

03081  
3  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PARTICIPACION DE LA PROGESTERONA Y EL ESTRADIOL EN LA REGULACION  
DEL RECEPTOR A PROGESTERONA EN EL HIPOTALAMO Y LA CORTEZA CEREBRAL  
DEL CONEJO.

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA  
IGNACIO CAMACHO ARROYO

DIRECTOR DE TESIS: MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES

MEXICO

FALLA DE ORIGEN

1995

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

La presente tesis se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular Aplicada a la Salud Reproductiva del Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán-Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El desarrollo de esta tesis fue posible gracias a una beca de doctorado otorgada a Ignacio Camacho Arroyo por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

El proyecto fue financiado por el Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM; el Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP), UNAM y la Fundación Rockefeller.

Se agradece el apoyo del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y de sus colaboradores en las diferentes etapas del trabajo de investigación, particularmente a la Señora Juana González López por su participación en la castración de los animales, a la Maestra en Investigación Biomédica Básica Ana María Pasapera Limón, a la Química Adriana Mendoza Rodríguez y a la Maestra en Ciencias Fisiológicas Sumiko Morimoto Martínez por su colaboración en los experimentos de expresión génica.

Se agradece la revisión del idioma de los manuscritos en inglés realizada por la profesora Flora Itzel García-Formentí Mansilla del Centro de Enseñanza de Lenguas Extranjeras de la UNAM.

Se dan las gracias también a los doctores Gregorio Pérez Palacios, Lino Díaz de León Hernández, Marco Antonio Cerbón Cervantes, Gabriela González Mariscal, Roberto Domínguez Casala, Alonso Fernández Guasti y Fernando Larrea Gallo por la revisión de esta tesis y su participación como miembros del jurado de la misma.

## INDICE

RESUMEN DE LA TESIS EN ESPAÑOL.....	4-6
RESUMEN DE LA TESIS EN INGLES.....	7-8
ORGANIZACION DE LA TESIS.....	9
1. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G y Cerbón MA. 1995. Participación de la progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del sistema nervioso central. <b>Rev. Inv. Clin.</b> En prensa.	
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION.....	10-13
3. Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM and Cerbón MA. 1994. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. <b>J. Steroid Biochem. Molec. Biol.</b> 50 (5-6): 299-303.	
4. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G and Cerbón MA. 1995. Progesterone receptor gene expression is regulated by estradiol and progesterone in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. En preparación para ser enviado a <b>J. Endocr.</b>	
5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	14-22
6. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO.....	23-25
7. LITERATURA CITADA EN LA TESIS.....	26-31
8. LISTA DE PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS EN LAS QUE HA PARTICIPADO EL AUTOR.....	32

## RESUMEN DE LA TESIS EN ESPAÑOL.

La progesterona participa en la regulación de diversas funciones en los vertebrados, entre las que se encuentran la reproducción, la conducta sexual y la excitabilidad neuronal. El mecanismo principal por el cual la progesterona ejerce sus efectos en el sistema nervioso central es mediado por su interacción con receptores intracelulares específicos a esta hormona. En el sistema nervioso central de los roedores, mamíferos de ovulación cíclica, se han reconocido dos poblaciones de receptores a progesterona; una se localiza en el hipotálamo y es regulada a la alta por los estrógenos, mientras que la segunda se encuentra en la corteza cerebral y es insensible a la regulación por los estrógenos. Sin embargo, en el sistema nervioso central de especies con ovulación refleja, como el conejo, se carece de información sobre la especificidad del receptor a progesterona, su regulación por los estrógenos y la progesterona, así como de los mecanismos moleculares involucrados en tal regulación.

Con el fin de conocer las características de unión del receptor a progesterona en el hipotálamo y la corteza cerebral del conejo, su distribución a nivel cortical, las diferencias sexuales en la concentración del receptor a progesterona, así como el papel del estradiol y de la progesterona en su regulación, se realizaron estudios de unión específica al receptor a progesterona con el uso de la progestina sintética marcada [<sup>3</sup>H]ORG 2058, en fracciones citosólicas del hipotálamo y de la corteza cerebral extraídas de conejos Nueva Zelanda que se sometieron a las siguientes condiciones experimentales: a) hembras prepúberes intactas; b) machos adultos; c) hembras adultas intactas; d) hembras adultas ovariectomizadas tratadas por vía subcutánea con: benzoato de estradiol (10 µg/día) por tres días consecutivos; benzoato de estradiol (10 µg/día) por tres días consecutivos + progesterona (1 mg) en el cuarto día; y vehículo (aceite de maíz). Veinticuatro horas después del último tratamiento se realizaron todos los experimentos de unión específica.

Los resultados obtenidos en estos experimentos mostraron lo siguiente:

- a) La presencia de receptores a progesterona específicos en diferentes regiones de la corteza cerebral y el hipotálamo de conejos de ambos sexos, con características de unión y estereoespecificidad similares a las informadas previamente en otros tejidos.
- b) Una distribución homogénea de los receptores a progesterona en la corteza cerebral del conejo.
- c) Una mayor concentración de receptores a progesterona en el hipotálamo de hembras adultas en comparación a los machos y a las hembras prepúberes.
- d) Una regulación de los receptores a progesterona a la alta mediada por el estradiol y a la baja por la progesterona en el hipotálamo, así como una insensibilidad a tal regulación en la corteza cerebral.

Posteriormente se estudiaron los efectos del estradiol y la progesterona en el contenido del ARN mensajero del receptor a progesterona en el hipotálamo y en la corteza cerebral del conejo, para lo cual se ovariectomizaron conejas adultas que fueron tratadas con: benzoato de estradiol (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por dos días consecutivos; benzoato de estradiol (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por dos días consecutivos + progesterona (5  $\text{mg}/\text{kg}$ ) en el tercer día; y vehículo. Veinticuatro horas después de la última dosis, se extrajo el ARN total de la corteza cerebral, del hipotálamo y del útero. El ARN fue utilizado para la formación del ADNc con el uso de la enzima transcriptasa reversa, y a partir del ADNc, se amplificó el mensaje del receptor a progesterona por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para determinar la expresión génica del receptor a progesterona. Los productos de la amplificación fueron detectados por la técnica de "Southern blot" y analizados por densitometría.

Los resultados de estos experimentos mostraron que en la corteza cerebral, el gen que codifica para el receptor a


progesterona se regula a la alta por el estradiol y a la baja por la progesterona, al igual que en el hipotálamo y en el útero.

En conjunto, los datos de esta tesis permiten sugerir que el estradiol y la progesterona regulan de manera diferencial la concentración del receptor a progesterona presente en el hipotálamo y en la corteza cerebral del conejo. En el hipotálamo, el estradiol regula a la alta el receptor a progesterona, mientras que la progesterona lo hace a la baja, sin tener ninguna de estas hormonas efectos en la corteza cerebral. Tal regulación diferencial probablemente ocurre a nivel postranscripcional ya que a nivel transcripcional la expresión del gen del receptor a progesterona es regulada por el estradiol y la progesterona tanto en la corteza cerebral como en el hipotálamo.

SUMMARY OF THE THESIS TO OBTAIN THE PhD DEGREE IN BASIC BIOMEDICAL RESEARCH "PARTICIPATION OF PROGESTERONE AND ESTRADIOL IN THE PROGESTERONE RECEPTOR REGULATION IN THE HYPOTHALAMUS AND THE CEREBRAL CORTEX OF THE RABBIT".

Progesterone (Prog) is a steroid hormone that participates in the regulation of several functions in vertebrates. This hormone is involved in the control of reproduction, sexual behavior and neural communication. Prog exerts its effects through the interaction with specific intracellular receptors. The activation of progesterone receptor (PR) by its ligand induces PR binding to specific DNA sequences that regulate the activation of several genes. In the uterus, estradiol increases PR number, whereas Prog decreases it. In the rabbit central nervous system there are no data about the mechanisms involved in PR regulation. In order to know some of these mechanisms, as well as the role of sex hormones on PR regulation, several biochemical and molecular studies were performed in rabbits submitted to the following conditions: a) prepubertal females; b) intact adult males; c) intact adult females; d) ovariectomized females treated subcutaneously with: 1) Estradiol benzoate (EB) (10  $\mu$ g/day) for three consecutive days; 2) EB (10  $\mu$ g/day) for three consecutive days + Prog (1 mg) on day four; 3) Prog (1 mg) a single dose; and 4) vehicle (corn oil) as a control. Twenty four hours after the last administration, the animals were killed and the hypothalamus and the cerebral cortex were dissected to carry out PR binding experiments and PR mRNA determinations in each region. The results demonstrate: 1) higher number of PR in the hypothalamus of adult females as compared to prepubertal females and adult males; 2) hypothalamic PR up-regulation induced by EB and a down-regulation produced by Prog; 3) similar PR number in the cerebral cortex of male and female rabbits, without effects of the steroid hormones on PR content; 4) PR mRNA content increase in the animals treated with EB and a decrease in those treated with EB both in the hypothalamus and the cerebral cortex. The data of this work suggest a differential PR regulation in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. It is probable that such differential regulation occurs at a posttranscriptional level since PR mRNA content is regulated in a similar manner both in the hypothalamus and the cerebral cortex.

  
\_\_\_\_\_  
IGNACIO CAMACHO ARROYO  
PHD STUDENT

  
\_\_\_\_\_  
Dr. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES  
THESIS DIRECTOR



## RESUMEN DE LA TESIS EN INGLES

Progesterone participates in the regulation of several functions in vertebrates. This hormone is involved in the control of reproduction, sexual behavior and neural excitability. Progesterone mainly exerts its effects through the interaction with specific intracellular receptors in the central nervous system. In the case of the one of rodents, cyclic ovulators, two progesterone receptor populations have been described. One is located in the hypothalamus and is up-regulated by estrogens, while the other is estrogen-insensitive and is located in the cerebral cortex. However, in the central nervous system of the rabbit, a reflex ovulator, there is no information about the regulation of progesterone receptor.

The aim of this thesis was to investigate the binding properties of progesterone receptor in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit, its cortical distribution, as well as the role of estradiol and progesterone in its regulation. Therefore progesterone receptor binding studies were performed with the use of [<sup>3</sup>H]ORG 2058, a synthetic progestin, in cytosolic fractions from the hypothalamus and the cerebral cortex of New Zealand rabbits assigned to the following groups: a) prepubertal females; b) adult males; c) adult females; d) ovariectomized females subcutaneously treated with estradiol benzoate (10 µg/day) for 3 consecutive days; the described administration of estradiol benzoate followed by 1 mg of progesterone administered on day 4; and vehicle (corn oil). Twenty four hours after the last treatment, the binding studies were carried out.

The results showed:

- a) The presence of specific progesterone receptors in several regions of the cerebral cortex and the hypothalamus of male and female rabbits, with binding properties and estereospecificity characteristics similar to those found in other tissues.
- b) A homogeneous distribution of progesterone receptors in the cerebral cortex of the rabbit.

c) A higher progesterone receptors concentration in the hypothalamus of adult females as compared to adult males and prepubertal females.

d) An up-regulation of hypothalamic progesterone receptors induced by estradiol and a down-regulation of the receptor produced by progesterone, whereas cortical progesterone receptors are steroid hormone insensitive.

After these studies we evaluated the effects of estradiol and progesterone upon progesterone receptor mRNA content in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. Ovariectomized adult rabbits were subcutaneously treated with estradiol benzoate (25  $\mu$ g/kg) for two consecutive days; the described treatment of estradiol benzoate followed by progesterone (5 mg/kg) on day 3; and vehicle. Twenty four hours after the last dose total RNA was extracted from the cerebral cortex, the hypothalamus and the uterus. In order to determine progesterone receptor gene expression, RNA was used to cDNA synthesis by reverse transcription, cDNA was amplified by polymerase chain reaction, and the amplification products were detected by "Southern blot" and analyzed by densitometry.

The results of these experiments showed that progesterone mRNA content is up-regulated by estradiol and down-regulated by progesterone both in the cerebral cortex and the hypothalamus in a similar manner as in the uterus.

The overall results suggest that progesterone receptor is differentially regulated by estradiol and progesterone in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. Progesterone receptor concentration in the hypothalamus, is up-regulated by estradiol and down-regulated by progesterone, whereas in the cerebral cortex progesterone receptor concentration is not modified by hormonal treatments. It is possible that such differential regulation occurs at a posttranscriptional level since progesterone receptor mRNA content is regulated by estradiol and progesterone both in the hypothalamus and the cerebral cortex.

## ORGANIZACION DE LA TESIS.

Esta tesis está dividida en tres secciones principales, en la primera de ellas se revisan los antecedentes más importantes del problema en estudio, que están contenidos en un artículo de revisión que se envió a la **Revista de Investigación Clínica** y que en este momento se encuentra en prensa. Al final de la misma se plantean los objetivos del estudio y la manera de cubrirlos.

Dado que dicha revisión es muy reciente (enviada a publicación en diciembre de 1994), es importante señalar que los datos sobre la regulación del receptor a progesterona en el sistema nervioso central del conejo, incluidos en ese artículo, son parte de esta tesis, por lo que no se conocían al inicio del desarrollo de la misma. De hecho tanto el artículo resultante de la primera parte del trabajo experimental de esta tesis como la presentación en un congreso nacional de los datos preliminares de la segunda parte del trabajo, se encuentran citados en dicha revisión.

En la segunda sección se presentan los dos artículos originales derivados del trabajo experimental. En ellos se detallan tanto los materiales y métodos utilizados como los resultados obtenidos. Uno de los trabajos ya fue publicado en la revista **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, mientras que el segundo está en proceso para enviarse como comunicación rápida a la revista **Journal of Endocrinology**.

En la tercera sección se presenta la discusión general del trabajo, en la que se incluyen los futuros experimentos que podrían proporcionar una visión más clara sobre la regulación del receptor a progesterona en el sistema nervioso central, así como las perspectivas del presente estudio. Finalmente se incluye una lista de publicaciones en las cuales participó el autor de esta tesis, referente a la expresión del receptor a progesterona en distintos tejidos. Tales trabajos fueron desarrollados paralelamente a la elaboración de la tesis doctoral.

LA REVISTA DE INVESTIGACION CLINICA  
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN  
VASCO DE QUIROGA No 15, TLALPAN  
14000 MEXICO, D. F.

INNSZ

10 de febrero de 1995

Dr. Ignacio Camacho Arroyo  
Depto. de Biología de la Reproducción  
Instituto Nacional de la Nutrición S.Z.  
Vasco de Quiroga No. 15  
Tlalpan  
México, D.F. 14000

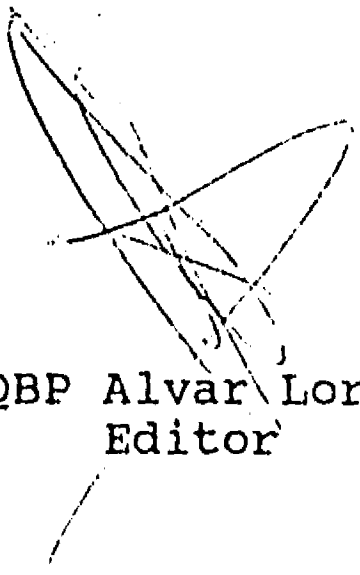
94-107

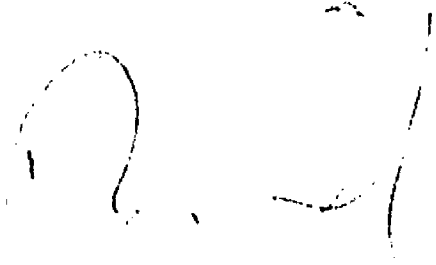
El Comité Editorial de la Revista ha decidido aceptar para publicación su trabajo intitulado:

Participación de la progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del sistema nervioso central.

El trabajo aparecerá próximamente en nuestra revista de acuerdo a su fecha de aceptación.

Esperamos contar nuevamente con su valiosa colaboración. Reciba Ud un cordial saludo de

  
QBP Alvar Loría  
Editor

  
Dr Rubén Lisker  
Editor

P.D. Nos permitimos recordarle que es indispensable que nos envíe usted una comunicación firmada por todos los coautores en que señalen su aceptación de aparecer en la lista de autores de este trabajo.

OR:  
EDICION ALARCON-SEGROVIA  
DIRECTOR EMERITO:  
SALVADOR ZUBIRAN  
COMITE:  
RUBEN LISKER  
ALVAR LORIA  
COMITE EDITORIAL:  
JORGE CARLOS ALCOCCER  
ARTURO ANGELES  
PEDRO ARROYO  
HECTOR AVILA ROSAS  
JUAN JOSE CALVA MERCADO  
MARIO H. CARDIEL RIOS  
ALESSANDRA CARNEVALE  
RICARDO CORREA ROTTER  
FRAN DIAZ-JOUANEN  
REBECCA E. FRANCO BOURLAND  
FERNANDO GABILONDO  
JURDES GUERRERO  
JAIME GUZMAN RAMIREZ  
JAIME HERRERA ACOSTA  
RAFAEL HURTADO MONROY  
DAVID KERSHENOBICH  
EUCARIO LEON RODRIGUEZ  
ISRAEL LERMAN GARBER  
IVIER LOPEZ KARPOVITCH  
JUAN MANUEL MALACARA H.  
JOSE PEDRAZA CHAVERRI  
JOSE ROGELIO PEREZ PADILLA  
SAMUEL PONCE DE LEON  
BERGIO PONCE DE LEON  
JOSE MANUEL PORTELA  
EDUARDO REYES GUTIERREZ  
GUILLERMO ROBLES DIAZ  
GUILLERMO J. RUIZ ARGÜELLES  
AN A. RULL  
JOSE SIFUENTES  
RICARDO ROSA SANCHEZ  
FREDDO ULLOA-AGUIRRE  
LUIS F. USCANGA  
LUCRENCIA VARGAS V.  
FONNI VILLA ROMERO  
GREGORIO VINIEGRA V.

Participación de la progesterona y sus metabolitos en el  
funcionamiento del sistema nervioso central.

Ignacio Camacho-Arroyo, Ana María Pasapera, Gregorio Pérez-Palacios  
y Marco Antonio Cerbón.

Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de  
la Nutrición Salvador Zubirán y Facultad de Estudios Superiores  
Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dirigir correspondencia a:

M. en IBB. Ignacio Camacho-Arroyo.  
Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán.  
Departamento de Biología de la Reproducción.  
Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan.  
México, D. F. 14000, México.

Teléfono: 5 73 11 60  
Fax: 6 55 98 59  
655 10 76

Financiamiento: Este trabajo se realizó con el apoyo del Programa  
Universitario de Investigación en Salud (PUIS) de la Universidad  
Nacional Autónoma de México, La Fundación Rockefeller (Nueva York)  
y la Organización Mundial de la Salud (Ginebra).

Cabecal: la progesterona en el sistema nervioso

**Resumen**

La progesterona ( $P_4$ ) y sus metabolitos participan en la regulación de la reproducción y de distintas funciones del sistema nervioso central (SNC) entre las que destacan la excitabilidad neuronal y la conducta sexual. La  $P_4$  y sus metabolitos actúan en las neuronas y en las células gliales a través de su interacción con: 1) receptores intracelulares específicos; 2) sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores; y 3) canales iónicos. Por estos mecanismos se inducen cambios en la expresión de genes específicos, la formación de segundos mensajeros y la conductancia iónica. La mayoría de las acciones de los metabolitos de la  $P_4$  en el SNC, ocurren a nivel membranal, mientras que las de la  $P_4$  principalmente son a nivel nuclear y están mediadas por la activación de los receptores intracelulares. Así, la  $P_4$  y sus metabolitos pueden modificar el funcionamiento de distintas regiones del SNC, a corto (milisegundos), mediano (minutos) y largo plazo (horas y días). El conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales la  $P_4$  y sus metabolitos participan en el funcionamiento del SNC, permitirá entender procesos biológicos fundamentales como la conducta sexual y la reproducción, además contribuirá al diseño de terapias alternativas en el tratamiento de diferentes trastornos neurológicos y psiquiátricos como la epilepsia, la ansiedad, el síndrome premenstrual y algunos tumores cerebrales que presentan datos de regulación hormonal.

**Palabras clave:** progesterona, sistema nervioso central, metabolitos de la progesterona, estradiol, reproducción, receptores a la progesterona.

The role of progesterone and its metabolites in the function of the central nervous system.

### **Abstract**

Progesterone ( $P_4$ ) and its metabolites are involved in several functions of the central nervous system (CNS). These steroids participate in neuronal excitability, reproduction and sexual behavior.  $P_4$  and its metabolites exert their effects on neurons and glial cells through several mechanisms that include the interaction of the steroids with: 1) intracellular specific receptors; modulatory sites located in neurotransmitter receptors; and 3) ionic channels. By these mechanisms, modifications in gene expression, second messenger production and ion conductance are induced. The actions of  $P_4$  metabolites have been mainly related to membrane effects, whereas in the case of  $P_4$ , transcriptional and translational effects mediated by intracellular receptors, have been reported. Thus, these steroids can modify CNS function at short (milliseconds), medium (minutes) or long term (hours or days). The knowledge of the molecular mechanisms involved in the actions of  $P_4$  and its metabolites in the CNS will contribute to the understanding of fundamental biological processes such as sexual behavior and reproduction, and it will give the possibility of alternative therapies in the treatment of neurologic and psychiatric disorders such as epilepsy, anxiety, premenstrual syndrome and cerebral tumors, known to be hormonally regulated.

**Key words:** progesterone, central nervous system, progesterone metabolites, estradiol, reproduction, progesterone receptors.

## Introducción

Las primeras evidencias experimentales sobre la participación de la progesterona ( $P_4$ ) en el funcionamiento del sistema nervioso central (SNC) datan de la década de 1930 (1, 2). Desde entonces hasta nuestros días se han descrito una gran variedad de funciones no sólo para la  $P_4$  sino también para sus metabolitos reducidos. Dichas funciones abarcan desde la regulación de los ciclos reproductivos de los mamíferos y los diferentes patrones conductuales asociados a la reproducción hasta procesos tan finos como la excitabilidad neuronal y la modulación de la actividad de algunos neurotransmisores (3-5).

Uno de los tópicos que ha despertado gran interés es el estudio de los mecanismos moleculares mediante los cuales la  $P_4$  y sus metabolitos ejercen sus acciones en el SNC con diferente latencia y duración (milisegundos, minutos, horas y días) así como los efectos neuronales de algunas progestinas sintéticas usadas como anticonceptivos en la mujer.

En la presente revisión se presentan datos sobre las diversas acciones de la  $P_4$  y sus metabolitos en el SNC, los mecanismos moleculares involucrados en tales acciones así como un panorama del estado actual del conocimiento en esta área.



### Metabolismo de la P<sub>4</sub>

La P<sub>4</sub> (4-pregnen-3, 20-diona) es un esteroide de 21 átomos de carbono, sintetizado a partir del colesterol en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo en el ovario, la corteza adrenal y la placenta. Aunque en el SNC se ha observado la síntesis de esteroides con actividad fisiológica (neuroesteroides) (6, 7) y en células gliales en cultivo, se ha mostrado tanto la síntesis de la P<sub>4</sub> como de su precursor inmediato, la pregnenolona (8), a la fecha no existe evidencia de la síntesis de la P<sub>4</sub> en neuronas del SNC, pero sí sus múltiples efectos sobre el funcionamiento del mismo por lo que se le considera como un esteroide neuroactivo (9, 10).

Tanto las células que sintetizan y liberan la P<sub>4</sub> como muchas de sus células blanco presentan enzimas que la reducen y dan origen a diversos metabolitos con actividad biológica que puede ser similar o incluso muy diferente a la de la P<sub>4</sub>. De esta manera los metabolitos generados pueden incrementar, prolongar o terminar con los efectos de la P<sub>4</sub> o bien proporcionar mecanismos alternativos que modulen las acciones de la hormona (11).

En diversas estructuras situadas en el tallo cerebral, el diencéfalo y el telencéfalo se han encontrado distintos metabolitos de la P<sub>4</sub> con actividad biológica, reducidos principalmente en las posiciones 3, 5 y 20 de la molécula por enzimas que se encuentran tanto en neuronas como en células gliales (11, 12) (Figura 1).

Se tienen evidencias de que el metabolismo de la P<sub>4</sub> varía tanto en las distintas estructuras cerebrales como en las diferentes especies. En el bulbo olfatorio, la corteza cerebral y el bulbo raquídeo de la rata y el ratón, el metabolito más abundante de la P<sub>4</sub> es la 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona, seguido de la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroprogesterona en el caso de la rata y por la 20 $\alpha$ -dihidroprogesterona en el caso del ratón, mientras que en el mono

el principal metabolito de la  $P_4$  es la  $20\alpha$ -dihidroprogesterona seguido por la  $5\alpha$ -dihidroprogesterona o la  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesterona, dependiendo de la estructura cerebral estudiada (13). Recientemente se ha demostrado que en el cerebro completo del ratón, el metabolito más abundante es la  $20\alpha$ -dihidroprogesterona (14).

El metabolismo de la  $P_4$  en el SNC, se inicia desde etapas embrionarias en las células gliales. En astrocitos aislados de la corteza cerebral y el cuerpo estriado de la rata, se ha determinado tanto la síntesis de la  $P_4$  como su bioconversión a metabolitos reducidos desde el día 17 de la gestación en esta especie (15).

Aunque en neuronas fetales no se ha mostrado aún la síntesis de la  $P_4$  o la formación de sus metabolitos, en la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano, que representa un modelo de neuronas inmaduras periféricas, se ha observado la conversión de la  $P_4$  a  $5\alpha$ -dihidroprogesterona tanto en células indiferenciadas como en aquellas diferenciadas "in vitro" mediante un estímulo con ésteres de forbol, que incrementan la  $5\alpha$ -reducción de la  $P_4$  (16).

En el hipotálamo la bioconversión de la  $P_4$  en sus distintos metabolitos varía durante el ciclo reproductivo de los roedores. En la eminencia media la  $5\alpha$ -reducción de la  $P_4$  es mayor durante el diestro que durante el estro, mientras que en el área preóptica medial ocurre lo contrario (11). Durante la lactancia y el destete, las ratas presentan una disminución en la  $5\alpha$ -reducción de la  $P_4$  tanto en el hipotálamo como en otras estructuras cerebrales (17).

El metabolismo de la  $P_4$  también se puede modificar por cambios en la excitabilidad neuronal. Así, en el cerebro anterior de la rata, el "electroshock" aumenta los niveles de la  $P_4$  y de la  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesterona (13).

## Receptores a la P<sub>4</sub>

La mayoría de los efectos de la P<sub>4</sub> en el SNC están mediados por su interacción con receptores nucleares (RP) que reconocen específicamente a la hormona (18, 19). Los RP están localizados tanto en neuronas como en células gliales, principalmente oligodendrocitos (20). Los RP pertenecen a una familia de factores de transcripción que son activados por su ligando específico. En esta familia se encuentran todos los receptores a hormonas esteroides, tiroideas y al ácido retinoico (21, 22).

Los RP presentan un dominio de unión a la hormona, otro de unión al ADN y otros situados en la región amino terminal que participan en la regulación de la transcripción de genes específicos (23). En general, el mecanismo de acción de los RP comprende: unión del ligando al receptor con la subsecuente transformación y activación de éste; dimerización del receptor y aumento de su afinidad por secuencias reguladoras en el ADN; y cambios en la transcripción (24).

Aunque la mayoría de los efectos de los metabolitos de la P<sub>4</sub> se ejercen a nivel membranar, algunos de ellos como la 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona también pueden interactuar con los RP y así modificar la expresión de genes específicos. Experimentos de transfección de genes en líneas celulares como la del neuroblastoma humano SK-N-MC indican que los metabolitos de la P<sub>4</sub> mediante su interacción con los RP inducen la transcripción de genes reporteros como el de luciferasa, el cual posee secuencias de ADN reguladas por los RP (25).

La presencia de los RP se ha mostrado desde etapas muy tempranas del desarrollo del ratón, incluso desde las 10 horas después del nacimiento, tanto en la corteza cerebral como en el hipotálamo (26). En la corteza cerebral de la rata por los métodos de transcripción reversa y de amplificación por reacción de la

polimerasa en cadena se ha detectado el ARN mensajero de los RP desde los dos días de edad (27). Estudios realizados en ratones de 8 días de edad indican un dimorfismo sexual en el contenido de RP en la corteza cerebral y el área preóptica, siendo mayor en las hembras que en los machos (28). El significado fisiológico de la presencia de los RP durante el desarrollo temprano de los mamíferos se desconoce.

Tanto en aves como en mamíferos se han caracterizado dos poblaciones de RP por métodos bioquímicos e inmunohistoquímicos (29-31). Una de estas poblaciones es regulada a la alta por estrógenos y se localiza en varios núcleos hipotalámicos entre los que están el núcleo arcuato, el ventromedial, el periventricular, el premamilar y el área preóptica, mientras que la segunda población de RP no es regulada por estrógenos y se encuentra distribuida en varias regiones cerebrales como el cerebelo, la amígdala y la corteza cerebral (30, 32, 33).

Ambos subtipos de RP presentan las mismas características fisicoquímicas e inmunológicas, lo que sugiere un origen común de estas proteínas pero con un mecanismo de regulación diferente (30). Recientemente se ha mostrado en el conejo que la administración sistémica de estrógenos incrementa el número de RP en el hipotálamo, mientras que la administración de la  $P_4$  lo reduce, en tanto que el número de RP presentes en la corteza cerebral no presenta modificaciones con ninguno de los tratamientos (34).

También se ha informado que en tejidos como el útero, la inducción de los RP por estrógenos ocurre a nivel transcripcional (35). En el hipotálamo se ha podido detectar un incremento en el contenido del ARN mensajero del receptor después de la administración de estrógenos con el uso de técnicas de hibridación "in situ" (36).

La regulación de los RP por estrógenos depende de tres condiciones principales: sexo, edad y tejido del animal, ya que por un lado es mayor en hembras que en machos y en ambos casos es mayor en organismos adultos que en prepúberes o viejos, además de que su regulación varía en los distintos tejidos (37-39). En el útero de la coneja, tal regulación está mediada por un elemento de respuesta hormonal a estrógenos localizado en una región intragénica del RP (40).

Estudios recientes realizados en la coneja adulta han mostrado que la inducción de la transcripción de los RP por los estrógenos ocurre en la corteza cerebral al igual que en el útero y en el hipotálamo (41). Sin embargo, estos cambios en la expresión del gen no están relacionados directamente con la síntesis de los RP, lo que sugiere un control diferencial a nivel postranscripcional en distintos tejidos. Hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares involucrados en la sensibilidad o la insensibilidad de los RP a la regulación por hormonas esteroideas en el SNC.

Se tienen evidencias de que la  $P_4$  puede ejercer acciones a nivel membranal ya que en la corteza cerebral y el hipocampo se han detectado sitios de unión a la hormona en preparaciones de membranas provenientes de terminales sinápticas aisladas (sinaptosomas) (42, 43). Recientemente se han descrito sitios de unión a la  $P_4$  a nivel membranal en sinaptosomas del hipotálamo y del cuerpo estriado de la rata con el uso de la  $P_4$  acoplada a la molécula de albúmina. Esos sitios de unión a la  $P_4$  al parecer son regulados por estrógenos, ya que la ovariectomía disminuye significativamente el número de tales sitios, mientras que la administración de estrógenos lo aumenta (44).

## Regulación del Proceso Reproductivo

La  $P_4$  y sus metabolitos participan en la regulación de la reproducción y de conductas asociadas a ésta (3, 45-47). Varios investigadores han mostrado que estos esteroides regulan la síntesis y la liberación del péptido liberador de gonadotropinas (LHRH) a nivel hipotalámico en las hembras. En los roedores se ha mostrado que la  $P_4$  incrementa la actividad de las neuronas LHRHérgicas e induce la expresión del gen que codifica para LHRH, así como la liberación de este péptido (48, 49).

El incremento en la síntesis y la liberación de LHRH inducido por la  $P_4$  podría estar mediado por el ácido gamma aminobutírico (GABA), endorfinas y catecolaminas, ya que los RP se han localizado en neuronas que sintetizan estos mensajeros pero no en neuronas LHRHérgicas (50, 51). Además, los efectos de la  $P_4$  sobre LHRH pueden ser bloqueados por la administración de antagonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (52). Los efectos de la  $P_4$  sobre LHRH pudieran también estar mediados por moléculas presentes en la membrana de neuronas LHRHérgicas que regularan los cambios a corto plazo (liberación de LHRH) inducidos por la hormona (53).

El incremento en la liberación de LHRH se ha observado también con la administración de algunos metabolitos de la  $P_4$  como la  $20\alpha$ -dihidroprogesterona o la pregnanolona tanto en animales con ovulación cíclica como en animales con ovulación refleja, por lo que se ha sugerido que los efectos de la  $P_4$  sobre la liberación de LHRH pueden estar mediados por sus metabolitos (54).

Por otro lado se tienen diversas evidencias que indican que en los roedores la administración de la  $P_4$ , tanto por vía sistémica como intrahipotalámica, posterior a la administración de estrógenos, induce en un período de 1 hora la conducta de lordosis en las hembras y así facilita la cópula (3, 47, 55).

Los RP que participan en la inducción de la conducta sexual se encuentran situados principalmente en los núcleos anterior, ventromedial y arcuato de hipotálamo, así como en el área preóptica. Se ha observado una relación entre el número de RP a nivel hipotalámico y la inducción de la conducta sexual. Así en animales prepúberes que poseen una concentración baja de RP, la conducta de lordosis inducida por la  $P_4$  es mucho menor en comparación con hembras adultas en estro que poseen un mayor número de RP (39).

En los roedores se ha encontrado que los efectos de la  $P_4$  sobre la conducta de lordosis dependen de la regulación de los RP a nivel hipotalámico ya que después del efecto inductor inicial de la  $P_4$  sobre la conducta, dosis subsecuentes de la hormona la inhiben (56, 57) esto se ha relacionado con el decremento en el número de RP inducido por la administración inicial de la  $P_4$  (58, 59).

Esta retroalimentación negativa se ha observado en animales con ovulación refleja como el conejo. En esta especie se ha encontrado una disminución importante en el número de RP a nivel hipotalámico, 24 horas después de la administración subcutánea de la  $P_4$  en conejos previamente tratados con estrógenos (34). Sin embargo en especies con ovulación cíclica la administración de la  $P_4$  no modifica al número de RP o incluso lo puede incrementar (60, 61).

Los mecanismos moleculares involucrados en la inducción de la conducta de lordosis después de la administración de la  $P_4$  se desconocen, sin embargo se tienen evidencias de que esta hormona induce cambios en la transcripción y en la traducción en el SNC ya que sus efectos sobre la conducta sexual pueden ser bloqueados por inhibidores tanto de la síntesis de RNA como de proteínas (62, 63).

Por otro lado se ha descrito que en el hipotálamo de la rata,

la administración de la  $P_4$  (posterior a la estimulación con estrógenos) incrementa el contenido de receptores a oxitocina, la cual aumenta la conducta de lordosis, por lo que algunos autores han propuesto que a nivel hipotalámico los mecanismos involucrados en la regulación de la conducta sexual femenina implican de manera secuencial la participación del estradiol, la  $P_4$  y la oxitocina (64). En el núcleo ventromedial del hipotálamo, los receptores a oxitocina son modulados por la  $P_4$  solamente en las hembras, lo cual se ha asociado con la insensibilidad en los machos a los efectos facilitadores de la  $P_4$  sobre la conducta de lordosis (65).

La conducta de lordosis en los roedores puede inducirse con igual eficacia a la de la  $P_4$  con la administración de algunos de sus metabolitos como la  $5\alpha$ -pregnandiona, la  $3\beta,5\beta$ -pregnanolona, la  $5\alpha$ -dihidroprogesterona y la  $20\alpha$ -dihidroprogesterona, esta última, incluso es más potente que la  $P_4$  en la facilitación de la conducta sexual (66, 67). De esta manera la participación de la  $P_4$  en la conducta de lordosis puede ser directa mediante la activación específica de algunos genes, o indirecta por la participación de sus metabolitos a nivel membranaral (68).



### **Modulación de la Excitabilidad Neuronal.**

La participación de la  $P_4$  y sus metabolitos en la modulación de la excitabilidad neuronal se ha descrito desde la década de 1940, cuando se mostraron los efectos anestésicos de estos esteroides (2), desde entonces hasta nuestros días se ha incrementado el número de evidencias que resaltan la importancia de la  $P_4$  y sus metabolitos en la regulación de la comunicación mediada tanto por neurotransmisores excitadores como inhibidores.

La administración intravenosa de la  $P_4$  a ratas ovariectomizadas sin pretratamiento con estrógenos, disminuye las respuestas de las células de Purkinje del cerebelo al glutamato, un aminoácido excitador, e incrementa las respuestas de las mismas células a un neurotransmisor inhibitor como el GABA, 15 minutos después de la administración de la hormona, lo que sugiere un efecto de la  $P_4$  a nivel membranal (69, 70). En ese mismo lapso de tiempo, la administración subcutánea de la  $P_4$  modifica la excitabilidad de neuronas del mesencéfalo dorsal del hámster involucradas en la conducta de lordosis (71).

Los cambios en la temperatura que ocurren a lo largo de los ciclos estral y menstrual, así como durante la gestación al parecer están regulados por la  $P_4$  a nivel central (72, 73). La regulación de la temperatura corporal por la  $P_4$  puede ser indirecta mediante su interacción con varios mensajeros como la serotonina, los péptidos opioides y la interleucina-1 (74) o directa por sus efectos sobre la excitabilidad de neuronas involucradas en el control de la temperatura. En este sentido se tienen datos que indican que la  $P_4$  modifica la tasa de disparo de neuronas termosensibles del área preóptica (75).

Por otro lado se ha informado que la microinyección de la  $P_4$  en el bulbo raquídeo del gato estimula la respiración al incrementar tanto la actividad del nervio frénico como la

ventilación (76). De esta manera la  $P_4$  puede regular la respiración tanto a nivel central como a nivel pulmonar (77).

En el gato, los metabolitos  $\beta$ -reducidos de la  $P_4$  como la epipreganolona y la  $5\beta$ -pregnandiona producen tanto sincronización cortical como inhibición de la actividad neuronal en la formación reticular mesencefálica con latencias menores a un minuto después de su administración (78). En estudios electrofisiológicos "in vitro" en el hipocampo del cobayo se ha observado que la pregnanolona inhibe la transmisión sináptica (79).

Otros metabolitos de la  $P_4$  como la  $5\alpha$ -pregnan- $3\alpha$ -ol-20-ona y su análogo  $5\beta$  también disminuyen la excitabilidad neuronal. Estos metabolitos reducen la actividad epiléptica en varios modelos experimentales de epilepsia tanto en gatos como en roedores y al igual que la  $P_4$ , inducen anestesia en diversas especies incluyendo al humano (80-83).

Por otra parte la ansiedad observada durante el síndrome premenstrual se ha asociado a una disminución en la concentración de la  $P_4$ , por lo que esta hormona es frecuentemente usada en el tratamiento de este síndrome (84). Se ha informado que diversos metabolitos de la  $P_4$  como la alopregnanolona,  $5\alpha$ -pregnan- $3\alpha$ -ol-20-ona y la pregnanolona, disminuyen la ansiedad en roedores (85, 86) y al parecer están involucrados en los efectos ansiolíticos inducidos por la  $P_4$  en el humano ya que se ha demostrado una correlación significativa entre la disminución en la ansiedad y el incremento en los niveles plasmáticos de estos metabolitos, después de la administración de la  $P_4$  (87, 88).

## Interacción de la $P_4$ y sus metabolitos con diferentes sistemas de neurotransmisión.

Se tienen diversos datos bioquímicos y electrofisiológicos que indican la participación de la  $P_4$  y sus metabolitos en la comunicación mediada por diferentes neurotransmisores (89). La administración de la  $P_4$  y de la  $17\alpha$ -dihidroprogesterona disminuye la unión de agentes colinérgicos a los receptores muscarínicos en el hipotálamo de la rata (90).

La neurotransmisión mediada por catecolaminas también es modulada por la  $P_4$ , ya que la administración de ésta modifica la liberación tanto de dopamina como de noradrenalina. Estos efectos dependen tanto de la dosis de la  $P_4$  como del estado fisiológico del animal ya que en diferentes fases del ciclo estral, la liberación de dopamina se reduce con dosis bajas de  $P_4$  en el cuerpo estriado de la rata, mientras que con dosis altas se incrementa. Sin embargo, en ratas ovariectomizadas o preñadas no se presenta el efecto inhibitor de las dosis bajas de la hormona (91, 92).

En el caso de la noradrenalina, se ha demostrado una inhibición en su liberación inducida por diferentes dosis de la  $P_4$  en la corteza cerebral de la rata en las distintas fases del ciclo estral. Este efecto es revertido por la yohimbina, un antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico (93). A nivel hipotalámico la administración de la  $P_4$  reduce la producción de AMP cíclico inducida por noradrenalina en ratas ovariectomizadas tratadas previamente con estradiol, a través de un mecanismo que induce desensibilización de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (94).

Por otra parte la neurotransmisión mediada por aminoácidos excitadores también se modifica por la  $P_4$  y sus metabolitos, ya que la primera aumenta la liberación de glutamato en sinaptosomas del área preóptica de la rata, mientras que el sulfato de pregnenolona actúa como un modulador alostérico positivo del receptor a

glutamato del tipo N-Metil-D-aspartato tanto en el hipocampo de la rata como en neuronas en cultivo de la médula espinal del pollo, modulando de esta manera el incremento en la excitabilidad neuronal inducida por el glutamato o el aspartato (95-97).

La interacción de la  $P_4$  y sus metabolitos con el sistema de neurotransmisión GABAérgico tanto a nivel presináptico como postsináptico es la más documentada hasta el momento (98). En el primer caso la  $P_4$  incrementa la liberación de GABA en sinaptosomas del área preóptica de la rata, mientras que a nivel postsináptico, los efectos de la  $P_4$  dependen tanto del estado fisiológico del animal como de la región cerebral estudiada (99). Así, la  $P_4$  aumenta la unión del muscimol, un agonista del GABA, a los receptores GABA<sub>A</sub> en la corteza cerebral de la rata macho pero disminuye tal unión en en el hipotálamo, la amígdala y la corteza cerebral de ratas ovariectomizadas (99, 100). Recientemente se ha demostrado que la inyección intratecal de la  $P_4$  y de algunos de sus metabolitos incrementan los efectos analgésicos inducidos por el muscimol en la médula espinal de la rata (101).

Por otro lado, la unión de moduladores positivos del receptor GABA<sub>A</sub> del tipo de las benzodiazepinas aumenta después de la administración de la  $P_4$  en la amígdala, el hipocampo y la corteza cerebral de ratas ovariectomizadas, pero disminuye en la sustancia nigra (102).

Aunque la mayoría de los metabolitos de la  $P_4$  modulan la neurotransmisión GABAérgica a nivel del receptor GABA<sub>A</sub>, hay algunos como la 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-ona que lo hacen a nivel de la liberación del neurotransmisor, ya que se tienen informes que indican que la administración de este esteroide disminuye la liberación de GABA en el hipocampo de la rata (103).

La modulación de la actividad del receptor GABA<sub>A</sub> por distintos metabolitos de la  $P_4$  se ha evidenciado a nivel bioquímico,

molecular y electrofisiológico. Tal modulación es posible debido a la interacción de los esteroides con sitios alostéricos específicos que se encuentran en la estructura del receptor GABA<sub>A</sub>. Así la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidroprogesterona, la 5 $\alpha$ - y la 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-ona se unen a un sitio parecido al de reconocimiento a barbitúricos y potencian el efecto inhibitor del GABA al incrementar la conductancia a Cl<sup>-</sup> (104, 105).

En diversas estructuras telencefálicas y diencefálicas como la corteza, el hipocampo y el área preóptica medial, se ha observado que tanto la P<sub>4</sub> como la 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidroprogesterona disminuyen la unión de t-butilbiciclofosforotionato, un antagonista del canal a Cl<sup>-</sup> presente en el receptor GABA<sub>A</sub>, siendo más potente el efecto del metabolito, por lo que este último podría mediar los efectos de la P<sub>4</sub> sobre el canal a Cl<sup>-</sup> (106).

La presencia de un sitio de unión a los metabolitos de la P<sub>4</sub> en el receptor GABA<sub>A</sub> se ha evidenciado en estudios de biología molecular. Se ha mostrado que los metabolitos  $\alpha$  reducidos de la hormona modulan la unión de las benzodiazepinas y del t-butilbiciclofosforotionato en preparaciones que contienen las diferentes subunidades del receptor transfectadas en un sistema de células que carecen de éste (107). En esos mismos estudios se demostró que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor GABA<sub>A</sub> son necesarias para dicha modulación más no la subunidad gamma.

Además de interactuar con distintos sistemas de neurotransmisión, la P<sub>4</sub> puede ejercer otros efectos a nivel membranal, ya que su administración disminuye la fluidez de la membrana en sinaptosomas de rata (108).

## Regulación de la expresión génica

En el SNC de los mamíferos la  $P_4$  puede inducir diferentes cambios tanto estructurales (densidad de espinas dendríticas) como funcionales (síntesis de neurotransmisores) mediante la regulación de distintos genes, algunos de los cuales ya han sido identificados (109, 110).

La  $P_4$  induce diferentes efectos sobre células gliales ya que por un lado disminuye su proliferación mientras que por otro lado incrementa la expresión de proteínas asociadas a la mielina como la proteína básica de mielina y la fosfodiesterasa denominada CNPasa (111).

A nivel hipotalámico se ha mostrado que la  $P_4$  puede modificar de manera diferencial la expresión de varios genes cuyos productos están involucrados en la regulación de la reproducción. Así, se ha informado que en roedores, la  $P_4$  induce la expresión de los genes de LHRH (al parecer de manera indirecta, al no encontrarse RP en neuronas LHRHérgicas) y de proencefalina (49, 112), mientras que en el caso del gen de tirosina hidroxilasa (enzima involucrada en la síntesis de dopamina) la  $P_4$  tiene un efecto dual ya que con tratamientos agudos y a tiempos cortos (8 horas) suprime su expresión, mientras que tratamientos crónicos (7 días) la estimulan (110, 113).

En la médula espinal, la  $P_4$  también tiene efectos transcripcionales, ya que su administración posterior a la de estrógenos, incrementa la expresión del gen de dinorfina, lo cual se ha asociado al aumento en la analgesia que ocurre durante el embarazo (114).

Uno de los mecanismos por los cuales la  $P_4$  puede modificar la transcripción de distintos genes en el SNC es mediante la regulación de genes de expresión temprana, cuyos productos

proteínicos actúan como factores de transcripción. Tal es el caso del proto-oncogen c-fos, cuyo producto interactúa generalmente con el de c-jun para formar el complejo AP1, el cual modula la transcripción de un amplio número de genes en distintos tejidos incluido el SNC (115-117). Se ha mostrado que la administración de la P<sub>4</sub>, posterior a la de estradiol, incrementa la expresión de c-fos en el hipotálamo de la rata, particularmente en neuronas LHRHérgicas (118-120).

En relación a procesos tumorales en el SNC, por métodos bioquímicos, moleculares e inmunohistoquímicos se ha mostrado la presencia de RP en meningiomas (121, 122) lo cual podría sugerir la participación de la P<sub>4</sub> en el crecimiento tumoral. Esta hipótesis se ha apoyado en estudios con pacientes con meningiomas donde se muestran que el tratamiento con RU 486, un antagonista de la P<sub>4</sub>, reduce el crecimiento tumoral y mejora el estado de los pacientes (123).

## Conclusiones y Perspectivas

El reconocimiento de la gran diversidad de funciones cerebrales en las que están involucradas tanto la  $P_4$  como sus distintos metabolitos ha modificado y ampliado al mismo tiempo el panorama con el que se contaba hace menos de diez años sobre la participación de las hormonas esteroides en el SNC.

El estudio de los mecanismos de acción hormonal de esteroides neuroactivos así como la interacción de los diferentes mensajeros químicos (esteroides, péptidos y aminoácidos) en la coordinación de los distintos procesos neuronales se ha convertido en una área de investigación fundamental de la neuroendocrinología.

Una de las áreas de mayor interés en este momento es la relacionada con los mecanismos moleculares mediante los cuales la  $P_4$  y sus metabolitos actúan en el SNC. En este sentido, distintos grupos de investigación han aportado evidencias que demuestran que estos esteroides pueden actuar tanto a nivel membranaral como a nivel nuclear, lo cual explica muchos de los efectos de la  $P_4$  y sus metabolitos a corto, mediano y largo plazo.

Hasta el momento la mayoría de las investigaciones indican que los metabolitos de la  $P_4$  inducen cambios en la conductancia de distintos iones, mientras que la  $P_4$  ejerce sus efectos principalmente mediante su interacción con los RP que, una vez activados, regulan la expresión de distintos genes (Figura 2). A pesar de que en la mayoría de las estructuras cerebrales se carece de información sobre los genes regulados por la  $P_4$ , en el hipotálamo se han empezado a reconocer algunos de éstos, aunque los mecanismos moleculares involucrados en tal regulación están aún por estudiarse.

Los cambios fisiológicos inducidos por la  $P_4$  y sus metabolitos en el SNC durante los ciclos estral y menstrual o en el transcurso



del embarazo, donde se modifican de manera importante los niveles de estos esteroides, son aún desconocidos, por lo que su estudio constituye también una parte básica en el conocimiento del significado fisiológico de la actividad de la  $P_4$  y de sus metabolitos en el SNC.

Dado que una gran proporción de los agentes esteroidales utilizados en terapia reproductiva y anticoncepción interactúan con los RP, el conocimiento de los efectos de dichas sustancias ampliará las fronteras en el diseño y aplicabilidad de estos fármacos en la clínica reproductiva. Por otro lado diversas investigaciones clínicas han empezado a surgir con el propósito de utilizar a la  $P_4$  y a sus metabolitos como agentes terapéuticos en distintas enfermedades neurológicas y psiquiátricas como la epilepsia y la ansiedad, el síndrome premenstrual e incluso aquellos tumores cerebrales cuyo crecimiento está regulado por hormonas esteroides.

**Referencias**

1. Boling JL, Blandau RJ. The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology* 1939; 25:359-64.
2. Selye H. The anesthetic effect of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 46:116-21.
3. Beyer C, González-Mariscal G. Effects of progesterone and natural progestins in brain. In: Negro Vilar A, Pérez-Palacios G, editors. *Reproduction, growth and development*. New York: Raven Press, 1991:199-208.
4. Majewska MD. Steroids and brain activity. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:3781-8.
5. McEwen BS. Steroid hormones are multifunctional messengers to the brain. *Trends Endocrinol Metab* 1991; 2:62-7.
6. Baulieu EE, Robel P. Neurosteroids: a new brain function? *J Steroid Biochem Molec Biol* 1990; 37:395-403.
7. Mathur C, Prasad VVK, Raju VS, Welch M, Lieberman S. Steroids and their conjugates in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:85-8.
8. Jung-Testas I, Hu EE, Baulieu EE, Robel P. Neurosteroids: Biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology* 1989; 125:2083-91.
9. Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J* 1992; 6:2311-22.

10. Orchinik M, McEwen B. Novel and classical actions of neuroactive steroids. *Neurotransmission* 1993; 1:1-6.
11. Karavolas HJ, Hodges DR. Neuroendocrine metabolism of progesterone and related progestins. In: Ciba Foundation Symposium. *Steroids and Neuronal Activity*. New York: John Wiley and Sons, 1990:22-55.
12. Hanukoglu I, Karavolas HJ, Goy RW. Progesterone metabolism in the pineal, brain stem, thalamus and corpus callosum of the female rat. *Brain Res* 1977; 125:313-24.
13. Korneyev A, Guidotti A, Costa E. Regional and interspecies differences in brain progesterone metabolism. *J Neurochem* 1993; 61:2041-7.
14. Carey MP, Aniszewski CA, Fry JP. Metabolism of progesterone in mouse brain. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1994; 50:213-7.
15. Kabbadj K, El-Etr M, Baulieu EE, Robel P. Pregnenolone metabolism in rodent embryonic neurons and astrocytes. *Glia* 1993; 7:170-5.
16. Melcangi RC, Maggi R, Martini L. Testosterone and progesterone metabolism in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 46:811-8.
17. Karavolas HJ, Hodges DR. Changes in pituitary, hypothalamic and brain progestin-metabolizing enzyme activities during lactation. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 44:299-303.
18. Kato J, Onouchi T. Specific progesterone receptors in the hypothalamus and anterior hypophysis of the rat. *Endocrinology* 1977; 101:920-8.

19. Blaustein JD, Feder HH. Nuclear progestin receptors in guinea pig brain measured by an in vitro exchange assay after hormonal treatments that affect lordosis. *Endocrinology* 1980; 106:1061-9.
20. Jung-Testas I, Renoir M, Bugnard H, Greene GL, Baulieu EE. Demonstration of steroid hormone receptors and steroid action in primary cultures of rat glial cells. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992; 41:621-31.
21. Evans R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988; 240: 889-95.
22. O'Malley BW, Tsai MJ. Overview of the steroid receptor superfamily of gene regulatory proteins. In: Parker MG, editor. *Steroid hormone action*. Oxford: Oxford University Press, 1993:45-63.
23. Gronemeyer H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Rev Genet* 1991; 25:89-123.
24. Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors and interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Rev* 1993; 14:459-79.
25. Rupprecht R, Reul JM, Trapp T, van Steensel B, Wetzel C, Damm K, Zieglgänsberger W, Holsboer F. Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. *Neuron* 1993; 11: 523-30.
26. Shughrue PJ, Sumpf WE, Elger W, Schulze PE, Sar M. Progestin receptor cells in mouse cerebral cortex during early postnatal development: a comparison with preoptic area and central hypothalamus using autoradiography with (125I) progestin. *Develop Brain Res* 1991; 59:143-55.

27. Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M, Kato J. Expression of progesterone receptor in the neonatal rat brain cortex: Detection of its mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1992; 41:637-40.
28. Shughrue PJ, Sumpf WE, Elger W, Schulze PE, Sar M. Progestin receptor cells in the 8-day-old male and female mouse cerebral cortex: Autoradiographic evidence for a sexual dimorphism in target cell number. *Endocrinology* 1991; 128:87-95.
29. MacLusky MJ, McEwen BS. Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 1978; 274:276-78.
30. Cerbón MA, Martínez M, Pérez-Palacios G. Oestrogen-insensitive progestin receptors in the central nervous system: Physicochemical and immunoreactive characteristics. *J Neuroendocrinol* 1989; 1: 292-8.
31. Blaustein JD, Turcotte JC. Down-regulation of progestin receptors in guinea pig brain: new findings using an immunocytochemical technique. *J Neurobiol* 1990; 21:675-85.
32. MacLuski MJ, McEwen BS. Progestins receptors in rat brain: Distribution and properties of cytoplasmic progestin-binding sites. *Endocrinology* 1980; 160:192-202.
33. Warembourg M, Jolivet A, Milgrom E. Immunohistochemical evidence of the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res* 1989; 480:1-15.

34. Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM, Cerbón MA. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1994; 50:299-303.
35. Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 1993; 132:2371-9.
36. Bayliss DA, Milhorn DE. Chronic estrogen exposure maintains elevated levels of progesterone receptor mRNA in guinea pig hypothalamus. *Mol Brain Res* 1991; 10:167-72.
37. Brown TJ, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. Comparison of age- and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progestin receptor induction in the rat brain. *Endocrinology* 1990; 126:2965-72.
38. Bogic J, Gerlach JL, McEwen BS. The ontogeny of sex differences in estrogen-induced progesterone receptors in rat brain. *Endocrinology* 1988; 122:2735-41.
39. Olster DH, Blaustein JD. Development of progesterone-facilitated lordosis in female guinea pigs: relationship to neural estrogen and progestin receptors. *Brain Res* 1989; 484:168-76.
40. Savouret JF, Bailly A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A, Milgrom E. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J* 1991; 10:1875-83.

41. Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. Cambios en la expresión génica del receptor a progesterona inducidos por estradiol y progesterona en la corteza cerebral y el hipotálamo del conejo. XXXIV Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología; 1994 Dic 1-4; Ixtapa, Guerrero. Revista de Endocrinología y Nutrición 1994; 2:204.
42. Towle AC, Sze PY. Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. J Steroid Biochem 1983; 18:135-43.
43. Ke FC, Ramirez VD. Binding of progesterone to nerve cell membranes of rat using progesterone conjugated to <sup>125</sup>I-bovine serum albumin as a ligand. J Neurochem 1990; 54:467-72.
44. Tischkau SA and Ramirez VD. A specific membrane binding protein for progesterone in rat brain: Sex differences and induction by estrogen. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:1285-9.
45. Smith ER, Weick RF, Davidson JM. Influence of intracerebral progesterone on the reproductive system of female rats. Endocrinology 1969; 85:1129-36.
46. Feder HH, Marrone BL. Progesterone: its role in the central nervous system as a facilitator and inhibitor of sexual behavior and gonadotropin release. Ann NY Acad Sci 1977; 286:331-54.
47. Maggi A, Perez J. Role of female gonadal hormones in the CNS: Clinical and experimental aspects. Life Sci 1985; 37:893-97.
48. Lee WS, Smith MS, Hoffman GE. Progesterone enhances the surge of luteinizing hormone by increasing the activation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. Endocrinology 1990; 127:2604-6.

49. Kim K, Lee BJ, Park Y, Cho WK. Progesterone increases messenger ribonucleic acid (mRNA) encoding luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) level in the hypothalamus of ovariectomized estradiol-primed prepubertal rats. *Mol Brain Res* 1989; 6:151-8.
50. Leranth C, MacLusky NJ, Brown TJ, Chen EC, Redmond E, Naftolin F. Transmitter content and afferent connections of estrogen-sensitive progestin receptor-containing neurons in the primate hypothalamus. *Neuroendocrinology* 1992; 55:667-82.
51. Fox SR, Harlan RE, Shivers BD, Pffaf DW. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 1990; 51:276-83.
52. Brann DW, Mahesh VB. Detailed examination of the mechanism and site of action of progesterone and corticosteroids in the regulation of gonadotropin secretion: hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and catecholamine involvement. *Biol Rep* 1991; 44:1005-15.
53. Ramirez VD, Dluzen DE, Ke FC. Effects of progesterone and its metabolites on neuronal membranes. In *Ciba Foundation Symposium. Steroids and Neuronal Activity*. New York: John Wiley and Sons, 1990:125-44.
54. Lin WW, Ramirez VD. Infusion of progestins into the hypothalamus of female New Zealand white rabbits: Effect on in vivo luteinizing hormone-releasing hormone release as determined with push-pull perfusion. *Endocrinology* 1990; 126:261-72.
55. McEwen BS. Genomic regulation of sexual behavior. *J Steroid Biochem* 1988; 30:179-83.



56. Nadler RN. A biphasic influence of progesterone on sexual receptivity of spayed female rats. *Physiol Behav* 1970; 5:95-97.
57. González-Mariscal G, Melo AI, Beyer C. Progesterone, but not LHRH or prostaglandin E<sub>2</sub>, induces sequential inhibition of lordosis to various lordogenic agents. *Neuroendocrinology* 1993; 57:940-945.
58. Blaustein JD, Feder HH. Cytoplasmic progestin receptors in female guinea pig brain and their relation to refractoriness in the expression of female sexual behavior. *Brain Res* 1979; 177:489-498.
59. Schwartz SM, Blaustein JD, Wade GN. Inhibition of estrous behavior by progesterone in rats: role of estrogen and progestin receptors. *Endocrinology* 1979; 105:1078-1082.
60. Bethea CL, Fahrenbach WH, Sprangers SA, Fresh F. Immunocytochemical localization of progestin receptors in monkey hypothalamus: effects of estrogen and progestin. *Endocrinology* 1992; 130:895-905.
61. Don Carlos L, Greene GL, Morrell JI. Estrogen plus progesterone increases progestin receptor immunoreactivity in the brain of ovariectomized guinea pigs. *Neuroendocrinology* 1989; 50:613-23.
62. Parsons B, MacLusky NJ, Krey L, Pfaff DW, McEwen BS. Hypothalamic protein synthesis essential for the activation of the lordosis reflex in the female rat. *Endocrinology* 1982; 110:620-4.
63. Brown TJ, Moore MJ, Blaustein JD. Maintenance of progesterone-facilitated sexual behavior in female rats requires continued

- hypothalamic protein synthesis and nuclear progestin receptor occupation. *Endocrinology* 1987; 121:298-304.
64. Schumacher M, Coirini H, Frankfurt M, McEwen BS. Localized actions of progesterone in hypothalamus involve oxytocin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6798-801.
  65. Coirini H, Johnson AE, Schumacher M, McEwen BS. Sex differences in the regulation of oxytocin receptors by ovarian steroids in the ventromedial hypothalamus of the rat. *Neuroendocrinology* 1992; 55:269-75.
  66. Kubli-Garfias C, Whalen RE. Induction of lordosis behavior in female rats by intravenous administration of progestins. *Horm Behav* 1977; 9:380-6.
  67. Beyer C, González-Mariscal G, Eguívar JR, Gómora P. Lordosis facilitation in estrogen primed rats by intrabrain injection of pregnanes. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 31:919-926.
  68. McEwen BS, Coirini H, Schumacher M. Steroid effects on neuronal activity: when is the genome involved? In: Ciba Foundation Symposium. *Steroids and Neuronal Activity*. New York: John Wiley and Sons, 1990:3-21.
  69. Smith SS, Waterhouse BD, Woodward DJ. Sex steroid effects on extrahypothalamic CNS. II. Progesterone, alone and in combination with estrogen, modulates cerebellar responses to amino acid neurotransmitters. *Brain Res* 1987; 422:52-62.
  70. Smith SS. Progesterone administration attenuates excitatory amino acid responses of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 1991; 42:309-20.

71. Havens MD, Rose JD. Estrogen-dependent and estrogen-independent effects of progesterone on the electrophysiological excitability of dorsal midbrain neurons in golden hamsters. *Neuroendocrinology* 1988; 48:120-9.
72. Davis ME, Fugo NW. The cause of physiological basal temperature changes in women. *J Clin Endocrinol* 1948; 8:550-63.
73. Nakayama T, Suzuki M, Ishizuka N. Action of progesterone on preoptic thermosensitive neurons. *Nature* 1975; 258:80.
74. Cannon JG, Dinariello CA. Increased plasma interleukin-1 activity in women after ovulation. *Science* 1984; 227:1247-50.
75. Tsai CL, Matsumura K, Nakayama T. Effects of progesterone on thermosensitive neurons in preoptic slice preparations. *Neurosci Lett* 1988; 86:56-60.
76. Bayliss DA, Milhorn DE, Gallman EA, Cidlowski JA. Progesterone stimulates respiration through a central nervous system steroid receptor-mediated mechanism in cat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7788-92.
77. Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J Endocr* 1994; 142:311-6.
78. Kubli-Garfias C. Physiological role of  $5\alpha$ - and  $5\beta$ -progesterone metabolites on the CNS. *Trends Pharmacol Sci* 1984; 5:439-42.

79. Landgren SOV. Pregnanolone (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-one), a progesterone metabolite, facilitates inhibition of synaptic transmission in the Schäffer collateral pathway of the guinea pig hippocampus in vitro. *Epilepsy Res* 1991; 10:156-65.
80. Bäckström T, Gee KW, Lan N, Sörensen M, Wahlström G. Steroids in relation to epilepsy and anaesthesia. In: Ciba Foundation Symposium. Steroids and Neuronal Activity. New York: John Wiley and Sons, 1990:225-39.
81. Belelli D, Bolger MB, Gee KW. Anticonvulsant profile of the progesterone metabolite 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one. *Eur J Pharmacol* 1989; 166:325-9.
82. Mok WM, Krieger NR. Evidence that 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20 one is the metabolite responsible for progesterone anesthesia. *Brain Res* 1990; 533:42-5.
83. Holmes GL, Weber DA. The effect of progesterone on kindling: A developmental study. *Dev Brain Res* 1984; 161:45-53.
84. Maddocks S, Hahn P, Moller F, Reid RL. A double blind placebo-controlled trial of progesterone vaginal suppositories in the treatment of premenstrual syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154:573-81.
85. Wieland S, Lan SC, Mirsadeghi S, Gee KW. Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\alpha$ -ol-20-one. *Brain Res* 1991; 565:263-8.
86. Bitran D, Hilvers RJ, Kellog CK. Anxiolytic effects of 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ [ $\beta$ ]-pregnan-20-one: Endogenous metabolites of progesterone that are effective at the GABA<sub>A</sub> receptor. *Brain Res* 1991; 561:157-61.

87. Rodríguez-Sierra JF, Hagley MT, Hendricks SE. Anxiolytic effects of progesterone are sexually dimorphic. *Life Sci* 1986; 3:1841-5.
88. Freeman EW, Purdy RH, Coutifaris C, Rickels K, Paul SM. Anxiolytic metabolites of progesterone: correlation with mood and performance measures following oral progesterone administration to healthy female volunteers. *Neuroendocrinology* 1993; 58:478-84.
89. Schumacher M. Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci* 1990; 13:359-62.
90. Klangkalya B, Chan A. Inhibition of hypothalamic and pituitary muscarinic receptor binding by progesterone. *Neuroendocrinology* 1988; 47:294-302.
91. Dluzen DE, Ramirez VD. In vitro progesterone modulates amphetamine-stimulated dopamine release from the corpus striatum of castrated male rats treated with estrogen. *Neuroendocrinology* 1990; 52:517-20.
92. Cabrera R, Díaz A, Pinter A; Belmar J. In vitro progesterone effects on 3H-dopamine release from rat corpus striatum slices obtained under different endocrine conditions. *Life Sci* 1993; 53: 1767-77.
93. Pinter A, Belmar J. In vitro progesterone effects on <sup>3</sup>H-norepinephrine release from rat cerebral cortex slices. *Neuroreport* 1993; 4:1203-6.

94. Petiti N, Etgen AM. Progesterone promotes rapid desensitization of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* 1992; 55:1-8.
95. Fleischmann A, Makman MH, Etgen AM. Ovarian steroids increase veratridine-induced release of amino acid neurotransmitters in preoptic area synaptosomes. *Brain Res* 1990; 507:161-3.
96. Irwin RP, Maragakis NJ, Rogawski MA, Purdy RH, Farb DH, Paul SM. Pregnenolone sulfate augments NMDA receptor mediated increases in intracellular  $Ca^{2+}$  in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1992; 141:30-4.
97. Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. Pregnenolone sulfate: A positive allosteric modulator at the N-Methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 1991; 40:333-6.
98. Schumacher M, Coirini H, McEwen BS. Regulation of high-affinity  $GABA_A$  receptors in the dorsal hippocampus by estradiol and progesterone 1989; 487:178-83.
99. López-Colomé AM, McCarthy M, Beyer C. Enhancement of [ $^3H$ ]muscimol binding to brain synaptic membranes by progesterone and related pregnanes. *Eur J Pharmacol* 1990; 176:297-303.
100. Jüptner M, Jussofie A, Hiemke C. Effects of ovariectomy and steroid replacement on  $GABA_A$  receptor binding in female rat brain. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1991; 38:141-7.
101. Caba M, González-Mariscal G, Beyer C. Perispinal progestins enhance the antinociceptive effects of muscimol in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 47:177-82.

102. Canonaco M, Carelli A, Maggi A. Steroid hormones and receptors of the GABA<sub>A</sub> supramolecular complex (I). *Neuroendocrinology* 1993; 57:965-73.
103. Taubol E, Ottersen OP, Gjerstad L. The progesterone metabolite 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one reduces K<sup>+</sup>-induced GABA and glutamate release from identified nerve terminals in rat hippocampus: a semiquantitative immunocytochemical study. *Brain Res* 1993; 623: 329-33.
104. Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 1986; 232:1004-7.
105. Peters JA, Kirkness EF, Callachan H, Lambert JJ, Turner AJ. Modulation of the GABA<sub>A</sub> receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br J Pharmacol* 1988; 94:1257-69.
106. Canonaco M, Tavolaro R, Maggi A. Steroid hormones and receptors of the GABA<sub>A</sub> supramolecular complex (II). *Neuroendocrinology* 1993; 57:974-84.
107. Lan NC, Bolger MB, Gee KW. Identification and characterization of a pregnane steroid recognition site that is functionally coupled to an expressed GABA<sub>A</sub> receptor. *Neurochem Res* 1991; 16:347-56.
108. Deliconstantinos G. Effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and progesterone on rat brain synaptosomal plasma membrane. In: Ciba Foundation Symposium. Steroids and Neuronal Activity. New York: John Wiley and Sons, 1990:190-205.

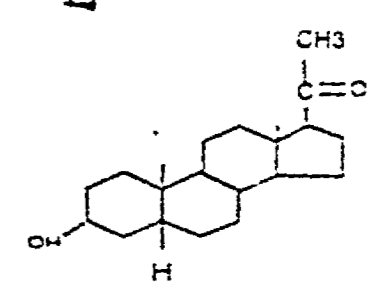
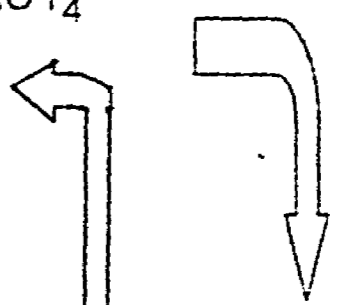
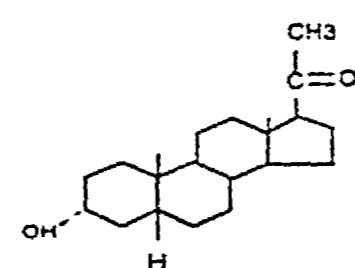
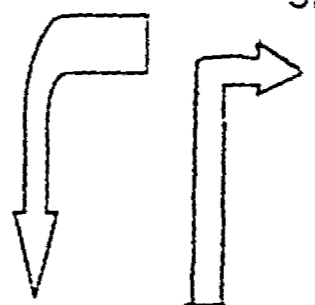
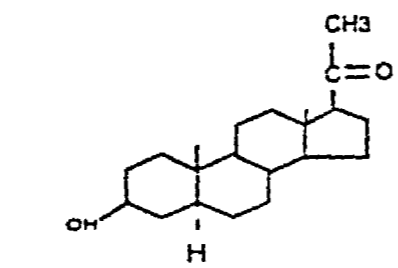
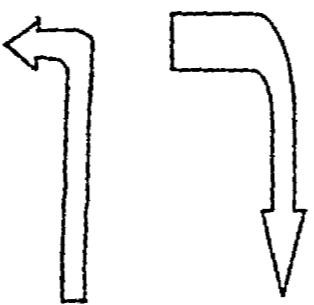
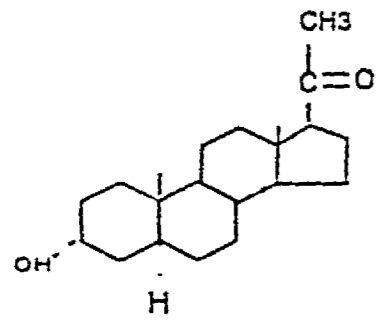
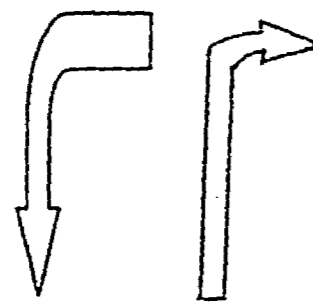
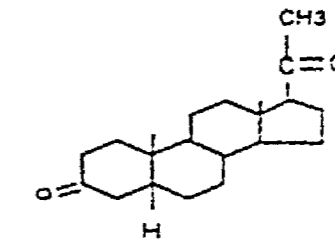
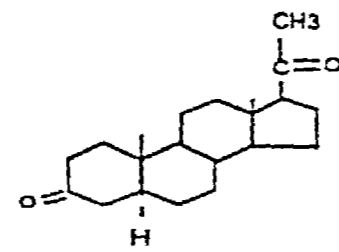
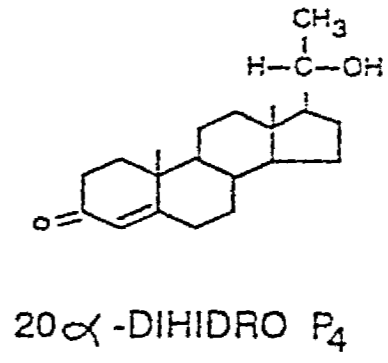
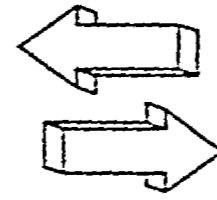
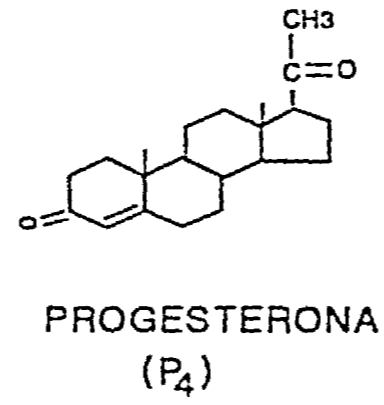
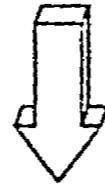
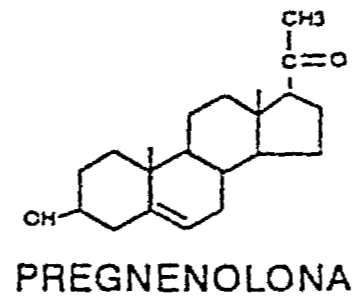
109. Frankfurt M, Gould E, Woodley CS, McEwen BS. Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamus neurons: A Golgi study in the adult rat. *Neuroendocrinology* 1990; 51:530-5.
110. Arbogast LA, Voogt JL. Progesterone suppresses tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nucleus on proestrus. *Endocrinology* 1994; 135:343-50.
111. Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P, Baulieu EE. Actions of steroid hormones and growth factors on glial cells of the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1994; 48:145-54.
112. Romano GJ, Mobbs CV, Howells RD, Pfaff DW. Estrogen regulation of proenkephalin gene expression in the ventromedial hypothalamus of the rat: temporal qualities and synergism with progesterone. *Mol Brain Res* 1989; 5:51-8.
113. Arbogast LA, Vogt JL. Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 1993; 58:501-10.
114. Medina VM, Dawson-Basoa ME, Gintzler AR. 17 $\beta$ -Estradiol and progesterone positively modulate spinal cord dynorphin: Relevance to the analgesia of pregnancy. *Neuroendocrinology* 1993; 58:310-15.
115. Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 1988; 54:541-52.
116. Ransone LJ, Verma IM. Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 6:539-57.

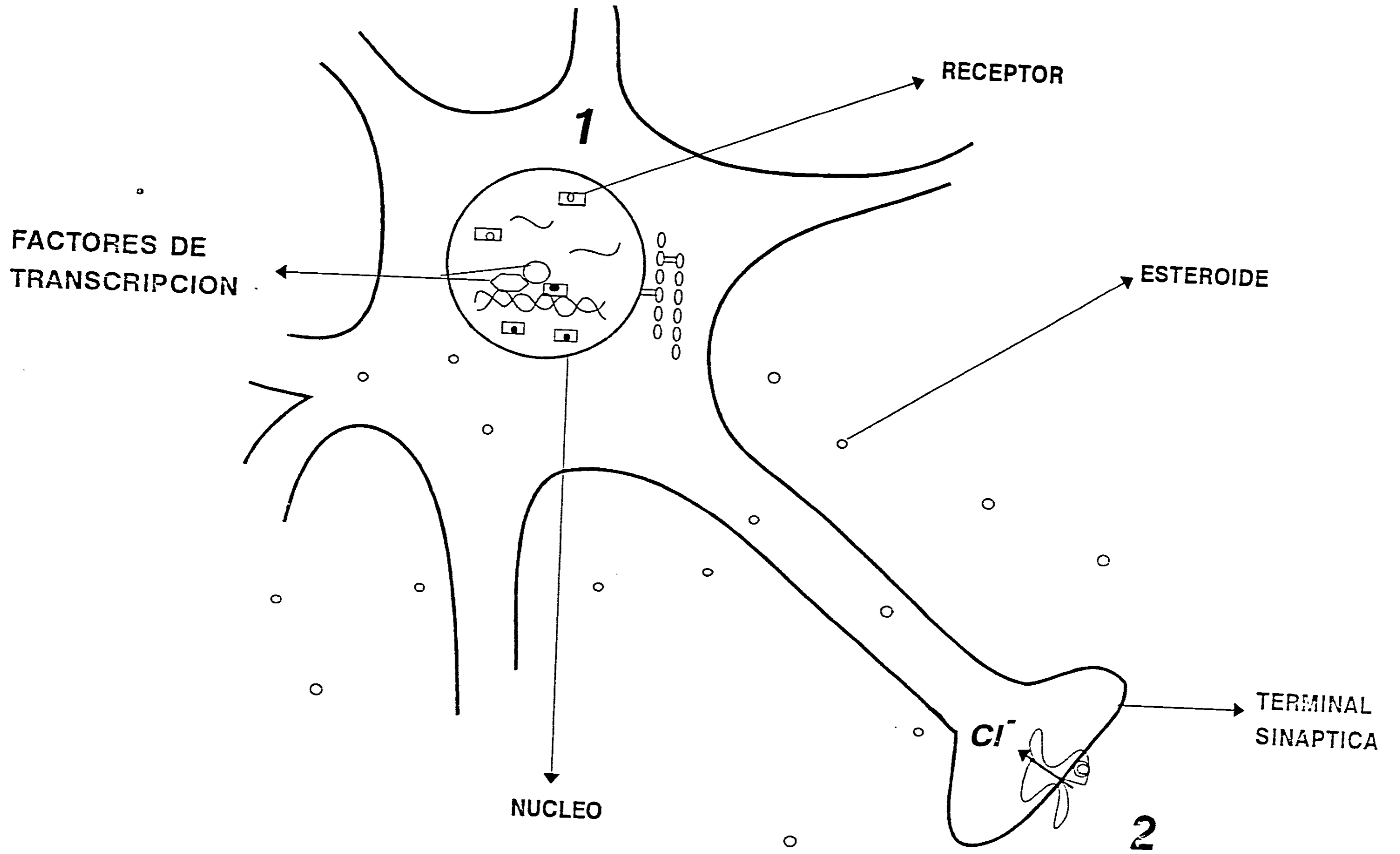


117. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann Rev Neurosci* 1991; 14:421-51.
118. Hoffman GE, Lee WS, Attardi B, Yann V, Fitzsimmons MD. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express c-fos antigen after steroid activation. *Endocrinology* 1990; 126:1736-41.
119. Insel TR. Regional induction of c-fos-like protein in rat brain after estradiol administration. *Endocrinology* 1990; 126:1849-53.
120. Wu TJ, Segal AZ, Miller GM, Gibson MJ, Silverman AJ. Fos expression in gonadotropin-releasing hormone neurons: enhancement by steroid treatment and mating. *Endocrinology* 1992; 131:2045-50.
121. Halper J, Colvard DS, Scheithauer BW, Jiang NS, Press MF, Graham ML, Riehl E, Laws ER, Spelsberg TC. Estrogen and progesterone receptors in meningiomas: comparison of nuclear binding, dextran-coated charcoal, and immunoperoxidase staining assays. *Neurosurgery* 1989; 25:546-53.
122. Carroll RS, Glowacka D, Dashner K, Black PM. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 1993; 53:1312-6.
123. Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, Ahmadi J, Sandun A, Russell CA, Lucci L, Stevenson LL. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestosterone agent mifepristone. *J Neurosurg* 1991; 74:861-6.

Figura 1. **Metabolitos de la progesterona ( $P_4$ ) en el SNC.** Los principales metabolitos de la  $P_4$ , producidos en el SNC y que desempeñan un papel funcional en este último se encuentran reducidos en las posiciones 3, 5 y 20.

Figura 2. **Mecanismos de acción de la  $P_4$  y sus metabolitos en el SNC.** La  $P_4$  y sus metabolitos participan en diferentes funciones del SNC mediante dos mecanismos principales: (1) Interacción con receptores a la  $P_4$  situados en el núcleo con la subsecuente modificación en la expresión de genes específicos; (2) Modulación de la conductancia iónica por medio de la interacción con sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores como ocurre en el caso del receptor  $GABA_A$ , en donde se incrementa la conductancia a  $Cl^-$ . La  $P_4$  actúa principalmente a través del primer mecanismo, mientras que sus metabolitos lo hacen vía el segundo mecanismo.





## OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION.

Como se señala en la revisión "**Participación de la progesterona y sus metabolitos en el sistema nervioso central**", el papel del receptor a progesterona en la mediación de las acciones de la progesterona es fundamental, por lo que el conocimiento tanto de las características del receptor a progesterona como de los mecanismos involucrados en su regulación, es básico para comprender los diversos procesos fisiológicos en los que participa la progesterona en el sistema nervioso central.

Existen diversos informes sobre el papel funcional del receptor a progesterona en el sistema nervioso central de mamíferos con ovulación cíclica como los roedores, en los que se destaca la participación del receptor a progesterona en la inducción de la conducta de lordosis y el papel del estradiol en la regulación a la alta del receptor a progesterona en el hipotálamo sin efectos en la corteza cerebral; sin embargo, en animales con ovulación refleja como el conejo, donde la progesterona desempeña un papel inhibitor en la conducta de lordosis, se carece de información sobre las características del receptor a progesterona, su distribución en la corteza cerebral, la participación del estradiol y la progesterona en su regulación, así como los mecanismos involucrados en tal regulación. Por lo que en este trabajo los objetivos principales fueron:

- 1) Conocer la especificidad del receptor a progesterona en el hipotálamo y la corteza cerebral del conejo, su distribución en distintas regiones de la corteza cerebral y la participación del estradiol y la progesterona en su regulación, mediante el uso de técnicas de unión específica al receptor en extractos citosólicos del hipotálamo y la corteza cerebral.

- 2) Evaluar el papel del estradiol y la progesterona en la regulación de la expresión del gen que codifica para el receptor a progesterona en el hipotálamo y la corteza cerebral del conejo mediante la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) del receptor a progesterona.

Para cumplir con el primer objetivo se utilizaron conejos de la cepa Nueva Zelanda que se sometieron a las siguientes condiciones experimentales:

- a) Hembras prepúberes intactas;
- b) Machos adultos intactos;
- c) Hembras adultas intactas;
- d) Hembras adultas ovariectomizadas tratadas por vía subcutánea con:
  - 1) Benzoato de estradiol (10  $\mu\text{g}/\text{día}$ ) por tres días consecutivos;
  - 2) Benzoato de estradiol (10  $\mu\text{g}/\text{día}$ ) por tres días consecutivos + progesterona (1 mg) en el cuarto día;
  - 3) progesterona (1 mg) por un solo día; y
  - 4) Vehículo (aceite de maíz).

Veinticuatro horas después del último tratamiento se realizaron todos los experimentos de unión específica en extractos citosólicos obtenidos del hipotálamo y las regiones frontal, temporo-parietal y occipital de la corteza cerebral de los animales descritos anteriormente.

Para cumplir con el segundo objetivo se ovariectomizaron conejas adultas que fueron tratadas con:

- 1) Benzoato de estradiol (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por dos días consecutivos;
- 2) Benzoato de estradiol (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) por dos días consecutivos + progesterona (5 mg/kg) en el tercer día; y
- 3) Vehículo.

Con el fin de obtener una respuesta máxima en la expresión del gen del receptor a progesterona, en esta segunda parte del trabajo

se modificó el esquema de tratamiento ya que se incrementaron las dosis tanto de benzoato de estradiol como de progesterona y en el caso del primero se redujo el tiempo de tratamiento a dos días. Estos cambios se realizaron de acuerdo a un artículo publicado en el transcurso del trabajo experimental en donde se observa que el tratamiento con estrógenos induce la máxima expresión del gen del receptor a progesterona en el útero de la rata 24 y 48 horas después de iniciado el tratamiento (1).

Veinticuatro horas después de la última dosis, se extrajo el ARN total de la corteza frontal, el hipotálamo y el útero, este último fue usado como testigo ya que existen numerosos datos sobre la regulación por estradiol y la progesterona del gen que codifica para el receptor a progesterona en este tejido.

El ARN fue procesado para detectar el nivel de expresión del gen del receptor a progesterona por la técnica de "Northern blot"; sin embargo, debido a la baja expresión del receptor a progesterona en el sistema nervioso central, no se obtuvo una adecuada señal del mensaje, por lo que el nivel de expresión del gen del receptor a progesterona fue analizado por una técnica más sensible como es la "RT-PCR" (transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa). Para lo cual el ARN total fue utilizado para la formación del ADNc con el uso de la enzima transcriptasa reversa, y a partir del ADNc, se amplificó el mensaje del receptor a progesterona por la técnica de PCR.

Posteriormente los productos de la amplificación fueron detectados por "Southern blot" y analizados por densitometría, utilizándose como testigo de expresión al gen de la ciclofilina, el cual se expresa constitutivamente tanto en el útero como en el sistema nervioso central, por lo que su expresión no depende de la concentración de hormonas esteroides, que es modificada por la ovariectomía y los tratamientos hormonales.

La siguiente sección está constituida por los dos artículos derivados del trabajo experimental (el primero ya está publicado en una revista con arbitraje y de circulación internacional y el otro está en proceso de revisión para ser enviado como comunicación rápida). En ellos se detallan los procedimientos experimentales utilizados para cubrir los objetivos de esta tesis, así como los resultados obtenidos en la misma.





# Intracellular Progesterone Receptors are Differentially Regulated by Sex Steroid Hormones in the Hypothalamus and the Cerebral Cortex of the Rabbit

Ignacio Camacho-Arroyo, Gregorio Pérez-Palacios, Ana Ma. Pasapera and Marco A. Cerbón\*

*Molecular Biology Unit in Reproductive Health, FES-Zaragoza, National Autonomous University of Mexico and National Institute of Nutrition, S. Zubirán, Mexico City, Mexico*

The aim of this study was to examine the role of sex steroid hormones in the regulation of intracellular progesterone receptors (PR) in the rabbit central nervous system. We determined PR concentration in cytosol preparations from the hypothalamus, the frontal, tempo-parietal and occipital cortex, by using the specific binding of the synthetic progestin [<sup>3</sup>H]ORG 2058. PR concentration was higher in the hypothalamus of intact adult females than in that of adult males and prepubertal females, whereas no significant differences were observed in the cerebral cortex of these animals. PR concentration was similar in the three cortical regions analyzed, indicating a homogeneous distribution of PR in the cerebral cortex. The administration of estradiol to ovariectomized animals increased PR concentration in the hypothalamus but not in the cortex. The administration of progesterone to ovariectomized rabbits did not modify PR concentration in any region, however when progesterone was administered after estradiol, it induced a significant diminution in hypothalamic PR concentration without effects in the cortex. These findings suggest that in the rabbit, PR are estrogen regulated in the hypothalamus but not in the cerebral cortex. In the latter, PR are not regulated by progesterone, whereas in the former the estrogen-induced PR are down-regulated by progesterone. Interestingly, hypothalamic PR constitutively expressed in ovariectomized animals are progesterone-insensitive.

*J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 50, No. 5/6, pp. 299–303, 1994

## INTRODUCTION

The participation of progesterone (P<sub>4</sub>) in several functions of the central nervous system (CNS) is well documented [1–3]. In the CNS, P<sub>4</sub> actions are exerted via different mechanisms that include the interaction of the steroid with either specific intracellular progestin receptors (PR) or with different proteins in the cell membrane as ligand-gated ion channels and G-protein coupled neurotransmitter receptors [4–7]. The effects mediated by intracellular PR usually last hours or days and involve changes in gene expression, whereas the membrane effects of the hormone are produced in seconds or minutes and are related to non-genomic mechanisms.

Two PR populations have been described in the CNS of cyclic ovulators as rodents [8]. One, located in the hypothalamus, is estrogen-regulated; while the other is estrogen-insensitive and is widely distributed in several brain regions such as the amygdala, cerebellum and cerebral cortex [8–10]. Previous studies have demonstrated that both intracellular PR present similar binding and physicochemical properties in the rat CNS [10].

It has been reported that PR content exhibits sex differences as well as variations during development both in the hypothalamus and the cerebral cortex of rodents [11–13]. Although the regulation of PR by estrogens has been established in the CNS of rodents, the role of P<sub>4</sub> in the regulation of its own receptor is not clear, thus there are data that indicate that P<sub>4</sub> can either increase, decrease or not affect the expression of PR [14–16].

\*Correspondence to M. A. Cerbón.  
Received 3 Sep. 1993; accepted 11 May 1994.

In the rabbit, a reflex ovulator, where  $P_4$  seems to play an inhibitory role in female sexual behavior, as compared to its stimulatory effect reported in rodents [17, 18] there are no data on PR regulation in the CNS. Therefore, in the present study we have evaluated the participation of estradiol and  $P_4$  on PR regulation in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit.

## EXPERIMENTAL

### Radioactive material and chemicals

[ $^3\text{H}$ ]16 $\alpha$ , ethyl-21 hydroxy-19-nor-4-pregnen-3, 20-dione (ORG 2058) (51 Ci/mmol) was purchased from Amersham International (Bucks., England). Non-radioactive steroids were obtained from Steraloids Inc. (Pawling, NY, U.S.A.) and Amersham International. All chemical reagents were of analytical grade. Radioactivity was determined in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer (model 2660) using liquifluor (Thomas Sci.) as the counting solution.

### Animals and treatments

Prepubertal female as well as adult male and female New Zealand White rabbits were used throughout the study. Animals were maintained in a 12:12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. When required, adult females were ovariectomized (Ovx) under ketamine anesthesia (80 mg/kg) and 1 week later they were randomly assigned to the following subcutaneous treatments: (1) daily administration of estradiol benzoate (EB) (10  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) for 3 days; (2) the described administration of EB followed by 1 mg of  $P_4$  administered on day 4; (3) a single dose of  $P_4$  (1 mg), and (4) vehicle alone (corn oil). Twenty four hours after the last injection the animals were killed by an air injection in a lateral ear vein, and after decapitation the brain was quickly removed and the hypothalamus, the frontal, tempo-parietal and occipital regions of the cerebral cortex were dissected on ice. Each experimental group consisted of three animals, but in the case of the experiments with the hypothalamus, the tissue corresponding to three animals was pooled for each assay.

### Cytosol PR binding assay

Cytosol PR concentration was measured by a method previously described by Cerbón *et al.* [10]. Briefly, tissues were homogenized in a ratio 1:3 (w/v) in TEDGDMo buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 4°C, 1.5 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 10% glycerol (v/v) and 10 mM sodium molybdate) using a Polytron homogenizer (Brinkman Instruments, Westbury, NY, U.S.A.). Homogenates were centrifuged at 105,000  $g$  for 1 h at 4°C in a SW 50.1 rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, U.S.A.). Kinetic parameters of [ $^3\text{H}$ ]ORG 2058 binding were determined in cytosol aliquots incubated with increasing concentrations of [ $^3\text{H}$ ]ORG 2058 (0.5–10 nM) in TEDGDMo buffer for

4 h at 4°C. Other cytosol aliquots were incubated with 2 nM [ $^3\text{H}$ ]ORG 2058 in TEDGDMo buffer at 4°C for 4 h. Non-specific binding was measured in similar incubations containing a 100-fold excess of unlabeled ORG 2058. Bound and free radioligand fractions were separated by the addition of a dextran-coated charcoal suspension (0.025% dextran T-70 and 0.25% Norit-A in TEDGDMo buffer) and incubated for 5 min at 4°C under continuous shaking. Following centrifugation at 800  $g$  for 10 min at 4°C, aliquots of the supernatants were assayed for radioactivity. Specific binding was calculated by subtracting non-specific binding from total binding. Stereospecificity of cortical PR was assessed in cytosol preparations from intact adult female rabbits incubated for 4 h at 4°C with [ $^3\text{H}$ ]ORG 2058 (1 nM) in the presence of a range of concentrations (10–500 nM) of different unlabeled steroids.

Saturation binding capacities and dissociation equilibrium constants ( $K_d$ ) were calculated from Scatchard plots. Cytosol protein content in all samples was determined by Bradford's method [19]. The results were expressed as specifically bound fmoles of [ $^3\text{H}$ ]ORG 2058 per mg cytosol protein. The data were statistically analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a test of individual differences between means.

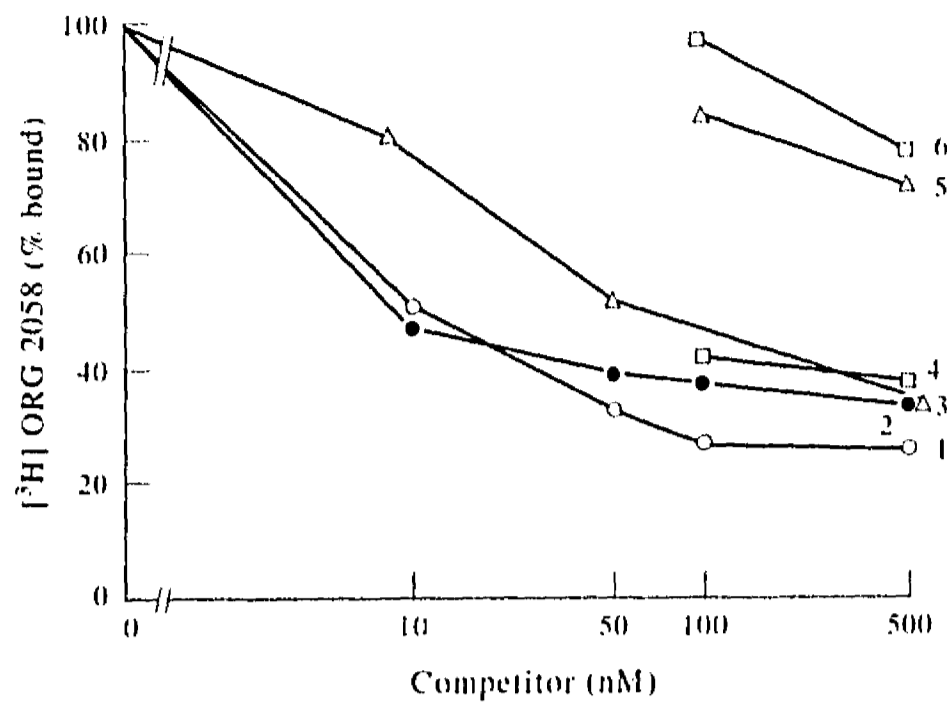
### Radioimmunoassay for $P_4$

Serum  $P_4$  concentration was measured in Ovx females treated with  $P_4$  and vehicle as described previously [20]. Anti- $P_4$  serum was kindly provided by the WHO-Mexico National Reagent Production Programme. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 7.6 and 6.5%, respectively.

## RESULTS

Incubations of [ $^3\text{H}$ ]ORG 2058 with cytosol preparations from the hypothalamus and the cerebral cortex demonstrated the presence of intracellular PR in the rabbit CNS. Scatchard plot analysis of PR binding kinetics showed the existence of high affinity binding sites in rabbit hypothalamus ( $K_d = 2.4$  nM) and cerebral cortex ( $K_d = 1.6$  nM). The stereospecificity of cerebral cortex PR determined by competitive binding analysis indicated that unlabeled ORG 2058 was the most potent competitor followed by R 5020,  $P_4$  and levonorgestrel (Fig. 1). Estradiol and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone did not compete for PR binding sites.

Adult female rabbits showed a similar [ $^3\text{H}$ ]ORG 2058 binding in the frontal, tempo-parietal and occipital cortex, although no significant differences were noticed among the three cortical regions analyzed, the lowest PR concentration was observed in the occipital cortex (Table 1). PR concentration in the cortex of adult female animals did not exhibit significant differences compared to that found in adult male and prepubertal female animals (Table 1).

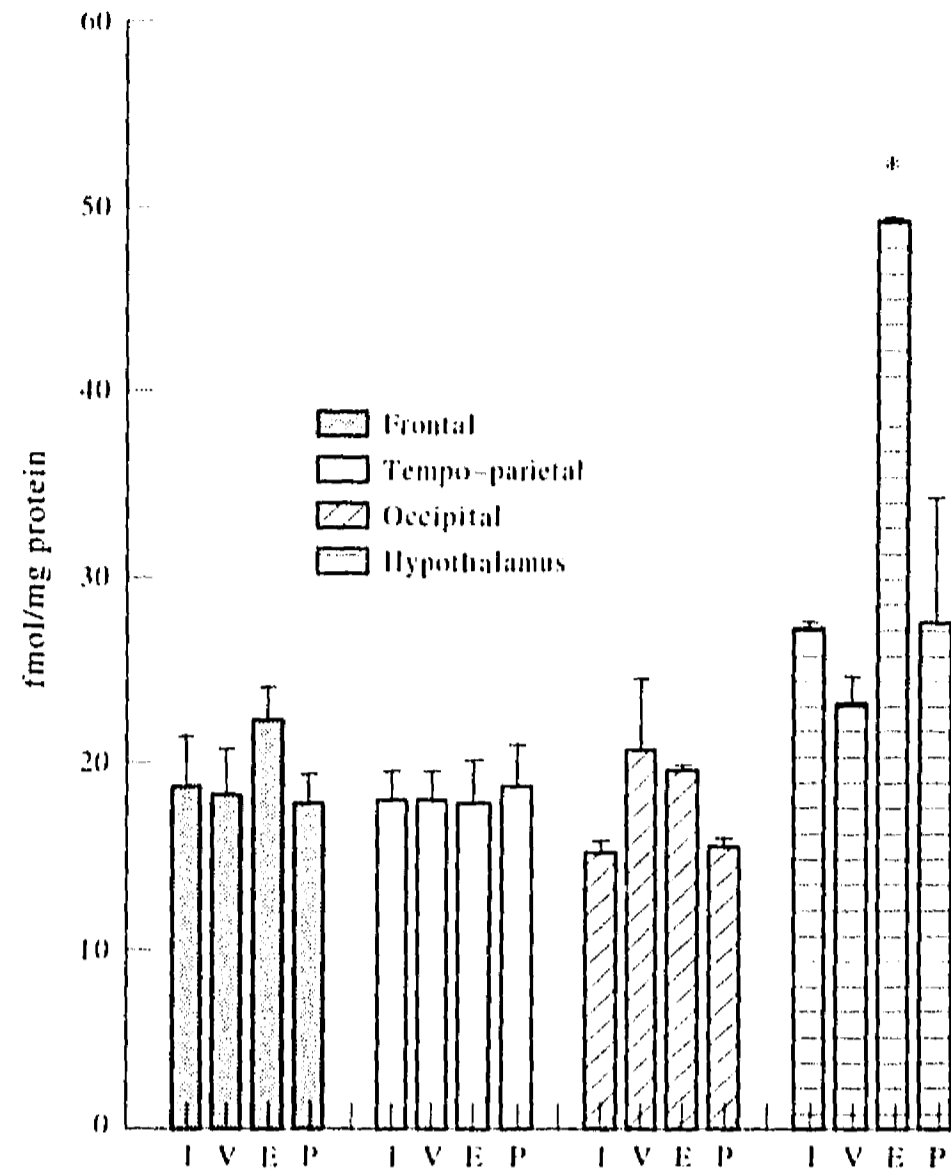


**Fig. 1.** Competition of non-labeled natural and synthetic steroids for intracellular PR in the rabbit cerebral cortex. PR were labeled with 1 nM [<sup>3</sup>H]ORG 2058. Increasing concentrations of non-labeled ORG 2058 (1), R5020 (2), P<sub>4</sub> (3), levonorgestrel (4), estradiol (5) and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (6) were added. [<sup>3</sup>H]ORG 2058 binding to PR in the absence of competitors was set as 100%. Results are expressed as the percentage of [<sup>3</sup>H]ORG 2058 specific binding. Each point represents the mean value of 3 determinations in triplicate.

In contrast, PR concentration in the rabbit hypothalamus, exhibited clear-cut differences among these groups. As indicated in Table 1, [<sup>3</sup>H]ORG 2058 specific binding in the adult female hypothalamus was significantly higher than that found in adult male and prepubertal female animals.

Gonadectomy of adult female rabbits did not significantly change PR concentration in the different regions of the cerebral cortex (Fig. 2). In addition no differences in PR concentration were observed after the administration of EB, P<sub>4</sub>, or the sequential treatment with EB and P<sub>4</sub> to Ovx rabbits (Table 2 and Fig. 2). Administration of EB to Ovx rabbits induced a marked increase on PR concentration in the hypothalamus whereas the administration of P<sub>4</sub> in animals primed with EB resulted in a significant diminution of PR concentration in the hypothalamus (Fig. 2).

In contrast to the diminution observed in hypothalamic PR concentration after the treatment of P<sub>4</sub> to EB



**Fig. 2.** Effects of EB and EB-P<sub>4</sub> on [<sup>3</sup>H]ORG 2058 binding in the cerebral cortex and the hypothalamus of adult castrated female rabbits. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM of 3 experiments in triplicate. (I) intact females; (V) Ovx animals treated with vehicle; (E) Ovx animals treated with EB; (P) Ovx animals treated with EB + P<sub>4</sub> in a sequential manner. \**P* < 0.05 as compared to the hypothalamus of I, V, and P animals.

primed animals, the single administration of P<sub>4</sub> to Ovx animals without EB treatment did not modify PR concentration in the hypothalamus (Table 2).

The concentration of P<sub>4</sub> in serum samples from Ovx rabbits treated 24 h earlier with P<sub>4</sub> was similar to that observed in Ovx animals treated with vehicle. In both cases P<sub>4</sub> concentration was low, the mean values were 0.72 and 0.50 ng/ml for the Ovx animals treated with P<sub>4</sub> and vehicle, respectively.

**Table 1.** [<sup>3</sup>H]ORG 2058 specific binding in the hypothalamus and several regions of the cerebral cortex of male and female intact rabbits

	Prepubertal		
	females	Adult females	Adult males
Hypothalamus	12.96 $\pm$ 3.22	26.75 $\pm$ 0.32*	17.36 $\pm$ 2.82
Frontal cortex	20.94 $\pm$ 2.81	18.85 $\pm$ 1.81	21.24 $\pm$ 1.06
Tempo-parietal cortex	19.72 $\pm$ 1.78	17.81 $\pm$ 1.60	17.45 $\pm$ 1.76
Occipital cortex	17.25 $\pm$ 2.67	14.88 $\pm$ 0.69	15.00 $\pm$ 3.44

Results are expressed as fmol/mg protein and represent the mean  $\pm$  SEM of 3 experiments performed each one in triplicate (3 animals per group). \**P* < 0.05 compared to the hypothalamus of prepubertal females and adult males.

**Table 2.** [<sup>3</sup>H]ORG 2058 specific binding in the hypothalamus and the cerebral cortex of Ovx rabbits treated with P<sub>4</sub>

	Vehicle	P <sub>4</sub>
	(corn oil)	(1 mg)
Hypothalamus	21.3 $\pm$ 3.7	18.1 $\pm$ 3.0
Cerebral cortex	9.6 $\pm$ 1.9	13.8 $\pm$ 3.4

Results are expressed as fmol/mg protein and represent the mean  $\pm$  SEM of 3 experiments performed each one in triplicate (3 animals per group). No significant differences were found between the group treated with P<sub>4</sub> and vehicle group.

## DISCUSSION

The results demonstrate the presence of specific intracellular PR in different regions of the cerebral cortex and the hypothalamus of male and female rabbits. The binding characteristics and stereospecificity of cortical PR are similar to those found in the cortex of other mammals as well as those described in other peripheral  $P_4$  responsive tissues [5, 21].

The lack of differences in PR concentration of the frontal, tempo-parietal and occipital cortex indicates a homogeneous distribution of intracellular PR, at least in prepubertal and adult animals. It is interesting to mention that Shugrue *et al.* [22] have reported changes in the content and distribution of cortical PR in the mouse developing brain.

The finding that PR concentration in different cortical regions was similar in male and female (both prepubertal and adult) rabbits, suggests that this PR population is not regulated by sex steroid hormones. In contrast, PR concentration in the rabbit hypothalamus exhibited a clear-cut sexual dimorphism, being higher in females than in males. These data confirm and extend similar results found in rodent hypothalamus [23, 24].

A higher hypothalamic PR concentration was also noticed in adult female rabbits than in prepubertal animals. This finding suggests an estrogen modulation of PR and is in line with the low content of these receptors observed in the hypothalamus of immature guinea pigs that may explain the lack of lordosis behavior reported in these young animals after the treatment with EB [25]. Furthermore, the administration of EB to Ovx rabbits induced a significant increase in hypothalamic PR concentration.

The results also revealed that PR concentration in estrogen-primed rabbits, significantly decreased after  $P_4$  treatment in the hypothalamus, whereas no changes were observed in the different cerebral cortex regions, suggesting that after estrogen priming, PR are down-regulated by  $P_4$  in the rabbit hypothalamus but not in the cerebral cortex. Although the diminution of hypothalamic cytosolic PR concentration produced by  $P_4$  could be due to a tight nuclear binding produced by the hormone or to the occupancy of PR by  $P_4$ , these possibilities are unlikely, since  $P_4$  concentration in Ovx animals treated with a single dose of  $P_4$  was similar to that found in Ovx animals treated with vehicle. Furthermore, in guinea pig hypothalamus neither depletion of cytoplasmic PR nor an increased concentration of plasmatic  $P_4$  as compared to the oil injection were found, 24 h after  $P_4$  administration [26].

Interestingly, the administration of  $P_4$  to Ovx animals without EB priming did not modify PR concentration in the hypothalamus, suggesting that constitutively expressed PR are insensitive to  $P_4$  regulation. The mechanisms involved in the different regulation of PR by  $P_4$  in the hypothalamus of Ovx EB-primed

rabbits and Ovx non-EB-primed animals require further research.

Recently, Savouret *et al.* [27] have demonstrated that the estrogen and  $P_4$  responsive elements in the rabbit PR gene are located in the same region. Whether the different steroid hormone regulation of PR in the CNS is due to the interaction among various tissue-specific factors which results in a differential PR gene expressions is still unknown.

The overall results demonstrate that in the rabbit, hypothalamic PR have a dual estrogen-progesterone regulation whereas cortical PR are steroid hormone-insensitive.

*Acknowledgements*—The authors thank Ms Juana González and Elizabeth Flores Escobar for their technical assistance in the experiments. This work was supported by the University Program in Health Research (PUIS), and the Supporting Program to Postgraduate Study Divisions (PADEP) UNAM, Mexico City, The Ministry of Public Education (DGISA), The Rockefeller Foundation (New York) and the Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction of the World Health Organization, Geneva.

## REFERENCES

1. Beyer C. and González-Mariscal G.: Effects of progesterone and natural progestins in brain. In *Hormones, Reproduction, Growth and Development* (Edited by A. Negro Vilar and G. Pérez-Palacios). Raven Press, New York (1991), pp. 199–208.
2. Maggi A. and Pérez J.: Role of female gonadal hormones in the CNS: Clinical and experimental aspects. *Life Sci.* 37 (1985) 893–897.
3. Feder H. H. and Marrone B. L.: Progesterone: its role in the central nervous system as a facilitator and inhibitor of sexual behavior and gonadotropin release. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 286 (1977) 331–354.
4. Orchinik M. and McEwen B. S.: Novel and classical actions of neuroactive steroids. *Neurotransmissions* 9 (1993) 1–6.
5. MacLusky N. J. and McEwen B. S.: Progesterone receptors in rat brain: Distribution and properties of cytoplasmic progesterone-binding sites. *Endocrinology* 106 (1980) 192–202.
6. Schumacher M., Corini H. and McEwen B. S.: Regulation of high-affinity GABA<sub>A</sub> receptors in the dorsal hippocampus by estradiol and progesterone. *Brain Res.* 487 (1989) 178–183.
7. Petiti N. and Eigen A. M.: Progesterone promotes rapid desensitization of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamus slices. *Neuroendocrinology* 55 (1992) 1–8.
8. MacLusky N. J. and McEwen B. S.: Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* 274 (1978) 276–278.
9. Bayliss D. A. and Milhorn D. E.: Chronic estrogen exposure maintains elevated levels of progesterone receptor mRNA in guinea pig hypothalamus. *Molec. Brain Res.* 10 (1991) 167–172.
10. Cerbón M. A., Martínez M. and Pérez-Palacios G.: Oestrogen-insensitive progesterone receptors in the central nervous system: Physicochemical and immunoreactive characteristics. *J. Neuroendocr.* 1 (1989) 292–298.
11. Blaustein J. D., Ryer H. I. and Feder H. H.: A sex difference in the progesterone receptor system of guinea pig brain. *Neuroendocrinology* 31 (1980) 403–409.
12. Bogie E., Gerlach J. L. and McEwen B. S.: The ontogeny of sex differences in estrogen-induced progesterone receptors in rat brain. *Endocrinology* 122 (1988) 2735–2741.
13. Shugrue P. J., Stumpf W. E., Elger W., Schulze P. E. and Sar M.: Progesterone receptor cells in the 8-day-old male and female mouse cerebral cortex: Autoradiographic evidence for a sexual dimorphism in target cell number. *Endocrinology* 128 (1991) 87–95.

14. Don Carlos L., Greene G. L. and Morrell J. I.: Estrogen plus progesterone increases progesterone receptor immunoreactivity in the brain of ovariectomized guinea pigs. *Neuroendocrinology* 50 (1989) 613-623.
15. Blaustein J. D. and Turcotte J. C.: Down-regulation of progesterone receptors in guinea pig brain: new findings using an immunocytochemical technique. *J. Neurobiol.* 21 (1990) 675-685.
16. Bethea C. L., Fahrenbach W. H., Sprangers S. A. and Fresh F.: Immunocytochemical localization of progesterone receptors in monkey hypothalamus: effect of estrogen and progesterone. *Endocrinology* 130 (1992) 895-905.
17. Hudson R., González-Mariscal G. and Beyer C.: Chin marking behavior, sexual receptivity, and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Horm. Behav.* 24 (1990) 1-13.
18. Kubli-Garfias C. and Whalen R. E.: Induction of lordosis behavior in female rats by intravenous administration of progestins. *Horm. Behav.* 9 (1977) 380-386.
19. Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
20. Sufi S. B., Donaldson A. and Jeffcoat S. L.: *Who Matched Reagent Programme Method Manual*. WHO, Geneva (1994) pp. 63-73.
21. Pérez-Palacios G., Cerbón M. A., Pasapera A. M., Castro J. I., Enríquez J., Vilchis F., García G. A., Morali G. and Lemus A. E.: Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 41 (1992) 479-485.
22. Shughrue P. J., Stumpf W. E., Elger W., Schulze P. E. and Sar M.: Progesterone receptor cells in mouse cerebral cortex during early postnatal development: a comparison with preoptic area and central hypothalamus using autoradiography with (<sup>125</sup>I) progesterone. *Devl. Brain Res.* 59 (1991) 143-155.
23. Thornton J. E., Nock B., Feder H. H. and McEwen B. S.: Sex differences in cytosolic progesterone receptors in microdissected regions of the hypothalamus/preoptic area of guinea pigs. *Brain Res.* 503 (1989) 253-257.
24. Pleim E. T., Brown T. J., MacLusky N. J., Etgen A. M. and Barfield R. J.: Dilute estradiol implants and progesterone receptor induction in the ventromedial nucleus of the hypothalamus: Correlation with receptor behavior in female rats. *Endocrinology* 124 (1989) 1807-1812.
25. Olster D. H. and Blaustein J. D.: Development of progesterone-facilitated lordosis in female guinea pigs: relationship to neural estrogen and progesterone receptors. *Brain Res.* 484 (1989) 168-176.
26. Blaustein J. D. and Feder H. H.: Nuclear progesterone receptors in guinea pig brain measured by an *in vitro* exchange assay after hormonal treatments that affect lordosis. *Endocrinology* 106 (1980) 1061-1069.
27. Savouret J. F., Bailly A., Misrahi M., Rauch C., Redeuilh G., Chauchereau A. and Milgrom E.: Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J* 10 (1991) 1875-1883.

PROGESTERONE RECEPTOR GENE EXPRESSION IS REGULATED BY OESTRADIOL  
AND PROGESTERONE IN THE HYPOTHALAMUS AND THE CEREBRAL CORTEX OF  
THE RABBIT.

I Camacho-Arroyo, A M Pasapera, G Pérez-Palacios and M A Cerbón.

Unidad de Biología Molecular Aplicada a la Salud Reproductiva,  
Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de  
la Nutrición Salvador Zubirán, Facultad de Estudios Superiores  
Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México.

Address all correspondence to:

Dr. Marco A. Cerbón  
Departamento de Biología de la Reproducción,  
Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán  
Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan  
México D. F. 14000, MEXICO.

Tel: (525) 573 11 60

fax: (525) 655 98 59

655 10 76

Short title: progesterone receptor gene regulation

## Abstract

We have studied the effects of oestradiol benzoate (OB) and progesterone ( $P_4$ ) upon progesterone receptor (PR) gene expression in the cerebral cortex, hypothalamus and uterus of the rabbit. Ovariectomized adult rabbits were submitted to s.c. administration of OB (25  $\mu$ g/kg) for two consecutive days, and OB (25  $\mu$ g/kg) + a single dose of  $P_4$  (5 mg/kg) on day three. Twenty four hours after the last dose, the cerebral cortex, hypothalamus and uterus were excised, total RNA was extracted and processed for reverse transcription-polymerase chain reaction. The amplification products were analyzed by Southern blot. The results showed that PR gene expression is induced by OB and down-regulated by  $P_4$ , both in the cerebral cortex and hypothalamus in a similar manner to the uterus. The surprising finding that PR is regulated by steroid hormones at the transcriptional level in the cerebral cortex suggest that posttranscriptional events are involved in the differential regulation of PR content previously reported by us and others in the hypothalamus and the cerebral cortex.

Key words: progesterone receptor gene; oestradiol; progesterone; hypothalamus; cerebral cortex; rabbit.



## Introduction

Two progesterone receptor (PR) populations have been described in the central nervous system (CNS) of mammals. One, located in the hypothalamus, is up-regulated by oestradiol and down-regulated by progesterone ( $P_4$ ); while the other is not regulated by steroid hormones and is located in the cerebral cortex (MacLusky & McEwen 1978, Cerbón et al. 1989, Blaustein et al. 1990, Camacho-Arroyo et al. 1994). The molecular mechanisms underlying this PR tissue-specific regulation in the CNS are unknown. In the present work we have evaluated whether the differential PR regulation by steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit is produced at the transcriptional level by amplifying PR mRNA signal. For this purpose we have used reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)-Southern blot analysis.

## Materials and Methods

### Animals and treatments

Nine adult female New Zealand White rabbits weighing 3.0-4.0 kg, maintained under a cycle of 12 h light:12 h darkness with food and water available ad libitum, were used in this study. All the animals were ovariectomized under ketamine anaesthesia (80 mg/kg), and two weeks later they were randomly assigned to the following subcutaneous treatments: (1) daily administration of oestradiol benzoate (OB) (25  $\mu$ g/kg) for 2 days; (2) the described administration of OB followed by  $P_4$  (5 mg/kg) on day 3, and (3) vehicle alone (corn oil). Twenty four hours after the last administration the animals were killed by an air injection in a lateral ear vein, and after decapitation the brain was quickly removed and the hypothalamus and the cerebral cortex were dissected on ice and immediately processed for total RNA extraction.



## Total RNA Extraction and Reverse Transcription

Total RNA was extracted from each tissue with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction (Chomczynski & Sacchi 1987) using Trizol reagent (Gibco-BRL, Inc, Gaithersburg, MD). The RNA concentration was determined by  $A_{260}$  measurement, and the RNA condition was observed by electrophoresis on 1.1% agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA. Briefly, 4  $\mu$ g of total RNA was incubated at 38°C for 60 min with 400 units of M-MLV reverse transcriptase (Gibco-BRL, Inc.) in 20  $\mu$ l reaction volume containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM  $MgCl_2$ , 10 mM DTT, 0.5 mM for each dNTP and 2.5  $\mu$ M oligo d-T (Gibco-BRL, Inc.).

## Oligonucleotide primers and PCR.

The sequences of the oligonucleotide primers for PR cDNA amplification by PCR were 5'-CGG GTC CAG CCA AAC CCC ACA CCC-3' in the sense primer and 5'-CCT GGA AGG GGC CAG GGT CCG GGC-3' in the antisense. The primer set flanked the rabbit PR cDNA sequence from -124 to +122 relative to the start site of translation (Misrahi et al 1988) which correspond to a part of the N-terminal PR domain, the most variable region in each member of the steroid hormone receptor family, and for this reason it is very specific for PR gene (Evans 1988, O'Malley 1993). The predicted size of the PR-PCR product was 246 bp. Ten  $\mu$ l of the cDNA were subjected to PCR in order to amplify a fragment of the PR gene, whereas the other ten  $\mu$ l of RT reaction were used to amplify a fragment of the cyclophilin gene (550 bp) which was used as a constitutive expression control (Haendler et al. 1987, Díaz-Sanchez et al. 1993). The 50  $\mu$ l PCR reaction included 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ M each dNTP, 2.5 units of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, CT, USA), and 0.5  $\mu$ M of

each primer. The PCR reaction was performed for 26 cycles. The cycling profile was 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; and 72°C, 1 min with the last phase of 72°C of the last cycle extended to 5 min.

### Southern Blot Analysis

Ten  $\mu$ l of the RT-PCR reaction products of each sample were separated by 2% agarose gel electrophoresis, denatured with 0.5 N NaOH + NaCl 1.5 M and neutralized with 1 M Tris (pH 7.4) + 1.5 M NaCl. The amplification products were then transferred to Gene Screen membranes (New England Nuclear Corp., Boston, USA) and hybridized to the probes [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP-PR and -cyclophilin which were labeled by the random primer method (Feinberg & Vogelstein, 1983). The PR cDNA probe was kindly provided by Professor E. Milgrom, Laboratoire des Hormones et Reproduction, Hôpital de Bicêtre, France, whereas cyclophilin probe was a PCR product obtained in our laboratory. Membranes were washed with 2X SSC at room temperature for 15 min (twice), followed by 0.1X SSC/0.1% SDS at 56°C for 45 min. The membranes were then exposed to Kodak X-AR film (Eastman Kodak Co., Rochester, USA) for 6 h at -70°C.

### Results

PR gene expression in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit was determined by RT-PCR. In all cases a single product of 246 bp corresponding to the expected fragment of the N-terminal PR domain was amplified. As it is shown in Fig 1, Southern blot analysis revealed that OB administration to ovariectomized rabbits increased PR gene expression both in the hypothalamus and the cerebral cortex, in a similar manner to the uterus, although the induction was much higher in the latter tissue as it is observed in the PR/cyclophilin ratio determined by the

densitometric analysis (Fig 2).

The administration of  $P_4$  after the OB priming resulted in a significant diminution of PR mRNA content in all the tissues (Fig 1). Indeed, PR gene expression in all tissues from the rabbits treated with  $P_4$ , was lower than that observed in the animals treated with vehicle (Fig 2).

## Discussion

This study demonstrates that PR gene expression is regulated by steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of adult female rabbits in a manner similar as in the uterus. In all tissues OB increased PR gene expression, whereas P<sub>4</sub> decreased it. PR gene expression was detected by RT-PCR, since in Northern blot analysis (data not shown) the PR mRNA signal from the cerebral cortex and hypothalamus was very low. RT-PCR technique was previously used to amplify PR mRNA from the cerebral cortex of neonatal rats (Hagihara et al. 1992), however the regulation of PR gene expression by steroid hormones was not investigated in that study.

Unexpectedly, we found that PR is regulated at the transcriptional level by OB and P<sub>4</sub> in the cerebral cortex of adult rabbits, suggesting that the insensitivity to steroid hormone regulation observed with binding techniques in this cerebral region (MacLusky & McEwen 1978, Camacho-Arroyo et al. 1994) should be mediated by some factors involved in PR posttranscriptional regulation.

In this way, the differential regulation of PR content previously reported by us and others in the hypothalamus and the cerebral cortex of rabbits and rodents (MacLusky & McEwen 1981, Camacho-Arroyo et al. 1994) could be due to tissue-specific factors that in the case of the hypothalamus maintain the steroid regulation of PR gene expression (Byliss DA & Millhorn DE 1991), whereas in the cortex they do not. Whether the differential PR regulation by sex steroid hormones occurs before or after translation requires further experiments.

At the moment, the possibility that the different results on PR regulation in the cerebral cortex obtained with binding and RT-PCR depend on the sensitivity of each technique and not on the

postranscriptional PR regulation can not be ruled out.

It is interesting to note that with the use of binding technique, Jung-Testas et al. in 1991 reported the presence of estrogen-inducible PR in primary cultures of newborn rat glial cells obtained from the cerebral hemispheres. The contribution of glial cells to the steroid regulation of PR gene expression in the cerebral cortex is unknown.

The fact that PR gene expression is regulated by OB and P<sub>4</sub> in a similar manner in both the CNS and the uterus suggest that the mechanism of regulation is the same i. e. through the interaction of the activated estrogen receptor and PR with the estrogen responsive element located in a 5' intragenic region of the rabbit PR gene (Savouret et al. 1991).

### **Acknowledgements**

The authors thank Professor E. Milgrom from the Laboratoire des Hormones et Reproduction, Hôpital de Bicêtre, France, for the generous supply of PR cDNA. We thank Ms. Juana Gonzáles for her technical assistance in the experiments.

This work was supported by the Programa Universitario de Investigación en Salud de la Universidad Nacional Autónoma de México, The Rockefeller Foundation (New York) and the Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction of the World Health Organization, Geneva.

## References

- Bayliss DA & Millhorn 1991 Chronic estrogen exposure maintains elevated levels of progesterone receptor mRNA in guinea pig hypothalamus. *Molecular Brain Research* **10** 167-172.
- Blaustein JD & Turcotte JC 1990 Down-regulation of progestin receptors in guinea pig brain: new findings using an immunocytochemical technique. *Journal of Neurobiology* **21** 675-685.
- Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM & Cerbón MA 1994 Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **50** 299-303.
- Cerbón MA, Martínez M & Pérez-Palacios G 1989 Oestrogen insensitive progestin receptors in the central nervous system: Physicochemical and immunoreactive characteristics. *Journal of Neuroendocrinology* **1** 292-298
- Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidin thiocyanate-phenol-chloroform extractions. *Analytical Biochemistry* **162** 156-159.
- Díaz-Sánchez V, Morimoto S, Morales A, Robles-Díaz G & Cerbón M 1995 Androgen receptor in the rat pancreas: genetic expression and steroid regulation. *Pancreas*. In press.
- Evans RM 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240** 889-895.

- Feinberg A & Vogelstein B 1983 A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **137** 6-13.
- Haendler L, Hofer-Warbinek R & Hofer E 1987 Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *EMBO Journal* **6** 947-950.
- Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M & Kato J 1992 Expression of progesterone receptor in the neonatal rat brain cortex: Detection of its mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **41** 637-640
- Jung-Testas I, Renoir JM, Gasc JM & Baulieu EE 1991 Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. *Experimental Cell Research* **193** 12-19.
- MacLusky NJ & McEwen BS 1978 Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* **274** 276-278.
- MacLusky NJ & McEwen BS 1980 Progestins receptors in rat brain: Distribution and properties of cytoplasmic progestin-binding sites. *Endocrinology* **106** 192-202.
- Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Mériel C, Zerah V, Dessen P & Milgrom E 1988 Organisation of the entire rabbit progesterone receptor mRNA and of promoter and 5' flanking region of the gene. *Nucleic Acids Research* **16** 5459-5472.
- O'Malley BW & Tsai MJ 1993 Overview of the steroid receptor superfamily of gene regulatory proteins. In: Parker MG, editor. *Steroid Hormone Action*. Oxford: Oxford University Press. 45-63.

Savouret JF, Bailly A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A & Milgrom E 1991 Characterization of hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor. *EMBO Journal* **10** 1875-1883.

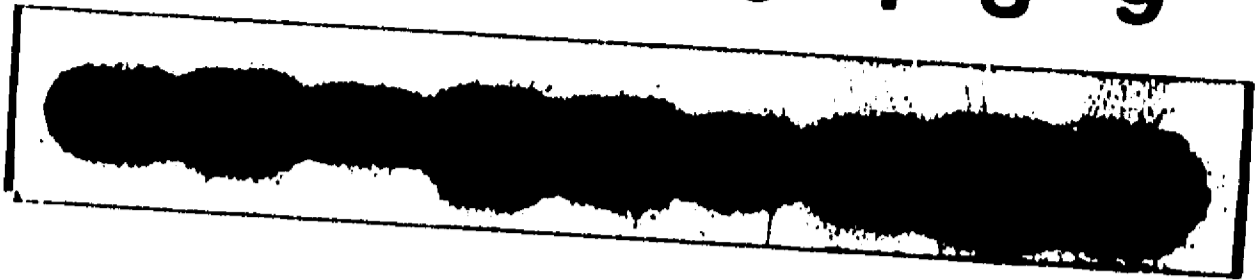


**Fig. 1. Southern blot analysis of RT-PCR products from the cerebral cortex, hypothalamus and uterus of ovariectomized adult rabbits.** PCR products (15  $\mu$ l) of progesterone receptor (PR) and cyclophilin (CP) cDNAs amplifications were fractionated on 2% agarose gels, denatured, neutralized and transferred to Gene-Screen membranes (See Materials and Methods). They were then hybridized with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-PR cDNA and a CP probes respectively. The membranes were exposed for 6 h using Kodak X-OMAT-AR film. Lanes 1, 2 and 3 correspond to the cerebral cortex of animals treated with vehicle (V), oestradiol benzoate (OB) and OB + progesterone ( $P_4$ ) respectively; Lanes 4, 5 and 6 correspond to the hypothalamus of the same animals; Lanes 7, 8 and 9 correspond to the uterus.

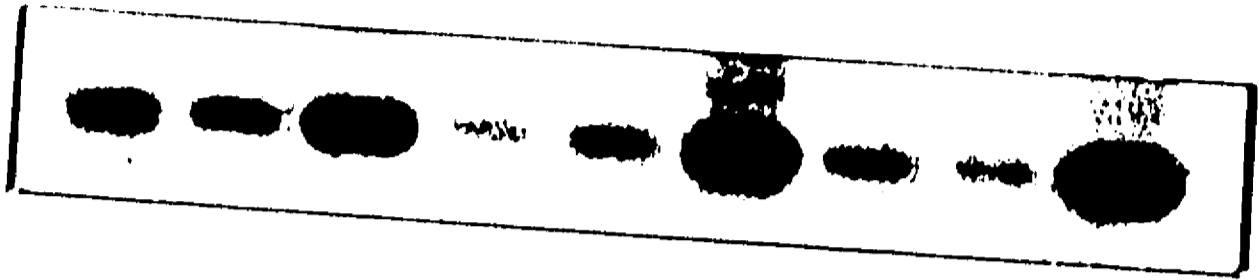
**Fig. 2. Densitometric analysis of PCR products of PR cDNA amplification.** The quantitation of PR gene expression was determined in relation to the constitutively expressed CP gene. PCR products of the amplification of both genes were analyzed by densitometry. CV, CO and CP correspond to the cerebral cortex of animals treated with V, OB and OB +  $P_4$  respectively; HV, HO and HP correspond to the hypothalamus of the same animals; UV, UO and UP are those from the uterus.

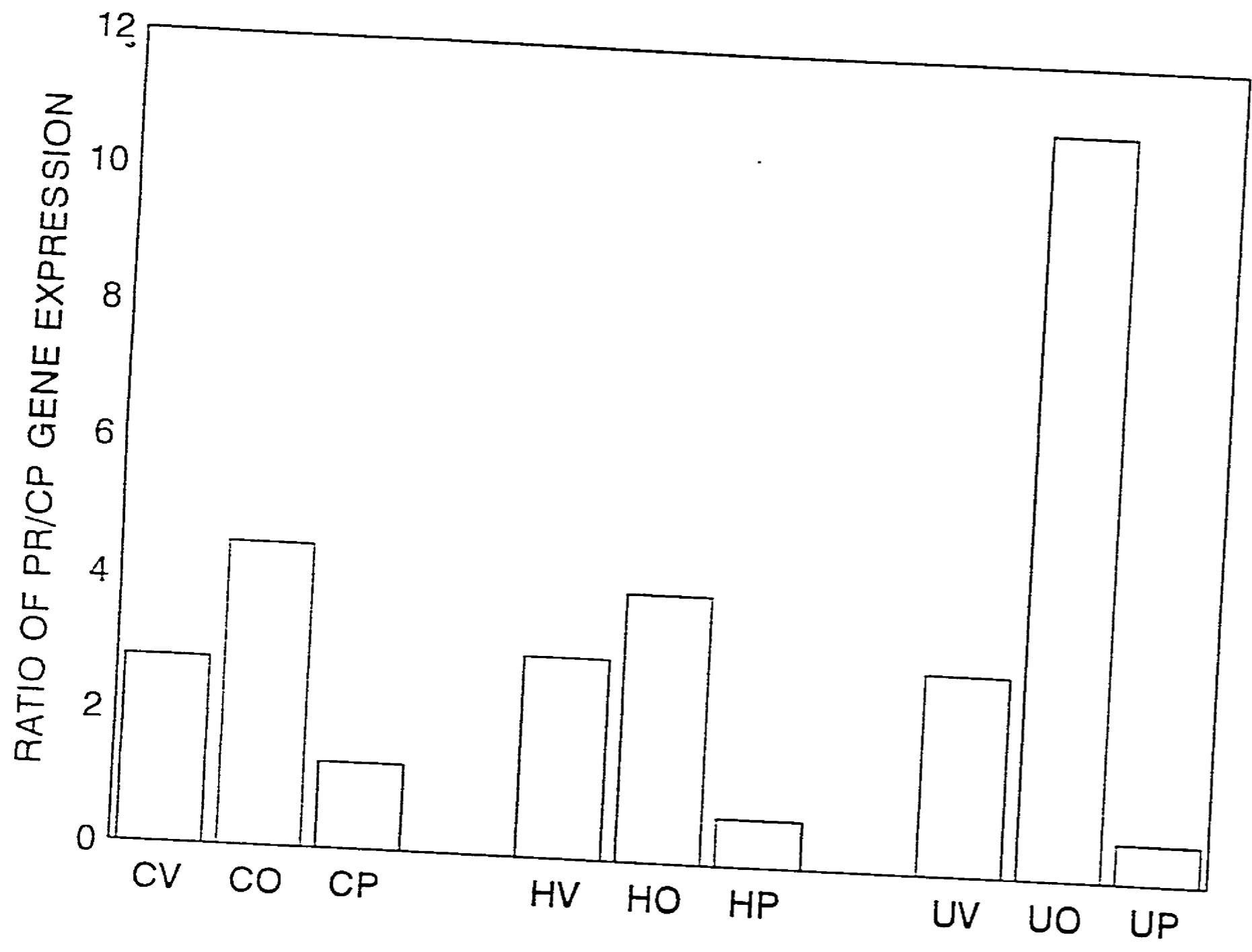
1 2 3 4 5 6 7 8 9

**PR**



**CP**





## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

### Datos de unión específica al receptor a progesterona.

Los resultados obtenidos en los experimentos de unión específica al receptor a progesterona en el hipotálamo y las regiones frontal, tempo-parietal y occipital de la corteza cerebral indican lo siguiente:

1) **La presencia de receptores a progesterona en el hipotálamo y la corteza cerebral de conejos adultos de ambos sexos y en hembras prepúberes.** El receptor a progesterona presente en el hipotálamo y la corteza cerebral del conejo tiene características de unión (un sitio de alta afinidad con una  $K_d=1.6$  nM) y especificidad similar a la informada anteriormente tanto en el sistema nervioso central de los roedores como en otros tejidos (2, 3).

Los datos anteriores permiten sugerir que el receptor a progesterona presente en los diferentes tejidos de los mamíferos es la misma macromolécula, lo cual se apoya también en informes que señalan que el receptor a progesterona expresado en el útero, el hipotálamo y la hipófisis de los roedores, regulado a la alta por estradiol, y el receptor a progesterona insensible a la regulación del estradiol expresado en la corteza cerebral y el cerebelo, comparten las mismas características fisicoquímicas e inmunológicas (2, 4).

2) **El receptor a progesterona está distribuido de una manera homogénea en las diferentes regiones de la corteza cerebral del conejo.** La mayoría de los estudios bioquímicos sobre el receptor a progesterona presente en la corteza cerebral fueron realizados en homogenados de la totalidad de esta estructura (4, 5); sin embargo, no existían datos sobre la distribución cortical de este receptor, lo cual es importante para la interpretación tanto del papel fisiológico de la progesterona como de la regulación del receptor

a progesterona, ya que estos aspectos podrían variar en las distintas regiones de la corteza cerebral.

En el presente trabajo se demostró que la concentración del receptor a progesterona en las regiones frontal, tempo-parietal y occipital de la corteza cerebral es similar en conejos adultos y prepúberes, y que la distribución del receptor a progesterona a nivel cortical es homogénea. Este hallazgo se observó también tanto en los machos adultos como en las hembras prepúberes y adultas, lo cual permite sugerir que el receptor a progesterona presente en esta estructura no es regulado por las hormonas esteroides sexuales, ya que a pesar de que los tres modelos estudiados presentan claras diferencias en las concentraciones de hormonas circulantes, éstas no influyeron al analizar la concentración del receptor a progesterona en la corteza cerebral.

**3) El receptor a progesterona es regulado de manera diferencial por el estradiol y la progesterona en el hipotálamo y en la corteza cerebral del conejo.** Los datos obtenidos en este estudio mostraron la insensibilidad del receptor a progesterona cortical a la regulación por hormonas esteroides, la cual fue más evidente en los experimentos realizados en conejas adultas ovariectomizadas, donde los tratamientos con el estradiol y la progesterona no modificaron la concentración del receptor a progesterona en la corteza cerebral, pero sí en el hipotálamo.

Los datos anteriores permiten sugerir que el receptor a progesterona presente en la corteza cerebral de la coneja adulta es independiente de la regulación por hormonas esteroides, lo que es consistente con lo informado anteriormente en roedores (4, 5). Hasta el momento no se conocen los factores involucrados en la insensibilidad del receptor a progesterona cortical a la regulación por hormonas esteroides. Entre las causas probables de tal insensibilidad se pueden considerar:

1. Los diversos factores de transcripción específicos de cada tejido que de manera diferencial modulan la expresión de genes regulada por hormonas esteroides (6, 7). (Esta posibilidad fue descartada en la segunda parte del trabajo de esta tesis, donde se demuestra que a nivel transcripcional el receptor a progesterona se regula por el estradiol y la progesterona tanto en la hipótlamo como en la corteza cerebral, por lo que es posible que la diferencia en la regulación del receptor a progesterona en el hipótlamo y la corteza cerebral ocurra a nivel postranscripcional).

2. La regulación del receptor a progesterona en la corteza cerebral por otras proteínas que no fueron estudiadas en el presente trabajo, como es el caso de la hormona gonadotropina coriónica y el factor de crecimiento parecido a la insulina, que en el ovario y en líneas celulares de cáncer mamario respectivamente, regulan la expresión del receptor a progesterona (8, 9).

3. La posibilidad de metilación del gen del receptor a progesterona, que en el caso de otros receptores a hormonas esteroides desempeña un papel importante en los mecanismos de regulación de la expresión génica específica en cada tejido (10, 11).

En el hipótlamo la concentración del receptor a progesterona en conejas adultas fue mayor que en machos adultos (1.5 veces) y que en hembras prepúberes (2.1 veces), lo que permite sugerir un dimorfismo sexual en una estructura donde la progesterona desempeña un papel fundamental en las hembras tanto en la regulación de los ciclos reproductivos, como en la conductas sexual y maternal (12, 13, 14).

Por otro lado, la mayor concentración del receptor a progesterona en hembras adultas en comparación con las prepúberes permite sugerir una regulación por el estradiol, cuya concentración

se incrementa de manera significativa después de la pubertad. En el caso de los roedores la mayor concentración del receptor a progesterona observado en las hembras adultas se ha correlacionado de una manera significativa con la inducción de la conducta sexual (15).

La regulación del receptor a progesterona por el estradiol en el hipotálamo se confirmó en los experimentos realizados en las conejas adultas ovariectomizadas y sustituidas con el estradiol donde se observó un incremento significativo en la concentración del receptor a progesterona después de la administración del estradiol. Este dato concuerda con lo observado en roedores mediante el uso de técnicas bioquímicas, inmunohistoquímicas y moleculares (5, 16, 17).

La concentración del receptor a progesterona en el útero es regulada a la alta por el estradiol mediante la interacción de su receptor, activado por el ligando (estradiol), con el elemento de respuesta a estrógenos situado en una región intragénica localizada hacia el extremo 5' del gen del receptor a progesterona (18). La regulación a la baja del receptor a progesterona por su ligando ocurre a nivel del mismo elemento de respuesta a estrógenos (1, 18).

La regulación a la alta del receptor a progesterona por el estradiol observada en el hipotálamo tanto de conejos (animales con ovulación refleja) como de distintas especies de roedores (animales con ovulación cíclica), permite sugerir que en los mamíferos el receptor a progesterona se regula de la misma manera, independientemente del tipo de ovulación y del efecto estimulador o inhibidor de la progesterona sobre la conducta sexual (19, 20).

A diferencia del papel inductor del estradiol sobre el receptor a progesterona, ampliamente reconocido en el hipotálamo de los roedores, la función de la progesterona sobre la regulación de

su propio receptor aún no se ha esclarecido, ya que distintos estudios han informado resultados completamente diferentes, al encontrarse que la progesterona puede disminuir, incrementar o incluso no tener efectos sobre la concentración de su receptor (16, 21, 22).

En el presente estudio se observó que en el hipotálamo, la progesterona regula a la baja el incremento en la concentración del receptor a progesterona inducido por el estradiol, como sucede en el útero (1). La dosis de progesterona capaz de disminuir la concentración de su receptor (1.0 mg) no modificó significativamente la concentración en suero de la progesterona en comparación con la determinada en las conejas ovariectomizadas y tratadas con el vehículo.

Un hallazgo interesante fue el hecho de que la progesterona reguló a la baja la concentración de su receptor que previamente había sido aumentada por el tratamiento con el estradiol, pero no la que se expresa de manera constitutiva en el hipotálamo, ya que la administración de progesterona en conejas ovariectomizadas sin tratamiento previo con estradiol no tuvo efectos sobre la concentración basal del receptor a progesterona.

Este resultado permite sugerir la presencia de dos poblaciones del receptor a progesterona en el hipotálamo del conejo, una de ellas se expresa constitutivamente y es insensible a la regulación por hormonas esteroideas, mientras que la otra es regulada por estas hormonas y se expresa sólo en condiciones fisiológicas en las que hay un aumento significativo en la concentración del estradiol.

La relación descrita anteriormente se ha observado en el período preovulatorio, después de la cópula, y durante los primeros tres días de la gestación, donde hay un aumento significativo en la expresión del gen del receptor a progesterona en el útero de la coneja (23).



Estos datos permiten sugerir que la población del receptor a progesterona presente en la corteza cerebral es similar a la que se expresa de manera constitutiva en el hipotálamo, ya que ambas poblaciones son insensibles a la regulación por la progesterona. Hasta el momento se desconoce tanto el papel fisiológico de esa población del receptor a progesterona, como los mecanismos involucrados en su regulación.

Datos sobre la expresión del gen que codifica para el receptor a progesterona en el hipotálamo y en la corteza cerebral.

Después de haber realizado los experimentos de unión específica del receptor a progesterona, el siguiente objetivo fue conocer si la regulación diferencial del receptor en la corteza cerebral y en el hipotálamo ocurre a nivel transcripcional, ya que se tienen diversos informes que indican que la regulación del receptor a progesterona por el estradiol es a ese nivel (6, 18).

Por tal motivo en esta serie de experimentos se utilizaron conejas adultas que fueron ovariectomizadas y tratadas con el estradiol, estradiol + progesterona y el vehículo. Es importante mencionar que como testigo positivo de expresión se utilizó el útero de las conejas sometidas a los tratamientos antes mencionados, en donde la regulación del gen del receptor a progesterona por el estradiol y la progesterona está bien documentada (1, 23).

En un principio se analizó el contenido del ARNm del receptor a progesterona en la corteza cerebral, en el hipotálamo y en el útero mediante la técnica de Northern blot, con el uso del ADNc del receptor a progesterona del conejo como sonda; sin embargo, a excepción del útero en donde la expresión del gen del receptor a progesterona es muy alta, ni en la corteza cerebral ni en el

hipotálamo se obtuvo una señal adecuada del ARNm del receptor a progesterona que pudiera ser analizada, a pesar de que en varios experimentos se incrementó la concentración de ARN total.

Por los motivos anteriores se decidió utilizar la combinación de dos técnicas que son más sensibles para el análisis de la expresión génica, como es el caso de la transcripción reversa del ARN extraído de los diferentes tejidos, seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), para lo cual se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos (utilizados como iniciadores para la reacción de PCR) de la región amino terminal del receptor a progesterona que es la más variable entre los receptores a hormonas esteroides y por lo tanto es la más específica para cada uno de ellos (24).

Este es el primer estudio sobre amplificación del gen del receptor a progesterona obtenido a partir de tejido cerebral de un mamífero adulto, ya que el único trabajo publicado hasta el momento fue realizado en ratas recién nacidas y con el uso de oligonucleótidos correspondientes a la región carboxilo terminal, que es la región más conservada entre la familia de los receptores a hormonas esteroides, y por lo tanto de menor especificidad para el receptor a progesterona (25).

Los productos amplificados por PCR que se obtuvieron en este estudio fueron analizados posteriormente por "Southern blot" y densitometría, utilizando como testigo de expresión constitutiva al gen de la ciclofilina. Los resultados de estos experimentos demostraron que a diferencia de lo observado en los experimentos de unión al receptor a progesterona, tanto en la corteza cerebral como en el hipotálamo, el gen del receptor a progesterona es regulado a la alta por el estradiol y a la baja por la progesterona, lo que aparentemente se contrapone con los resultados encontrados tanto por nosotros como por otros grupos (5, 26). Cabe mencionar que en cultivos de células gliales obtenidas de la corteza cerebral de

ratas recién nacidas se ha observado la regulación del receptor a progesterona por el estradiol (27). Hasta el momento se desconoce el porcentaje de células gliales y neuronas que poseen receptores a progesterona en las distintas estructuras cerebrales.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten sugerir que la regulación diferencial del receptor a progesterona en el hipotálamo y en la corteza cerebral ocurre a nivel postranscripcional de manera tejido-específica ya que el contenido del ARNm del receptor a progesterona se modifica de la misma manera en ambas estructuras por las hormonas esteroides, mientras que cuando se analiza la unión específica del receptor a progesterona se observa que éste se regula por el estradiol y la progesterona en el hipotálamo, más no en la corteza cerebral (5, 26).

La regulación postranscripcional y postraducciona del receptor a progesterona, puede ocurrir a nivel de la vida media del ARNm y del mismo receptor así como el tiempo de estancia de la proteína en el núcleo o en el citoplasma y el recambio del receptor a progesterona (28). Hasta el momento se desconocen tanto los factores como los mecanismos involucrados en la modulación postranscripcional del receptor a progesterona en el sistema nervioso central.

Aunque a nivel postraducciona una de las modificaciones mejor descritas en el receptor a progesterona es la fosforilación (29, 30), su función se ha asociado principalmente con la capacidad del receptor a progesterona de activar distintos genes, sin conocerse hasta el momento el papel de la fosforilación en la regulación del propio receptor (31, 32).

En conclusión los resultados del presente trabajo señalan:

- a) La presencia de receptores a progesterona intracelulares en la corteza cerebral del conejo, con características de especificidad y de unión similares a las informadas anteriormente en otros tejidos.
- b) Una regulación diferencial de la concentración del receptor a progesterona mediada por el estradiol y la progesterona en la corteza cerebral y el hipotálamo del conejo. En el hipotálamo, el estradiol regula a la alta el receptor a progesterona, mientras que la progesterona lo hace a la baja, sin tener ninguna de estas hormonas efectos en la corteza cerebral.
- c) La regulación diferencial en el contenido del receptor a progesterona observada en el hipotálamo y en la corteza cerebral probablemente ocurre a nivel postranscripcional ya que la transcripción del gen del receptor a progesterona en ambas estructuras, al igual que en el caso del útero, es regulada de la misma manera: a la alta por el estradiol y a la baja por la progesterona.

## PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO.

Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan información básica tanto de las características del receptor a progesterona presente en el hipotálamo y en la corteza cerebral del conejo como de la participación del estradiol y la progesterona en su regulación. Los resultados obtenidos en los experimentos sobre la expresión del gen del receptor a progesterona proporcionan las bases para estudiar diversos aspectos de los eventos transcripcionales y postranscripcionales que llevan en última instancia a la síntesis de un receptor a progesterona con capacidad tanto de unir a su ligando y al ADN, como de regular la expresión de distintos genes.

Sobre la regulación transcripcional del receptor a progesterona en el sistema nervioso central, falta por conocerse desde el efecto de antagonistas tanto del receptor a estrógenos (ICI 384) como del receptor a progesterona (RU 486) sobre este proceso, hasta los distintos factores de transcripción involucrados en la regulación del receptor a progesterona.

Aunque la mayoría de los metabolitos de la progesterona actúan a nivel membranal, hasta el momento se desconoce el papel de estos esteroides en la regulación del receptor a progesterona. Recientemente se ha informado que algunos metabolitos reducidos de la progesterona pueden interactuar con el receptor a progesterona en líneas celulares de neuroblastoma humano e incluso modificar la expresión de genes que presentan el elemento de respuesta al receptor a progesterona (33).

Un punto que será clave en el estudio del receptor a progesterona es el dilucidar si la regulación diferencial del receptor por hormonas esteroides en la corteza cerebral y en el hipotálamo ocurre a nivel postranscripcional (procesamiento y estabilidad del ARNm) o postraduccionales (recambio de la proteína,

fosforilación). En este sentido es fundamental realizar experimentos de "Run on-Run off" en los que se pueda conocer la estabilidad del ARNm en la corteza cerebral y en el hipotálamo (34) y análisis por "Western blot" en los que se pueda determinar la presencia del receptor a progesterona sintetizado en las distintas estructuras cerebrales independientemente de la capacidad del receptor de unir a la progesterona (35).

A partir del presente trabajo se pueden derivar estudios en los que se trate de conocer el papel que tienen las modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, en la regulación de la expresión del receptor a progesterona en el sistema nervioso central.

Los mecanismos de regulación de la población del receptor a progesterona de expresión constitutiva encontrada en el hipotálamo (insensible a la regulación por la progesterona) así como su papel fisiológico son otros de los aspectos a estudiar. En roedores se han reconocido varios núcleos hipotalámicos que contienen receptores a progesterona insensibles a la regulación por hormonas esteroides (36). En estos casos los mecanismos de regulación del receptor a progesterona son desconocidos.

El estudio sobre la regulación del receptor a progesterona en el sistema nervioso central del conejo realizado en esta tesis es fundamental para la comprensión de distintas conductas de esta especie moduladas positiva y negativamente por la progesterona como son las conductas maternal y sexual respectivamente (14, 20). Aunque se conocen los cambios en la concentración de la progesterona asociados a la presentación e inhibición de las conductas mencionadas anteriormente, se desconoce la manera en cómo se regula el receptor a progesterona en dichas conductas, así como los genes regulados por este receptor, por lo que el estudio de la participación del receptor a progesterona en la presentación e inhibición de las conductas maternal y sexual es básico para el

entendimiento de los mecanismos involucrados en el despliegue de las mismas.

Uno de los aspectos fundamentales a estudiar en este campo consiste en conocer el papel fisiológico del receptor a progesterona en las diferentes regiones de la corteza cerebral en los organismos adultos. En el laboratorio se tienen datos preliminares que permiten sugerir que la activación del receptor a progesterona en la corteza cerebral del conejo puede modificar la expresión de genes tempranos que funcionan como factores de transcripción de un gran número de genes, tal es el caso de c-fos, cuya expresión en la corteza cerebral se modifica 2 horas después de la administración de la progesterona. Estos datos permiten sugerir que el receptor a progesterona podría participar como un activador de la transcripción de distintos genes en la corteza cerebral (37).

En investigación clínica los hallazgos sobre la regulación del receptor a progesterona en el sistema nervioso central tienen cada vez más repercusiones debido a que por un lado diversos fármacos utilizados en anticoncepción en el ser humano interactúan con el receptor a progesterona, siendo aún desconocidos sus efectos en el sistema nervioso central, y por otro lado se han reconocido varios tumores cerebrales cuyo crecimiento puede ser disminuido con el uso de antagonistas del receptor a progesterona (38, 39).

Por lo señalado anteriormente, el trabajo realizado en esta tesis además de aportar información sobre la regulación de un receptor a hormonas esteroides que participa en diversas funciones del sistema nervioso central, permite diseñar diversos estudios sobre el mismo tanto a nivel básico como clínico.

## LITERATURA CITADA EN LA TESIS

1. Kraus WL and Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology*. (1993) 132: 2371-2379.
2. MacLusky NJ and McEwen B. S. Progestins receptors in rat brain: Distribution and properties of cytoplasmic progestin-binding sites. *Endocrinology*. (1980) 106: 192-202.
3. Pérez-Palacios G, Cerbón MA, Pasapera AM, Castro JI, Enríquez J, Vilchis F, García GA, Moralí G and Lemus AE. Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* (1992) 41: 479-485.
4. Cerbón MA, Martínez M and Pérez-Palacios G. Oestrogen-insensitive progestin receptors in the central nervous system: Physicochemical and immunoreactive characteristics. *J. Neuroendocrinol.* (1989) 1: 292-298.
5. MacLusky NJ and McEwen BS. Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature*. (1978) 274: 276-278.
6. Gronemeyer H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu. Rev. Genet.* (1991) 25: 89-123.
7. Truss M and Beato M. Steroid hormone receptors: Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Rev.* (1993) 14: 459-479.



8. Park OK and Mayo KE. Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology*. (1994) 134: 709-718.
9. Cho H, Aronica SM and Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor gene expression in MCF-7 breast cancer cells: A comparison of the effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, estradiol, insuline-like growth factor-I, and serum factors. *Endocrinology*. (1994) 134: 658-664.
10. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB and Davidson NE. Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res*. (1994) 54: 2552-2555.
11. Christophe D and Pichon B. DNA methylation and gene activity: towards the end of the debate? *Mol. Cell Endocrinol*. (1994) 100: 155-158.
12. Feder HH and Marrone EL. Progesterone: its role in the central nervous system as a facilitator and inhibitor of sexual behavior and gonadotropin release. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. (1977) 286: 331-354.
13. Brown TJ, Moore MJ and Blaustein JD. Maintenance of progesterone-facilitated sexual behavior in female rats requires continued hypothalamic protein synthesis and nuclear progestin receptor occupation. *Endocrinology*. (1987) 121: 298-304.
14. González-Mariscal G, Díaz-Sánchez V, Melo AI, Beyer C and Rosenblatt JS. Maternal behavior in New Zealand white rabbits: quantification of somatic events, motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiol Behav*. (1994) 55: 1081-1089.

15. Olster DH and Blaustein JD. Development of progesterone-facilitated lordosis in female guinea pigs: relationship to neural estrogen and progestin receptors. *Brain Res.* (1989) 484: 168-176.
16. Blaustein JD and Turcotte JC. Down-regulation of progestin receptors in guinea pig brain: new findings using an immunocytochemical technique. *J. Neurobiol.* (1990) 21: 675-685.
17. Bayliss DA and Milhorn DE. Chronic estrogen exposure maintains elevated levels of progesterone receptor mRNA in guinea pig hypothalamus. *Mol. Brain Res.* (1991) 10: 167-172.
18. Savouret JF, Bailly A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A and Milgrom E. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J.* (1991) 10: 1875-1883.
19. Pleim ET, Brown TJ, MacLusky NJ, Etgen AM and Barfield RJ. Dilute estradiol implants and progesterone receptor induction in the ventromedial nucleus of the hypothalamus: Correlation with receptive behavior in female rats. *Endocrinology.* (1989) 124: 1807-1812.
20. Hudson R, González-Mariscal G and Beyer C. Chin marking behavior, sexual receptivity, and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Horm. Behav.* (1990) 24: 1-13.
21. Don Carlos L, Greene GL and Morrell JI. Estrogen plus progesterone increases progestin receptor immunoreactivity in the brain of ovariectomized guinea pigs. *Neuroendocrinology.* (1989) 50: 613-623.

22. Bethea CL, Fahrenbach WH, Sprangers SA and Freesh F. Immunocytochemical localization of progestin receptors in monkey hypothalamus: effect of estrogen and progestin. *Endocrinology*. (1992) 130: 895-905.
23. Gutierrez-Sagal R, Pérez-Palacios G, Langley E, Pasatera AM, Castro I and Cerbón MA. Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. *Mol. Reprod. Dev.* (1993) 34: 244-249.
24. O'Malley BW and Tsai MJ. Overview of the steroid receptor superfamily of gene regulatory proteins. In: Parker MG, editor. *Steroid Hormone Action*. Oxford: Oxford University Press. (1993): 45-63.
25. Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M and Kato J. Expression of progesterone receptor in the neonatal rat brain cortex: Detection of its mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* (1992) 41: 637-640
26. Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM and Cerbón MA. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* (1994) 50: 299-303.
27. Jung-Testas I, Renoir JM, Gasc JM and Baulieu EE. Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. *Exp. Cell Res.* (1991) 193: 12-19.
28. Savouret JF, Misrahi M and Milgrom E. Molecular action of progesterone. *Int. J. Biochem.* (1990). 22: 579-594.

29. Ghosh-Dastidar P, Coty WA, Griest RE, Woo DL and Fox CF. Progesterone receptor subunits are high-affinity substrates for phosphorylation by epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1984) 81: 1654-1658.
30. Poletti A and Weigel NL. Identification of a hormone-dependent phosphorylation site adjacent to the DNA-binding domain of the chicken progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* (1993) 7: 241-246.
31. Zazmi SM, Visconti V, Plante RK, Ishaque A and Lau C. Differential regulation of human progesterone receptor A and B form-mediated transactivation by phosphorylation. *Endocrinology.* (1993) 133: 1230-1238.
32. Bagchi MK, Tsai SY, Tsai MJ and O'Malley BW. Ligand and DNA-dependent phosphorylation of human progesterone receptor in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1992) 89: 2664-2668.
33. Rupprecht R, Reul JM, Trapp T, van Steensel B, Wetzel C, Damm K, Ziegler W and Holsboer F. Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroid. *Neuron.* (1993) 11: 523-30.
34. Kaplan JC and Delpech M. *Biologie Moléculaire et Médecine.* (1993): 790 pp. Flammarion Co.
35. Pasapera AM, Cerbón MA, Castro I, Gutierrez R, Camacho-Arroyo I, García GA and Pérez-Palacios G. Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. *Biol. Rep.* (1995) 52: 426-432.

36. Thornton JE, Nock B, McEwen BS and Feder HH. Estrogen induction of progestin receptors in microdissected hypothalamic and limbic nuclei of female guinea pigs. *Neuroendocrinology*. (1986) 43: 182-188.
37. Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G y Cerbón MA. El estradiol y la progesterona inducen cambios en la expresión de c-fos en el hipotálamo y la corteza cerebral del conejo. *XXXIII Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología*. (1993): 21.
38. Carroll RS, Glowacka D, Dashner K and Black PM. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res*. (1993) 53: 1312-1316.
39. Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, Ahmadi J, Sandun A, Russell CA, Lucci L and Stevenson LL. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestosterone agent mifepristone. *J. Neurosurg*. (1991) 74: 861-866.

**LISTA DE PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA TESIS EN LAS QUE HA PARTICIPADO EL AUTOR**

1. **Camacho-Arroyo I**, Pasapera AM, Pérez-Palacios G y Cerbón MA. Participación de la progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del sistema nervioso central. **Rev. Inv. Clin.** (1995). En prensa.
2. **Camacho-Arroyo I**, Pérez-Palacios G, Pasapera AM and Cerbón MA. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.** (1994) 50 (5-6): 299-303.
3. **Camacho-Arroyo I**, Pasapera AM, Pérez-Palacios G and Cerbón MA. Progesterone receptor gene expression is regulated by estradiol and progesterone in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. (1995) En preparación para ser enviado a **J. Endocr.**
4. **Camacho-Arroyo I**, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G and Cerbón MA. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. **J. Endocrinol.** (1994) 142: 311-316.
5. Pasapera AM, Cerbón MA, Castro I, Gutierrez R, **Camacho-Arroyo I**, García GA and Pérez-Palacios G. Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. **Biol. Rep.** (1995) 52: 426-432.
6. Castro I, Cerbón MA, Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, Orozco C, García GA, **Camacho-Arroyo I**, Anzaldúa R and Pérez-Palacios G. Molecular mechanisms of the anti-hormonal and anti-implantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. **Mol. Reprod. Develop.** (1995) En prensa.
7. Hernández-Hernández F, De Bievre C, **Camacho-Arroyo I**, Cerbón MA, Dupont B and López-Martínez R. Sex hormone effects on *Phialophora verrucosa*'s in vitro growth and characterization of progesterone receptors. **J. Med. Veter. Mycol.** (1995) En prensa.