphorylate PR [39], and serine phosphates [41], which dephosphorylate PR; but this deserves further investigation.

The expression of both PR isoforms in the lung suggests a genomic action of P<sub>4</sub> in this tissue, which may occur when the activated PR binds to progesterone responsive elements



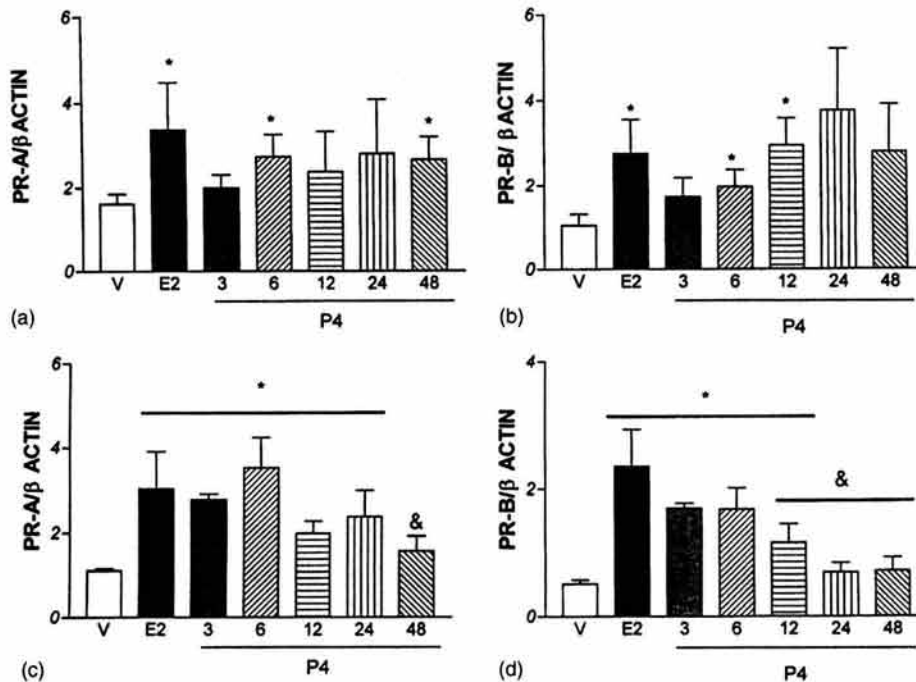


Fig. 4. Densitometric analysis of PR isoforms protein content in the lung and the uterus of the rat. Proteins detected by Western blot for the lung (a and b) and the uterus (c and d) were quantified by densitometric analysis and corrected by using data of  $\beta$ -actin protein content. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$ ). (\*)  $P < 0.05$  compared with V and (&)  $P < 0.05$  compared with E2.

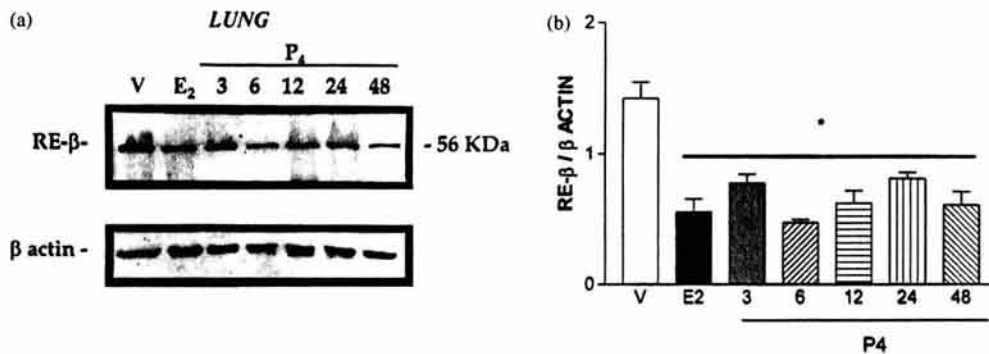


Fig. 5. Protein content and densitometric analysis of ER- $\beta$  in the lung. A representative assay of four Western blot experiments is shown (a). Proteins from the rat lung ( $100 \mu\text{g}$ ) were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE. Gels were transferred to nitrocellulose membranes and then incubated with anti-ER- $\beta$  monoclonal antibody. The protein-antibody complex was detected by chemiluminescence (ECL). Blots were stripped, reprobed with anti- $\beta$ -actin polyclonal antibody and detected by ECL. Proteins detected by Western blot for the lung were quantified by densitometric analysis (b) and corrected by using data of  $\beta$ -actin protein content. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$ ). (\*)  $P < 0.05$  compared with V.

in genes regulated by P4. This could be supported by the fact that the processes regulated by P4 in the lung such as ventilation occurred at long latencies, usually more than 24 h, and most non-genomic actions of P4 occurred at short latencies (seconds or minutes). A direct effect of P4 in lung is also supported by Waddell et al. [42] who demonstrated the presence of this steroid hormone in the rat lung in a major proportion compared with its metabolites (P4:metabolites ratio, 6:1).

Both PR isoforms are physiologically important and it has been reported that they regulate different genes [28,29].

One of the genes regulated by P4 in lung is *CYP4A4*, which has a progesterone responsive element [7]. It would be important to search for more P4 regulated genes in the lung as well as the participation of PR isoforms in the functions of this tissue.

#### Acknowledgements

We thank Dr. Andrea Reyna-Neyra for her technical support and Flora García-Formentí from CELE, Universidad

Nacional Autónoma de México for the revision of the English manuscript. This study was supported by PAIP 6190-07. The first author was supported by CONACYT scholarship 121714.

## References

- [1] P. Brodeur, M. Mockus, R. McCullough, L.G. Moore, Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. *J. Appl. Physiol.* 60 (1986) 590–595.
- [2] J.D. Hosenpud, M.V. Hart, M.J. Morton, A.R. Hohimer, J.A. Resko, Progesterone induced hyperventilation in the guinea pig. *Respir. Physiol.* 52 (1983) 259–264.
- [3] J.G. Regensteiner, W.D. Woodard, D.D. Hagerman, J.V. Weil, C.K. Pickett, P.R. Bender, L.G. Moore, Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women. *J. Appl. Physiol.* 66 (1989) 808–813.
- [4] K. Tatsumi, M. Mikami, T. Kuriyama, Y. Fukuda, Respiratory stimulation by female hormones in awake male rats. *J. Appl. Physiol.* 71 (1991) 37–42.
- [5] R.L. Goodland, W.T. Pommerenke, Cyclic fluctuations of the alveolar carbon dioxide tension during the normal menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 3 (1952) 394–401.
- [6] R.L. Goodland, J.G. Reynolds, A.B. McCoord, W.T. Pommerenke, Alveolar carbon dioxide tension levels during pregnancy and early puerperium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 14 (1954) 522–530.
- [7] T.J. McCabe, L.J. Roman, B.S. Masters, Induction of rabbit lung CYP4A4 prostaglandin  $\omega$ -hydroxylase by various steroid hormones. *Arch. Biochem. Biophys.* 393 (2001) 78–86.
- [8] A. Trotter, L. Maier, H.J. Grill, T. Kohn, M. Heckmann, F. Pohlandt, Effects of postnatal estradiol and progesterone replacement in extremely preterm infants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 4531–4535.
- [9] A. Trotter, L. Maier, F. Pohlandt, Management of the extremely preterm infant: is the replacement of estradiol and progesterone beneficial? *Paediatr. Drugs* 3 (2001) 629–637.
- [10] J.S. Torday, H.C. Nielsen, M. de M. Fencl, M.E. Avery, Sex differences in fetal lung maturation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123 (1981) 205–208.
- [11] I.Y. Adamson, G.M. King, Sex differences in development of fetal rat lung. *Lab. Invest.* 50 (1984) 456–460.
- [12] M. Johannesson, D. Ludviksdottir, C. Janson, Lung function in relation to menstrual cycle in females with cystic fibrosis. *Respir. Med.* 94 (2000) 1043–1046.
- [13] W.L. Kraus, B.S. Katzenellenbogen, Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132 (1993) 2371–2379.
- [14] I. Camacho-Arroyo, A.M. Pasapera, M.A. Cerbón, Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci. Lett.* 214 (1996) 25–28.
- [15] T. Ilenchuk, M. Walters, Rat uterine progesterone receptor analyzed by [<sup>3</sup>H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology* 120 (1987) 1449–1456.
- [16] O.M. Conneely, B.L. Maxwell, D.O. Toft, W.T. Schrader, B.W. O'Malley, The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149 (1987) 493–501.
- [17] P. Kas'ner, A. Krust, B. Turcotte, U. Stropp, L. Tora, H. Gronemeyer, P. Chambon, Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptors forms A and B. *EMBO J.* 9 (1990) 1603–1614.
- [18] W.L. Kraus, M.M. Montano, B.S. Katzenellenbogen, Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 8 (1994) 952–969.
- [19] S.C. Sharma, J.W. Clemens, M.D. Pisarska, J.S. Richards, Expression and function of oestrogen receptor subtypes in granulosa cells. *Endocrinology* 149 (1999) 4320–4334.
- [20] I. Camacho-Arroyo, M.A. Cerbón, A. Gamboa-Domínguez, G. González-Agüero, G. González-Mariscal, Immunocytochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the rabbit submandibular gland. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 123 (1999) 179–186.
- [21] J.I. Macgregor, V.C. Jordan, Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol. Rev.* 50 (1998) 151–196.
- [22] M.K. Lindberg, Z. Weihua, N. Andersson, S. Moverare, H. Gao, O. Vidal, M. Erlandsson, S. Windahl, G. Andersson, D.B. Lubahn, H. Carlsten, K. Dahlman-Wright, J.A. Gustafsson, C. Ohlsson, Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. *J. Endocrinol.* 174 (2002) 167–178.
- [23] P.T. Saunders, S.M. Maguire, J. Gaughan, M.R. Millar, Expression of oestrogen receptor beta (ER  $\beta$ ) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J. Endocrinol.* 154 (1997) R13–16.
- [24] C.L. Bethea, A.A. Widmann, Differential expression of progestin receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary and endometrium of rhesus macaques. *Endocrinology* 139 (1998) 677–687.
- [25] R.K. Mangal, R.D. Wiehle, A.N. Poindexter, L.N. Weigel, Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 63 (1997) 195–202.
- [26] C. Guerra-Araiza, M.A. Cerbón, S. Morimoto, I. Camacho-Arroyo, Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci.* 66 (2000) 1743–1752.
- [27] D.L. Clemm, B.L. Macy, D. Santiso-Mere, D.P. McDonnell, Definition of the critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53 (1995) 487–495.
- [28] J.K. Richer, B.M. Jacobsen, N.G. Manning, M.G. Abel, D.M. Wolf, K.B. Horwitz, Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 5209–5218.
- [29] B. Mulac-Jericevic, R.A. Mullinax, F.J. DeMayo, J.P. Lydon, O.M. Conneely, Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289 (2000) 1751–1754.
- [30] K. Matsui, K. Takeda, Z.X. Yu, J. Valencia, W.D. Travis, J. Moss, V.J. Ferrans, Downregulation of estrogen and progesterone receptors in the abnormal smooth muscle cells in pulmonary lymphangioleiomyomatosis following therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 161 (2000) 1002–1009.
- [31] J.F. Savouret, H. Loosfelt, M. Atger, E. Milgrom, Differential hormonal control of a messenger RNA in two tissues: uteroglobin mRNA in the lung and the endometrium. *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 4131–4136.
- [32] E.H. Moser, G. Daxenbichler, Detection of a heat- and acid-stable progesterone-binding protein in the rat lung. *FEBS Lett.* 150 (1982) 347–353.
- [33] I. Camacho-Arroyo, A. Ruiz, G. Gamboa-Domínguez, G. Pérez-Palacios, M.A. Cerbón, Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J. Endocrinol.* 142 (1994) 311–316.
- [34] I. Camacho-Arroyo, S.T. Méndez-Cruz, C. Guerra-Araiza, M.A. Cerbón, Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J. Endocrinol.* 157 (1998) 71–74.
- [35] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.

- [36] O.K. Park-Sarge, K.E. Mayo, Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate in rat granulosa cells, *Endocrinology* 134 (1994) 709–718.
- [37] J.F. Savouret, A. Bailli, M. Misrahi, C. Rauch, G. Redeuilh, A. Chauchereau, E. Milgrom, Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene, *EMBO J.* 10 (1991) 1875–1883.
- [38] Z. Nawaz, D.M. Lonard, A.P. Dennis, C.L. Smith, B.W. O'Malley, Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 1858–1862.
- [39] C.A. Lange, T. Shen, K.B. Horwitz, Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 1032–1037.
- [40] J. Ortiz, H.W. Harris, X. Guitart, R.Z. Terwilliger, J.W. Haycock, E.J. Nestler, Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine, *J. Neurosci.* 15 (1995) 1285–1297.
- [41] B. Lifschitz-Mercer, Y. Sheinin, D. Ben-Meir, L. Bramante-Schreiber, L. Leider-Trejo, S. Karby, N.I. Smorodinsky, S. Lavi, Protein phosphatase 2C  $\alpha$  expression in normal human tissues: an immunohistochemical study, *Histochem. Cell. Biol.* 116 (2001) 31–39.
- [42] B.J. Waddell, P.C. O'Leary, Distribution and metabolism of topically applied progesterone in a rat model, *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 80 (2002) 449–455.



Sexual dimorphism in the content of progesterone and  
estrogen receptors, and their cofactors in the lung of adult rats

Aliesha González-Arenas, Teresa Neri-Gómez, Christian Guerra-  
Araiza and Ignacio Camacho-Arroyo\*

Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma  
de México, México D.F., México

Running title: Sex steroid receptors and cofactors in rat lung

\*Corresponding author:

Dr. Ignacio Camacho-Arroyo

Facultad de Química, UNAM,

Ciudad Universitaria

Coyoacán 04510, México, D.F.

MÉXICO.

Tel. 5255-5622-3098

Fax. 5255-5616-2010

e-mail: igcamacho55@hotmail.com

## **Abstract**

Progesterone and estradiol play an important role in the regulation of lung functions such as ventilation and vasoconstriction. The genomic actions of progesterone and estradiol are mediated by their nuclear receptors: progesterone receptors (PR) and estrogen receptors (ER). These actions are linked to interactions between steroid receptors and some cofactors that function as coactivators or corepressors. In this work we determined the content of PR isoforms, ER- $\beta$ , one coactivator (SRC-1), and one corepressor (SMRT) in the lung of both female rats during the estrous cycle and intact males by Western blot. The rat lung presented a higher content of PR-A than that of PR-B during the estrous cycle. The highest content of both PR isoforms was observed on the day of proestrus whereas the lowest one was found on the day of estrus. In contrast, the lowest content of ER- $\beta$  was found on the day of proestrus and it increased at estrus. The content of SRC-1 and SMRT increased on the day of diestrus. SRC-1 content decreased at proestrus and estrus, while SMRT content decreased at proestrus and increased again at estrus. In the lung of adult male rats the content of PR isoforms, ER- $\beta$  and SMRT was lower than in that of females, whereas the content of SRC-1 was similar in both sexes. Our results suggest a sexual dimorphism in the content of PR, ER- $\beta$  and SMRT in the rat lung; and that the content of these sex steroid hormone receptors and their cofactors in the lung of female rats is related to the physiological levels of progesterone and estradiol.

*Keywords:* Progesterone receptor isoforms, estrogen receptor  $\beta$ , SMRT, SRC-1, lung

## 1. Introduction

Progesterone (P4) and estradiol (E2) participate in the regulation of many pulmonary functions. The administration of P4 induces hyperventilation in guinea pigs and rats of both sexes and humans [1-4]. P4 also mediates the fall of alveolar carbon dioxide tension observed in the luteal phase of the menstrual cycle and during pregnancy in humans, when P4 levels are high [5,6]. In women with cystic fibrosis lung function improves during the luteal phase of the menstrual cycle [7]. In the adult rat lung P4 treatment diminishes the granulomatous inflammatory process by decreasing both the interferon gamma levels and the activated T cells [8].

The treatment with E2 diminishes vasoconstriction and hypoxia in the adult rat lung by decreasing the expression of endothelin-1, increasing nitric oxide-dependent dilation in pulmonary arteries and prostaglandin release, [9-11]. E2 increases the gas exchange by inducing the formation of alveoli in the lung of adult female rats [12] and also has a protective role against chemical-induced acute inflammation in this tissue [13].

Many actions of P4 and E2 are mediated by specific intracellular receptors (PR and ER) that are members of the nuclear receptor family that activate transcription. In several tissues PR are up-regulated by E2 and down-regulated by P4 [14,15], while ER is negatively regulated by its ligand [16,17].

Two PR isoforms have been described in the rat: a full length form (PR-B, 120 KDa) and the N- terminally truncated one (PR-A, 80 KDa) [18]. Both PR isoforms are derived from a single gene and are generated from either alternative

transcriptional or translational start sites [19,20]. There are also two ER isoforms, ER- $\alpha$  and ER- $\beta$ , encoded by different genes and with a molecular weight of 66 KDa and 54 KDa respectively, [21]. It has been shown that PR and ER isoforms are functionally distinct in terms of their ability to activate target genes in the same cell and regulate different physiological processes [22-24].

Both PR isoforms have been found in the rat lung, and their expression in ovariectomized rats is regulated by E2 and P4 [25,26]. ER isoforms have also been detected in the lung; ER- $\beta$  is the predominant isoform detected in this tissue [27,28] and its content is down-regulated by E2 [26].

The transcriptional activity of PR and ER isoforms has been linked to interactions with general classes of cofactors that act as coactivators or corepressors [29]. Coactivators of the p160 family such as SRC-1 and CBP/p300 have been detected in the lung of rodents by immunohistochemistry and Northern blot analysis [30,31], and the expression of corepressors such as N-CoR and SMRT has been observed in the rat lung by Northern blot analysis [31].

The content of PR isoforms, ER- $\beta$  and their cofactors in the rat lung under physiological conditions is unknown. Therefore, we evaluated the content of these receptors, SRC-1 and SMRT in the rat lung of intact females during the estrous cycle and in intact adult males.

## 2. Experimental

### 2.1. *Intact Animal Experiments*

Adult male and female Sprague–Dawley rats (250 g) were obtained from Harlan (Mexico City). Animals were maintained under a 14:10 h light-dark cycle (lights on 6:00-20:00), with food and water available *ad libitum*. Female rats which presented at least 4 regular 4 day estrous cycle, as determined by daily vaginal smears, were used. Rats (4 / each day) were killed at 12:00 on each day of the estrous cycle, and the lung was excised. The lung of male rats was obtained in the same conditions as that of females. The experiments were performed under the guidelines of the Mexican Law of Animal Protection.

### 2.2. *Protein Extraction and Western Blot*

The rat lung was homogenized in TDG lysis buffer with protease inhibitors (10 mM Tris-HCl, 1 mM dithiotreitol, 30% glycerol, 1% triton X-100, 15 mM sodium azide, 1 mM EDTA, 4  $\mu$ g/ml leupeptin, 22  $\mu$ g/ml aprotinin, 1mM PMSF, 1 mM sodium ortovanadate). Proteins were obtained by centrifugation for 15 min at 20,000 g at 4°C, and quantified by the method of Bradford (Gibco-BRL, Maryland). Proteins (100  $\mu$ g) were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE. Pre-stained and chemiluminescent (ECL) markers (BIORAD, CA, USA and Gibco-BRL, Maryland) were included for size determination. Gels were transferred overnight to

nitrocellulose membranes (Amersham, NJ, USA) at 30 mV and at 4°C, which were blocked 2 hours at room temperature with 5% nonfat dry milk and 0.5% albumin. Blots were incubated with antibodies against PR (1µg/ml of mouse monoclonal anti-PR, Santa Cruz sc-810), ER-β (0.5 µg/ml of goat polyclonal anti-ER-β, Santa Cruz sc-6820), SRC-1 (0.5 µg/ml of goat polyclonal anti-SRC-1, Santa Cruz sc-6097) and SMRT (0.5 µg/ml of goat polyclonal anti-SMRT, Santa Cruz sc-1612) for 2 hours at room temperature. Blots were incubated 1 hour with a 1:1500 dilution of goat anti-mouse IgG (Santa Cruz sc-2005) or donkey anti-goat IgG (Santa Cruz sc-2033) conjugated to horseradish peroxidase and detected by chemiluminescence (Amersham, NJ, USA).

In order to correct for differences in the amount of total protein loaded in each lane, blots were stripped with glycine (0.1 M, pH 2.5, 0.5 % SDS) overnight at 4°C and 30 min at 37 °C, and reprobed with 1µg/ml of goat anti-β actin polyclonal antibody (Santa Cruz sc-1615) for 2 hours at room temperature. Blots were incubated 1 hour with a 1:1500 dilution of donkey anti-goat IgG conjugated to horseradish peroxidase and detected by chemiluminescence. The content of PR isoforms, ER-β, SRC-1 and SMRT was normalized to that of β actin. The intensity of PR isoforms, ER-β, SRC-1, SMRT or β actin signals was quantified by densitometry using a Scan Primax 600p apparatus (Colorado, Utrecht, the Netherlands) and the Scion Image software (Scion Corp., Maryland, USA).

### *2.3. Statistical Analysis*

Data were analysed by using a two way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's t-test. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values.

### *2.4. Radioimmunoassay for E2 and P4*

Serum E2 and P4 levels were measured by using the solid-phase <sup>125</sup>I technique, with the Coat-A-Count kit (Diagnostic Products Corporation), following the method described by the manufacturer. Sensitivity for E2 and P4 with this method was 5 pg/ml and 0.02 ng/ml respectively. The intra- and inter-assay coefficients of variations were 4.8 and 10.7% for E2; and 3.4 and 7.7% for P4, respectively.

### 3. Results

#### 3.1. *PR isoforms content in the rat lung*

PR isoforms content was assessed in the lung of female rats during the estrous cycle and in intact males by Western blot. In all experiments two bands of 120 and 80 KDa corresponding to PR-B and PR-A were detected (Fig. 1). Western blot analysis showed that the highest content of both PR isoforms was observed on the day of proestrus whereas the lowest one was found on the day of estrus (Fig. 2A). The content of both PR isoforms was significantly lower in the lung of males than in that of females (Figs. 1 and 2A). PR-A content was higher than that of PR-B in the lung of both males and females (A:B ratio; mean  $\pm$  SEM: metestrus  $1.60 \pm 0.33$ ; diestrus  $1.22 \pm 0.08$ ; proestrus  $1.10 \pm 0.066$ ; estrus  $1.83 \pm 0.49$ ; males  $2.50 \pm 0.60$ ).

#### 3.2. *ER- $\beta$ content in the rat lung*

In all experiments a band of 56 KDa corresponding to ER- $\beta$  was detected by Western blot analysis in the rat lung (Fig. 1). In contrast to PR isoforms, the lowest content of ER- $\beta$  was found on the day of proestrus and it increased on the day of estrus (Fig. 2B). As in the case of PR isoforms the content of ER- $\beta$  in males was significantly lower than in females (Figs. 1 and 2B).



### 3.3. SRC-1 and SMRT content in the rat lung

SRC-1 and SMRT were detected as bands of 160 KDa in the rat lung. SRC-1 and SMRT content increased on the day of diestrus (Fig. 1). SRC-1 decreased on the days of proestrus and estrus, while SMRT content decreased on the day of proestrus and increased again at estrus (Fig. 3A). The content of SMRT was lower in males than in females while the content of SRC-1 was the same in the lung of both sexes, except on the day of diestrus, when its content was higher in females. The SRC-1/SMRT ratio significantly increased on the day of diestrus and decreased at estrus (Fig. 3B). Interestingly, this ratio was higher in males than in females (Fig. 3B). In all experiments  $\beta$  actin was recognized as a band of 40 KDa.

### 3.4. E2 and P4 levels

The highest serum levels of E2 and P4 were observed on the days of proestrus and metestrus. P4 levels in males were significantly lower than in females, while E2 levels were significantly lower compared to females on the days of metestrus, proestrus and estrus (Table 1).

#### 4. Discussion

The expression of PR isoforms and ER- $\beta$  in the lung of ovariectomized rats treated with E2 and P4, and that of SRC-1 and SMRT in intact animals had been determined [26,30,31]. However, there were no studies in the rat lung about the content of these proteins in models in which steroid sex hormone levels vary in physiological conditions such as the estrous cycle or in adult males. Our study suggests a sexual dimorphism in the content of PR isoforms, ER- $\beta$  and SMRT in the rat lung and that their content in the estrous cycle is related to the physiological levels of E2 and P4.

Although PR-A was the predominant isoform in the rat lung (Figs. 1 and 2A), both PR isoforms could be functional mediators of P4 actions in this tissue, as it has been reported in the mice uterus [32]. The maximal content of both PR isoforms was detected on the day of proestrus (Fig. 2A) when serum E2 levels were the highest and P4 levels were low (Table 1), whereas the lowest content of PR isoforms occurred on the day of estrus (Fig. 2A) after a marked decrease in E2 levels (Table 1).

Our data are in line with those obtained in the lung of ovariectomized rats where PR isoforms expression was up-regulated by E2 [26]. In the rabbit lung PR-B is also up-regulated by the treatment with E2 [33]. This sensitivity to E2 is associated with the presence of estrogen responsive elements located in the promoter region of PR-A [34] and Sp1 binding sites in the promoter of PR-B that

could also be up regulated by E2 [35,36]. The content of both PR isoforms in the lung of adult male rats was lower than in that of females. This sexual difference could be partly due to the low levels of E2 present in males compared with females.

Our work shows that the lowest content of ER- $\beta$  was found on the day of proestrus and it increased again on the day of estrus (Fig. 2B) as it has been reported in other systems such as pituitary cells [37]. These data correlate with binding studies in female rats in which estrogen binding is higher at estrus [38]. In the lung of ovariectomized rats ER- $\beta$  expression was down-regulated by E2 [26].

The observed variations in PR isoforms and ER- $\beta$  in females across the estrous cycle could be related to the regulation of genes that may be necessary for the metabolic requirements if pregnancy occurs. In the adult rat lung the treatment with E2 induces the formation of smaller numerous alveoli that results in an increasing in gas-exchange surface area [13], which is necessary for pregnancy when the O<sub>2</sub> volume increases to cover metabolic demands.

The content of ER- $\beta$  was markedly lower in the lung of male rats than in that of females (Figs. 1 and 2B). Gender differences in ER isoforms have been reported in tumor and nontumor human lung [39]. In that study ER- $\beta$  mRNA content in nontumor lung tissue of women was slightly higher than in men. Sex differences have been reported in lung maturity which is greater in infant, rabbit and rat females than in males [40-42]. The maturation of this tissue could be related to sex differences in the content of PR and ER.

SRC-1 content decreased in the rat lung on the days of proestrus and estrus. Other studies have reported that in ovaries of sheep, cow, and pig the lowest expression of SRC-1 was observed during the luteal phase of the estrous cycle when P4 levels are high [43]. This difference could be due to the species and tissue-specific regulation of this cofactor.

SMRT expression diminished on the day of proestrus and increased at estrus (Fig. 3A). Our results suggest that ER- $\beta$ , SRC-1 and SMRT should be down-regulated by E2 in the rat lung, because all of them decreased on the day of proestrus when there is a significant increase in E2 levels. In line with these results, it has been reported that E2 reduces SRC-1 and SMRT gene expression in the pituitary of the rat [31]. The content of SRC-1 in the rat lung was similar in both sexes but SMRT content was lower in males than in females (Figs. 1 and 3).

The content of SRC-1 compared to SMRT in males was higher than in females, and variations in the SRC-1/SMRT ratio were observed during the estrous cycle. Changes in the SRC-1/SMRT ratio could modulate PR and ER- $\beta$  actions by changing their transcriptional activity. In HeLa and T47D cells the PR antagonist RU486 acts as an agonist when the rate SRC-1/NcoR (also a corepressor)+SMRT is 2.4 and acts as an antagonist when the rate is 0.8 [44].

The expression of both PR isoforms and ER- $\beta$  as well as their cofactors, SRC-1 and SMRT, in the rat lung suggests a genomic action of P4 and E2 in this tissue. This could be supported by the fact that the functions regulated by P4 and E2 in the lung such as ventilation and lung maturation occurred at long latencies, usually more than 24 h, and most non-genomic actions of P4 and E2 occurred at

short latencies (seconds or minutes). A direct effect of P4 in the lung is also supported by Waddell & O'Leary who recently demonstrated the presence of this steroid hormone in the rat lung in a major proportion compared with its metabolites (P4:metabolites ratio, 6:1) [45].

## **Aknowledgments**

We thank Dr. Andrea Reyna-Neyra for her technical support and Flora García-Formentí from CELE, Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) for the revision of the English manuscript. We also thank Dr. Cristina Fernández-Mejía, and Dr. Martha Robles Flores (U.N.A.M.) for their helpful comments to this project. This study was supported by PAIP 6190-07, Facultad de Química, U.N.A.M. The first author was supported by CONACYT scholarship 121714.

## References

- [1] Brodeur P, Mockus M, McCullough R, Moore LG. Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. *J Appl Physiol* 1986;60:590-5.
- [2] Hosenpud JD, Hart MV, Morton MJ, Hohimer AR, Resko JA. Progesterone-induced hyperventilation in the guinea pig. *Respir Physiol* 1983;52:259-64.
- [3] Regensteiner JG, Woodard WD, Hagerman DD, Weil JV, Pickett CK, Bender PR, Moore LG. Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women. *J Appl Physiol* 1989;66:808-13.
- [4] Tatsumi K, Mikami M, Kuriyama T, Fukuda Y. Respiratory stimulation by female hormones in awake male rats. *J Appl Physiol* 1991;71:37-42.
- [5] Goodland RL, Pommerenke WT. Cyclic fluctuations of the alveolar carbon dioxide tension during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* 1952;3:394-401.
- [6] Goodland RL, Reynolds JG, Pommerenke WT. Alveolar carbon dioxide tension levels during pregnancy and early puerperium. *J Clin Endocrinol Metab* 1954;14:522-30.
- [7] Johannesson M, Ludviksdottir D, Janson C. Lung function in relation to menstrual cycle in females with cystic fibrosis. *Resp Med* 2000; 94:1043-6.
- [8] Shirai M, Sato A, Chida K. The influence of ovarian hormones on the granulomatous inflammatory process in the rat lung. *Eur Respir J* 1995;8:272-7.

- [9] Early S, Resta TC. Estradiol attenuates hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L86-L93.
- [10] Gonzales RJ, Walker BR, Kanagy NL.  $17\beta$ -Estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L555-64.
- [11] Sylvester JT, Gordon JB, Malamet RL, Wetzel RC. Prostaglandins and estradiol-induced attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest* 1985;88:252S-254S.
- [12] Massaro GD, Mortola JP, Massaro D. Estrogen modulates the dimensions of the lung's gas-exchange surface area and alveoli in female rats. *Am J Physiol* 1996;270:L110-4.
- [13] Cuzzocrea S, Mazzon E, Sautebin L, Serraino I, Dugo L, Calabro G, Caputi AP, Maggi A. The protective role of endogenous estrogens in carrageenan-induced lung injury in the rat. *Mol Med* 2001;7:478-87.
- [14] Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 1993;132:2371-9.
- [15] Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, Camacho-Arroyo I. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 2002;59:105-9.



- [16] Sharma SC, Clemens JW, Pisarska MD, Richards JS. Expression and function of oestrogen receptor subtypes in granulosa cells. *Endocrinology* 1999;149:4320-34.
- [17] Camacho-Arroyo I, Cerbón MA, Gamboa-Domínguez A, González-Agüero G, González-Mariscal G. Immunocytochemical detection of estrogen and progesterone receptors in the rabbit submandibular gland. *Comp Biochem Physiol A* 1999;123:179-86.
- [18] Ilenchuk T, Walters M. Rat uterine Progesterone receptor analyzed by [<sup>3</sup>H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology* 1987;120:1449-56.
- [19] Conneely OM, Maxwell BL, Toft DO, Schrader WT, O'Malley BW. The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;149:493-501.
- [20] Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptors forms A and B. *EMBO J* 1990;9:1603-14.
- [21] Macgregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1998;50:151-96.
- [22] Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 1988;333:185-8.

- [23] Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 2002;277:5209-18.
- [24] Lindberg MK, Weihua Z, Andersson N, Moverare S, Gao H, Vidal O, Erlandsson M, Windahl S, Andersson G, Lubahn DB, Carlsten H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C. Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. *J Endocrinol* 2002;174:167-78.
- [25] Moser EH, Daxenbichler G. Detection of a heat- and acid-stable progesterone-binding protein in the rat lung. *FEBS Lett* 1982;150:347-53.
- [26] González-Arenas A, Villamar-Cruz O, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85:25-31.
- [27] Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR. Expression of oestrogen receptor  $\beta$  (ER- $\beta$ ) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol* 1997;154:R13-6.
- [28] Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. 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* 1997;138:4613-21.
- [29] Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000;14:121-41.

- [30] Naltner A, Wert S, Whitsett JA, Yan C. Temporal/spatial expression of nuclear receptor coactivators in the mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1066-74.
- [31] Misiti S, Schomburg L, Yen PM, Chin WW. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 1998;5:2493-500.
- [32] Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 2000;289:1751-54.
- [33] Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J Endocrinol* 1994;142:311-6.
- [34] Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Molecular Endocrinology* 1994;8:952-69.
- [35] Salvatori L, Pallante P, Ravenna L, Chinzari P, Frati L, Russo MA, Petrangeli E. Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human ER alpha and beta subtypes via an Sp1 site. *Oncogene* 2003;22:4875-81.
- [36] Khan S, Abdelrahim M, Samudio I, Safe S. Estrogen receptor/Sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells. *Endocrinology* 2003;144:2325-35.

- [37] Childs GV, Unabia G, Komak S. Differential expression of estradiol receptors alpha and beta by gonadotropes during the estrous cycle. *J Histochem Cytochem* 2001;49:665-6.
- [38] Morishigue WK, Uetake CA. Receptors for androgen and estrogen in the rat lung. *Endocrinology* 1978;102:1827-37.
- [39] Fasco MJ, Hurteau GJ, Spivack SD. Gender-dependent expression of alpha and beta estrogen receptors in human nontumor and tumor lung tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2002;188:125-40.
- [40] Torday JS, Nielsen HC, Fencel M deM, Avery ME. Sex differences in fetal lung maturation. *Am Rev Resp Dis* 1981;123:205-8.
- [41] Nielsen HC, Torday JS. Sex differences in fetal rabbit pulmonary surfactant production. *Pediatr Res* 1981;15:1245-7.
- [42] Adamson IY, King GM. Sex differences in development of fetal rat lung. I. Autoradiographic and biochemical studies. *Lab Invest* 1984;50:456-60.
- [43] Hlaing M, Nam K, Lou J, Pope WF, Nephew KP. Evidence for expression of estrogen receptor cofactor messenger ribonucleic acid in the ovary and uterus of domesticated animals (sheep, cow and pig). *Life Sci* 2001;68:1427-38.
- [44] Liu Z, Auboeuf D, Wong J, Chen JD, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7940-4.
- [45] Waddell BJ, O'Leary PC. Distribution and metabolism of topically applied progesterone in a rat model. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:449-455.

**Figure 1. PR isoforms, ER- $\beta$ , SRC-1 and SMRT protein content in the lung of intact adult rats.** A representative assay of 4 Western blot experiments is shown. Proteins from the rat lung (100  $\mu$ g) were separated by electrophoresis on 7.5% SDS-PAGE. Gels were transferred to nitrocellulose membranes and then incubated with anti-PR antibody, anti-ER- $\beta$ , anti-SRC-1 or SMRT monoclonal antibodies. The protein-antibody complex was detected by chemiluminescence (ECL). Blots were stripped, reprobred with anti- $\beta$  actin polyclonal antibody and detected by ECL.  $\beta$  actin was used to correct differences in the amount of total loaded protein. Metestrus (M), diestrus (D), proestrus (P), estrus (E), and intact males ( $\text{O}^{\text{♂}}$ ).

**Figure 2. Densitometric analysis of PR isoforms and ER- $\beta$  content in the rat lung.** Proteins detected by Western blot were quantified by densitometric analysis and corrected by using data of  $\beta$ -actin protein content. (A) PR isoforms and (B) ER- $\beta$ . Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. n=4. \*p<0.05 compared with metestrus and estrus.  $\text{\&p}$ <0.05 compared with estrus. \*\*p<0.05 compared with the other groups.  $\text{\&\&p}$ <0.05 compared with metestrus, diestrus and proestrus. Metestrus (M), diestrus (D), proestrus (P), estrus (E), and intact males ( $\text{O}^{\text{♂}}$ ).

**Figure 3. Densitometric analysis of SRC-1 and SMRT content in the rat lung.**

(A) Proteins detected by Western blot were quantified by densitometric analysis and corrected by using data of  $\beta$ -actin protein content. (B) SRC-1/SMRT ratio was carried out using the data of Western blot analysis of each protein from the lung. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. n=4. <sup>†</sup>p<0.05 compared with proestrus. <sup>\*</sup>p<0.05 compared with diestrus and proestrus. <sup>\*\*</sup>p<0.05 compared with the other groups. <sup>&&</sup>p<0.05 compared with metestrus and estrus. Metestrus (M), diestrus (D), proestrus (P), estrus (E), and intact males (♂).

**Table 1.** Estradiol and progesterone levels in female rats during the estrous cycle and in intact males.

Day	Estradiol (pg/ml)	Progesterone (ng/ml)
Metestrus	15.64 ± 1.01*	12.83 ± 2.33 <sup>&amp;</sup>
Diestrus	8.04 ± 2.63	10.47 ± 4.73
Proestrus	38.57 ± 4.77*	5.90 ± 2.57
Estrus	6.82 ± 1.33	4.63 ± 1.37
Males	10.45 ± 1.45**	1.30 ± 0.20*

Steroid levels were determined by radioimmunoassay. Data are expressed as the mean ± SEM of 4 animals/group. \* p<0.05 as compared with the other groups. \*\*p<0.05 as compared with metestrus, proestrus and estrus, &p<0.05 as compared with proestrus, estrus and males.

Fig. 1

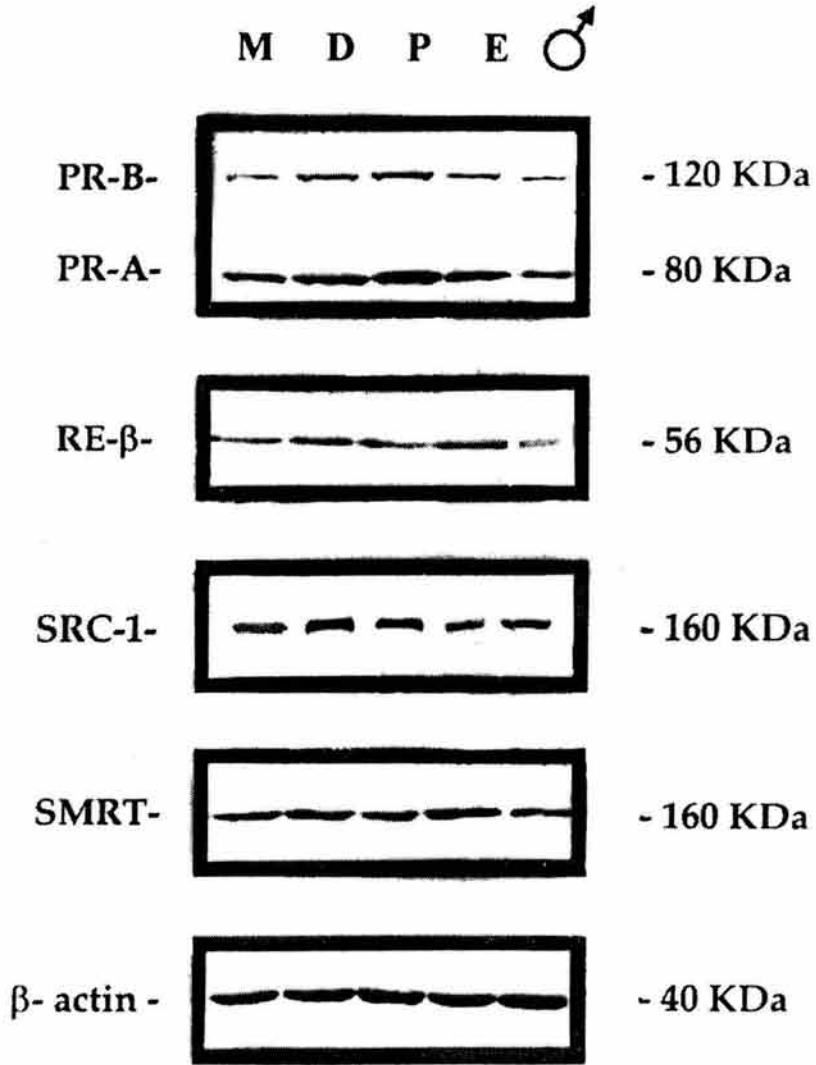




Fig. 2

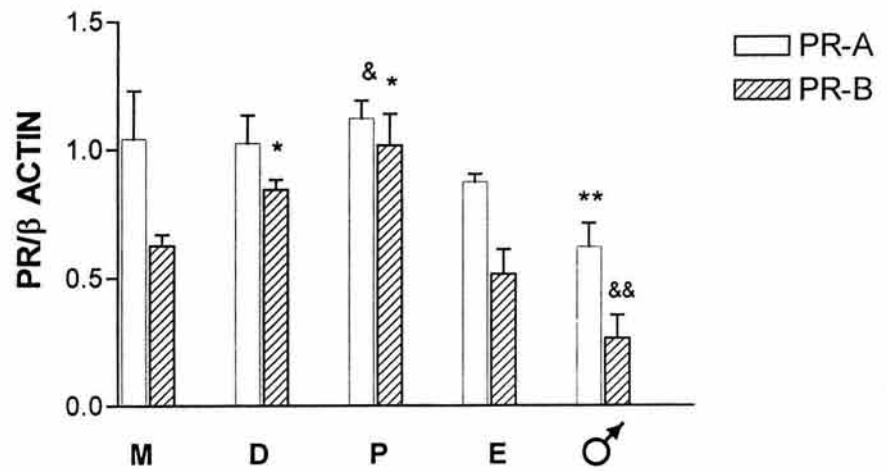
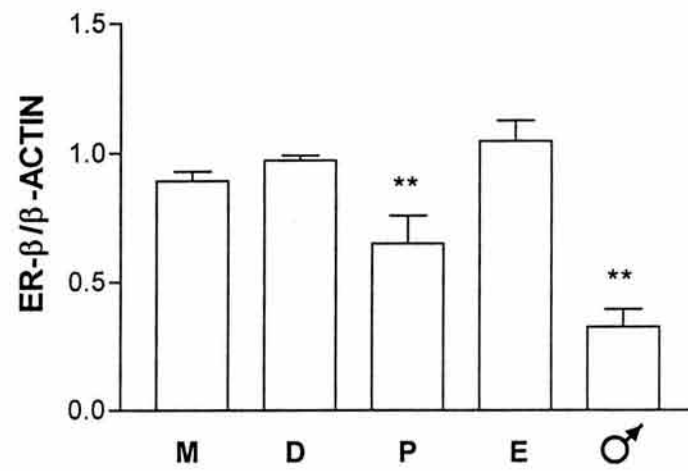
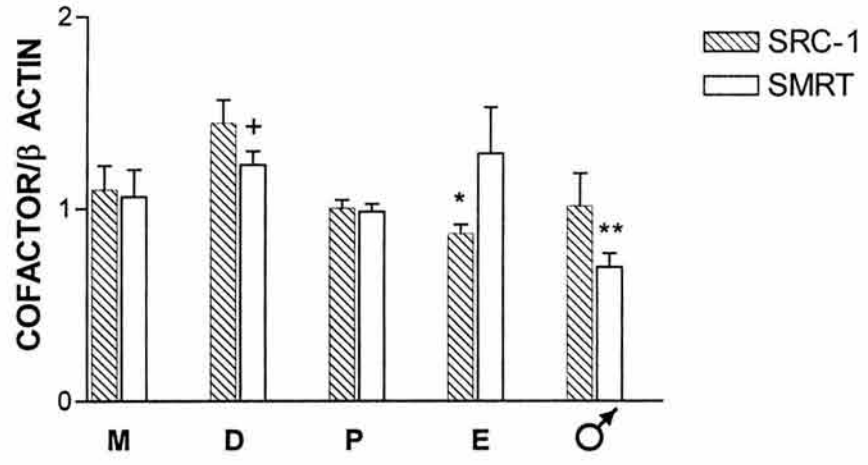
**A****B**

Fig. 3

*A*



*B*

