

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

***NÚMERO Y AFINIDAD DE LOS RECEPTORES A CORTISOL EN LA PLACENTA Y EL
HÍGADO DE CABRA DURANTE LA GESTACIÓN***

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

GABRIELA LÓPEZ

DIRECTORES DE TESIS:

TUTOR: DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ

ASESORES: MVZ. CARLOS MANUEL ROMERO RAMÍREZ

M. en C. ARTURO ÁNGEL TREJO GONZÁLEZ

DR. TOMÁS MORATO CARTAGENA

M. en C. JOAQUÍN FERNANDO HERRERA MUÑOZ

1999

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología de la Reproducción, de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, con la valiosa asesoría del M.V.Z. Carlos Manuel Romero Ramírez, la Dra. Maricela Luna Muñoz, el M. en C. Arturo Ángel Trejo González, el Dr. Tomás Morato y el M. en C. Joaquín Fernando Herrera Muñoz.

La Maestría en Biología Experimental que se imparte en la UAM-Iztapalapa, está incluida en el padrón d excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del convenio 309-0.1407PN, mediante este convenio recibí por dicha institución un apoyo económico durante la realización de los estudios de la maestría antes mencionada, a través de la beca con número de registro 91611; por tal motivo agradezco el apoyo que ésta institución nos brinda a los estudiantes de este posgrado.

DEDICO ESTE TRABAJO CON MUCHO CARIÑO A :

Mi madre, por el amor que he recibido de ella y por el ejemplo de valentía y entereza que siempre ha sido para mi.

Mis hermanos: José Luis, Miguel Ángel, Xochitl y Francisco, por sus demostraciones de cariño y comprensión, los amo.

A todos mis tios y primos, especialmente a mi tío Carlos y a mis primas Rosita, Lupe, Fabia y Marin , por su cariño, sus consejos y por nuestra lejana infancia.

A todos los que ya no estan con nosotros, pero que sinembargo no se han marchado del todo . . . los seguiré queriendo.

Con amor para mis tres tesoros:

Arturo, Arturito y Gaby

Porque sin su amor comprensión y confianza no lo hubiera logrado, los amo.

*A la señora Altagracia Ferreira, a quien agradezco todo su esfuerzo por ayudarnos,
así como el apoyo, el cariño y la comprensión que nos brinda.*

AGRADECIMIENTOS

Al M.V.Z. Carlos M. Romero Ramírez y a la Dra. Maricela Luna Muñoz por sus enseñanzas, tiempo, dedicación y paciencia durante la realización de este trabajo.

Al M. en C. Arturo Ángel Trejo González, al Dr. Tomás Morato y al M. en C. Joaquín Fernando Herrera Muñoz a quienes agradezco sinceramente el esfuerzo, tiempo y dedicación invertidos en la realización y revisión de este trabajo.

De manera especial a la Bióloga Experimental Veronica Lona Díaz por su entusiasmo, e invaluable apoyo desde el inicio de este trabajo, y a la Dra. Brenda Anguiano Serrano por la solidaridad y empeño demostrada en su participación en este trabajo.

A la M. en C. Minerva Muñoz por las fotografías de los animales del rastro y su colaboración en los muestreos.

A la M. en C. Rosario Tarragó y al M. en C. Mario García Lorenzana por su apoyo y compañerismo en el laboratorio.

A la M. en C. Hilda Pérez Vega por sus demostraciones de solidaridad en cualquier circunstancia y por su contagiante espíritu revolucionario.

A Juan Carlos Escobedo Alcántra, Javier López Rosales, Jose Antonio Villalobos y Juan José Gamboa por su gran ayuda y agradable compañía en el laboratorio y los muestreos.

A Cristina Armijo, Yolanda Bedolla y Elizabeth por su compañerismo en el laboratorio.

Al Sr. Miguel gracias por su apoyo en el laboratorio, por su amabilidad y siempre oportuna colaboración.

Al Sr. Melitón y a su hijo por permitirnos amablemente coleccionar las muestras de los animales de su rastro.

Y a todos gracias por lo mejor que me han ofrecido, su amistad, por saber que puedo contar con ustedes.

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ACTH	Adrenocorticotropina hipofisiaria
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CBG	Transcortina o Corticosteroid binding globulin
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CKII	Caseín cinasa
F	Cortisol (reactivo F de Kendall)
Dxm	Dexamametasona
E₂	Estradiol 17-β
RG	Receptores a glucocorticoides
³H-Dxm	Dexamametasona marcada con tritio
³H-P₄	Progesterona marcada con tritio
HE	Hormonas esteroides
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxiquinasa
P₄	Progesterona
TAD	Dominio de activación de la transcripción
UE	Unión específica
UI	Unión inespecífica
UT	Unión total

INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. ANTECEDENTES	2
2.1.1. Control endocrino del parto en la cabra.	2
2.1.2. Anatomía de la placenta caprina	9
2.1.3. El cortisol biosíntesis y regulación de la secreción	16
2.1.4. El Receptor a glucocorticoides	21
2.1.5 Mecanismo de acción de los glucocorticoides	25
2.1.6 Actividad biológica de los glucocorticoides	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	31
3.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
3.2. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL Y METODOS	32
4.1 ANIMALES	32
4.2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	32
4.3 OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN CITOSÓLICA	33
4.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	33
4.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES	34
4.5.1 Estandarización del radioligando de Receptores a Glucocorticoides en citosol de hígado de rata	34
4.5.2. Estandarización del radioligando de Receptores a Glucocorticoides en citosol de tejidos caprinos	35
4.5.3. Determinación de los receptores a cortisol Tipo I y Tipo II	36
4.5.4. Desplazamiento de la unión a ³ H-Dxm por la progesterona	37

4.6. DETERMINACIONES HORMONALES	38
4.6.2. Cuantificación de la concentración de progesterona	38
4.6.3. Determinación de las concentraciones de cortisol	38
4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
5. RESULTADOS	40
5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RADIOLIGANDO PARA RECEPTORES A CORTISOL EN CITOSOL DE HÍGADO DE RATA.	40
5.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RADIOLIGANDO PARA RECEPTORES A CORTISOL EN CITOSOL DE HÍGADO DE CABRA	43
5.3. NIVELES CIRCULANTES DE CORTISOL EN CABRAS	44
5.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RADIOLIGANDO PARA RECEPTORES A CORTISOL EN CITOSOL DE HÍGADO DE FETO CAPRINO	46
5.5. NIVELES CIRCULANTES DE CORTISOL EN FETOS CAPRINOS	49
5.6. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RADIOLIGANDO PARA RECEPTORES A CORTISOL EN CITOSOL DE PLACENTA DE CABRA	50
5.7. NIVELES CIRCULANTES DE PROGESTERONA EN CABRAS GESTANTES	54
6. DISCUSIÓN	57
7. BIBLIOGRAFÍA	64

1. RESUMEN

En este trabajo se analizan los cambios en número y afinidad de los receptores a glucocorticoides (RG) en el hígado y la placenta de cabras con el fin de aportar mayores elementos para explicar la alta incidencia del aborto caprino. Se utilizaron 30 cabras mestizas (cinco no gestantes y 25 en cinco diferentes etapas de gestación: a) 40-50, b) 51-75, c) 76-100, d) 101-125 días de gestación y e) 126 días de gestación al parto. Estos animales se obtuvieron de un rastro, se tomaron muestras sanguíneas de los fetos (cordón umbilical) y las madres (yugular), muestras de hígado fetal y materno, y tejidos placentarios (carúncula y cotiledón). De las muestras de sangre se separó el suero, en el cual se determinaron las concentraciones de cortisol (F) y progesterona (P_4) en el suero de las madres y de F en el suero de los fetos. El F se determinó por medio de un ensayo de unión a proteínas y la P_4 mediante un radioinmunoensayo. De cada uno de los tejidos se obtuvo la fracción citosólica, en la cual se determinó la cantidad de RG mediante la técnica de radioligando, utilizando dexametasona marcada con tritio, como ligando.

Las principales modificaciones en los parámetros evaluados en las madres y en los fetos se observan en la etapa de 101-125 días de gestación. En la cabra se incrementa, con respecto a la etapa anterior, el número y disminuye la constante de afinidad de RG en la placenta (6.09 ± 1.49 a 18.13 ± 3.03 fmol/mg de proteína; $K_a = 3.53$ a 2.06 nM), junto con este incremento se observa una elevación de los niveles circulantes de F materno (de 67.0 ± 35.0 a 659.0 ± 194.0 nmol/L). En el mismo periodo los niveles de P_4 materna disminuyen con respecto a las etapas anteriores (de 23.37 ± 17.71 a 17.71 ± 5.62 nmol/L), al igual que la afinidad de los RG por esta hormona; por lo cual es posible que el efecto protector que la progesterona proporciona a la gestación se vea disminuido. Así resulta que con estos cambios fisiológicos el animal en esta etapa de la gestación es altamente sensible a los efectos del F en la placenta. Los cambios que se manifiestan en esta etapa (101-125 días de gestación) coinciden con la etapa en la cual ocurren con más frecuencia los abortos (102-134 días de gestación). En conjunto este trabajo muestra que durante esta etapa de la gestación la concentración de F materno frente al estrés es alta y los RG en la placenta se encuentran en mayor cantidad y con más afinidad a este glucocorticoide; es decir se encuentran dadas las condiciones para que la cabra aborte si se enfrenta a situaciones estresantes durante el último tercio de la gestación.

2. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo es parte de un proyecto prospectivo y multidisciplinario, apoyado en observaciones anteriores de nuestro grupo, que pretende mostrar la existencia de un Síndrome General de Adaptación durante la gestación de los rumiantes domésticos; en donde una gran proporción de los abortos caprinos serían una de las formas de la manifestación clínica del estrés en esta especie. El proyecto pretende además describir y distinguir las rutas metabólicas y endocrinas que conllevan a las diferentes manifestaciones clínicas del estrés en cada especie.

Este proyecto se inició con una cercana y fructífera relación con los caprinocultores, la alta incidencia de abortos en las cabras de nuestro país los ha preocupado desde hace tiempo, los primeros acercamientos con especialistas de la medicina veterinaria llevó a buscar y descartar a agentes infecciosos como causantes principales de los abortos. El acercamiento con nuestro grupo indujo a explorar y tratar de demostrar un mecanismo metabólico-endocrino que provoca el aborto en las cabras. Así se demostró (Romero et al., 1998) una asociación entre abortos y elevaciones en el cortisol* (F) materno como consecuencia de vientos con frío y heladas que provocan variaciones en la temperatura ambiente de más de 20 C en un día.

En esta investigación se analiza el número y la afinidad de los receptores a F (R-F) en el hígado y la placenta de cabras durante la gestación, con objeto de explorar su posible relación con la elevada frecuencia del aborto caprino durante situaciones de estrés.

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. Control Endocrino del Parto en la Cabra

El parto en la cabra es precedido por la regresión del cuerpo lúteo, principal fuente de progesterona (P_4) durante la preñez en esta especie; la luteólisis disminuye bruscamente los niveles plasmáticos de P_4 a la vez que incrementan las concentraciones sanguíneas de

* El cortisol fue descrito originalmente como la sustancia F de Kendall; y aún se conserva esta sinonimia.

estrógenos del animal gestante. Esto se ha confirmado con base en estudios que muestran que la ovariectomía en la cabra induce el aborto y que este puede ser retardado por la administración de dosis elevadas de P_4 (Meites, 1951; Linzel and Heap, 1968).

Entre los factores endocrinos involucrados en la iniciación del parto en esta especie, el F juega un papel fundamental ya que es el responsable de la disminución de los niveles de P_4 y el incremento en los niveles de estrógenos que desencadenan el trabajo de parto (Currie and Thorburn, 1977). El F fetal inicia los mecanismos endocrinos que llevan a la inversión de las concentraciones de estrógenos y P_4 encontradas al final del parto. A continuación se presenta una sinopsis del desarrollo del conocimiento sobre este fenómeno, que tiene su origen en una serie de observaciones clínicas y una gran cantidad de experimentos en la oveja, algunos de ellos corroborados en la cabra.

En fetos de ovejas de 134 días de gestación, la lesión del 70% o más de la hipófisis por electrocoagulación prolonga indefinidamente la preñez (Liggins et al., 1967). En otros experimentos, la hipofisectomía fue seguida de una marcada hipoplasia de la corteza adrenal del feto (Liggins and Kennedy, 1968).

Por otra parte, la infusión continua por vía intraperitoneal de 0.1 mg /día de ACTH, a fetos de oveja (95 - 135 días de gestación), adelantó el nacimiento entre los 4 a 7 días de infusión. Las adrenales fetales pesaban cuando menos lo mismo que las de los corderos normales nacidos a término. También se encontró que la administración de F a dos fetos, en dosis de 50 mg/24 horas fue seguida de parto prematuro a las 30 y 36 horas, respectivamente (Liggins, 1968).

La adrenalectomía en fetos ovinos entre los 110 y 120 días prolongó la gestación, la cual fue interrumpida por cesárea a los 160 y 180 días de gestación (Drost y Holm, 1968). Esto demuestra la importancia de la función adrenal del feto para que la gestación concluya normalmente entre los 150 ± 5 días.

Los experimentos anteriores pusieron de manifiesto la importancia funcional del eje hipotalamo-hipófisis-adrenal del feto en los mecanismos endocrinos que participan en la

iniciación del trabajo de parto. Sobre esta base se propuso el esquema de control endocrino del parto que se esquematiza en la Figura 1, (Liggins et al., 1973).

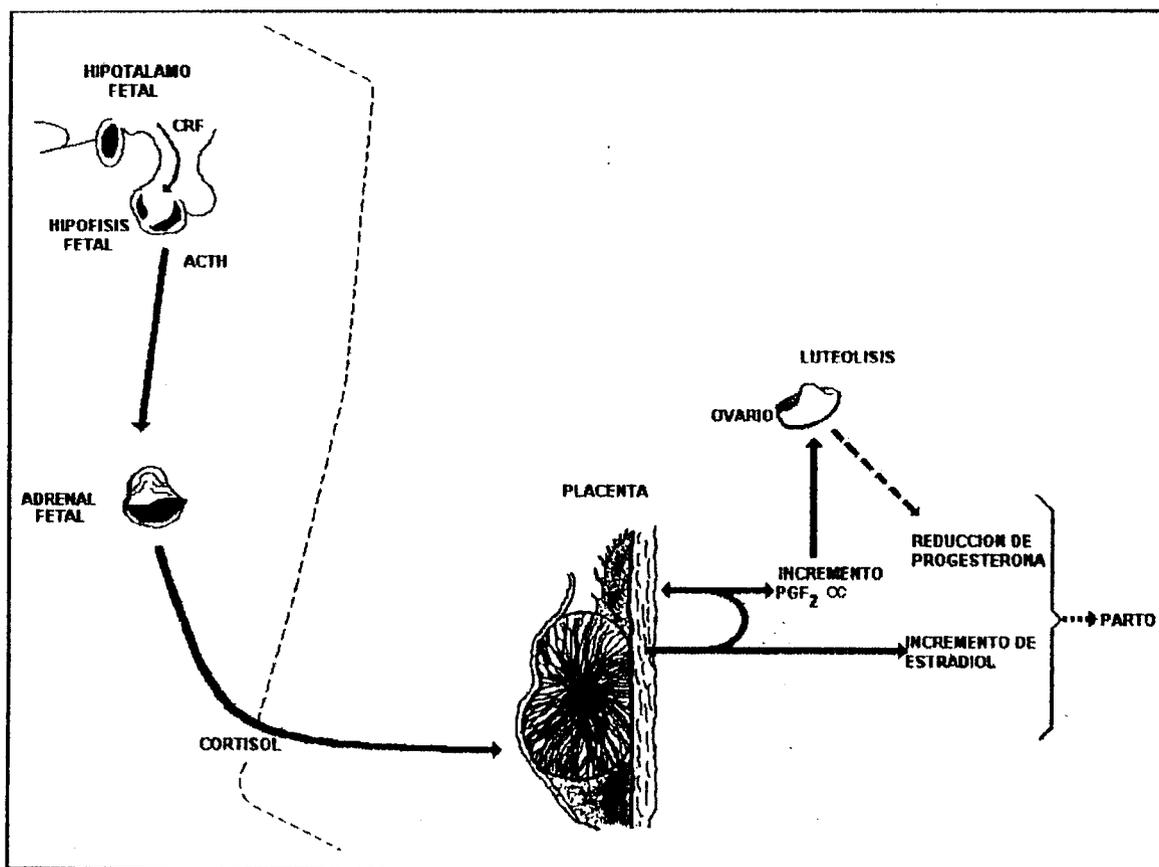


Figura 1. Diagrama propuesto por Liggins para representar el control endocrino del parto en la oveja. El incremento de cortisol fetal actúa modificando la síntesis de esteroides en la placenta; desvía la síntesis de progesterona hacia estradiol-17 β por consiguiente se incrementa la concentración de estradiol-17 β en la circulación materna, induciendo la producción uterina de PGF_{2 α} que causa luteólisis y la disminución de los niveles periféricos de progesterona, ocasionando el parto.

En la cabra al igual que en la oveja, se han determinado las concentraciones de glucocorticoides fetales, y los niveles maternos de prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}) en la circulación útero-ovárica, así como los niveles periféricos de P₄ y estradiol-17 β (E₂) (Currie, 1975). Estos

estudios han mostrado que los glucocorticoides fetales se incrementan en los últimos 11 a 13 días de gestación y particularmente en los últimos 3 días. Los mayores niveles (160 a 300 ng/ml) ocurren durante la etapa de trabajo de parto (Currie and Thorburn, 1977).

En el compartimiento materno, aproximadamente 24 horas antes del parto, la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ se incrementa en la vena uterina de 0.6 ng/ml durante el estado previo al parto a 340 ng/ml durante la labor, asociándose esta elevación con la regresión lútea y la disminución concomitante de P_4 a valores menores de 1.0 ng/ml. Simultáneamente el E_2 alcanza concentraciones promedio de 60 ng/ml durante las 12 horas próximas al parto (Currie et al., 1976; Currie and Thorburn, 1977).

Los mecanismos que llevan a la inversión de las concentraciones de E_2 y P_4 pueden ser activados por el F aunque este no provenga de la circulación fetal. Los trabajos que apoyan este hecho se resumen a continuación:

Fylling (1971) demostró que la administración intramuscular de dexametasona (Dxm) en dosis de 6.0 a 10.0 mg/día durante 4 días de tratamiento, provoca disminución en las concentraciones periféricas de P_4 y parto prematuro en la oveja. En el mismo año Van Rensburg (1971), sugirió que la causa de aborto en la cabra de Angora parecía estar relacionada íntimamente con un elevado metabolismo prioritario para el crecimiento del pelo, artificialmente inducido por una intensiva selección consanguínea; que indirectamente inducía a seleccionar animales con hipofunción adrenal. Un bajo nivel de la función adrenal, unido con algunos cambios cualitativos en la biosíntesis de esteroides adrenales parecía ser el mecanismo responsable del aborto. La adaptación fisiológica incluye hiperplasia adrenal con el fin de apoyar la transferencia de nutrientes maternos al feto. El aborto entonces es una consecuencia de la falla de estos mecanismos. Posteriormente, Wentzel y colaboradores (1975b) propusieron dos tipos de aborto en las cabras, los primeros de fetos "frescos" con aspecto normal y los segundos de fetos edematosos que eran expulsados después de un tiempo variable de haber muerto y los autores demostraron que el primer tipo de aborto resultaba de condiciones estresantes, tales como las determinadas por dietas con contenido energético inferior al del

mantenimiento y asociada a un notable aumento en el nivel de estrógenos en el plasma materno observado poco después de reducir el nivel energético de nutrición. Posteriormente mostraron que la causa desencadenante primaria era un descenso de la concentración de glucosa en la sangre materna (Wentzel et al., 1976). Lo anterior sugiere que una alimentación pobre en energía y probablemente otros factores de estrés influyen en la esteroidogénesis placentaria y que los elevados niveles de esteroides maternos están íntimamente relacionados con el fenómeno del aborto. En el segundo tipo de aborto, en el que el feto había muerto y la madre presentaba edema en el útero, Wentzel y colaboradores (1975a) encontraron al igual que Van Rensburg, valores de F anormalmente altos en las cabras abortadoras. La administración de cantidades excesivas de cortisona a cabras gestantes provocó aborto en el 78% de las cabras tratadas (Wentzel and Roelofse, 1975).

En un experimento realizados en nuestro laboratorio (Romero et al., 1998), se encontró una relación entre un tipo de aborto (no infeccioso) en cabras y el incremento en las concentraciones en suero de F materno. En este experimento se colectaron semanalmente, muestras de sangre de cabras gestantes para determinar las concentraciones circulantes de F y P₄ durante el último tercio de la preñez (90-150 días). Utilizando los partos y abortos como criterio se formaron dos grupos; uno con los animales que parieron a termino y otro con los animales que abortaron. En dicho experimento observamos que la concentración en suero de F en el compartimiento materno de cabras durante el último tercio de la gestación, oscila alrededor de 13 ± 8 ng/ml; y no se observan modificaciones en la concentración de F en el compartimiento materno hasta los 3 días antes del parto. Por otra parte, la concentración promedio de F plasmático en las cabras abortadoras, durante el último tercio de la gestación fue semejante a las primeras (17 ± 10 ng/ml), incrementándose hasta 46 ± 28 ng/ml solamente en el intervalo de -7 a 0 días preaborto. Por otra parte, los niveles de P₄ mostraron una correlación negativa ($r = -0.99$) con los niveles de F a partir del intervalo -21 a 0 días del parto o el aborto.

En otro experimento en nuestro laboratorio, se realizó un análisis comparativo de la concentración de F frente a la hipoglucemia inducida por insulina en cabras y ovejas en el último tercio de la gestación, se utilizó a la hipoglucemia como uno de los factores estresantes involucrados en los abortos caprinos y la toxemia de la preñez en las ovejas. En este trabajo los animales (3 experimentales y 2 testigos por cada especie) se sometieron a ayuno 24 horas antes del experimento. En el tiempo cero se desafió a los grupos experimentales con 2 UI de insulina por kg de peso vivo (insulina Lilly R U-100, de acción rápida 100 regular). Los resultados mostraron que la respuesta máxima de la glucosa a la insulina se establece a partir de los 30 minutos y se mantuvo a lo largo del experimento (180 minutos), indicando que la hipoglucemia es mayor en las cabra que en las ovejas. Por otra parte, la respuesta del F a la hipoglucemia se observa entre los 30 y 150 minutos. Las ovejas responden con una mayor concentración de F (135.91 ± 65.19 ng/ml), comparado con la cabras (56.1 ± 18.04 ng/ml). Además dos de las cabras experimentales parieron prematuramente al término del experimento y una al día siguiente, mientras que en las ovejas aún con las concentraciones de F alcanzadas no desencadenaron el parto (López y col., 1996).

Los trabajos antes descritos muestran que cualquiera que sea el origen del cortisol (fetal o materno, endógeno o exógeno), éste es capaz de inducir un trabajo de parto, incluso adelantado produciendo abortos. Los cambios biosintéticos que determinan la inversión de los niveles de P_4 y E_2 han sido dilucidados en gran medida en la oveja y se describen adelante. Pero independientemente del origen del glucocorticoide, este tendrá que encontrarse un órgano blanco en capacidad de responder al estímulo y de ahí que la población de R-F en un momento dado también sea importante para producir una respuesta.

France y colaboradores (1988) encontraron que las actividades de la aromatasa y la 17α -hidroxilasa de la placenta ovina se incrementan en el periodo periparto inmediato en respuesta a la infusión fetal de Dxm. Donde el incremento de la actividad de la aromatasa es de aproximadamente el triple de los niveles basales (5.6 ± 1.6 pmol/min/mg de proteína), la actividad de la 17α -hidroxilasa se incrementa hasta 600 veces (de 0.5 hasta 320 pmol/min/mg de proteína). La Dxm y presumiblemente el F fetal en la preñez normal, ejercen su efecto sobre la 17α -hidroxilasa por un incremento en el ácido ribonucleico mensajero para el citocromo P₄₅₀ y de ahí a la actividad de la enzima, a través de la inducción de la transcripción del gen para 17α -hidroxilasa o algún proceso postranscripcional aún indefinido, (Figura 2). La activación de esta enzima placentaria da como resultado un aumento en la conversión de la P₄ a 17α -hidroxiprogesterona que es un metabolito más polar y prácticamente sin actividad progestacional. Además, este metabolito puede ser transformado a andrógenos por acción de la 17-20-liasa presente en la placenta y posteriormente aromatizado a E₂ (Flint et al., 1979).

Evidencias experimentales previas encaminadas a detectar el metabolismo de los esteroides en la placenta de la cabra señalan que, en la etapa final de la gestación la placenta de la cabra difiere con la de la oveja, en que ésta metaboliza rápidamente la P₄ a 5- β -pregnandiol "in vitro". Sin embargo, como en la oveja, cuando la placenta es expuesta a cortisol endógeno o exógeno, el metabolismo de P₄ se dirige hacia 17α -hidroxiprogesterona (Flint et al., 1978).

En la cabra no existen evidencias *in vivo* de que la elevación de E₂ al término de la gestación se deba a la diferencia de concentración arterio venosa en el útero para estrona o E₂ (Thorburn et al., 1972), y no hay evidencias de un incremento en la tasa de producción de estrona (Chalis and Linzel, 1971).

2.1.2. Anatomía de la placenta caprina

La especialización de las membranas embriogénicas y el desarrollo del endometrio como un órgano de nutrición y secreción interna es el resultado de una verdadera viviparidad. Dentro de las formas de reproducción sexual más avanzadas se requiere una íntima conexión nutritiva entre madre e hijo. Esta unión entre los tejidos fetales y maternos para un propósito de intercambio fisiológico se define como una placenta, el órgano anatómico y fisiológico esencial para la viviparidad (Wynn, 1968).

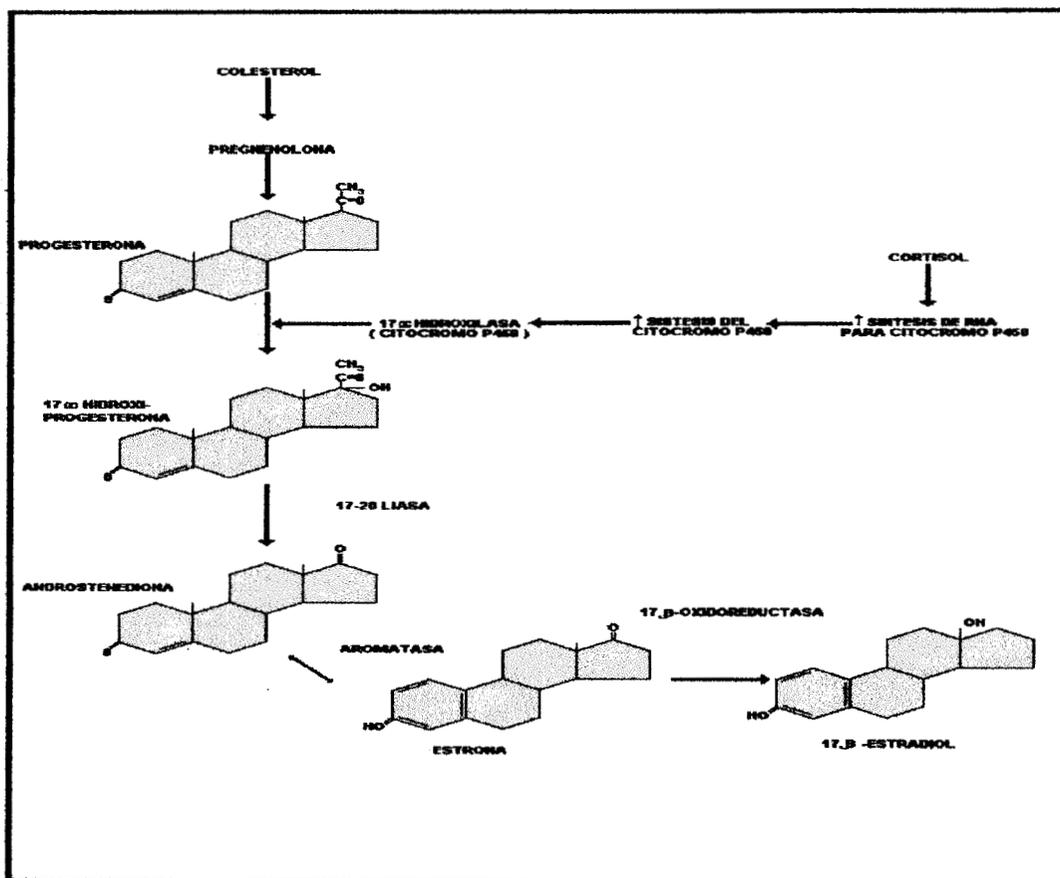


Figura 2. Modificaciones preparto de la esteroidogénesis en la placenta ovina inducidas por el cortisol fetal. El cortisol fetal estimula la síntesis de la enzima 17 α -hidroxilasa la cual desvía la síntesis de progesterona hacia 17 α -hidroxiprogesterona, que en presencia de las enzimas 17, 20 liasa y aromatasa es convertida a androstenediona, después a estrona y finalmente a estradiol-17 β .

La placentación representa un medio de comunicación entre dos organismos pero con cierto grado de restricción. La unión es lo bastante íntima para permitir que materiales nutritivos pueden atravesar con facilidad de la madre al feto, y sustancias de desecho del feto hacia la madre. Durante la gestación la madre no solo sirve como un hospedero que provee alimento, sino además comparte sus sistemas respiratorio y urinario con el feto.

La clasificación de las placentas desde el punto de vista histológico, está basada en el número de capas de tejido que separa la sangre materna de la sangre fetal (Tabla 1). Todos los animales inician el proceso de placentación con seis capas de tejido entre las sangres fetal y materna, pero a medida que la implantación se torna más desarrollada disminuyen las capas de tejido que permanecen. Así resulta que la unión *epiteliocorial* observada en cerda y yegua consta de seis capas. Esta es la forma más simple de placentación y consiste meramente de una aposición de los tejidos de las placentas de los dos organismos. El tipo de placentación *sindesmocorial* en los rumiantes involucra la disminución de una de las capas, el revestimiento epitelial del útero. Bjorkman encontró un sincicio entre el trofoblasto y el tejido conectivo materno de la oveja el cual puede causar que la clase *sindesmocorial* se considere como *epiteliocorial* (McDonald, 1989). Si dos de las capas están ausentes, entonces cuatro capas separan la sangre de los dos organismos, y ésta es denominada placenta de tipo *endoteliocorial*. Si disminuye otra capa de tejido de tal forma que solo persistan tres capas el tipo de unión es *hemocorial* y está presente en primates. En estos animales el corion está bañado por la sangre de la madre debido a que el endotelio de los vasos sanguíneos del útero se ha consumido. En el caso de la rata, el conejo y el cobayo la placenta es de tipo *hemoendotelial*, es decir, solo una capa de tejido, el endotelio de los capilares fetales separa los dos sistemas sanguíneos. Muchos autores describen el

Cuadro 1. Clasificación anatómica e histológica de las placentas.

Clasificación Anatómica	Clasificación histológica	Especies	Capas de tejido	Tejidos maternos (Membrana uterina)			Tejidos fetales (Alantocorion)		
				Endotelio de vasos sanguíneos	Tejido conectivo	Epitelio uterino	Trofoblasto (corion)	Tejido conectivo	Endotelio de vasos sanguíneos
Difusa	Epiteliocorial	cerda yegua burra	6	+	+	+	+	+	+
Cotiledonaria	Sindesmocorial	vaca oveja cabra	5	+	+	-*	+	+	+
Zonal o discoide	Endoteliocorial	gata perra hurón	4	+	-	-	+	+	+
Discoide o zonal	Hemocorial	Primates	3	-	-	-	+	+	+
Discoide o esferoidal	Hemoendotelial	cuyo rata conejo	1	-	-	-	-	-	+

* Brokman encontró un sincicio entre el trofoblasto y el tejido conectivo materno de la oveja el cual puede ocasionar que el tipo sindesmocorial pueda considerarse como epiteliocorial (McDonald, et. al. 1989)

proceso de placentación como un proceso progresivo en el cual los fetos de ciertas especies son más exitosos en invadir el útero.

La clasificación histológica de las placentas es también utilizada para explicar las intrincadas interacciones celulares que se desarrollan entre el trofoblasto y el epitelio uterino. Primero las capas epiteliales entran en aposición; entonces el microvello del corion lentamente empieza a interdigitarse con el epitelio materno. Un verdadero proceso invasivo se realiza en los perros y los gatos el cual puede ser facilitado por enzimas líticas, ya que ocurre una reacción decidua seguida por la corrosión o penetración del trofoblasto al tejido materno. En las cerdas, las yeguas, las ovejas y las vacas no hay reacciones deciduales y no hay invasión del tejido materno, ya que la aposición de la placenta fetal y materna es pasiva, excepto por la unión del microvello y las adherencias. Sin embargo la aposición en éste grupo es suficiente para dar la señal de gestación y consecuentemente prevenir la producción y liberación de prostaglandinas.

En los animales que conservan capas de tejido que recubren los capilares maternos tales como la yegua, la oveja y la vaca, rara vez ocurre hemorragia después del parto y en la concomitante separación de las placentas fetal y materna. En tales especies el suministro de sangre materna está bien protegido. Pero en los primates esto es un problema serio debido a que hay poco tejido sobrante para proteger la continuidad de las paredes de los vasos sanguíneos en la madre después de que la placenta es separada.

El tamaño del feto también afecta la tendencia hacia la hemorragia; consecuentemente la hemorragia postparto en la rata y la coneja es rara vez severa porque el útero es tan pequeño que el coágulo se desarrolla poco después y rellena la cavidad uterina (McDonald, 1989).

La placentación en cabras y ovejas es cotiledonaria-sindesmocorial; el placentoma está formado por la unión del cotiledon fetal y la carúncula materna. El útero de la cabra tiene de

160 a 180 carúnculas arregladas en hileras definidas. En el último tercio de la gestación normal la masa del cotiledón consiste de la zona íntima, en ésta el tejido fetal se une en forma estrecha al materno. Después de la zona íntima hay una zona intermedia en la cual el tejido fetal se une de forma mas laxa al tejido materno. En la región hemófaga, la depresión central del cotiledón, el tejido fetal se encuentra mas separado del materno debido a la extravasación de la sangre materna (Figura 3) (Hoffman et al., 1977).

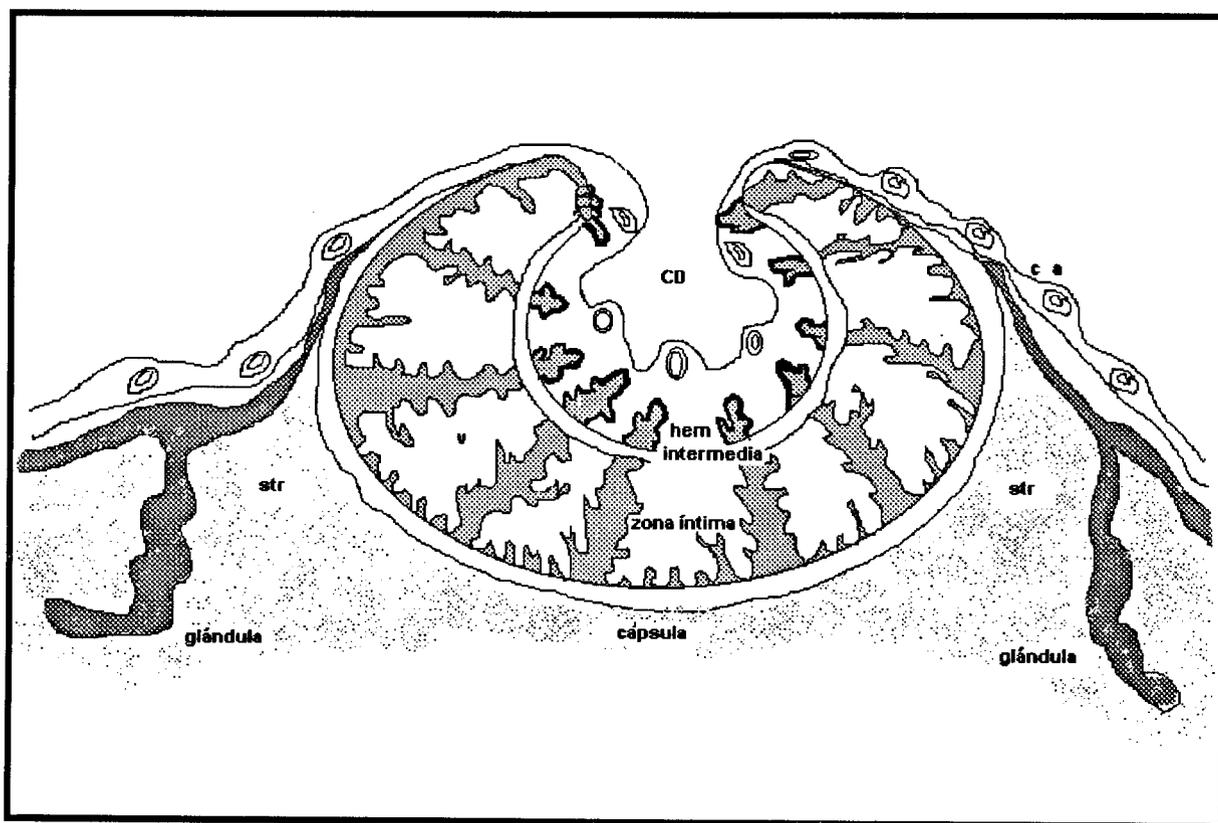


Figura 3. Estructura de la placenta de oveja. El diagrama ilustra las tres principales regiones dentro del cotiledón. En la región hemófaga (hem) en la depresión central del cotiledón (CD), los tejidos materno y fetal están ligeramente separados por extravasación de la sangre materna. En la región intermedia (intermed) la separación del tejido fetal y materno es menos marcada. El epitelio fetal y materno está en cerrada aposición en la zona íntima, los cuales representan la parte principal del tejido cotiledonario. Ca, membrana corioalantoica; str, estroma endometrial; v, vello fetal (Hoffmann et al., 1977).

Existe una gran variabilidad entre la estructura, transporte y otras funciones de la placenta corioalantoica (epiteliocorial, sindesmocorial, endoteliocorial y hemocorial). A pesar

de que el trofoblasto es un tejido común en todas las placentas su configuración varía, en algunas es de forma celular, en otras es sincicial, en algunas es una capa única de células y en otras está compuesta de más de una capa de células. Los microvellos del trofoblasto (revestimiento materno) y la membrana basal (revestimiento fetal) generalmente son considerados elementos clave en el transporte transplacentario. Por otra parte el endotelio de los capilares fetales es común a todas las placentas y no puede subestimarse como una barrera importante en el movimiento de moléculas que cruzan la placenta.

Una segunda diferencia estructural es el arreglo de los vasos sanguíneos fetales en la placenta corioalantoica, la cual puede ser arborizada con vello o formada dentro de un laberinto, o una red capilar. La relación relativa del flujo sanguíneo en las circulaciones placentarias materna y fetal también difieren entre especies, en algunas los flujos son concurrentes, mientras que en otras parecen ser en contracorriente. Estas diferencias en el flujo sanguíneo están asociadas con la eficiencia de la placenta en transferir los gases respiratorios y otras sustancias, la transferencia está limitada más por el flujo sanguíneo que por la permeabilidad.

Existen también diferencias en la permeabilidad para la difusión de ciertas sustancias por unidad de peso de la placenta. Son muchas las sustancias que se han estudiado en la transferencia transplacentaria, las siguientes son algunas de las más importantes (Morris et al., 1994).

Glucosa. Existen evidencias de que la difusión facilitada es el proceso principal para la transferencia transplacental de la D-glucosa, ésto se demostró primeramente en la oveja. La concentración de glucosa en la sangre arterial fetal esta en función de la concentración de glucosa en la arteria materna, en muchas especies como la oveja, la vaca, la yegua, la mona y la mujer; en cada caso la concentración fetal es menor que la materna. Así se tiene un gradiente de concentración para la glucosa desde la arteria materna a la arteria fetal. El sistema de transporte demuestra saturabilidad, pero sólo a concentraciones suprafisiológicas de glucosa en la sangre materna. Con base en una serie de experimentos muchos de ellos en la oveja, se sugiere que la

capacidad en el transporte de glucosa de la barrera placentaria es mayor en la superficie fetal que en la materna y que el metabolismo de glucosa uteroplacentario ocurre primeramente en tejidos que tienen acceso a la circulación fetal. Otros estudios sugieren que el flujo transplacentario de glucosa próximo al término de la gestación es suficiente para satisfacer la utilización de la glucosa necesaria para los fetos en ovejas bien nutridas, a pesar de la ausencia de un incremento durante el último mes de la gestación, pero que la hipoglucemia materna reduce esto a menos de los requerimientos metabólicos de glucosa para el feto. Durante la hipoglucemia materna en ovejas cercanas al término, la producción fetal de glucosa endógena puede limitar la transferencia uteroplacentaria de glucosa.

El efecto de la insulina materna sobre la transferencia de glucosa se ha investigado con varias técnicas, a distintas concentraciones hormonales y en diferentes especies. Debido a la dificultad para distinguir un efecto directo de la insulina sobre la placenta de los efectos indirectos seguidos de un cambio en la concentración de la glucosa, los resultados son contradictorios. De los cinco transportadores de glucosa identificados en tejidos de mamífero, dos están presentes en los tejidos placentarios. De estos se ha mostrado que la expresión de del transportador de glucosa 1 en otros tejidos es regulada por insulina, mientras que la transportador 3, no.

Lactato. La difusión facilitada de ácido láctico se ha demostrado durante el estado de reposo en placentas perfundidas de cobayo y humano. En estado de reposo la permeabilidad de placenta de cobayo al L-lactato es tres veces mayor que para D-lactato, y el sistema muestra saturabilidad y competencia con el piruvato pero no con la D-Glucosa. El movimiento neto es bajo un gradiente de concentración transplacentario. Así el transporte de lactato demuestra el criterio de difusión facilitada.

Bajo condiciones fisiológicas al término de la gestación en la oveja, no hay un movimiento neto transplacentario de lactato. La glucosa es el precursor para al menos algo del lactato producido por la placenta de la oveja; en la rata, la L-alanina es el precursor de lactato. El flujo neto del lactato dentro de la circulación umbilical de la placenta de oveja es

independiente de la concentración de lactato de la arteria materna. El lactato es producido endógenamente por fetos cercanos al nacimiento, presumiblemente a partir de glucosa y otros sustratos, así como por la placenta; ambas fuentes contribuyen al lactato utilizado por el feto. A mitad de la gestación en la oveja, la producción placentaria de lactato es menor que cuando se aproxima al término de la gestación.

Aminoácidos. Los estudios más sistemáticos del transporte de aminoácidos son una serie de cuidadosas mediciones en las concentraciones de aminoácidos en la arteria uterina y en la arteria y vena umbilical en ovejas concientes, los resultados son los siguientes:

1. El flujo neto transplacentar de la mayoría de aminoácidos es un exceso de los requerimientos para el crecimiento fetal, sugiriendo su utilización para otras funciones además de la síntesis de proteína fetal.

2. Hay un flujo neto transplacentar negativo para glutamato, el cual es removido de la circulación fetal por la placenta.

3. Existe un flujo neto transplacentar de los aminoácidos básicos lisina y arginina dentro de la circulación fetal pero el gradiente de la concentración arterial es bajo de la sangre materna a la sangre fetal, lo cual es opuesto al gradiente de concentración encontrado para la mayoría de aminoácidos en esta especie.

4. El flujo neto de glicina desde la placenta al feto ovino es grande, aún así la remoción de este aminoácido desde la circulación materna uteroplacentaria no es detectable. Por lo tanto, la glicina que aparece en la circulación fetal se incrementa desde el metabolismo de la placenta. El esqueleto de carbón de la serina es convertido a glicina en la placenta, mientras que, en el hígado fetal 30% de la producción hepática de serina es derivado de la glicina.

2.1.3. El Cortisol Biosíntesis y regulación de la secreción

El F es sintetizado en la zona fascicular y en mínima cantidad en la zona reticular de la corteza adrenal de los mamíferos. Al igual que las demás hormonas esteroideas, su síntesis deriva del colesterol. Como se muestra en la Figura 4, la biosíntesis de F es un proceso compartimentalizado que implica una serie de modificaciones de la molécula de colesterol, éstas

se inician con la ruptura de la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. Tradicionalmente, se ha considerado que esta reacción es el paso limitante para la síntesis de cortisol, tiene lugar en la mitocondria y está regulada por la 20 α -hidroxilasa, enzima cuya síntesis y activación son inducidas por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) de la hipófisis. Posteriormente, el grupo 3 β -hidroxilo de la pregnenolona es oxidado a una cetona por la 3 β -ol-deshidrogenasa, localizada en el retículo endoplásmico liso. Esta última reacción requiere como aceptor de hidrógeno al adenindinucleótido de nicotinamida. El desplazamiento del doble enlace es catalizado por la Δ -5,3-cetosteroide-isomerasa formando P₄. Las restantes reacciones en la síntesis del cortisol son todas hidroxilaciones y requieren como cofactor oxígeno molecular, adenindinucleótido de nicotinamida fosforeducido, flavoproteínas, una hemoferroproteína y el sistema citocromo P₄₅₀. La P₄ es convertida a 17 α -hidroxiprogesterona en la zona fascicular y reticular, donde posteriormente es transformada a 11-desoxicortisol por la 21-hidroxilasa, el precursor final del F, relativamente inactivo. El 11-desoxicortisol es finalmente hidroxilado por la 11 β -hidroxilasa, enzima que se encuentra únicamente en las zonas glomerular y fascicular de la glándula adrenal (Brobeck, 1983; Orth et al., 1992).

La síntesis y secreción de los glucocorticoides es controlada por el eje HHA. El hipotálamo secreta la hormona liberadora de la ACTH que induce en la hipófisis la liberación de ésta hormona. La ACTH estimula la zona fascicular de la corteza adrenal aumentando la liberación y síntesis de glucocorticoides, F y corticosterona (compuesto B de Kendall). La ACTH ejerce su acción a través de receptores específicos en la membrana acoplados al sistema enzimático adenil ciclasa que cataliza la conversión de adenosín trifosfato a adenosín monofosfato cíclico (AMPc). La formación de este nucleótido cíclico es proporcional a la cantidad de ACTH unido a la membrana. El AMPc, activa a la protein cinasa dependiente de AMPc (protein cinasa A) y la fosforilación de proteínas.

Los efectos de la ACTH sobre la esteroidogénesis pueden dividirse en agudos y crónicos que requieren horas o días respectivamente para manifestarse. Los efectos agudos de ACTH incrementan la conversión de colesterol a Δ^5 -pregnenolona, esta es la etapa inicial y

limitante en la biosíntesis del F; efecto mediado por la activación de la 20α -hidroxilasa, una enzima del citocromo P_{450} que rompe la cadena lateral del colesterol. Los efectos crónicos de la

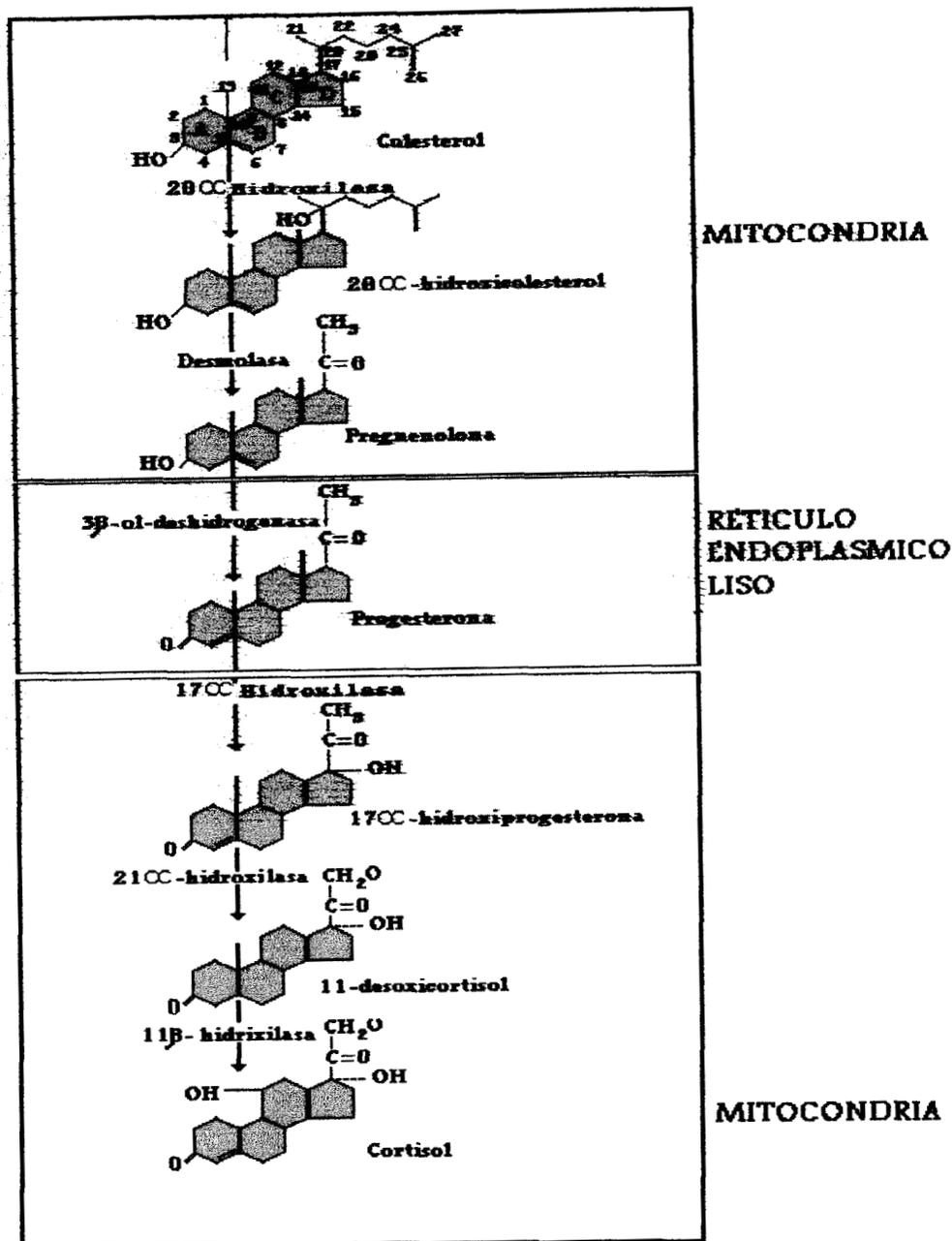


Figura 4. Biosíntesis del Cortisol. El F es sintetizado en la zona fascicular de la corteza adrenal. Esta síntesis es un proceso compartimentalizado que implica una serie de modificaciones de la molécula de colesterol, las cuales se inician con el rompimiento de la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. Esta reacción es el paso limitante para la síntesis del F, tiene lugar en la mitocondria y está regulado por la 20α -hidroxilasa, enzima cuya síntesis y activación son inducidos por la ACTH.

ACTH involucran el incremento en la síntesis de la mayoría de las enzimas de la vía esteroidogénica y acciones más generales sobre proteínas celulares de la corteza adrenal. En la corteza adrenal de bovino, la ACTH incrementa la velocidad de síntesis de todas las enzimas esteroidogénicas del citocromo P₄₅₀, incluyendo la 20 α -hidroxilasa, la 17 α -hidroxilasa, la 21-hidroxilasa y la 11 β -hidroxilasa, además incrementa el transporte de electrones en la proteína adrenodoxina y adrenodoxina reductasa.

La máxima velocidad de síntesis de proteínas ocurre 24 a 36 horas después de la estimulación con ACTH y los niveles de ácido ribonucleico mensajero que codifican para todas estas enzimas se incrementan 4 horas después de la exposición a esta hormona (Simpson y Waterman, en Orth y col., 1992). Estos efectos de la ACTH son reproducidos por análogos de AMPc, lo cual indica que estos son mediados por este nucleótido cíclico. Los mecanismos exactos por medio de los cuales el AMPc incrementa la transcripción del gen de la enzima adrenocortical del P₄₅₀ no se conocen. La cicloheximida, que inhibe la síntesis de proteínas a nivel de la traducción, bloquea el incremento en los niveles de ácido ribonucleico mensajero de P₄₅₀ inducido por ACTH (Simpson y Waterman, en Orth y col., 1992).

La regulación funcional del eje HHA es un proceso particularmente complejo y multifactorial en el cual participan los siguientes mecanismos o variables fundamentales:

1) El aumento agudo en los niveles de F circulante inhibe por retroalimentación negativa la secreción de ACTH. En tanto que un aumento prolongado de F inhibe no solo la secreción sino también la síntesis de ACTH. Esta última inhibición se ejerce principalmente a nivel hipotálmico bloqueando la liberación del CRH al sistema porta hipofisiario. Por el contrario, concentraciones bajas de F llevan a un aumento en la liberación de ACTH hipofisiaria.

2) Las concentraciones plasmáticas de F muestran un ciclo circadiano, con valores elevados en las primeras horas de la mañana y niveles bajos por la noche en animales de hábitos diurnos. El efecto contrario ocurre en animales de hábitos nocturnos.

3) Independientemente del nivel sanguíneo de F, los niveles plasmáticos de ACTH aumentan durante la fiebre, la intervención quirúrgica, el frío, la hipoglucemia u otros factores estresantes provocando un aumento concomitante en la secreción de F.

Una vez secretados, los glucocorticoides pasan al torrente sanguíneo en donde se encuentran en forma libre o unidos a proteínas transportadoras con diferente grado de afinidad, en el caso del F la mayor fracción (70 %) se encuentra unida a la transcortina o globulina unidora de corticosteroides, que es una globulina con gran afinidad al esteroide y baja capacidad de unión; el 20% se une a albúmina, con menor afinidad pero con una mayor capacidad de unión que la transcortina y entre el 5 al 10% restante se encuentra libre; esta última fracción es la forma activa de la hormona. La producción diaria de F en humanos es de 20 a 30 mg y tiene una vida media circulante de 60 a 90 minutos cuando se encuentra libre (Brobeck, 1983).

En el cuadro 2 se presentan las concentraciones de F determinadas en cabras y ovejas gestantes.

Cuadro 2. Niveles circulantes de cortisol en oveja y cabra.

ESPECIE	CONDICION	VALOR (ng/ml)	REFERENCIA
Oveja	G-3er T	38.0	Drost and Guzman, 1973
Oveja	G-3er T	14.7	Jones et al., 1977
Oveja	G	11.3 ± 4.1	Wood, 1988
Cabra	G	10.0 ± 2.5	Rensburg Van, 1971
Cabra	G-3er T	7.0	Paterson and Linzell, 1971
Cabra	G-3er T	15.9	Wentzel et. al., 1975b
Cabra	G-3er T	12.7 ± 2.17	Romero et. al, 1998

Los valores de cortisol representan intervalos, promedios o promedios ± error estandar.
G, gestación; G-3er T, gestación tercer tercio.

2.1.4. El Receptor a Glucocorticoides (RG)

Las diversas acciones fisiológicas de las hormonas esteroides (HE) sobre el metabolismo y la diferenciación son predominantemente mediadas por receptores intracelulares que regulan directamente patrones de expresión génica en las células blanco. Las estructuras primarias de los receptores conocidos a HE se han dilucidado por medio de experimentos de clonación y secuenciación de su ácido desoxirribonucleico (ADN), de ellos el RG ha sido el más estudiado. Estos estudios indican que los receptores a HE pertenecen a una superfamilia con un sorprendente número de genes y una amplia gama de factores de transcripción conocidos en eucariontes. La superfamilia incluye los receptores para estrógenos, progesterona, glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos. Además comprende los receptores para hormonas tiroideas, vitamina D, ácido retinoico y ácido retinoico 9-Cis y ecdisona (Tsai and O'Malley, 1994).

Los RG son una cadena polipeptídica de aproximadamente 94 Kda, se unen a los glucocorticoides con una alta afinidad y de manera específica y saturable, en presencia de molibdato de sodio, el receptor puede extraerse de la célula formando un complejo con otras proteínas que no tienen capacidad de unión al esteroide. La masa molecular del complejo es de 270 a 320 KDa. El análisis de la secuencia de aminoácidos de los receptores intracelulares indican que todos los miembros de la familia de receptores a HE presentan regiones altamente conservadas y regiones con variación que corresponden a los dominios funcionales.

En la Figura 5, se esquematizan algunos receptores representativos de la superfamilia; el segmento amino terminal A/B es altamente variable en secuencia y longitud, usualmente este dominio contiene secuencias responsables de la activación de genes blanco, presumiblemente por medio de su interacción con componentes del centro de la maquinaria transcripcional, y/o

con otros factores de transcripción. Esta región puede ser importante también para la especificidad de genes blanco para isoformas del receptor, el cual reconoce los mismos elementos de respuesta. La secuencia de la región C o dominio de unión al ADN, se encuentra altamente conservada en la superfamilia de receptores y consiste de dos sitios de unión a zinc, cada uno coordinado por dos pares de cisteínas separadas por 10-15 aminoácidos. Estas estructuras son llamadas "dedos de zinc" y se esquematizan en la Figura 6. La región D es también conocida como bisagra porque está localizada entre el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando, su principal función es la localización nuclear. Esta tarea es realizada por una secuencia específica, la señal de localización nuclear, la cual es reconocida por un sistema de transporte nuclear aún no caracterizado, existen algunas controversias sobre si esta señal es constitutivamente activa o se activa cuando se une al ligando. En la región E residen varias funciones: 1) unión al ligando, 2) activación transcripcional, 3) dimerización, 4) unión a proteínas de choque térmico, 5) translocación nuclear, así como mantener en silencio al receptor en ausencia de la hormona (Bamberger y col., 1996).

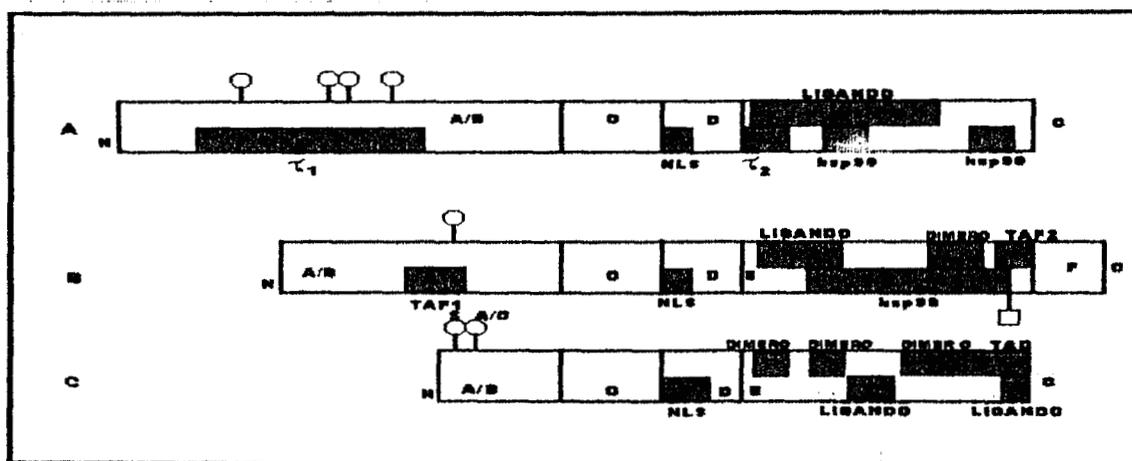


Figura 5. Representación esquemática de los receptores a: (A) glucocorticoides, (B) estrógenos y (C) triyodotironina, mostrando los distintos dominios funcionales. El receptor A contiene 777, el B 595 y el C 456 amino ácidos. Los círculos representan los sitios de fosforilación de serina o treonina; los cuadrados representan los sitios de fosforilación de tirosina; hsp, proteínas de choque térmico; NLS, señal de localización nuclear; y TAF, dominios de activación de la transcripción.

Entre los dedos de zinc existe una secuencia cercana al extremo carboxilo del nudillo del primer dedo que forma la caja P, esta es idéntica en la familia de receptores a HE (Figura 6) y es la responsable del reconocimiento de los elementos de respuesta a esteroides. En realidad, los cuatro receptores a esteroides se unen al mismo elemento de respuesta, el cual aparece como una repetición invertida o palindrómica separada por tres pares de bases nucleotídicas. Solo se conocen dos isoreceptores en esta familia. En los pollos y el hombre hay dos isoreceptores a P₄, que solo difieren en que en los primeros el receptor presenta una forma corta que carece de los aminoácidos 127 a 164 del extremo amino terminal. No hay diferencia entre las dos formas con respecto a la unión con el ligando y la distribución tisular; en realidad las dos formas pueden heterodimerizarse. Sin embargo, la forma larga es más activa a un promotor mínimo y en presencia de múltiples elementos de respuesta a progesterona.

El otro isoreceptor es el receptor a mineralocorticoides, el cual se une tanto a F como a aldosterona, puesto que hay mucho más F que aldosterona en el suero, el receptor a mineralocorticoides es primeramente regulado por F. Sin embargo se ha encontrado en los tejidos blanco para aldosterona la enzima, la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa que es responsable de la especificidad del receptor mineralocorticoide, ya que degrada al F, previendo así que este reaccione con el receptor a mineralocorticoide (Bolander, 1994; Edward et al., 1989).

Otros autores han sugerido que son dos las enzimas responsables de esta acción, y que actúan independientemente, la 11-deshidrogenasa y la 11-reductasa (Lakshmi y Monder, 1985). La actividad de estas enzimas varía en tejidos diferentes, la 11-reductasa por ejemplo, es dominante en el hígado y la 11-deshidrogenasa en el riñón (Bush et al., 1968; Jenkins, 1966). En estos tejidos, el receptor a mineralocorticoides es un receptor fiel para aldosterona.

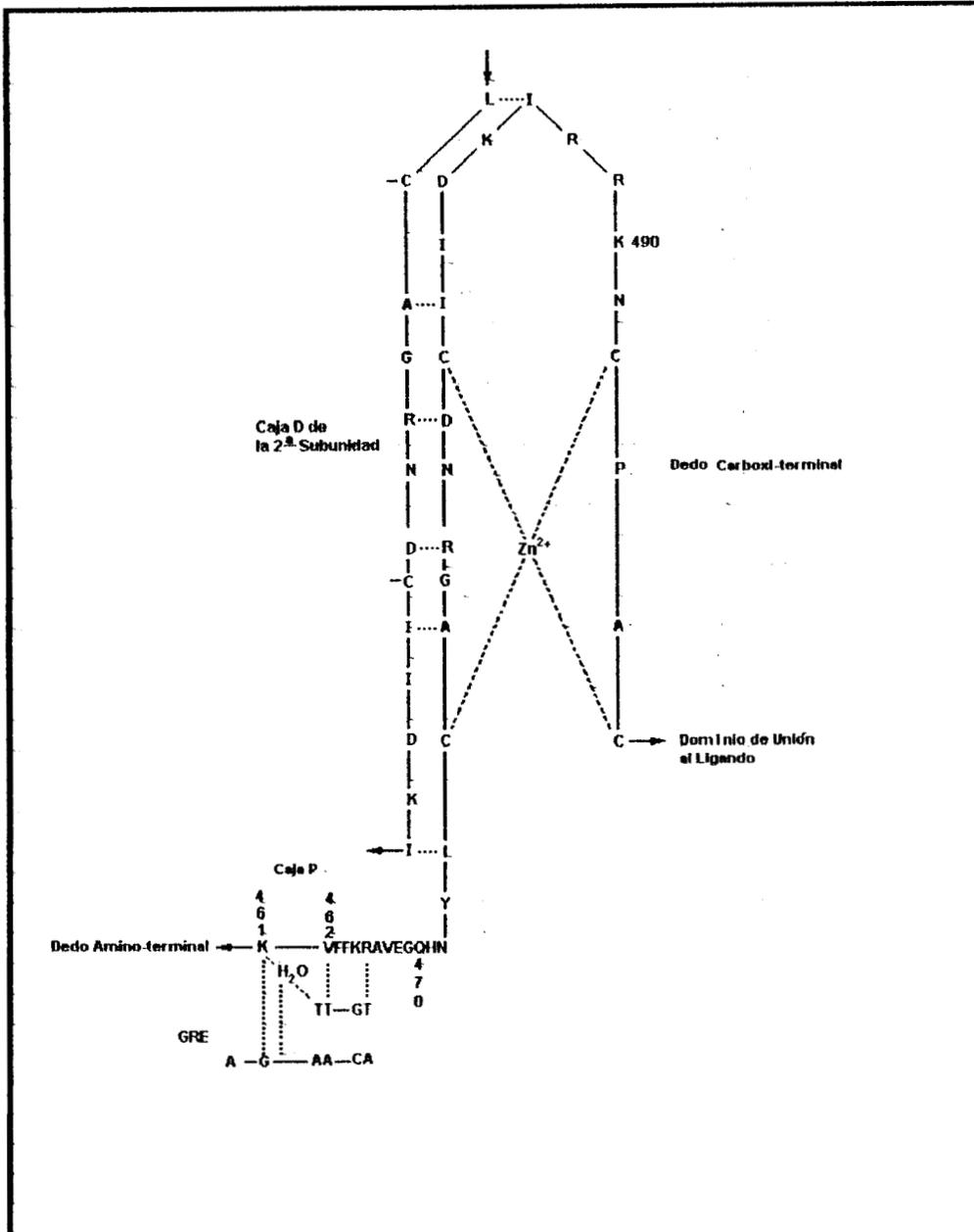


Figura 6. Representación esquemática de los "dedos de zinc" y las cajas P y D en el dominio de unión al ADN del receptor a glucocorticoides. Las líneas de puntos muestran las uniones entre la caja P y los nucleótidos de los elementos de respuesta a glucocorticoides.

En otros tejidos que poseen un receptor a mineralocorticoides pero carecen de esta enzima, el receptor a mineralocorticoides se convierte en un segundo RG. Sin embargo, si el receptor a mineralocorticoides se une al F con una afinidad 10 veces mayor que el clásico RG, el receptor a mineralocorticoides puede funcionar como un RG supersensible; por esta razón, el receptor a mineralocorticoides es algunas veces referido como Tipo I y el RG como Tipo II. Estos dos receptores actúan separadamente y no heterodimerizan (Bolander, 1994).

Para ambos tipos de receptores el modelo del mecanismo de acción es similar pero no idéntico. Un aspecto en que difieren los dos receptores es su localización en ausencia del ligando; el receptor a mineralocorticoides (Tipo I) es predominantemente nuclear, mientras que los RG (Tipo II) aparecen tanto en citoplasma como en núcleo (Funder, 1992).

Puesto que la presencia de receptores a esteroides es un requerimiento absoluto para la respuesta hormonal, no es sorprendente que la concentración de moléculas receptoras en una célula blanco esté relacionada con la extensión de la sensibilidad hormonal. Esta relación incrementa la posibilidad de que los mecanismos que regulan el nivel de RG está fundamentalmente controlado por la acción de la hormona. Es claro que los niveles de receptores pueden cambiar en un determinado tejido o línea celular. El número de receptores es influido por factores como la etapa del ciclo celular (Bodwel, et al., 1998), el estado de diferenciación y el *estatus* endócrino (Armanini, 1994).

2.1.5 Mecanismo de Acción de los Glucocorticoides.- Las moléculas lipofílicas de los glucocorticoides entran a la célula por difusión pasiva y son unidas por el RG. El complejo hormona-receptor sufre una "transformación" o "activación". Este proceso es reflejado por un cambio en el tamaño del complejo hormona-receptor de aproximadamente 8-9 S (en su estado no transformado) a 4 S (receptor transformado). Funcionalmente el proceso de transformación

involucra la adquisición de propiedades específicas de unión al ADN por el complejo hormona-receptor. Esto es presumiblemente a través de interacciones directas del receptor con genes receptores blanco capaces de modular la transcripción génica (Figura 7) (O'Malley et al., 1995), o bien un segundo mecanismo que involucra la interacción del RG con otros factores de transcripción en ausencia de una unión específica con el ADN (Bamberger et al., 1996).

Los receptores activados interactúan selectivamente con secuencias del ADN, denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides, que están asociados con genes que responden a esteroides. Tanto efectos positivos como negativos sobre la transcripción, han sido demostrados en respuesta al tratamiento con esteroides. Aunque es claro que los RG ejercen su primera influencia por alterar la transcripción génica, los efectos de los receptores sobre el cambio de la estabilidad del ARNm y proteínas también han sido observados (Gehring, 1988).

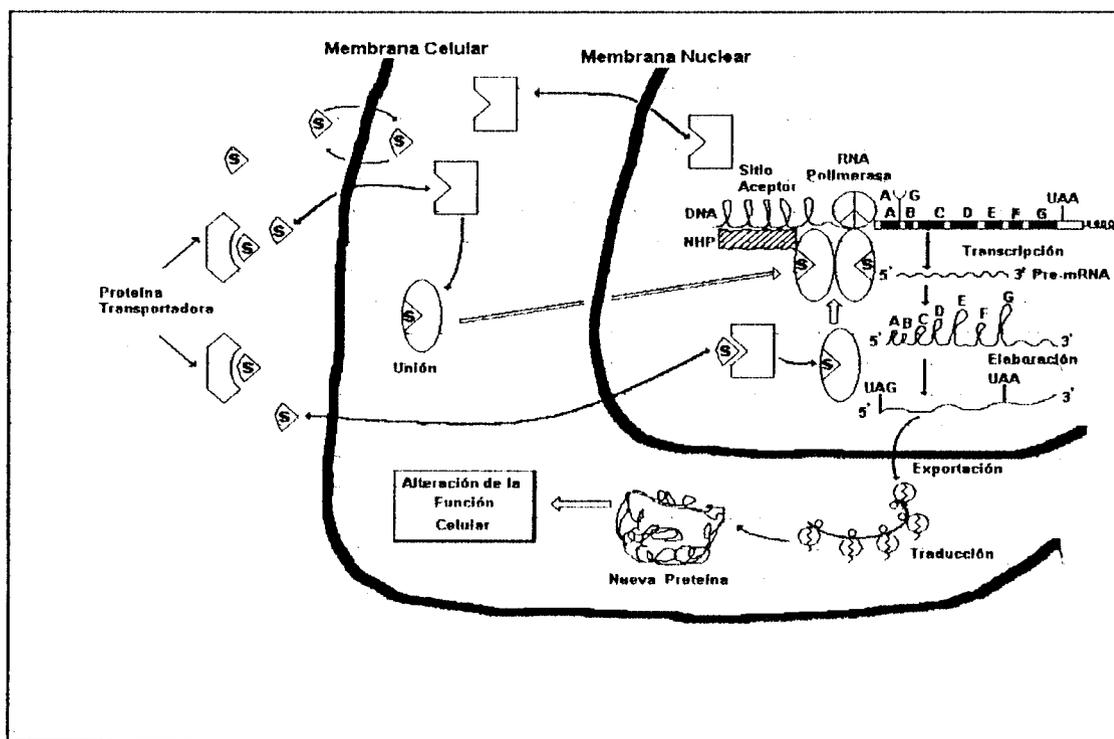


Figura 7. Modelo simplificado del mecanismo de acción propuesto para las hormonas esteroides.

2.1.6. Actividad Biológica de los Glucocorticoides

Los glucocorticoides tienen una amplia gama de efectos sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos, el sistema inmune, la estabilización de membranas y algunos efectos sobre procesos particulares como la inducción de la lactancia y la inducción del parto. Este último efecto ya fue revisado en el capítulo anterior.

2.1.6.1 Efecto sobre el metabolismo intermediario. Los efectos sobre el metabolismo de carbohidratos incluyen la promoción de gluconeogénesis, de depósitos hepáticos de glucógeno y el incremento de los niveles circulantes de glucosa. Los glucocorticoides naturales que exhiben una gran potencia biológica son el F (el más potente), la cortisona, la corticosterona y la 11-dehidrocorticosterona; los dos últimos no poseen actividad biológica intrínseca, sino que son potencialmente activos como precursores del F y la corticosterona, respectivamente. Los animales adrenalectomizados no pueden mantener reservas hepáticas de glucógeno. El reemplazamiento de esteroides adrenocorticales revierte la depleción de glucógeno y la hipoglucemia en animales adrenalectomizados en ayuno. Los glucocorticoides activan ambas glucógeno sintetasas e inactivan la enzima que moviliza el glucógeno, la glucógeno fosforilasa. La cantidad total de la glucógeno sintetasa permanece inalterable, pero la enzima es activada por desfosforilación. No se conoce como los glucocorticoides realizan este efecto, si directamente por activar una fosfatasa hepática o indirectamente por la inactivación de la glucógeno fosforilasa, un inhibidor de la fosfatasa.

Los glucocorticoides incrementan la producción de glucosa hepática en parte por incrementar la disponibilidad de sustratos, como la liberación de aminoácidos glucogénicos desde tejidos periféricos, tales como músculo esquelético. Los glucocorticoides también activan directamente las enzimas clave en la gluconeogénesis hepática, tales como la glucosa-6-fosfatasa y la fosfoenol piruvato carboxiquinasa (PEPCK). El incremento en la actividad de la PEPCK resulta de la inducción de la transcripción del gen para PEPCK mediado por la interacción del complejo receptor tipo II de los glucocorticoides con un elemento de respuesta específico a glucocorticoides (GRE) localizado en la región del extremo 5 del gen PEPCK.

Otras hormonas gluconeogénicas como el glucagon y la epinefrina, son inefectivas sin el efecto permisivo de los glucocorticoides. Estos esteroides, incrementan la sensibilidad a las catecolaminas en la lipólisis del tejido adiposo. El glicerol liberado durante la lipólisis proporciona un sustrato para la producción de glucosa, y la liberación de ácidos grasos proporciona un recurso de energía para el proceso. Los glucocorticoides también incrementan la producción de lactato en músculo estimulado por catecolaminas. En adición a la movilización de sustrato para la gluconeogénesis hepática, los glucocorticoides inhiben la captación de glucosa y su utilización por tejidos periféricos. El número de transportadores de glucosa en adipocitos es disminuido por glucocorticoides debido a que los niveles de ARNm son disminuidos.

Los glucocorticoides activan agudamente la lipólisis en tejido adiposo. La actividad lipolítica y consecuentemente, los niveles de ácidos grasos libres en el plasma son reducidos en animales adrenaletomizados y regresan a la normalidad después de dos horas de la administración de glucocorticoides. Este efecto permisivo puede ser mediado por alterar la sensibilidad a otras hormonas lipolíticas, como las catecolaminas y la hormona de crecimiento, pero los mecanismos moleculares no se conocen (Orth et al., 1992).

2.1.6.2. Efectos sobre el sistema inmune. El exceso de glucocorticoides suprime la respuesta inmunológica y la reactivación de infecciones latentes, como la tuberculosis. Las células del sistema inmune tienen receptores a glucocorticoides de alta afinidad, pero los resultados *in vitro* comunmente se producen con concentraciones suprafisiológicas de la hormona. Por otra parte, las propiedades inmunosupresivas y antiinflamatorias de los glucocorticoides son en general observadas solo cuando se administran cantidades farmacológicas de las hormonas.

Uno de los principales efectos de los glucocorticoides sobre las células del sistema inmune es sobre su transporte para y desde la circulación periférica. Los glucocorticoides producen una marcada disminución en el número de linfocitos periféricos en humano. Los linfocitos T, derivados del timo, son disminuidos en mayor proporción que los linfocitos B,

derivados de la médula y placas de Peyer. El efecto se debe a la redistribución de los linfocitos desde el compartimiento vascular, al bazo, nodos linfáticos, ducto torácico y médula del hueso. Los glucocorticoides también causan una similar redistribución de monocitos, pero el efecto opuesto es ejercido sobre granulocitos, los cuales dejan la médula del hueso y entran a la circulación de la sangre. Al mismo tiempo los glucocorticoides inhiben la acumulación de neutrófilos al sitio de inflamación. Estos efectos son manifestados clínicamente por incrementar el número de neutrófilos circulando y la supresión local de la respuesta inflamatoria.

Los linfocitos son ampliamente reconocidos como blanco para la acción de los glucocorticoides. En ciertas especies, particularmente la rata y el ratón, los glucocorticoides inducen la lisis de células T y timocitos normales y neoplásicos, un proceso que puede involucrar la inducción de una nucleasa específica que degrada su ADN. Las células T maduras de humano y los timocitos inmaduros de humano también contienen receptores a glucocorticoides de alta afinidad, pero estos son relativamente insensibles a la lisis inducida por glucocorticoides. Así el efecto agudo de los glucocorticoides sobre el número de linfocitos de humano es el resultado de una redistribución vascular, no de la lisis celular. Sin embargo, los glucocorticoides ejercen efectos inmunosupresivos sobre las células T humanas *in vitro*, tales como la proliferación e inhibición de la transcripción del gen para interleucina 2, un potente factor de crecimiento de la célula T.

La modulación de la función de las células B por los glucocorticoides, pueden ser ambas, directas y mediadas por efectos sobre los monocitos y las subpoblaciones de células T.

Las células B en reposo presumiblemente primero bajo un proceso de activación, proliferan en respuesta a los factores de crecimiento derivados de la célula T, tales como interleucina 4, y finalmente se diferencian para producir inmunoglobulinas, los glucocorticoides parecen modular este proceso. Los primeros eventos como activación y proliferación de las células B son inhibidos. Las células mononucleares accesorias pueden tener una función bajo ciertas condiciones. La diferenciación terminal de las células B es mucho menos sensible a la

inhibición de los glucocorticoides. En efecto los glucocorticoides pueden incrementar la producción de inmunoglobulinas bajo algunas condiciones *in vitro*.

Los glucocorticoides inhiben la respuesta de proliferación de los monocitos para el factor que estimula la colonia y su diferenciación dentro de los macrófagos. Ellos también inhiben las funciones fagocíticas y citotóxicas de los macrófagos.

Los Glucocorticoides inhiben el movimiento de las células y los fluidos desde el compartimiento intravascular que caracteriza la respuesta local inflamatoria. Estos también inhiben la acción de la histamina, un potente agente vasoactivo, por un mecanismo aún desconocido. Las prostaglandinas son probablemente mediadores de la respuesta inflamatoria y los glucocorticoides inhiben la síntesis de las prostaglandinas, posiblemente por inducir un incremento en los niveles de una de las lipocortinas, una familia de proteínas dependientes de Ca^{2+} /fosfolípidos, que inhiben la activación de la fosfolipasa A2, y así la síntesis de prostaglandinas y otros derivados del ácido araquidónico.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

3.1. Planteamiento del problema. El F fetal es el responsable de la activación de los procesos enzimáticos placentarios que conducen a las modificaciones endocrinas que ocasionan el parto en la cabra y otros mamíferos. Se ha demostrado que el mecanismo de parto también puede ser activado con infusiones de F. Por otra parte la cabra es una especie que presenta una frecuencia alta de abortos y se ha mostrado que algunos de estos pueden ser inducidos por incrementos en el F materno. Este tipo de abortos es común entre los 100 a 130 días de gestación.

En esta investigación se explora la capacidad de la placenta para recibir la señal endocrina del F, a través de determinar el número y la afinidad de los RG en la placenta y en el hígado de cabras durante la gestación, con objeto de conocer su posible relación con la alta frecuencia del aborto caprino durante situaciones de estrés.

3.2. Objetivos

3.2.1. General Analizar si los cambios en el número y afinidad de los receptores citosólicos a cortisol en el hígado y la placenta de la cabra durante la gestación pueden explicar en parte la alta incidencia de abortos en esta especie durante el último tercio de la gestación.

3.2.2. Particulares

1) Diferenciar y cuantificar los RG citosólicos (Tipo I y Tipo II) en citosol de hígado de feto caprino en diferentes etapas de la gestación.

2) Diferenciar y cuantificar los RG citosólicos (Tipo I y Tipo II) en citosol de hígado de cabra en diferentes etapas de la gestación.

3) Diferenciar y cuantificar los RG citosólicos (Tipo I y Tipo II) en citosol de placenta de cabra en diferentes etapas de la gestación.

4) Analizar si el número y tipo de RG citosólicos en la placenta de cabras está relacionado con los niveles circulantes de F y P₄ en los animales gestantes.

5) Identificar si el momento en que el útero responde al F produciendo trabajo de parto está asociado con cambios en el número de RG.

222876

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 ANIMALES.

Se utilizaron 30 cabras mestizas, de éstas cinco no gestantes y 25 en cinco diferentes etapas de la gestación: **a)** 40 a 50 (n = 5), **b)** 51 a 75 (n = 6), **c)** 76 a 100 (n = 5), **d)** 101-125 (n = 3) días de gestación y **e)** 126 días de gestación al parto (n = 6); la gestación normal en esta especie es de 150 ± 5 días. Los animales utilizados se obtuvieron de un rastro (ubicado en Atizapán de Zaragoza, Estado de México), lo que implica que fueron animales estresados. El estrés de estos animales se debió a diferentes factores, como son: a) la transportación por aproximadamente cinco horas (desde el estado de Guanajuato), b) el estrés por ayuno: los animales permanecieron sin comer ni beber en la camioneta donde los transportaron hasta el momento del sacrificio al día siguiente, y c) el estrés por la manipulación previa al sacrificio. La etapa gestacional de los fetos se determinó con base en el criterio propuesto por Sivachelvan y colaboradores (1996) que consiste principalmente en considerar el peso, la logitud del cuarto trasero y otras características como aparición de pelo, dientes, color y apariencia del tegumento.

4.2 OBTENCION DE LAS MUESTRAS.

Los animales fueron insensibilizados y degollados, en ese momento se tomó la muestra de sangre materna, posteriormente se evisceraron y se separó el útero gestante del cual se extrajo el feto para la toma de la muestra sanguínea de la vena umbilical. Una vez que el feto se separó de la placenta se determinó el peso corporal, la talla y mediante examinación visual otras características morfológicas, para determinar la edad gestacional. En seguida se extrajo el hígado completo del feto y simultáneamente se separaron la carúncula (zona fetal) y el cotiledón (zona materna) del placentoma, así como una parte del hígado materno. Los tejidos se lavaron

con solución salina (NaCl al 0.9 %) y después con una solución de sacarosa (0.3 M), el tejido se colocó en una bolsa de plástico, se identificó y se congeló con nitrógeno líquido, luego se almacenó en un ultracongelador a -70 C hasta que se utilizó para la extracción de la fracción citosólica y la cuantificación de RG. A las muestras sanguíneas se les separó el coágulo y se centrifugaron a 1000 G para separar el suero, éste se congeló a -20 C hasta que se cuantificó el F y la P₄.

4.3. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN CITOSÓLICA.

El tejido (hepático o placentario) se fragmentó en presencia de nitrógeno líquido en un mortero, posteriormente se homogenizó con la ayuda de un homogenizador (politrón) con 3 volúmenes de solución amortiguadora (Tris-HCl 10 mM pH= 7.4 adicionado con EDTA 1.5 mM, ditiotritol 2 mM, Na₂MoO₄ 0.1 M, y glicerol al 10%). El homogeneizado se centrifugó a 1000 G durante 10 minutos a 4 C, se extrajo el sobrenadante y se recentrifugó a 105,000 G durante 60 minutos. Este sobrenadante se definió como la fracción citosólica (Panarelli et al., 1995).

4.4 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS. Para cada muestra de citosol se determinó la cantidad de proteínas mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (Copeland, 1994). Se preparó una solución de albúmina sérica bovina con una concentración de 1mg /ml, de ésta se elaboraron estándares de 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 y 20.0 µg/ml para construir una curva estándar. Se utilizó 1.0 ml de cada uno de los estándares y cada muestra de citosol (1.0 µl) se agregó a 1.0 ml de agua destilada en tubos independientes. Se adicionó 1.0 ml del reactivo de Bradford (Sigma Chemical Company), se dejó incubar durante cinco minutos y se leyó la absorbencia en un espectrofotómetro a 595 nm. Se obtuvo la concentración de proteína total en µg/ml para cada muestra.

4.5 CUANTIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES

4.5.1. Estandarización del radioligando de RG en citosol de hígado de rata. Primeramente se estandarizó la técnica de radioligando para la cuantificación de RG en la fracción citosólica del hígado de rata (Panarelli et al., 1995) debido a que en este tejido están bien identificados estos receptores; además su cuantificación se utilizó como un control interno positivo en los ensayos para evaluar los receptores en los tejidos hepático y placentario de la cabra. La fracción citosólica del hígado de rata se obtuvo del tejido fresco, como ya se describió anteriormente para los tejidos de cabra.

Para obtener la masa óptima de proteína en el ensayo se incubaron 600 μ l conteniendo diferentes cantidades de proteína (0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 y 1.0 mg/tubo) de la fracción citosólica, 800 fmol (\approx 60,000 cpm) de dexametasona marcada con tritio (6,7 3 H-Dexametasona [3 H-Dxm]) en 100 μ l de una solución amortiguadora durante 18-24 horas a 4 C. La unión inespecífica (UI) se determinó realizando una incubación paralela en presencia de un exceso (120 veces) de dexametasona fría (Dxm) (\approx 96,000 fmol/tubo). Para separar la fracción unida de la libre, se adicionó después de la incubación 200 μ l de una suspensión de carbón/dextrán (0.75/0.075 %) y se incubó durante 60 minutos a 4 C. Se separó la fracción unida de la libre por una centrifugación a 1200 G. El sobrenadante (fracción de la 3 H-Dxm unida al receptor) se decantó en un vial y se adicionaron 5.0 ml de líquido de centelleo, se agitó y se dejaron reposar los viales durante 24 horas, luego se contó en un contador de centelleo líquido. La unión específica (UE) se obtiene de la diferencia entre la unión total (UT) y la UI y se expresa en porcentaje de unión. La cantidad de proteína que dió la mayor UE y la menor UI se seleccionó para montar el ensayo.

Para determinar la UT de la $^3\text{H-Dxm}$ a los RG en la fracción citosólica de tejido hepático de rata se incubaron 0.2 mg/tubo de proteína citosólica con concentraciones crecientes de $^3\text{H-Dxm}$ (400 a 6400 fmol/tubo \approx 30,000-480,000 cpm) a 4 C durante 18 a 24 horas. Para determinar la UI se incubaron en paralelo tubos adicionados además con Dxm en una concentración 120 veces mayor. Después de la incubación se adicionaron 200 μl de carbón cubierto con dextrán (0.75 / 0.075 %) para separar la hormona marcada unida al receptor, de la hormona libre, se incubaron durante 60 minutos a 4 C. Se separó la fracción unida de la libre por centrifugación a 1200 G. El sobrenadante (fracción de la $^3\text{H-Dxm}$ unida al receptor) se decantó a un vial y se adicionaron 5.0 ml de líquido de centelleo, se agitó y se dejaron reposar los viales durante 24 horas, luego se contaron en un contador de centelleo líquido. Finalmente los resultados fueron expresados en fmol/mg de proteína. Con los resultados obtenidos se calculó la UE y se construyó una curva de saturación. Para obtener el número total de receptores y la constante de asociación (K_a), los resultados de la UE se analizaron por el método de Scatchard (1949).

4.5.2. Estandarización del radioligando de RG en citosol de tejidos caprinos.

La masa óptima de proteína para cada ensayo se obtuvo mediante la incubación de 600 μl conteniendo diferentes cantidades de proteína (0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/tubo) de la fracción citosólica de cada tejido (hígado y zona fetal y materna de la placenta), con 100 μl de una solución que contiene 400 fmol (\approx 30,000 cpm) de dexametasona marcada con tritio (6,7 $^3\text{H-Dexametasona}$ [$^3\text{H-Dxm}$]) durante 18-24 horas a 4 C. La unión inespecífica (UI) se determinó realizando una incubación paralela en presencia de un exceso (240 veces) de dexametasona fría (Dxm) (\approx 96,000 fmol/tubo). Para separar la fracción unida de la libre, se adicionó después de la incubación 200 μl de una suspensión de carbón/dextrán (0.75/0.075 %)

y se incubó durante 60 minutos a 4 C. Se separó la fracción unida de la libre por una centrifugación a 1200 G. El sobrenadante (fracción de la $^3\text{H-Dxm}$ unida al receptor) se decantó en un vial y se adicionaron 5.0 ml de líquido de centelleo, se agitó y se dejaron reposar los viales durante 24 horas, luego se contó en un contador de centelleo líquido. La cantidad de proteína que dió la mayor UE y la menor UI se seleccionó para montar el ensayo.

Para determinar la UT de la $^3\text{H-Dxm}$ a los RG en la fracción citosólica de tejido hepático de feto caprino se incubaron 2.0 mg/tubo de proteína citosólica con concentraciones crecientes de $^3\text{H-Dxm}$ (184 a 2860 fmol/tubo \approx 15,000- 240,000 cpm) a 4 C durante 18 a 24 horas. Para determinar la UI se emplearon las mismas concentraciones de hormona marcada más hormona no radiactiva, esta última en una concentración 240 veces mayor. Después de la incubación se adicionaron 200 μl de carbón cubierto con dextrán (0.75 / 0.075 %) para separar la hormona marcada unida al receptor, de la hormona libre, se incubaron durante 60 minutos a 4 C. Se separó la fracción unida de la libre por centrifugación a 1200 G. El sobrenadante (fracción de la $^3\text{H-Dxm}$ unida al receptor) se decantó a un vial y se le adicionaron 5.0 ml de líquido de centelleo, se agitó y se dejaron reposar durante 24 horas, se determinó la radioactividad en un contador de centelleo líquido. Finalmente los resultados fueron expresados en fmol/mg de proteína, se calculó la UE y se construyó una curva de saturación. Para obtener el número total de receptores y la constante de asociación (Ka), los resultados de la UE se analizaron por el método de Scatchard (1949).

4.5.3. Determinación de los receptores a cortisol Tipo I y Tipo II. La diferenciación de los dos tipos de receptores, se realizó en el hígado materno y fetal y en la placenta (carúncula y cotiledón). Se utilizaron 2.0 mg/tubo de proteína citosólica de los respectivos tejidos en un volumen de 600 μl de solución amortiguadora por tubo. El ensayo se montó en

tres series; la primera serie de tubos fue adicionada de 100 μ l que contenian 400 fmol (\approx 30,000 cpm) de $^3\text{H-Dxm}$ y se incubo a 4 C durante 18 a 24 horas. La segunda serie, se montó en las mismas condiciones pero además se le agregaron 100 μ l conteniendo 96,000 fmol de Dxm. En la tercera serie con las mismas condiciomes que la primera, se pusieron a competir 100 μ l de una solución amortiguadora conteniendo 96,000 fmol de aldosterona fría. Después de la incubación se adicionaron a todos los tubos 200 μ l de carbón cubierto con dextrán (0.75 / 0.075), se incubó durante 60 minutos a 4 C, y se centrifugó a 1200 G. La fracción unida se decantó a un vial y se le adicionaron 5.0 ml de líquido de centelleo y se determino la radioactividad en un contador de centelleo líquido. A la UT se le restó la UI y el desplazamiento de la $^3\text{H-Dxm}$ por la aldosterona y así se calculó el número de receptores Tipo I en fmol/mg de proteína. La diferencia entre el total de receptores a cortisol y el desplazamiento por aldosterona, da como resultado el número de receptores Tipo II.

4.5.4. Desplazamiento de la unión a $^3\text{H-Dxm}$ por la progesterona. El desplazamiento de la unión a $^3\text{H-Dxm}$ por la P_4 se calculó en el citosol de la placenta caprina. En este ensayo se colocaron tres series de tubos, con la primera serie se calculó la UT, con la segunda la UI y con la tercera la unión a $^3\text{H-Dxm}$ en presencia de P_4 . A las tres series de tubos se adicionaron 2.0 mg de proteína total citosólica, contenida en un volumen de 600 μ l de solución amortiguadora, a los mismos tubos se agregaron 100 μ l de $^3\text{H-Dxm}$ (400 fmol/tubo, 30,000 cpm); a la segunda serie de tubos se agregaron además 100 μ l (96,000 fmol/tubo) de Dxm y a la tercera serie se agregó en lugar de Dxm 100 μ l de P_4 (96,000 fmol/tubo). El ensayo se incubó a 4 C durante 18 a 24 horas. Después de la incubación se adicionaron 200 μ l de una suspensión de carbón cubierto con dextrán (0.75/0.075), se incubó durante una hora a 4 C, y se

centrifugó a 1200 G. El sobrenadante (Fracción de $^3\text{H-Dxm}$ unida al receptor) se decantó a un vial y se adicionaron 5 ml de líquido de centelleo, se agitaron los viales y se dejaron reposar durante 24 horas, posteriormente se contaron en un contador de centelleo líquido. A la UT se le restó la UI y el desplazamiento de la $^3\text{H-Dxm}$ por la P_4 y así se calculó el número de sitios de unión desplazados por la P_4 en fmol/mg de proteína.

4.6. DETERMINACIONES HORMONALES

4.6.1. Cuantificación de la concentración de progesterona. La determinación se realizó mediante un radioinmunoanálisis que utiliza un anticuerpo policlonal específico contra progesterona (QKP5) producido en nuestro laboratorio (Herrera y col. 1993). Los esteroides se extrajeron de 500 μl del suero problema con eter dietílico en una proporción 1:10 v/v, posteriormente se separó la fase orgánica, se evaporó el éter y se resuspendió el residuo en 2.0 ml de una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, adicionada con 8.8 g de NaCl y 1.0 g de gelatina por litro pH 7.0, de esta suspensión se tomaron 500 μl por triplicado para el ensayo. El porcentaje de recuperación durante este procedimiento se determinó mediante sueros agregados de progesterona tritiada ($^3\text{H-P}_4$) (1,2,6,7, ^3H -progesterona, 101.7 Ci/mmol). Las condiciones del ensayo fueron las siguientes: 500 μl del estandar (P_4 , de 25 a 80 pg) o problema, 100 μl de la dilución (1:100) del anticuerpo QKP5, 100 μl del trazador $^3\text{H-P}_4$ (~ 17.91 pg, 10,000 cpm).

4.6.2. Determinación de las concentraciones de cortisol. El F se cuantificó por un ensayo por competencia de unión a proteínas (CPBA) desarrollado en nuestro laboratorio (Luna y col., 1990). Para este ensayo se extrajeron las hormonas esteroides de 500 μl de suero

problema, con diclorometano en una relación 1:10 v/v, una vez evaporada la fase orgánica, el residuo se resuspendió en 2.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos (0.01 M) a pH=8.0 y se obtuvieron 500 µl por triplicado para el ensayo. Se utilizó un suero bovino rico en transcortina. El suero libre del esteroide utilizado unió el 40-50 % de trazador radioactivo en una dilución 1:10. La separación de las fracciones libre y unida se realizó con DEAE-celulosa activada con NaCl. Las condiciones finales del ensayo permiten cuantificar de 3 a 40 ng/ml del esteroide. En tubos de vidrio se colocaron por triplicado, 100 µl de la dilución de trabajo del suero rico en transcortina, 100 µl de F marcado con tritio (1,2,6,7,³H-Cortisol, 70.0 Ci/mmol) conteniendo ~ 30.17 pg, (10,000 cpm), 500 µl de la solución estandar o problema y 200 µl de DEAE-celulosa; los tubos de ensayo se agitaron e incubaron a 4 C durante 24 horas. Posteriormente se centrifugaron a 1000 G durante 15 minutos y el sobrenadante (fracción libre) se decantó a un vial. Se adicionaron 5.0 ml de líquido de centelleo y se valoró en un contador de centelleo líquido.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se presentan como la media \pm la desviación estandar. Las diferencias entre grupos se evaluaron por análisis de varianza simple y las diferencias mínimas significativas por una prueba Tukey; en algunos casos se utilizó la t de student, en un paquete GB-STAT (Friedman, 1991). Se consideró diferencia significativa cuando $P < 0.05$ y diferencia altamente significativa cuando $P < 0.01$.

5. RESULTADOS

5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RADIOLIGANDO PARA RECEPTORES A CORTISOL EN CITOSOL DE HÍGADO DE RATA

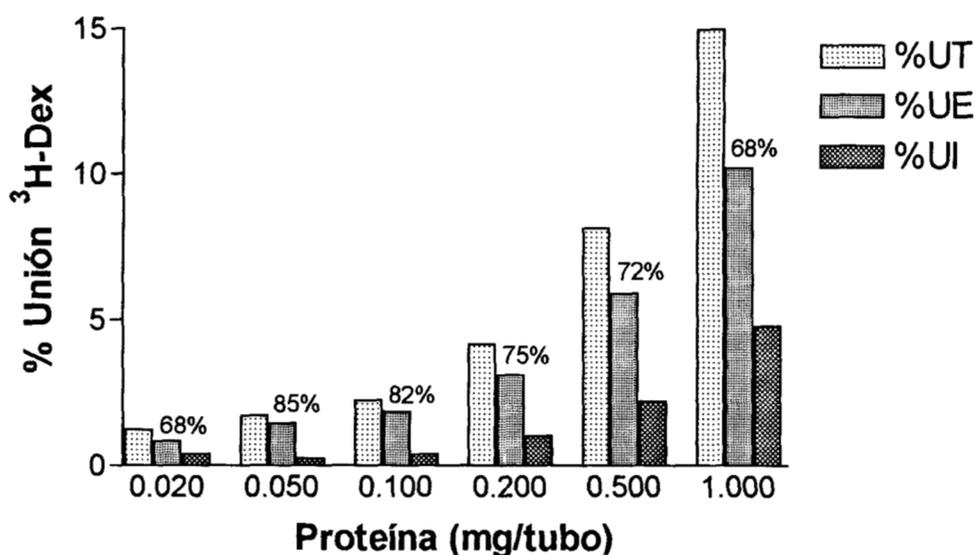
Se estandarizó la técnica de radioligando para receptores a F en la fracción citosólica de hígado de rata con base en la técnica usada por Panarelli y colaboradores (1995).

Se seleccionó una concentración óptima de proteínas totales para el ensayo de radioligando en citosol de hígado de rata. En la Figura 8 se muestra el porcentaje de unión de 800 fmol de $^3\text{H-Dxm}$ frente a diferentes cantidades de proteína de la fracción citosólica de hígado de rata. La cantidad de proteína que se decidió utilizar fue de 0.2 mg/tubo, ya que presenta una UT apreciable y una unión específica UE del 75 %; porcentaje que equivale a 184.45 fmol. En las cantidades mayores de proteína aunque aumenta la UT, disminuye el porcentaje de la UE.

Las condiciones finales del ensayo de radioligando para RG en citosol de hígado de rata, fueron las siguientes: Se incubaron 600 μl conteniendo 0.2 mg de proteína citosólica con 400 fmol en 100 μl de $^3\text{H-Dxm}$ a 4 C durante 18-24 horas. Para calcular la unión inespecífica, en todos los casos se realizaron incubaciones paralelas adicionadas de un exceso de Dxm (96,000 fmol). Después de la incubación se adicionaron 200 μl de carbón cubierto con dextrán (0.75 / 0.075 %) para separar la hormona marcada unida al receptor, de la hormona libre, se incubaron durante 60 minutos a 4 C, posteriormente se centrifugó a 1200 G. El sobrenadante, que contiene la fracción unida se decantó a un vial y se le adicionaron 5.0 ml de líquido de centelleo y se contaron al día siguiente en un contador de centelleo líquido. Muestras de este tejido se utilizaron como control positivo para los ensayos en hígado de cabra.

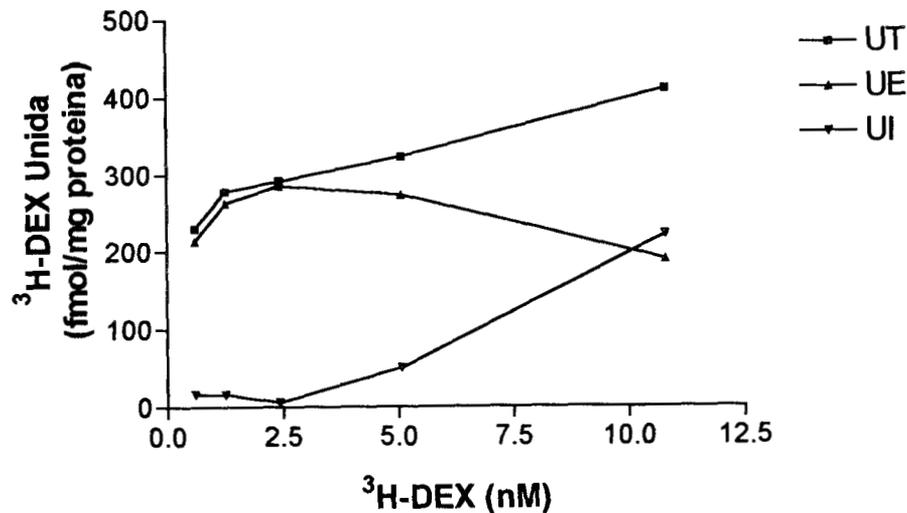
Una característica general de los receptores es mostrar una cinética de saturación con afinidades de unión para ligandos específicos. El patrón de unión de la ^3H -Dxm a los RG obtenido en la fracción citosólica de tejido hepático de rata se muestran en la Figura 9a, en ella se observa que en el intervalo de 2.5×10^{-9} a 5.0×10^{-9} M de Dxm, se obtiene la mayor UE. La Figura 9b, muestra los resultados de la UE analizados por el método de Scatchard (1949), para estimar el número ($N = 319.18$ fmol/mg de proteína) y la afinidad de los sitios de unión a ^3H -Dxm ($K_a = 5.81$ nM). La constante de afinidad de los sitios de unión a ^3H -Dxm aquí encontrada está dentro del intervalo (2.6 a 7.4 nM); comunicado por otros autores en el mismo tejido y la misma especie (Panarelli et al., 1995; Feldman, 1974; Rousseau et al., 1972).

Unión de ^3H -Dexametasona en Citosol de Hígado de Rata

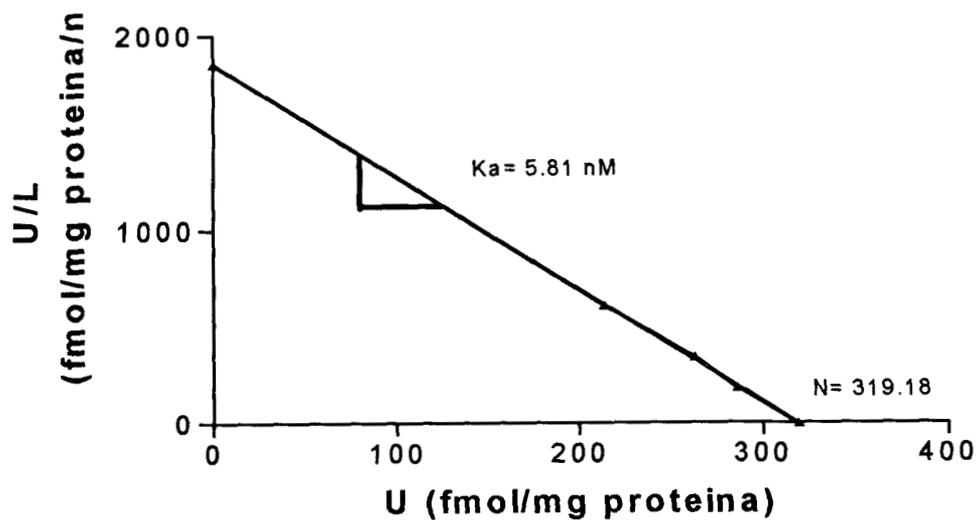


222876

Figura 8. Porcentaje de unión de ^3H -Dexametasona a sitios receptores en citosol de hígado de rata como una función de la concentración de proteína total citosólica. Se muestran la unión total, UT; unión específica, UE y unión inespecífica, UI, cuando se incubaron diferentes diluciones de proteínas totales de la fracción citosólica durante 18 a 24 horas a 4 C con 100 μl de ^3H -Dxm (800 fmol, 1.2×10^{-9} M) para obtener la unión total de los sitios receptores a ^3H -Dxm. La unión inespecífica se estimó realizando una incubación paralela en presencia de un exceso (120 veces) de dexametasona fría (Dxm) (100 μl \approx 96,000 fmol/tubo). Con la diferencia entre la UT y la UI se obtiene la UE.



(a)



(b)

Figura 9. Curva de saturación de sitios de unión a $^3\text{H-Dxm}$ y análisis de Scatchard de la unión específica en citosol de hígado de rata. En a, se presenta la curva de saturación de sitios de unión a $^3\text{H-Dxm}$. Se muestran la unión total (UT), la unión específica (UE) y la unión inespecífica (UI). La unión fue determinada por la incubación de 0.2 mg de proteína/tubo con $^3\text{H-Dxm}$ en una concentración de 0.61×10^{-9} a 10.8×10^{-9} M. Para determinar la UI se realizó una incubación paralela con concentraciones crecientes de Dxm (1.46×10^{-7} a 26.0×10^{-7} M; 146 a 2600 nmol/tubo). La UE es la diferencia entre UT menos UI. En b se muestra la UE analizada por el método de Scatchard para estimar el número (N) y afinidad de los sitios de unión a $^3\text{H-Dxm}$ (K_a).

5.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RADIOLIGANDO PARA RECEPTORES A GLUCOCORTICOIDES EN CITOSOL DE HÍGADO DE CABRA

La concentración seleccionada de proteína del citosol de hígado de cabra fue de 2.0 mg/tubo debido a que esta cantidad presentó un porcentaje de UE del 79% (17.76 fmol/mg proteína) y una UI baja con respecto a las otras cantidades analizadas. Como se observa en la Figura 10, por debajo de esta masa de proteína la UT es baja y por arriba la UI es alta.

Así, las condiciones finales del ensayo para la cuantificación RG en citosol de hígado de cabra fueron las siguientes: 2.0 mg de proteína citosólica en 600 μ l de solución amortiguadora se incubaron con 100 μ l de solución conteniendo 400 fmol de $^3\text{H-Dxm}$ a 4 C, durante 18-24 horas. En todas las muestras se realizaron incubaciones paralelas adicionando un exceso de Dxm (96,000 fmol/tubo) para calcular la UI. Para la determinación de los RG tipo I y tipo II se adicionó en el ensayo un tercer tubo con aldosterona como se indica en la sección correspondiente de material y métodos. Después de la incubación se adicionaron 200 μ l de carbón con dextrán (0.75 / 0.075 %), se incubó durante 60 minutos a 4 C, posteriormente se centrifugó a 1200 G. El sobrenadante, se decantó a un vial, se le adicionaron 5.0 ml de líquido de centelleo y se contaron por centelleo líquido.

En la Figura 11 aparece la unión a los RG totales en el citosol de hígado de cabras no gestantes y en distintas etapas de la gestación. La unión a $^3\text{H-Dxm}$, es semejante entre las cabras no gestantes y las que se encuentran en el primer tercio de la gestación. A partir de ese momento en que se unen 19.95 fmol/mg de proteína, se observa un comportamiento bifásico con una disminución significativa que alcanza su punto mas bajo en la etapa de 101 a 125 días de gestación (2.1 fmol/mg de proteína); presentando posteriormente un incremento

considerable (18.09 fmol/mg de proteína) en la última etapa (126 días al parto). La Figura 12 muestra la relación entre los receptores Tipo I y Tipo II, aunque ambos casos muestran la misma tendencia, la cantidad de receptores Tipo I es sustancialmente menor e incluso en la etapa de 101-125, prácticamente desaparecen.

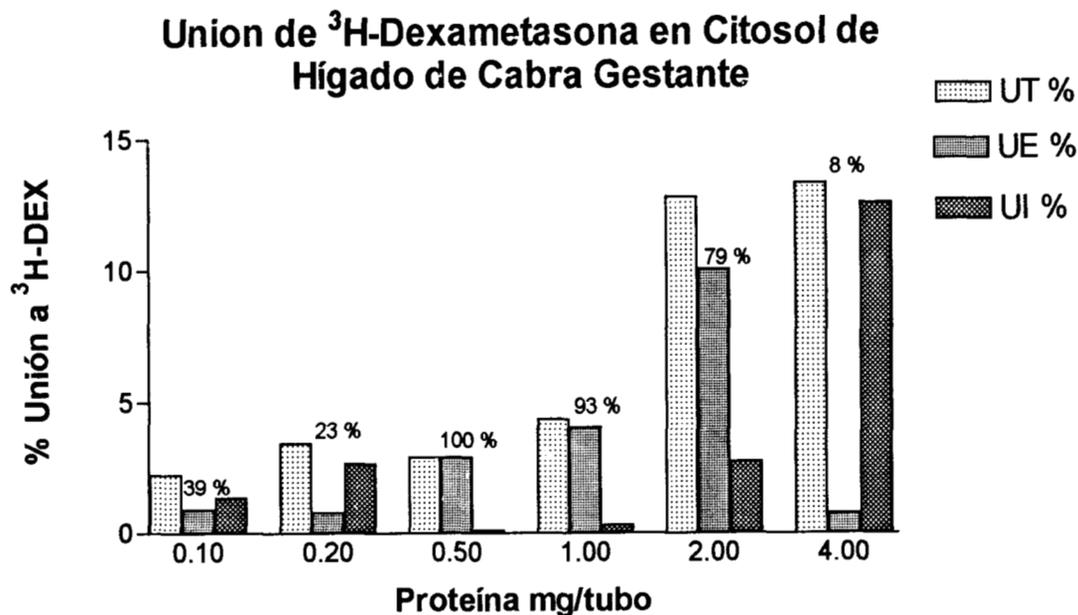


Figura 10. Porcentaje de unión de ^3H -Dxm a sitios receptores en citosol de hígado de cabra como una función de la concentración de proteína total citosólica Se muestra la unión total, UT; la unión específica, UE y la unión inespecífica, UI. Se incubaron diferentes diluciones de proteína de la fracción citosólica durante 18 a 24 horas a 4 C con 400 fmol de ^3H - Dxm para obtener la unión total de los sitios receptores a ^3H -Dxm. La UI se estimó realizando una incubación paralela en presencia de un exceso (240 veces) de dexametasona fría (96,000 fmol/tubo).

5.3. NIVELES CIRCULANTES DE CORTISOL EN CABRAS

La concentración sanguínea de F en el compartimento materno se presenta en la Figura 11, aunque los niveles en general son alto, debido a la situación estresante en que se encontraban los animales en el momento del sacrificio, las hembras que se encontraban en el intervalo de gestación de 101 a 125 días, presentan concentraciones significativamente ($p < 0.0001$) nas altas (659.64 nmol/l) que en cualquier otro momento de la gestación. Este

intervalo de gestación es al mismo tiempo en donde la cantidad de RG en hígado materno fue menor.

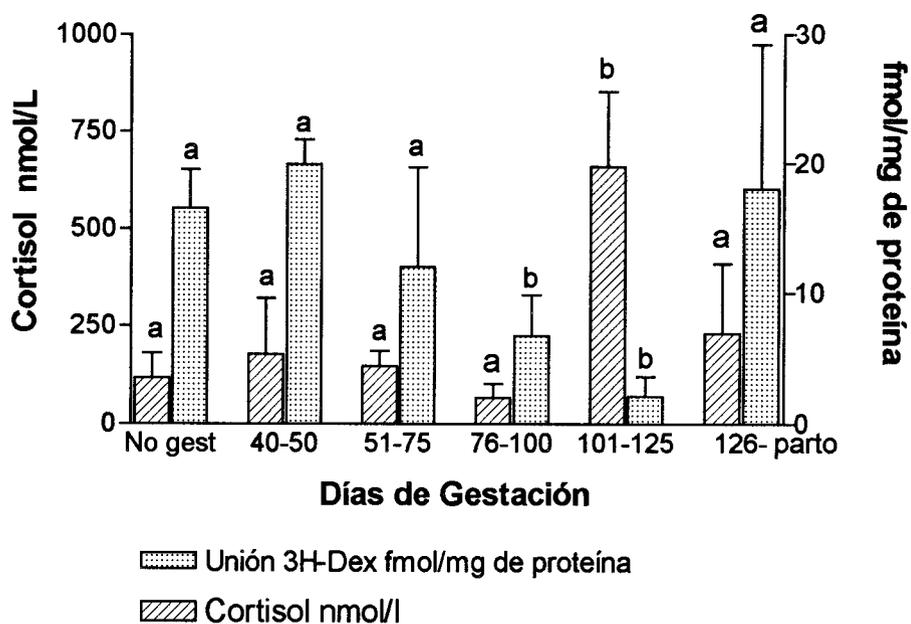


Figura 11. Asociación entre niveles de cortisol circulante y el número de receptores a cortisol en citosol de hígado de cabra. En la etapa de 101-125 días de gestación los niveles de cortisol se incrementan y el número de receptores a cortisol totales disminuye. Los valores representan las medias \pm la desviación estándar; letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.01$, las comparaciones se hacen entre barras semejantes.

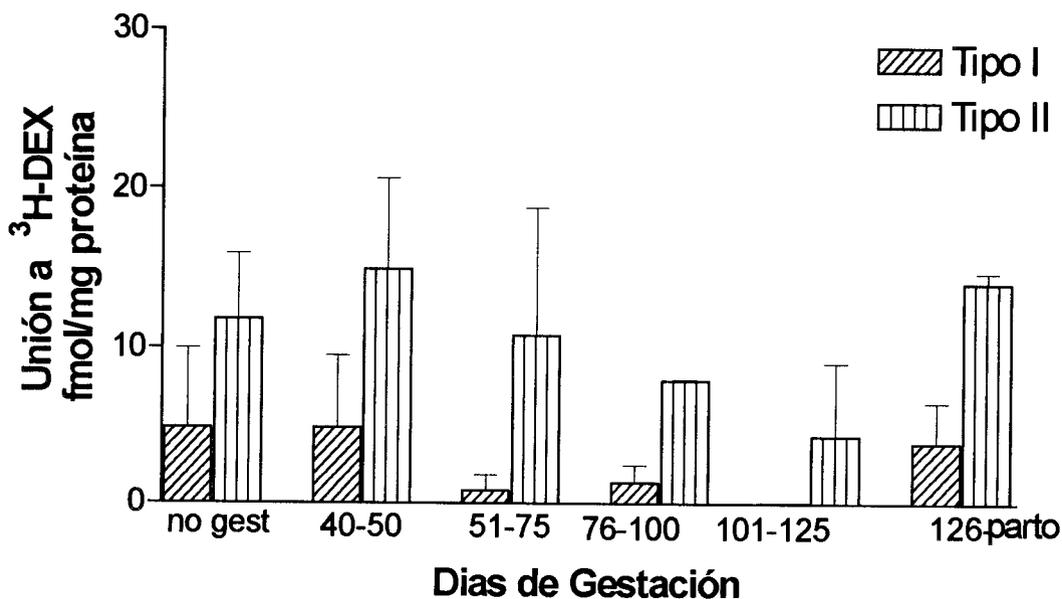


Figura 12. RG en citosol de hígado de cabra no gestante y en diferentes etapas de la gestación. La unión a RF Tipo I y Tipo II va disminuyendo ($p < 0.01$) hasta la etapa de 101-125 días de gestación, Los RF Tipo I incluso desaparecen en esa etapa. Las barras representan la media y las líneas la desviación estándar.

5.4 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RADIOLIGANDO PARA RECEPTORES A CORTISOL EN CITOSOL DE HÍGADO DE FETO CAPRINO.

En el caso del hígado del feto, también se seleccionaron 2.0 mg de proteína para montar el ensayo de RG. En la Figura 13, se observa que esta cantidad de proteína presentó una UE del 96% (80.76 fmol/mg de proteína) y una UI 2.0 % . Esta relación entre una mayor UE y una menor UI aunado al porcentaje de unión del 50 % es lo que nos llevó a seleccionar ésta masa.

Unión de ^3H -Dexametasona en Citosol de Hígado de Feto

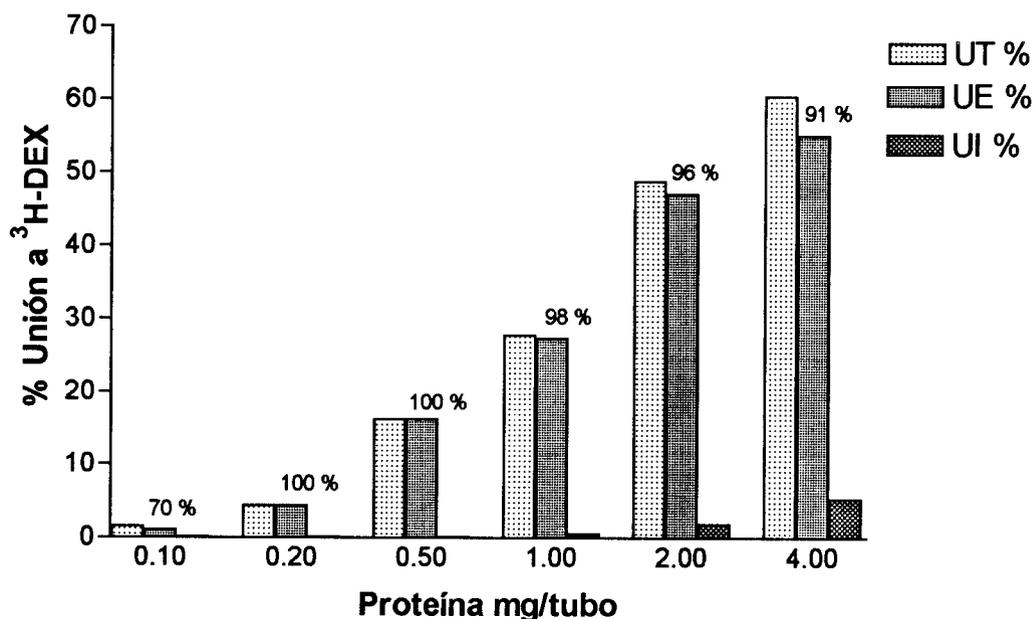


Figura 13. Porcentaje de unión a ^3H -Dexametasona en citosol de hígado de feto en función de la concentración de proteína total citosólica. Se muestra la unión total (UT), unión específica (UE) y unión inespecífica (UI). Se incubaron diferentes diluciones de proteínas totales de la fracción citosólica durante 18 a 24 horas a 4°C con $100\ \mu\text{l}$ de ^3H -Dxm ($400\ \text{fmol}$, $0.6 \times 10^{-9}\ \text{M}$) para obtener la unión total de los sitios receptores a ^3H -Dxm. La unión inespecífica se estimó realizando una incubación paralela en presencia de un exceso ($96,000\ \text{fmol/tubo}$) de dexametasona fría.

El patrón de unión de la ^3H -Dxm a los receptores a cortisol en la fracción citosólica del hígado de feto caprino se muestra en la Figura 14a; la UI fue baja y la saturación de los RG ocurre desde $2.4 \times 10^{-9}\ \text{M}$. La Figura 14b muestra la UE analizada por el método de Scatchard

(1949), para estimar el número ($N = 162.66$ fmol/mg de proteína) y la afinidad de los sitios de unión a ^3H -Dxm ($K_a = 1.96$ nM).

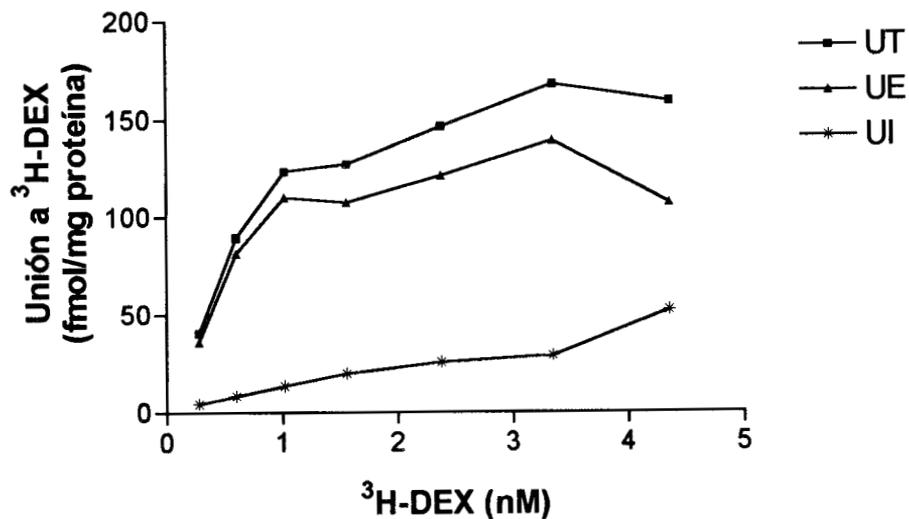


Figura 14 (A)

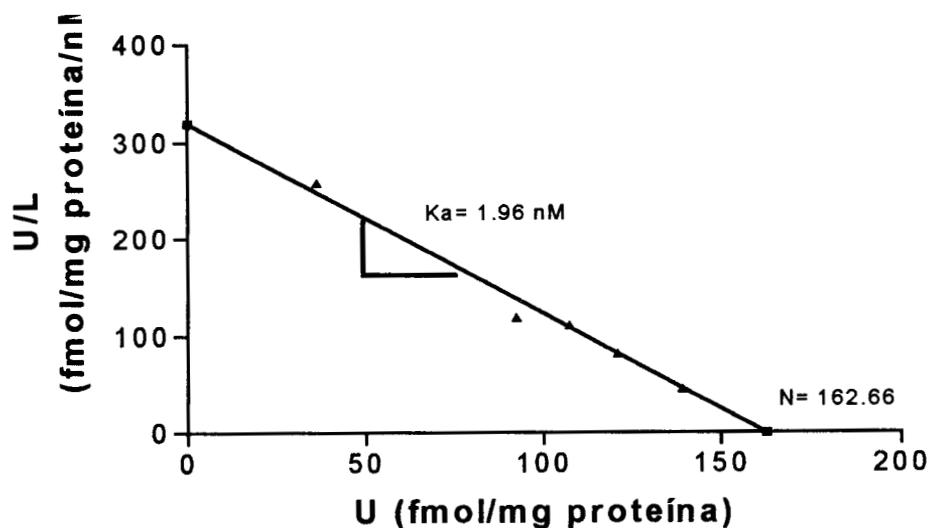
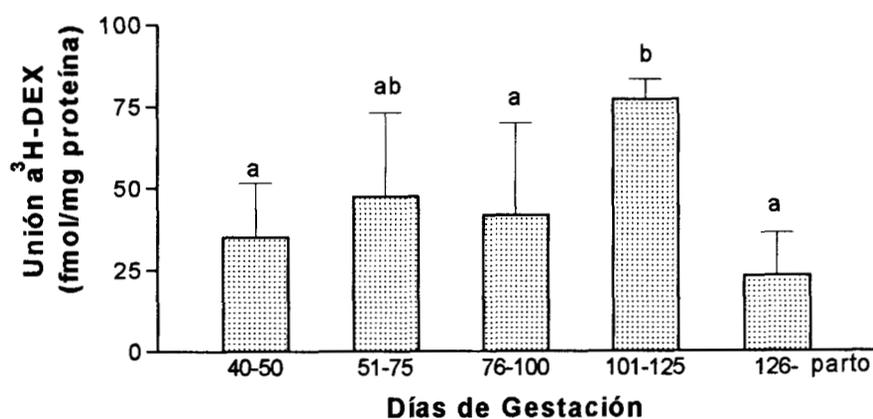


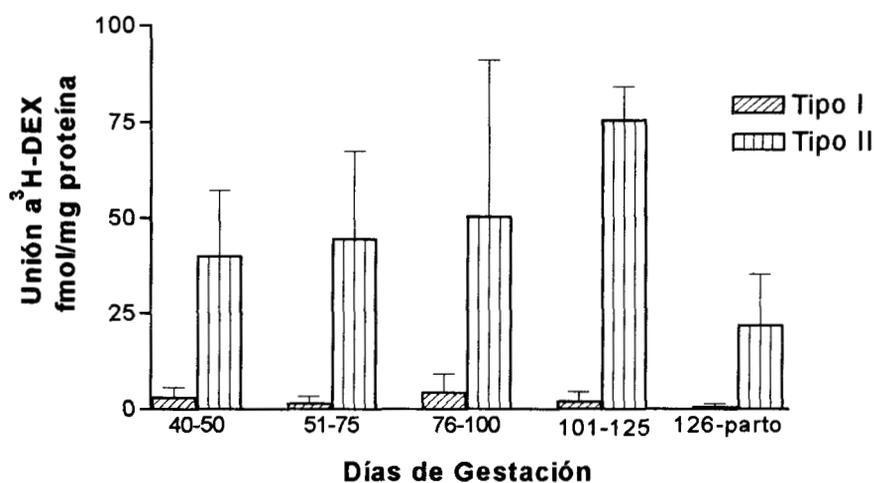
Figura 14 (B)

Figura 14. Curva de saturación de sitios de unión a ^3H -Dxmametasona y análisis de Scatchard de la unión específica en citosol de hígado de feto caprino. (A). La saturación se obtuvo a partir de 2.4×10^{-9} (1600 fmol /tubo). (B) muestra la UE ajustada por el método de Scatchard, y se estiman el número ($N = 162.66$ fmol/mg de proteína) y la afinidad de los sitios de unión a ^3H -Dxm. ($K_a = 1.96$ nM).

La población de RG totales en el citosol del hígado fetal se encontro entre 25 y 45 fmol/mg de proteína en practicamente todas las etapas de la gestación a excepción del intervalo de 101 a 125 días de gestación en que se elevo a 76.27 fmol/mg de (Figura 15a). En tres fetos de cada etapa se determinó la población de los tipos de RG, los receptores Tipo II son mucho más abundantes y tienden a increnetarse a medida que avanza la gestación, desde el intervalo de 40 a 50 día hasta los 101 a 125 días Los RF Tipo I son escasos y no presentan variaciones significativas a lo largo de la gestación (Figura 15b).



(A)



(B)

Figura 15. Receptores a cortisol en citosol de hígado de feto de cabra en distintas etapas de la gestación Los RG totales se incrementan en el intervalo de 101 a 125 días de gestación. Los RG tipo II se incrementan al avanzar la gestación hasta los 101 a 125 días y disminuyen en la última etapa, mientras que los Tipo I son mucho más escasos y prácticamente no sufren cambios.

5.5. Niveles circulantes de Cortisol en fetos caprinos

Los niveles sanguíneos de F en los fetos en general son mucho menores que en las madres; presentan un incremento significativo en la etapa de 51-75 días de gestación en donde alcanza valores de 87.32 ± 51.8 nmol/L (Figura 16), y los valores disminuyen hasta 33.06 ± 5.52 nmol/L en la etapa de 126 días de gestación al parto.

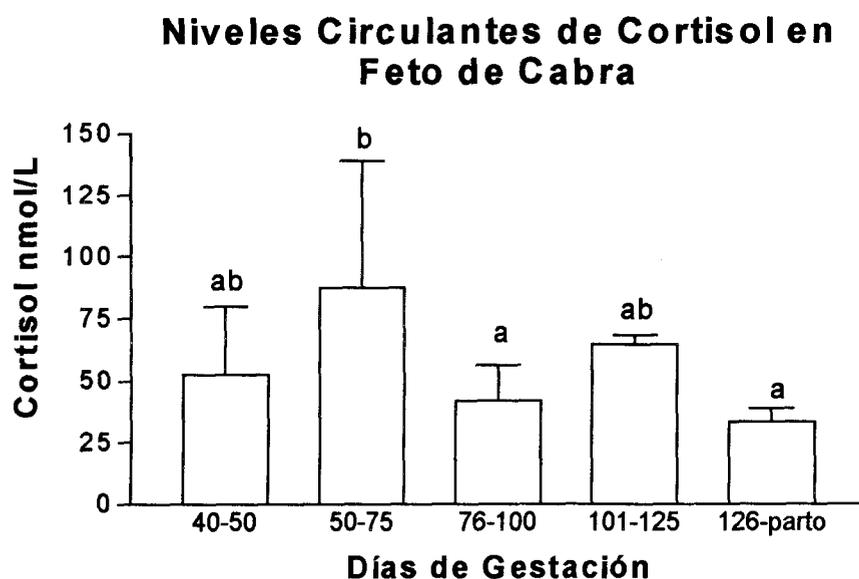


Figura 16. Niveles circulantes de cortisol en fetos de cabra en distintas etapas de la gestación. Los valores representan las media \pm la desviación estándar, $n = 5$ mediciones.

Cuando se comparan los niveles de F sanguíneo con los RG totales en hígado de los fetos (Cuadro 3) encontramos que la elevación de ambos parámetros coincide en las etapas de 51-75 y de 101-125 días de gestación, es decir se muestra una relación directa entre los niveles de F y los RG a diferencia de la relación inversa encontrada en la madre.

Cuadro 3. Niveles de cortisol sanguíneo y receptores totales a cortisol en citosol de hígado de fetos.

Etapas de gestación (Días)	Cortisol (nmol/l)	Receptores a cortisol (fmol/mg de proteína)
40-50	52.36 ± 27.51 ^{ab}	35.23 ± 16.36 ^a
51-75	87.28 ± 51.80 ^b	47.54 ± 25.5 ^{ab}
76-100	41.71 ± 14.40 ^a	41.75 ± 28.15 ^a
101-125	64.55 ± 3.86 ^{ab}	76.95 ± 6.25 ^b
126-parto	33.05 ± 5.54 ^a	23.28 ± 13.17 ^a

5.6. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RADIOLIGANDO PARA RECEPTORES A CORTISOL EN CITOSOL DE PLACENTA DE CABRA.

Los RG en citosol de placenta caprina se determinaron en la carúncula (zona fetal) y el cotiledón (zona materna). La concentración de proteína óptima para utilizar en el ensayo de radioligando fue de 2.0 mg/tubo para ambas zonas, ya que como se muestra en la Figura 17, es ésta la concentración que proporcionó un porcentaje mayor de UE cuando se incubó con 400 fmol (0.6×10^{-9} M) de $^3\text{H-Dxm}$.

La saturación de los RG a $^3\text{H-Dxm}$ en la fracción citosólica del placentoma de 112 días de gestación ocurrió entre 1.19 a 1.83×10^{-9} M (Figura 18a). En la Figura 18b se presenta el resultado del análisis de Scatchard, la afinidad de la $^3\text{H-Dxm}$ por los sitios de unión, así como el número de receptores es mayor en la cabra de 112 días de gestación, ($K_a = 2.06$ nM, $N = 21.92$ fmol/mg proteína) con respecto a la cabra de 77 días de gestación ($K_a = 3.57$, $N = 13.95$ fmol/mg proteína).

Unión a ³H-Dexametasona a Sitios Receptores en Citosol de Placenta (Cotiledón) de Cabra

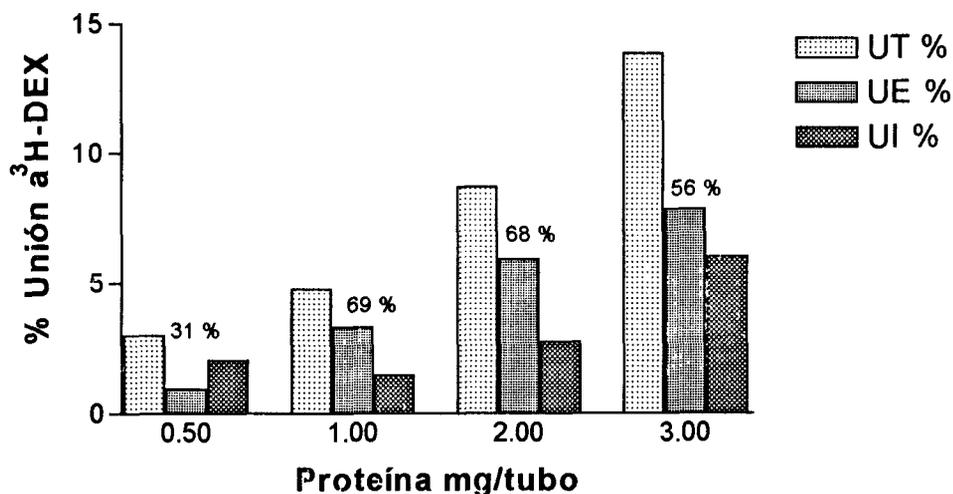
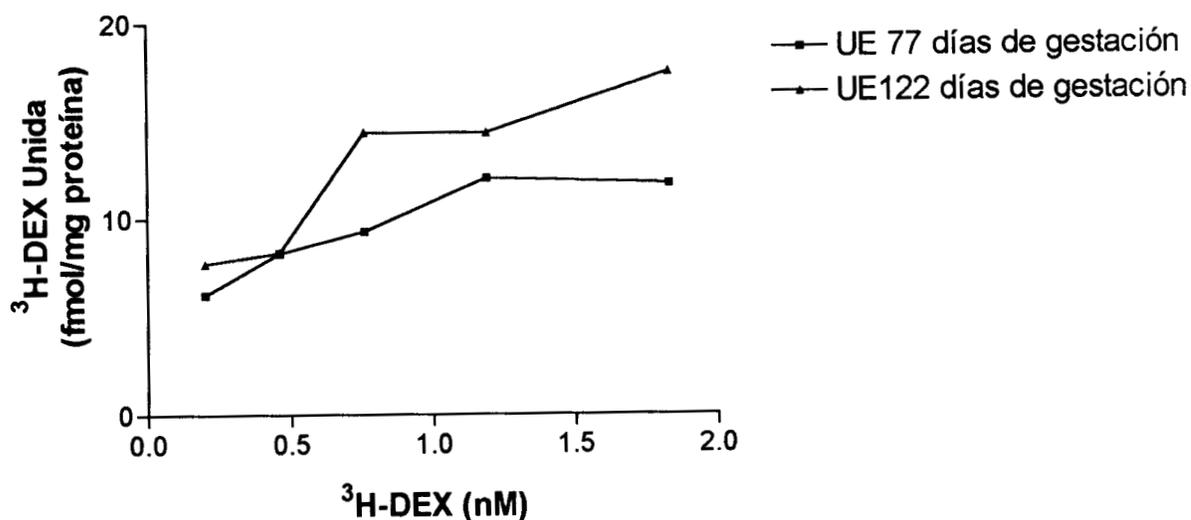
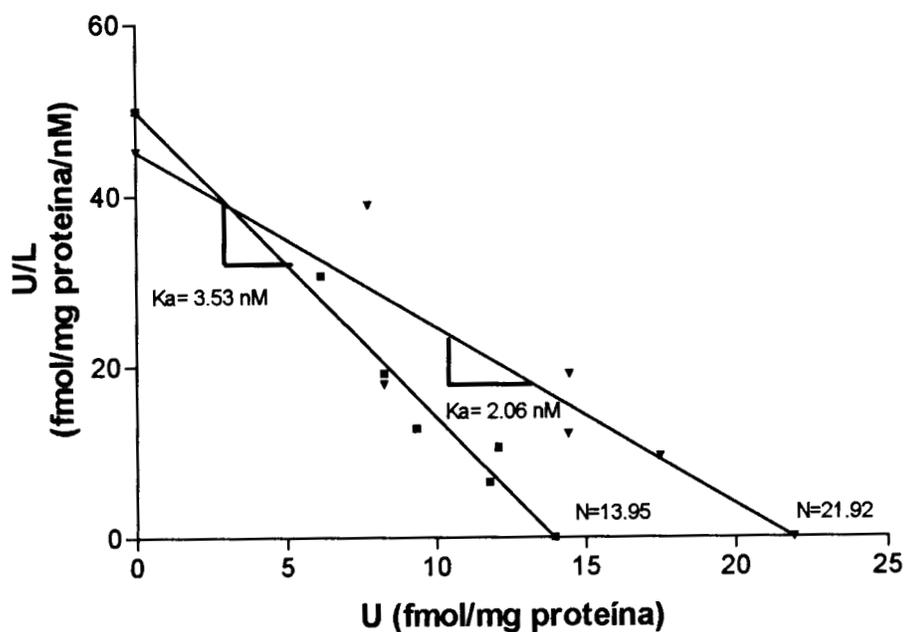


Figura 17. Unión de ³H-Dexametasona a sitios receptores en citosol de placenta de cabra en función de la concentración de proteína total ciosólica. Se muestran la unión total, UT; unión específica, UE y unión inespecífica, UI, cuando se incubaron diferentes diluciones de proteínas totales de la fracción citosólica del cotiledón durante 18 a 24 horas a 4 C, con 400 fmol (de 0.6×10^{-19} M) de ³H-Dxm. La unión inespecífica se estimó realizando una incubación paralela en presencia de un exceso (240 veces) de dexametasona fría (96,000 fmol/tubo). Con la diferencia entre la UT y la UI se obtiene la UE.

La población de RG en la zona fetal (carúncula) y en la zona materna (cotiledón) del placentoma de la cabra, están referidos en la Figura 19, cuando se observan por separado, los RG de la zona fetal (Figura 19a) presentan un incremento significativo en el intervalo de 101 a 125 días de gestación; mientras que los de la zona materna (Figura 19b) aunque no alcanzan diferencias significativas, presentan una tendencia a disminuir conforme avanza la gestación desde la etapa de 40-50 y hasta la de 76-100 días de gestación, y un posterior incremento a los 101-125 días de gestación que se mantiene en la última etapa (126-parto). Cuando se considera la población total de RG en el placentoma (Figura 19c), entonces presentan una tendencia a disminuir desde el intervalo de 40 a 50 días de gestación hasta el de 76 a 100 días, y un incremento significativo en la etapa de 101-125 días de gestación que se mantiene en el último intervalo.



(A)



(B)

Figura 18. Cinética de saturación y análisis de Scatchard en la fracción citosólica de tejido placentario de cabras. Se presenta la cinética de saturación de los sitios receptores a $^3\text{H-Dxm}$ en citosol de placentoma de cabra de 77 y de 122 días de gestación. Estas presentan una saturación que va de 780 a 1220 fmol/tubo ~ 1.19 a 1.83×10^{-9} M de $^3\text{H-Dxm}$. En (B) se muestran las constantes de afinidad de los sitio de unión a $^3\text{H-Dxm}$. (K_a) calculadas para cada animal, 3.57 y 2.06 nM para la cabra de 77 (+) y 122 (∇) días de gestación, respectivamente. También se muestra el número de receptores calculado para la cabra de 77 ($N = 13.95$ fmol/mg de proteína) y 122 ($N = 21.92$ fmol/mg de proteína) días de gestación.

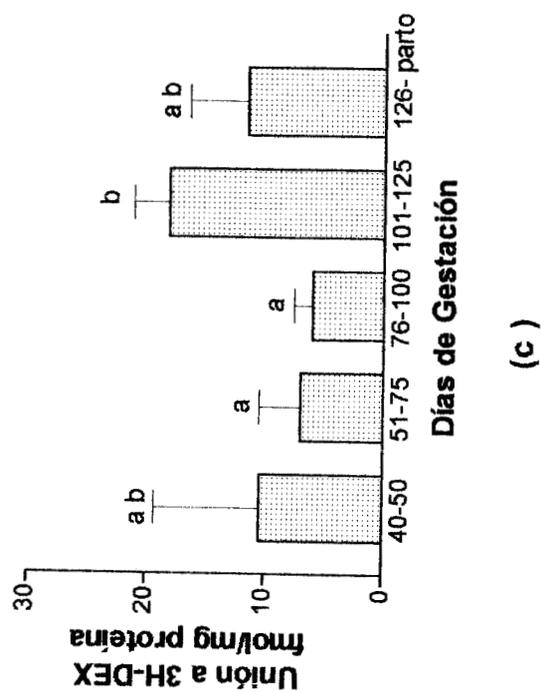
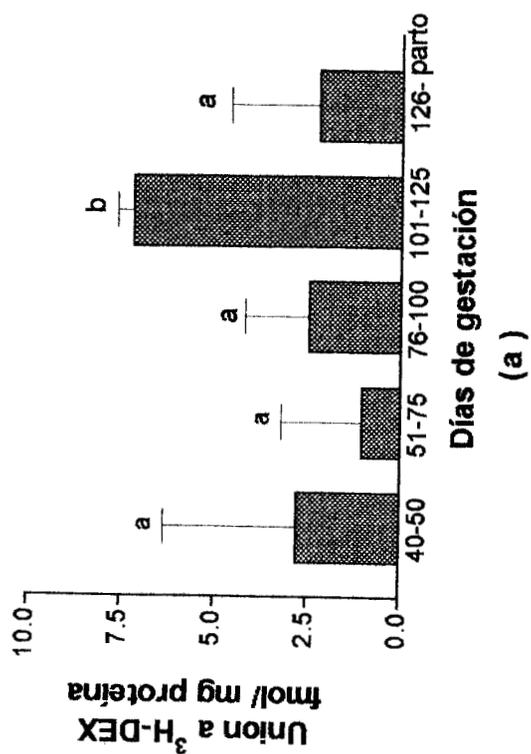
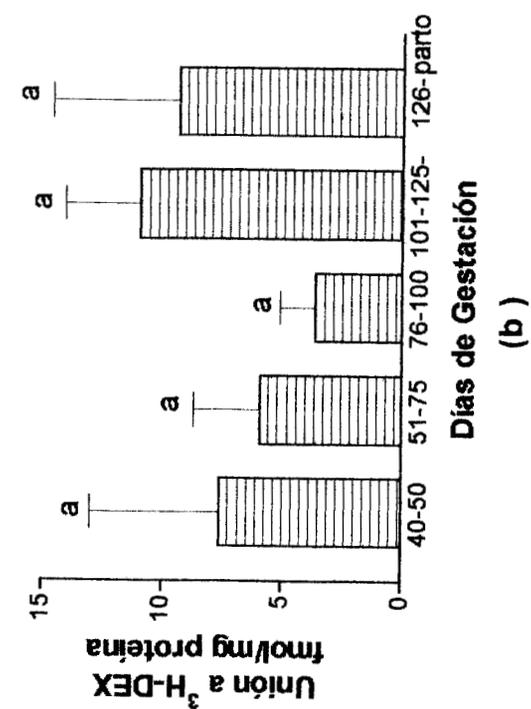


Figura 19. Receptores a cortisol en placenta de cabra en distintas etapas de la gestación. (a) Carúncula (zona fetal), (b) Cotiledón (zona materna), y (c) Placentoma (zona fetal más zona materna).

Para el análisis de la determinación de los Tipo I y Tipo II de los RG, no se consideró el intervalo de 40 a 50 días de gestación porque tenía pocas muestras; y los otros intervalos fueron agrupados por tercios de gestación, 51 a 100 días (segundo tercio) y 101 días a parto (tercer tercio). Los resultados se presentan en la Figura 20, los RG Tipo II son más abundantes y su número, no presentan variaciones entre el segundo y tercer tercio de la gestación. Sin embargo, los RG Tipo I aunque representan solo alrededor del 16% del total, sufren un incremento significativo de 0.675 ± 1.1 fmol/mg de proteína en el segundo tercio a 1.67 ± 1.65 fmol/mg de proteína en el último tercio de gestación.

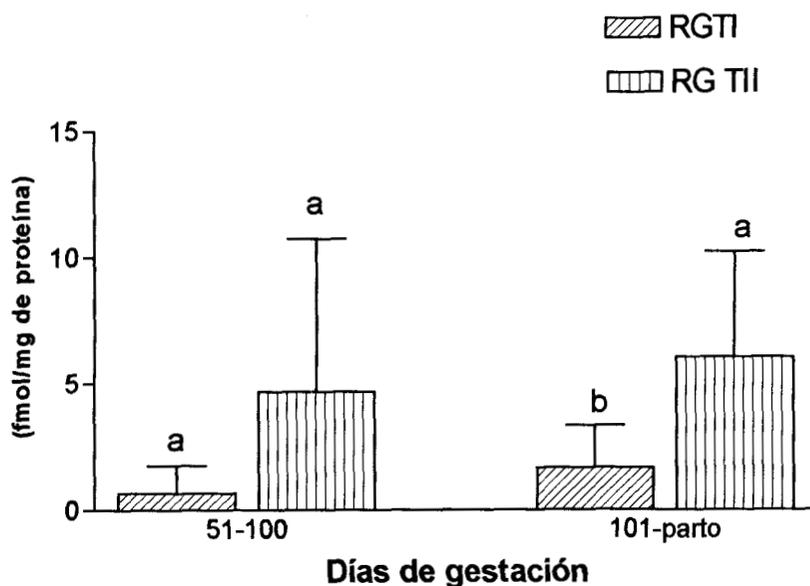


Figura 20. Tipos de RG en los placentomas en el segundo y tercer tercios de la gestación. Los RG Tipo II se encuentran en mayor proporción, pero no presentan variaciones; en cambio aunque el número de los RG Tipo I es menor se incrementan significativamente en el último tercio de la gestación.

5.7. NIVELES CIRCULANTES DE PROGESTERONA EN CABRAS GESTANTES

Los niveles circulantes de P_4 en cabras disminuyen al final de la gestación (Figura 20), con valores que van de 45.49 ± 2.43 nmol/L en etapas tempranas de la gestación (40-50 días) hasta 11.75 ± 5.27 nmol/L en la última etapa de 126 días de gestación al parto.

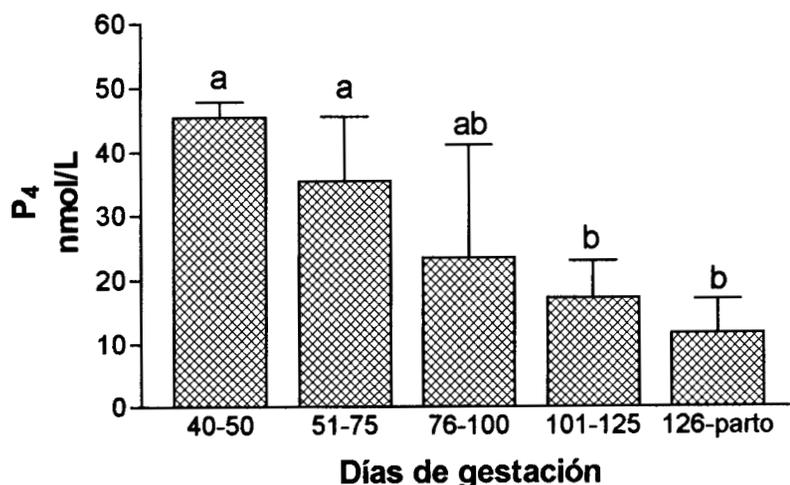


Figura 21. Concentraciones circulantes de progesterona durante la gestación en cabras. Los valores representan las medias \pm las desviaciones estándar, de una $n = 5$ mediciones. $P < 0.05$.

Si se asocian los niveles circulantes maternos de F y P₄ con los RG en el placentoma de la cabra en las distintas etapas de la gestación, tenemos que en la etapa de 101-125 días es cuando ocurren los cambios más importantes en estos parámetros, tales como un incremento en las concentraciones de F, así como en el número de RG y la disminución de la P₄ (Figura 21), además la afinidad entre la Dxm y el RG placentario disminuye en ésta etapa con respecto a la anterior (Figura 18b), resultando en un aumento de la capacidad de unión a los glucocorticoides.

La P₄ tiene la capacidad de unirse a los RG, de esta forma compite con el F por estos sitios de unión (Rousseau, 1972). En la Figura 22 se observa que la relación entre el F y la P₄ (F/ P₄) circulantes se incrementa de 4.7 en las primeras etapas de la gestación hasta 40.4 en la etapa de 101-125 días, es decir, hay aproximadamente 8.6 veces más moléculas de F que de P₄ en la circulación. Así mismo el porcentaje de unión de la P₄ a los RG disminuye en esta misma etapa (42.4%) con respecto a la anterior (69.0 %), mientras que el porcentaje de unión del F a los RG se incrementa en esta misma etapa (57.6 %).

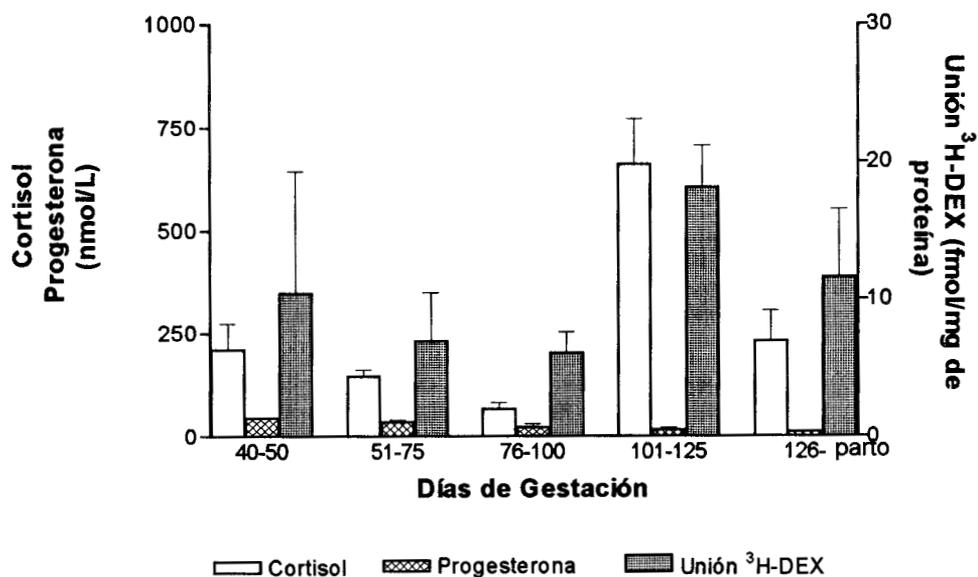


Figura 22. Se muestra la relación entre los niveles circulantes de cortisol y progesterona, y el número de los RG en el placentoma de cabra en las distintas etapas de la gestación. En el intervalos de 101 a 125 días de gestación coinciden la disminución de progesterona, y el incremento en el cortisol y el número de receptores a glucocorticoides.

Proporción de Ct/P₄ y % de Unión de la P₄ a los Receptores a Cortisol en placentoma de Cabra

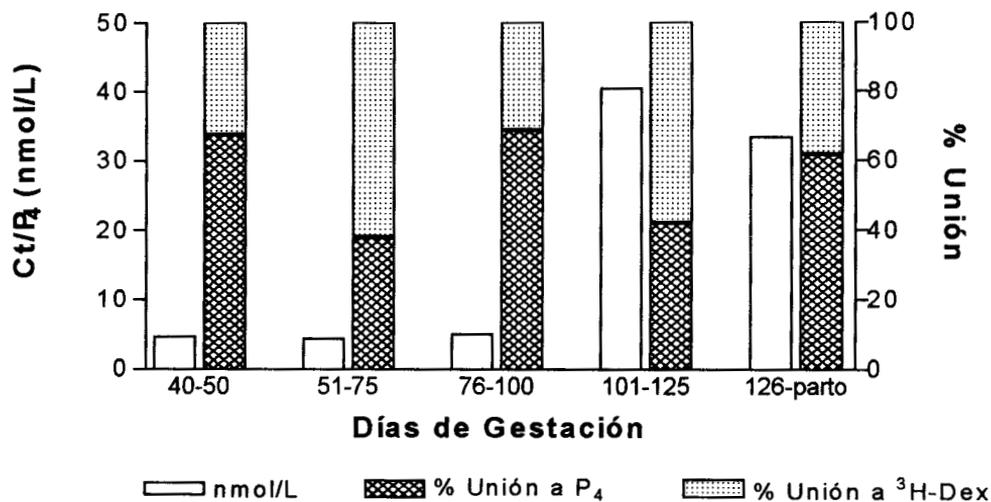


Figura 23. Asociación entre la relación F/P₄ y el porcentaje de desplazamiento de ³H-Dxm por P₄ en citosol del cotiledón de placenta de cabra en distintas etapas de la gestación.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo muestran que durante la etapa de 101 a 125 días de gestación ocurren cambios en la concentración sanguínea de F y P₄ maternos y en el número y afinidad de los RG citosólicos en el hígado y el placentoma, que conjuntamente pueden explicar la mayor susceptibilidad de las cabras al aborto en esta etapa de la gestación.

En efecto, la concentración sanguínea de F materno fue significativamente más alta en el grupo de animales con 101 a 125 días de gestación (659.36 nmol/L) que en las cabras en otras etapas de gestación (225.39 nmol/L). Los niveles de F materno en todas las etapas fueron mayores a los obtenidos en cabras gestantes (19.31 a 44.14 nmol/L) por nosotros y otros autores (Van Rensburg, 1971; Paterson and Linzell, 1971, Wentzel et al., 1975b; Romero et al., 1998); sin embargo, los animales utilizados en este trabajo habían sufrido de un estrés por transporte y ayuno de 18 horas, lo que puede explicar los altos valores de F aún en los animales no gestantes (115.87 nmol/L). El incremento de F asociado con el estrés por transporte es bien conocido, y ha sido corroborado por Nwe y colaboradores (1995) en cabras no gestantes, aunque los valores basales descritos por estos autores son mas altos (115.87 nmol/L) que los reconocidos en la literatura, posiblemente porque se utilizó para su determinación una técnica de cromatografía de líquido de alta presión, el incremento fue claro desde los 30 minutos de viaje, alcanzó su pico a los 60 minutos (457.96 nmol/L), se mantuvo durante todo el viaje y al desembarque empezó a declinar hasta alcanzar sus valores basales tres horas después. En el caso de los animales de este estudio, el traslado se inició en la tarde de un día, al termino del viaje se quedaron arriba del camión sin comida y fueron sacrificados a las 12 horas del día

siguiente, situación que puede mantener elevados los niveles de F. Aún en estas condiciones, el incremento de F materno observado en el grupo de 101 a 125 días de gestación es mucho mayor que en los animales en otras etapas de la gestación y puede deberse al súbito incremento de la demanda energética que sufre la madre por el inicio del crecimiento exponencial del feto en el último tercio de la gestación, con la consecuente demanda de glucosa y de la gluconeogénesis (Bell, 1995).

Las concentraciones sanguíneas de P_4 materna durante la gestación presentan una disminución conforme ésta avanza, con valores que van de 45.47 nmol/L en etapas tempranas (40-50 días de gestación) hasta 11.73 nmol/L en las etapas avanzadas (126 al parto). El valor promedio de P_4 obtenido en este trabajo es de 27.92 ± 15.70 nmol/L, esta concentración es similar a los valores encontrados en un trabajo previo, 26.23 ± 11.13 nmol/L en cabras que parieron normalmente y 22.26 ± 13.35 nmol/L en cabras abortadoras, en ese trabajo también se observa una disminución de las concentraciones de P_4 periparto y periaborto, las cuales presentan una correlación negativa con las concentraciones circulantes de F (Romero et al., 1998). En la cabra como en otras especies (rata, coneja, cerda y yegua), el cuerpo lúteo es la principal fuente de P_4 para mantener la gestación, por lo tanto la luteólisis disminuye bruscamente los niveles de P_4 . La disminución de la concentración de P_4 en las etapas avanzadas de la gestación pudiera ser ocasionada por el envejecimiento del cuerpo lúteo.

Por otra parte, en este trabajo se encontró que el número de RG totales en citosol del hígado de cabra disminuye significativamente con el avance de la gestación, de valores que van de 19.95 fmol/mg de proteína en la etapa de 40-50 días de gestación hasta 3.94 fmol/mg de proteína en la etapa de 101-125 días. Al relacionar los niveles circulantes de F materno con el número de RG en el hígado en las distintas etapas de la gestación, se tiene que cuando los

niveles de F son más altos, en la etapa de 101-125 días de gestación los RF se encuentran significativamente más bajos. Estos resultados pueden deberse a una regulación negativa del receptor por el esteroide o bien a un incremento en la secreción de F por una falta de respuesta en ese momento debido al bajo número de RG en el hígado ocasionada por otros factores. En esta etapa se produce una gran demanda gluconeogénica al hígado materno, que es incrementada en situaciones de estrés. Si el hígado no es capaz de contender con esa demanda el F continuará incrementándose. Entre los factores que alteran el nivel de expresión de los RG, los glucocorticoides parecen ser uno de los más potentes y causan regulación a la baja del receptor en muchas líneas celulares (Hoeck et al., 1989; Silva et al., 1994) y tejidos (Sapolsky et al., 1984; Murphy, 1991). Por lo tanto se puede señalar que el efecto negativo de los glucocorticoides sobre la expresión de los RG representa un mecanismo de retroalimentación negativa de asa corta que protege a los tejidos de un excesivo nivel de glucocorticoides en estados hipercortisolémicos. Al menos tres mecanismos pueden participar en la regulación a la baja mediada por glucocorticoides: a) a nivel transcripcional, los glucocorticoides aparentemente inhiben la síntesis del ARNm para el RG por interferir con la activación transcripcional del gen mediada por AP-1 y/o AP-2 (Nobukuni et al., 1995, citado por Bamberger et al., 1996), b) también se ha mostrado que el RG activado puede unirse a sitios específicos del ADN y/o ARNm (Zong, et al., 1990; citado por Bamberger et al., 1996); esto conduce a la regulación a la baja del ARNm de RG ya sea por inhibición de la transcripción y/o por reducción de la estabilidad de su ARNm y su traducibilidad, y C) finalmente la vida media de la proteína de RG puede ser disminuida en presencia de los glucocorticoides (McIntyre and Samuels, 1989), estos autores proponen que la vida media del RF disminuye cuando el receptor activado es degradado más rápidamente por la célula, o cuando la estabilidad del receptor se ve

disminuida. Además de los glucocorticoides, los efectos de otros esteroides (Peiffer and Bardin, 1987) y neurotransmisores (Antakly et al., 1987) se pueden sumar a la complejidad de la transcripción y expresión del RG.

A pesar de la evidencia experimental que apoya la existencia de una regulación a la baja como un control de los RG, en este caso es difícil sostener ese fenómeno como explicación de la baja concentración de RG en el hígado en la etapa de 101-125 días, pues en este periodo el placentoma está expuesto a las mismas concentraciones de F sanguíneo y sin embargo la cantidad de RG es mucho mayor. En efecto, los receptores a F en el placentoma de cabra se detectaron desde la etapa de 40-50 días de gestación y contrariamente a lo que ocurrió con los RG en el hígado materno, éstos se incrementaron significativamente en la etapa de 101-125 días de gestación, este incremento ocurre junto con la elevación en los niveles circulantes de F y la disminución de la P_4 .

El análisis de los tipos de RG en el placentoma a lo largo de la gestación, mostró un incremento de los RG Tipo I en el último tercio de la gestación que coincide con una disminución en la afinidad del RG a la $^3\text{H-Dxm}$ disminuyó ($K_a = 2.06 \text{ nM}$) con respecto a la etapa anterior ($K_a = 3.53 \text{ nM}$). Además en este mismo intervalo, la capacidad de la P_4 para desplazar $^3\text{H-Dxm}$ disminuyó y la concentración sanguínea de P_4 también. El papel que juega el incremento de los RG tipo I en la modificación de la afinidad a $^3\text{H-Dxm}$ y la competencia por la P_4 aún no está analizado. Otros autores han descrito que los RG pueden estar ocupados por P_4 durante la gestación (Rousseau et al., 1972), de tal forma que esta competencia por P_4 puede prevenir o disminuir los efectos del F sobre la placenta en las etapas tempranas, cuando los

niveles circulantes de P_4 se encuentran muy elevados. Así resulta que con estos cambios fisiológicos el animal en este estadio es altamente sensible a los efectos del F en el placentoma. Los cambios que se manifiestan en esta etapa (101-125 días de gestación) coinciden con la etapa en la cual hemos observado que ocurren con más frecuencia los abortos (102-134 días de gestación) (Romero et. al, 1998). Por lo que se muestra que durante este periodo de gestación la respuesta materna del F al estrés es mayor y RG en el placentoma se encuentran en mayor cantidad y con mayor capacidad de unión a este glucocorticoide. Es decir en conjunto se encuentran dadas las condiciones para que la cabra aborte si se enfrenta a situaciones estresantes durante el último tercio de la gestación.

Por lo que respecta al feto, en 1997 Weisbart y Huntley describieron una relación directa entre las concentraciones de F adicionadas a cultivos de amnios humano y el número de receptores nucleares a F. La posible importancia fisiológica de los RG en las membranas fetales pueden incluir la osmorregulación de los fluidos amnióticos, la maduración pulmonar y el parto. El F participa de manera importante en la correlación entre el volumen de líquido amniótico y el volumen del fluido en el pulmón fetal, se ha mostrado que el F es diurético y natriurético en el feto ovino (Wintour et al., 1989). El volumen del fluido en el pulmón fetal participa de manera importante en el desarrollo del pulmón. El F en particular reduce la secreción del pulmón fetal, participa en la maduración de éste y en la producción de líquido surfactante. Con respecto a la participación del F durante el parto, se conoce que en concentraciones elevadas, es la señal que manda el feto para iniciar los mecanismos del parto.

Por otra parte, se encontró también que las concentraciones de F circulante en los fetos se encuentran altas en la etapa de 51-75 días de gestación con valores de 87.28 ± 49.65 nmol/L

222876

y disminuyen hasta 33.05 ± 5.51 nmol/L en la última etapa de gestación (126-parto); posiblemente participen en la regulación de los lípidos de las membranas fetales.

En 1983, Challis y Currie midieron cambios en la respuesta *in vitro* a ACTH en células adrenales de feto de cabra en varias etapas de la gestación. Ellos encontraron que en el día 77 la producción basal de F y corticosterona en ausencia de ACTH fue mayor que en otras etapas de la gestación. Pero, el efecto de incremento sobre la producción de F de la ACTH fue significativo en el día 100, 147 y al término de la gestación, pero no en el día 77. Un factor asociado con estos cambios en la respuesta de la adrenal puede ser el incremento que se observa en la actividad adrenal de la enzima 17α -hidroxilasa. Los autores plantearon que los cambios que se presentan pueden ser alteraciones en la actividad de un tipo de células existente en la adrenal o la aparición de un nuevo tipo de célula con un diferente potencial para la síntesis de glucocorticoides.

En otro trabajo Wintour y colaboradores (1975), incubaron glándulas adrenales de fetos ovinos desde los 40 días hasta el término con y sin ACTH. La producción basal de F fue insignificante en todo momento; en presencia de ACTH, las adrenales del día 40 de gestación fueron capaces de producir ocho veces más F por gramo y esta capacidad fue disminuyendo hasta el día 130 de gestación, a partir de ese momento y hasta la labor la capacidad de responder a la ACTH se recuperó.

El número de RG citosólicos totales en el hígado fetal presenta un incremento significativo en la etapa de 101-125 días de gestación, la diferenciación entre los tipos I y II no mostro ninguna diferencia entre las etapas de gestación, únicamente se corroboró la baja concentración de los Tipo I en relación a los Tipo II ya descrita por otros autores (Spencer et al., 1990).

El hígado fetal pesa aproximadamente del 3 al 6 % del peso corporal hasta la mitad de la gestación y desciende paulatinamente hasta después del nacimiento. El hígado fetal se diferencia al del adulto en que presenta una gran heterogeneidad celular; así a la mitad de la gestación hay numerosas células hematopoyéticas entre los hepatocitos, formando la masa del tejido. El hígado en ese momento, es el principal órgano hematopoyético y los hepatocitos tienen pocas mitocondrias y gran cantidad de retículo endoplásmico liso, lo cual indica elevada actividad biosintética (Jones and Rolph, 1985).

Por otro lado, en el feto ovino, próximo al nacimiento hay un incremento en las reservas de glucógeno hepático y en la actividad de las principales enzimas gluconeogénicas (glucosa-6-fosfatasa, fructosa difosfatasa, fosfoenol piruvato carboxilasa y aspartato transaminasa) (Fowden and Silver, 1993) que incrementan la capacidad gluconeogénica del feto durante la gestación avanzada. Estos cambios son dependientes del incremento de F plasmático fetal y son abolidos cuando la producción de F es interrumpida por hipofisectomía o adrenalectomía fetal. El F es un regulador fisiológico de la mayoría de enzimas gluconeogénicas, en el feto se incrementa la capacidad gluconeogénica durante la etapa final de la gestación, periodo durante el cual se realiza el 50% del crecimiento fetal. En resumen, los niveles sanguíneos de F fetal aquí encontrados son de fetos normales, es decir de fetos no estresados; el pequeño incremento detectado en la etapa de 51-75 días de gestación puede deberse a la función hematopoyética del hígado en esa etapa, y el incremento de esta misma hormona en la etapa de 101-125 pudiera estar relacionado con la función gluconeogénica normal del hígado en esa etapa.

7. BIBLIOGRAFIA

- Armanini, D. 1994. Corticosteroid receptors in lymphocytes: a possible marked of brain involution? *J. Steroid. Biochem Mol. Biol.* 49: 429-434.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M. and Chrousos, G.P. 1996. Molecular determinants of glucocorticoids receptor functions and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 103: 245-261.
- Bell, A.W. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition for late pregnancy to early lactation. *J. A. Sci.* 73: 2804-2819.
- Bolander, F. F. 1994. *Molecular endocrinology*. E. 2. Academic Press, inc. U.S.A. pp 118-147.
- Brobeck, R. J. 1983. *Bases Fisiológicas de la práctica médica de Best y Taylor*. E. 10., Editorial Médica Panamericana y Williams y Wilkins. México. pp. 1107-1164.
- Burnstein, K.L.; Bellingham, D.L.; Jewell, C.M.; Powell-Oliver, F. E. and Cidlowski, J.A. Autorregulation of glucocorticoid receptor gene expression. *Steroids* 56: 52-57.
- Bush, I. E.; Hunter, S.A. and Meigs, R.A. 1968. Metabolism of 11-oxygenated steroids. *Biochem. J.* 107: 239-257.
- Challis, J.R.G. and Linzell, J.L. 1971. The concentration of total unconjugated oestrogen in the plasma of pregnant goats. *J. Reprod. Fert.* 26: 401-404.
- Copeland R.A. 1994. *Methods for protein analysis: a practical guide to laboratory protocols*. Chapman and Hall, New York.
- Currie, W.B. 1975. Secretion rate of prostaglandin F during induced labor in goats. *Prostaglandins* 9: 867-869.
- Currie, W.B.; Cox, R.I. and Thorburn, G.D. 1976. Release of Prostaglandin F, regression of corporea lutea and induction of premature parturition in goats treated with estradiol 17 beta. *Prostaglandins* 12: 1093-1103.
- Currie, W.B.; Gorewit, R.C. and Michel, F.J. 1988. Endocrine Changes, with special emphasis on oestradiol 17-B, prolactin and oxitocin, before and during labor and delivery in goats. *J. Reprod. Fert.* 82: 299-308.
- Currie, W.B. and Thorburn, G.D. 1977. Parturition in goats: studies on the interactions between the foetus, placenta, prostaglandin F and progesterone before parturition, at term or at parturition induced prematurely by corticotrophyn infusion of the foetus. *J. Endocr.* 73: 263-278.
-

Drost, M. and Holm, L.W. 1968. Prolonged gestation in ewes after foetal adrenalectomy. *J. Endocr.* 40: 293-296.

Drost, M.; Kumagai, L.F. and Guzman, M. 1973. Sequential foetal-maternal plasma cortisol levels in sheep. *J. Endocr.* 56:483-492

Edwards, C.R.W.; Burt, D. and Stewart P.M. 1989. The specificity of the human mineralocorticoid receptor: Clinical clues to a biological conundrum. *J. Steroid Biochem.* 32: 213-216.

Flint, A.P. F. and Burton, R. D. 1984. Propieties and ontogeny of the glucocorticoid receptor in the placenta and fetal lung of the sheep. *J. Endocr.* 103:31-42.

Flint, A.P. F.; Kingston, E.J.; Robinson, J.S. and Thorburn, G.D. 1978. Initiation of parturition in the goat: evidence for control by foetal glucocorticoids through activation of placental C21 steroids 17 α -hidroxilase. *J. Endocr.* 78: 367-378.

Flint, A.P.F.; Ricketts, A. P. and Craig, V.A. 1979. The control of placental steroid synthesis at parturition in domestic animals. *An. Reprod. Sci.* 2: 239-251.

Fowden, A.L.; Mijovic J. and Silver. 1993. The effects of cortisol on hepatic and renal gluconeogenic enzyme activites in the sheep fetus during late gestation. *J. Endocr.* 137: 213-222.

France, J.T.; Magness, R.R.; Murry, B.A.; Rosenfeld, C.R. and Mason, J. Y. 1988. The regulation of ovine placenta steroid 17 α -hidoxilase and aromatase by glucocorticoid. *Mol. Endo.* 2:193-199.

Friedman, P. 1991. GB-STAT Ver. 3.0 Computer aided statistics and graphics tutorial/manual. Dynamic Microsystems, Inc. U.S.A.

Funder , J. W. 1992. Glucocorticoids Receptors. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 43: 389-394.

Fylling, P. 1971. Premature parturition following dexamethasone administration to pregnant ewes. *Acta Endocr.* 66:289-295.

Herrera D. M.R.; Luna M. y Romero, R. C. 1993. Obtención de anticuerpos contra progesterona y estradiol, estandarización del radioinmunoanálisis y validación en suero de rumiantes. *Vet. Méx,* 24: 223-230.

Hoeck, W.; Rusconi, S. and Groner, B. 1989. Down-regulation and phosphorylation of glucocorticoid receptors in cultured cell. *J. Biol. Chem. Mol. Biol., Inc.* 264:14396-174402.

Hoffman, 1977. Ultrastructure of the sheep placenta in the fetus and birth. Ciba Foundation Symposium 47. pp 99.

Hollenberg, S.M.; Weinberger, C.; Ong, S. E; Cerelli, G.; Oro, A.; Lebo, R.; Thompson, B. E.; Rosenfeld, G. M. and Evans, M. R. 1985. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318: 635-641.

Jones, C.T. and Rolph T.P. 1985. Metabolism during fetal life: a functional assessment of metabolic development. *Physiological Reviews*. 65: 357-730

Jones, C. T.; Boddy, K. and Robinson, J.S. 1977. Changes in the concentration of adrenocorticotrophin and corticosteroid in the plasma of foetal sheep in the latter half of pregnancy and during labor. *J. Endocr.* 72:293-300.

Lakshmi, V. and Monder, C. 1985. Evidence for independent 11-oxidase and 11-reductase activities of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Enzyme latency, phase transition, and lipid requirements. *Endocrinology* 116: 552-560.

Liggins, G. C. 1968. Premature parturition after infusion of corticotrophin or cortisol into foetal lamb. *J. Endocr.* 42: 323-329.

Liggins, G. C.; Fairclough, R.J.; Grieves, S.A.; Kendall, J.Z. and Knox, B.S. 1973. The mechanism of initiation of parturition in the ewe. *Recent. Prog. Horm. Res.* 290: 111-159.

Liggins, G. C. and Kennedy, P.C. 1968. Effect of electrocoagulación of the foetal lamb hypophysis on growth and development. *J. Endocr.* 40: 333-344.

Liggins, G. C.; Kennedy, P. C. and Holm, L.W. 1967. Failure of initiation of parturition after electrocoagulation of the pituitary of the foetal lamb. *Am. J. Obst. Gynec.* 98: 1080-1086.

Linzell, J.I. and Heap, R.B. 1968. A compararison of progesterone metabolism in the pregnant sheep and goat : sources of production and an estimulation of uptake by some target organs. *J. Endocr.* 41 : 433

López R. L. J.; Romero. R.C.M., Lona D. V.; Bermúdez, E. J. y Calderón, F. C. J. 1996. Análisis comparativo de la secreción de cortisol frente a la hipoglucemia inducida por insulina entre cabras y ovejas gestantes. XI Reunión Nac. Sobre Caprinocultura. Chapingo México.

Luna. M.; Romero, R. y Valverde, R. 1990. Ensayo por competencia de unión a proteínas para cuantificar sin purificación previa cortisol o corticosterona en el suero de algunas especies animales. *Vet. Méx.* 21:115-122.

McDonald L. E. 1989. Pregnancy and parturition veterinary endocrinology and reproduction. p.p.503. Ed. 4. McDonald L.E. and Pineda M.H. Lea and Febiger Philadelphia, London.

Meites, J., Webster, H.D.; Young, F.W. 1951. Effect of corporea lutea removal and replacement with progesterone on pregnancy in goats. *J. Anim. Sci.* 10: 411-416.

Morris, F. H.; Boyd, R.D.H. and Mahebdran, D. 1994 Placental Transport in the physiology of reproduction. Secon Edition. Edited by Knobil and J.D. Neill. Raven Press. Ltd., N.Y., U.S.A.

Murphy, B.E.P. 1991. Treatment of major depression with steroid suppressive drugs. *J. Steroid. Bioch. Molec. Biol.* 39: 239-244.

Niswender, G.C. and Nett T.M. 1994. Corpus luteum and its control in infraprimates species in the physiology of reproduction, second edition. Edited by E. Knobil J.N. Neil Raven Press, Ltd, New York.

O'Malley, B.W.; Schrader, W.T.; Mani, S.; Smith, C.; Weigel N.L.; Conneely, O.M.; and Clark, J.H. 1995. An Alternative Ligand-Independent pathway for activation of steroids receptors. *Rec. Prog. Hormon Res.* 50: 333-345.

Orth, D.N.; Kovacs, W. J. and Rowan, C. 1992. The adrenal cortex in Williams Textbook of Endocrinology. Ed. by Jean D. Wilson, M.D. and Daniel, W. Foster. W. B. Saunders Company, USA.

Panarelli, M.; Holloway, Ch. D.; Barr, A.B.P; Fraser, R. and Kenyon, Ch. J. 1995. Differences in temperature-sensitive receptor binding in glucocorticoids in spontaneously hypertensive and normotensive wistar-kyoto rats. *Steroids* 60:73-75.

Patterson, J. Y. F and Linzell, A. J. 1971. The secretion of cortisol and its mammary uptake in in the goat. *J. Endocr* 50: 493-499.

Rensburng Van, S.J. 1971. Reproductive physiology and endocrinology of normal and habitually aborting angora goats. *Onderstepoort Journal of veterinary Research* 38: 1-162.

Ricketts, A.P. and Flint, A.P.E. 1980. Onset of syntheses of progesterone by ovine placenta. *J. Endocr.* 86:337-347.

Romero, R. C.; López, G. and Luna, M.M. 1998 Abortion in goats associated with increased maternal cortisol. *Small Ruminant Research* 30:7-12.

Rousseau G. G.; Baxter J. D. and Tomkins G. M. 1972. Glucocorticoid receptors: relations between steroid binding and biological effects. *J. Mol. Biol.* 67: 99-115.

Sapolsky, R.M.; Krey, L.C. and McEwen, B. 1984. Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. *Endocr.* 114:287-292.

Scatchard, G. 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad. Sci.* 51:660-672

Sivachelvan, M. N.; Ghali, M. and Chibuzo, G. A. 1996. Foetal age stimulation in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 19: 69-75.

Silva, C.M.; Powell-Oliver, F.E.; Jewell, C.M.; Sar, M.; Algood V.E. and Cidlowski J.A. 1994. Regulation of the human glucocorticoid receptor by long-term and chronic treatment with glucocorticoid. *Steroids.* 59:436-442.

Spencer, R. L.; Young, E.A.; Choo, P.H. and McEwen, B.S. 1990. Adrenal steroid type I and type II receptor binding: estimates of in vivo receptor number, occupancy, and activation with varying level of steroids. *Brain Research* 514: 37-48.

Thorburn, G.D. and Schneider, W. 1972. The progesterone concentrations in the plasma of the oestrus cycle and pregnancy. *J. Endocr.* 52: 23-36.

Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. 1994. Molecular Mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Reviews* 63: 451-486.

Wango, E.O.; Heap, R.B. and Wooding, F.B. 1991. Progesterone and 5β -pregnanediol production by isolated fetal placental binucleate cells from sheep and goat. *J. Endocr.* 129: 283-289.

Wango, E.O.; Heap, R.B. and Wooding, F.B. 1992. Regulation of steroid Synthesis and metabolism in isolated binucleate cells of the placenta in sheep and goats. *J. Reprod. Fert.* 94: 203-211.

Weisbart, M. and Huntley, F. M. 1997. The presence of cortisol receptors in the human amnios. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 63:339-344

Wentzel, D.; Le Roux, M. M. and Botha, L.J. 1976. Effect of the level of nutrition on blood glucose concentration and reproductive performance of pregnant Angora goats. *Agroanimalia* 8: 59-61

Wentzel, D.; Morgenthal, J.C. and Van Niekerk, C.H. 1975a. The habitually aborting Angora doe: III Luteal function in normal and aborter does. *Agroanimalia* 7: 15-22.

Wentzel, D.; Morgenthal, J.C. and Van Niekerk, C.H. 1975 b. The habitually aborter Angora doe: IV Adrenal function in normal and aborter does. *Agroanimalia* 7: 27-24.

Wentzell, D. and Roelofse C.S. 1975. The habitually aborting angora doe. VII. Introduction of abortion by administration of cortisone acetate. *Agroanimalia* 7: 45-48.

Wintour, E.M.; Brown, E.H. and Denton, D.A. 1975. The ontogeny and regulation of corticosteroid secretion by the ovine foetal adrenal. *Acta Endocrinologica* 79: 301-316.

Wintour, E. M.; Cooper, E.; McDougall, J.G. Shine, P.F. and Towstoles, M.K. 1989. Interrelationship between cortisol and atrial natriuretic factor in the immature ovine fetus Clin Exp. Pharmacol. Physiol. 16:737-744.

Wood, Ch. E. 1988. Are fetal adrenocorticotrophic hormone and renin secretion suppressed by maternal cortisol secretion? Am. J. Physiol 255: R412-R417.

222876

La División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, asignó como sinodales de la tesis **Número y afinidad de los receptores a cortisol en la placenta y el hígado de cabra durante la gestación**, de la alumna Gabriela López a los profesores que abajo se indica. Los sinodales revisaron y aprobaron el trabajo escrito como requisito para sustentar el examen de grado en la Maestría de Biología Experimental el día 24 de noviembre de 1999.

Dra. Mañicela Luna Muñoz
PRESIDENTE

M. en C. Joaquín Fernando Herrera Muñoz

SECRETARIO

M. en C. Arturo Ángel Ttejo González

VOCAL

Dr. Tomás Morato Cartagena
SUPLENTE

MVZ Carlos M. Romero Ramirez
SUPLENTE