

223



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"REGULACION DE LA EXPRESION DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR A PROGESTERONA A NIVEL DE LA PROTEINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA."

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

OLGA VILLAMAR CRUZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



FACULTAD DE CIENCIAS MEXICO, D.F. UNAM

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

MAYO 2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias

Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Regulación de la expresión de las isoformas del receptor a progesterona a nivel de la proteína en el sistema nervioso central de la rata".

realizado por Olga Villamar Cruz

con número de cuenta 8832389-5, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Propietario Dr. Christian Humberto Guerra Araiza

Propietario M.en C. Aliesha Araceli González Arenas

Suplente M.en C. Gabriela González Agüero

Suplente Biol. Marcela Andrea Reyna Neyra

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

**Este trabajo se realizó en el departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo y con el apoyo de la beca otorgada por CONACyT con el proyecto 35025-N, y del subprograma 127 "Formación Básica en Investigación" otorgado por la Facultad de Química.**

Dedicatorias y agradecimientos a:

Dios, por permitirme estar en este planeta y darme todo lo que tengo.

- \* MARIA FERNANDA a quien le debo toda la felicidad de la vida, por ser la luz de todos los días, por su sonrisa, por ser mi amiguita preferida, por ser mi TODO.
- \* Mi familia, por ser el apoyo incondicional de todos contra todos y por demostrar que ahí hay canela fina...
- \* Mi mamá que es más que eso, eres mi otro todo. por darme la vida, por estar siempre cuando me río, cuando me enojo, cuando lloro, y por la comida tan buena que haces, GRACIAS.
- \* A mi papá Juanelo, por aportar la otra mitad de mi existencia, por su apoyo, sus correctivos y sobre todo por su cariño: GRACIAS.
- \* Mis abuelos Micaela y Nacho, por enseñarnos que la unión hace la fuerza y que lo más valioso en esta vida es eso, la vida y nuestra familia.
  - \* Al colectivo Villamar Cruz, a los 5 integrantes (y anexos): Nacho (y Lucía), Vicky (y Carlitos), Gabis (y Lorena), Claudia (Paola, Arturo y "Emiliano") y Edgard (y la Kikis), sobre todo a Edgard, por escucharme, por regañarme, por esas tardes-noches zapatistas y no zapatistas, por salir de todas esas broncas y por lo que nos falta...
- \* Mi queridísima tía Angy, que tanto me ha ayudado, en todos los sentidos, no se que habría hecho sin su apoyo...
  - \* Todos mis sobrinos, en especial a Paola, Carlitos y "Emiliano" que apenas ahí viene.
- \* Luis, por ser mi complemento en la vida, por su paciencia, su fortaleza, por compartir todo, por enseñarme que todavía se puede creer y a tener fé, y principalmente por su amor... Luisito: Gracias.
  - \* Las personas muy queridas que ya no están con nosotros, especialmente a mi abuelita Maqui, que era toda dulzura...
  - \* A todos mis amigos de la P5, a mi comadre Brenda, a Maricarmen, a Bere, a los camaradas de la Facultad de Ciencias, a TODOS (para no omitir a nadie), a mis profes (los buenos y los no tan buenos) de todos se aprende.
- \* Todas las personas que todavía creen que el mundo puede cambiar (para bien), a las que creen que sin justicia no habrá paz, a las que no se venden ni se deslumbran ante el poder, a quienes tienen dignidad y creen en la verdad. Al EZLN, a la banda honesta del CGH.

## AGRADECIMIENTOS

**Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo:**

Por darme la oportunidad de participar en este proyecto, por todo el apoyo recibido, por convencerme de hacer ciencia (¡verdadera ciencia!).

**A la M. en C. (casi Dra.) Aliesha González Arenas:**

Por enseñarme a trabajar con tanta paciencia y empeño, por su confianza y amistad, por tantos días y tardes de trabajo, por la atinada revisión de esta tesis, en fin, por todo: GRACIAS.

**Al Dr. Christian Guerra Aralza:**

Por compartir sus conocimientos tanto académicos como experimentales, por ser un buen amigo, por todas esas sesiones maratónicas de cirugía y matazón, por su disposición para la revisión de este trabajo y sobre todo por esos grandes falsetes...

**A la M. en C. Gabriela González Agüero:**

Por sus colaboraciones para la realización de este proyecto, por sus comentarios en la revisión de este trabajo, por su confianza, por esos jalones de orejas mutuos y sobre todo por ser una buena amiga.

**A la casi Dra. Andrea Reyna Neyra:**

Por esa actitud siempre tan crítica y a la vez tan amable, por ayudarme y resolver dudas siempre que las necesité, por las oportunas correcciones de este trabajo y también por ser una buena amiga.

A todo el personal del laboratorio 202, a Angélica y a Tere por colaborar en todo momento; a Mauricio y a Luciano por compartir esos gustos musicales que a más de uno les borra la sonrisa de la boca, y por esas tardes que soleadas o no hacía mucha sed; y a toda la gente del labo que en algún momento colaboró o compartió algo que ayudó a la realización de este trabajo.

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR  
A PROGESTERONA A NIVEL DE LA PROTEÍNA EN EL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA**

**INDICE**

<b>1. Resumen.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Antecedentes</b>	
3.1 Estructura y función de las hormonas esteroides	
3.1.1 Generalidades.....	6
3.1.2 La progesterona.....	8
3.2 El receptor a progesterona (RP)	
3.2.1 Características principales del RP.....	14
3.2.2 Isoformas del RP.....	19
3.2.3 Regulación de la expresión de las isoformas del RP.....	23
<b>4. Planteamiento del problema.....</b>	<b>26</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>27</b>
<b>6. Objetivos.....</b>	<b>28</b>
<b>7. Materiales y Métodos</b>	
7.1 Animales de experimentación.....	29
7.2 Preparación de las hormonas.....	29
7.3 Tratamientos.....	29
7.4 Obtención de las diferentes regiones cerebrales.....	30
7.5 Extracción de proteínas totales.....	30
7.6 Western Blot.....	30
7.7 Análisis de resultados.....	32
<b>8. Resultados.....</b>	<b>34</b>
<b>9. Discusión.....</b>	<b>42</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>47</b>
<b>11. Referencias.....</b>	<b>48</b>
<b>12. Apéndice .....</b>	<b>57</b>

## 1. RESUMEN

En el Sistema Nervioso Central (SNC), la progesterona ( $P_4$ ) regula diversas funciones a través de su interacción con su receptor nuclear (RP). Se han descrito dos isoformas del RP en la rata, sin embargo se desconoce su distribución y regulación por hormonas esteroides en el SNC, por lo que en este trabajo se estudió la expresión a nivel de la proteína de las isoformas A y B del RP en el SNC de ratas hembras ovariectomizadas, tratadas con estradiol (E2) y  $P_4$  mediante la técnica de Western blot.

Los datos obtenidos muestran que en el hipotálamo a nivel de la proteína no hay cambios en la expresión de las isoformas del RP al administrar E2 o  $P_4$ , ni hubo predominio de alguna de las isoformas. En el área preóptica hubo una inducción en la expresión de ambas isoformas al administrar E2 que se mantuvo después de la administración de  $P_4$ . No hubo predominio en la expresión de alguna de las isoformas; para el caso del hipocampo, se observó una regulación negativa al administrar  $P_4$  de 12 a 48 horas en la isoforma A y en la isoforma B a las 6 y a las 12 horas; mientras que no se presentaron diferencias al administrar E2 en ambas isoformas; de manera interesante, se observó en este tejido que solamente a las 24 y 48 horas después del tratamiento con  $P_4$  predominó la isoforma B. La corteza cerebral presentó un patrón diferente de expresión, ya que sólo la isoforma A se reguló positivamente con los dos tratamientos hormonales, excepto a las 3 horas después de haber administrado  $P_4$ , donde se reguló negativamente, mientras que la isoforma B no mostró diferencias en su expresión con ninguno de los tratamientos, salvo a las 24 horas después del tratamiento con  $P_4$  donde se reguló negativamente.

Los datos obtenidos sugieren que existe una regulación diferencial de la expresión de las isoformas del RP a nivel de la proteína dependiente de las hormonas esteroideas en el cerebro de la rata. Esta regulación depende también del tejido y del estado hormonal del animal.

## 2. INTRODUCCIÓN

La progesterona ( $P_4$ ) participa en la regulación de diversas funciones en el cerebro de los mamíferos, entre las que se encuentran la reproducción, el despliegue de conducta sexual, la excitabilidad neuronal (Camacho-Arroyo, 1995) y la protección al daño neuronal (Stein, 2001). Uno de los mecanismos por los cuales la  $P_4$  ejerce sus efectos en el Sistema Nervioso Central (SNC) es a través de su interacción con receptores específicos a  $P_4$  (RP) (Evans, 1988). En roedores (Ilechuk, 1987), en aves (Kuhn, 1977) y en primates (Lessey, 1983) se han descrito dos isoformas del RP denominadas RP-A y RP-B. La diferencia entre estas está dada por 164 aminoácidos de la región amino-terminal de RP-B que están ausentes en RP-A (Krauss, 1993). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por distintos promotores que son regulados por estradiol (E2) (Krauss, 1993 y Kastner, 1990). RP-B actúa como un fuerte activador transcripcional en diferentes contextos celulares, mientras que RP-A funciona como un inhibidor de la transcripción inducida por RP-B, por lo que la actividad de la  $P_4$  depende de la tasa de expresión de las isoformas del RP en las diferentes regiones cerebrales. El contenido de las isoformas, así como su regulación por hormonas esteroides se presenta de manera tejido-específica (Ilechuk, 1987, Graham, 1996).

Existen datos que demuestran que a nivel del RNAm las isoformas del RP se regulan diferencialmente en el cerebro de la rata (Guerra-Araiza, 2001).

Sin embargo se desconoce la regulación del contenido de las isoformas del RP a nivel de la proteína, por lo que en este trabajo se estudió dicha regulación en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza cerebral de la rata

después de la administración de E2 y P<sub>4</sub> mediante la técnica de Western blot. También se determinó si alguna de las isoformas del RP se expresa predominantemente en las regiones cerebrales estudiadas y si existe relación entre la expresión de dichas isoformas a nivel del RNAm (Guerra-Araiza, 2001) y a nivel de la proteína.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Estructura y función de las Hormonas Esteroides.

##### 3.1.1 Generalidades.

Las hormonas esteroides son lípidos no saponificables hidrofóbicos, solubles en disolventes orgánicos y que estructuralmente presentan en común como núcleo químico básico, el ciclo pentanoperhidrofenantreno (hidrocarburo cíclico constituido por diecisiete átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono y un anillo de cinco átomos de carbono) (Knobil y Neill, 1988). El término "esteroide" se deriva de la palabra griega *estéreos* = sólido; la mayoría de ellos se sintetizan en el ovario, testículo y glándulas adrenales utilizando al colesterol como precursor (Fig. 1).

Las hormonas esteroides desempeñan un papel muy importante en la regulación de múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre ellos destacan la homeostasis hidrolítica, el dimorfismo sexual, la función reproductiva y la respuesta al estrés. Entre las hormonas esteroides se encuentran los estrógenos, las progestinas, los andrógenos, los glucocorticoides y los mineralocorticoides (González-Arenas et al., 2001).

Estas hormonas modifican la actividad celular al interactuar con receptores específicos que tienen una alta afinidad para cada hormona esteroide. Los receptores a hormonas esteroides son proteínas que en su mayoría se localizan en el núcleo de la célula y son parte de una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos positiva o negativamente a través de la interacción con distintas secuencias en el DNA denominadas elementos de respuesta hormonal (Zhang et al., 1996).

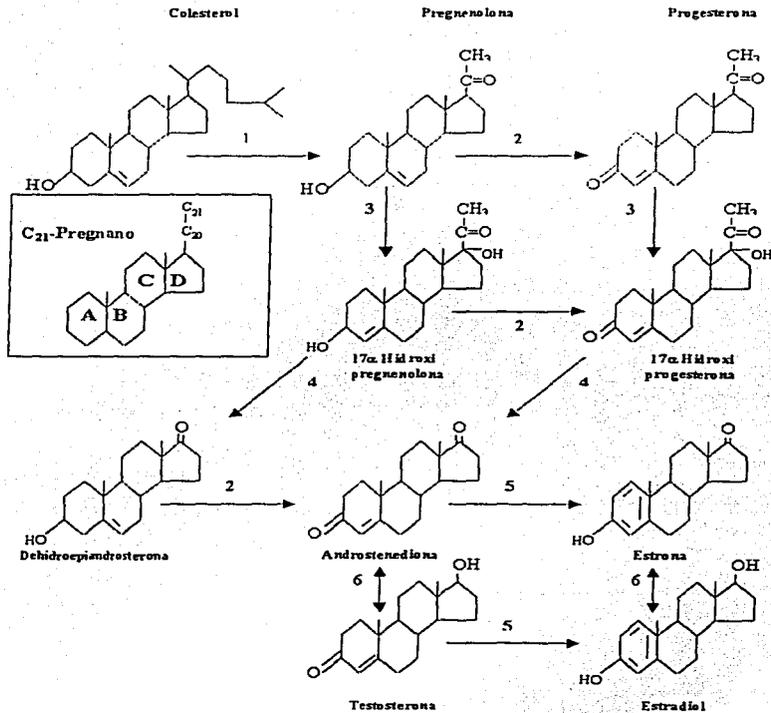


Fig.1. Síntesis de los principales esteroides. 1)20,22. desmolasa; 2) 3β-OH-esteroide deshidrogenasa, 3)17α-hidroxi liasa; 4)17, 20-esteroide liasa; 5) aromatasa; 6) 17β-OH-esteroide deshidrogenasa. En el recuadro se encuentra la estructura del pregnano al igual que las letras con las que se denominan a cada uno de los anillos de la estructura principal de las hormonas esteroides (Gore-Langton et al., 1988).

3.1.2 La Progesterona.

La progesterona ( $P_4$ ) (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides, su nombre se deriva del latín: *pro*= a favor y *gestare*=llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción (Pérez-Palacios., et al, 1985).

La estructura química de la  $P_4$  y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21; Fig. 1). La  $P_4$  se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso en las células del cuerpo lúteo en el ovario durante el ciclo menstrual (Hsueh et al., 1984; Hutchison et al., 1986). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona foliculo estimulante (FSH), las prostaglandinas y los agentes  $\beta$ -adrenérgicos (Graham et al., 1997). Otros órganos donde también se ha demostrado la síntesis de  $P_4$  son la corteza adrenal, la placenta (Gorospe et al., 1985; Perrot-Applanat et al., 1982) y el testículo (Weisz et al., 1980; Dalkin et al., 1992). En el SNC la  $P_4$  se sintetiza desde etapas embrionarias en neuronas, células gliales; y en astrocitos de la corteza cerebral y del cuerpo estriado de la rata desde el día 17 de la gestación (Zwain y Yen, 1999; Ukena et al., 1999).

La síntesis de  $P_4$  se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a  $P_4$  (Fig. 2), mediada por distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

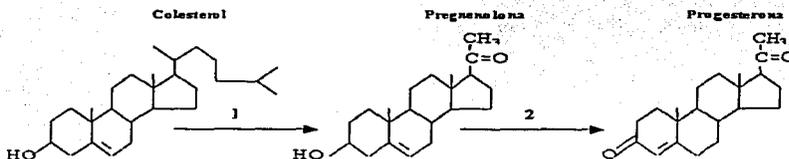
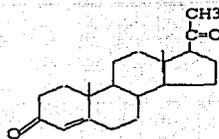


Fig. 2. Biosíntesis de la  $P_4$ . La biotransformación de colesterol a  $P_4$  implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17. B) La oxidación del grupo alcohol en el C-3. C) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A. (1)=20, 22-esteroides liasa, (2) 3 $\beta$ -OH-esteroides deshidrogenasa (Gore-Langton et al., 1988).

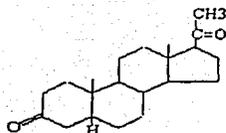
La  $P_4$  puede reducirse para formar varios metabolitos los cuales pueden incrementar, prolongar o terminar los efectos de la  $P_4$  o bien proporcionar mecanismos alternativos que modulen las acciones de la hormona (Karavolas et al., 1990) (Fig. 3). Existen dos tipos de metabolitos: los reducidos en el anillo A: Dihidroprogestinas (5 $\beta$ , 5 $\alpha$ -progestinas), las cuales tienen una gran potencia anestésica y las tetrahidroprogestinas (reducción en los carbonos 5 y 3) que modulan el funcionamiento del sistema neuronal relacionado con la producción y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Existen otros metabolitos reducidos en el carbono 20 y el carbono 17, la 20 $\alpha$ -hidroxiprogestero y la 17 $\alpha$ -hidroxiprogestero respectivamente, los cuales presentan numerosas actividades en el organismo. Los metabolitos se sintetizan en el ovario, el hígado, el riñón, la placenta y el SNC.

La  $P_4$  participa en un amplio rango de actividades biológicas en numerosos tejidos (Tabla 1). Sus efectos pueden ser estimuladores como en el caso de la liberación de la GnRH (Ke et al., 1987), de la dopamina (Dluzen et al., 1991) en la inducción de la lordosis (Schaeffer et al., 1990); en la síntesis de uteroglobina (Beier et al., 1968), en la reacción acrosomal y en el flujo  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide (Meizel et al., 1991; Tesarik et al., 1992) y durante la diferenciación sexual (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000); o bien, inhibidores como en la contractilidad uterina (Csapo et al., 1979) y en la síntesis de norepinefrina inducida por AMPc en el hipotálamo (Petitti et al., 1992).

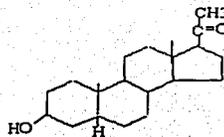


Progesterona

A) Metabolitos reducidos en el anillo A

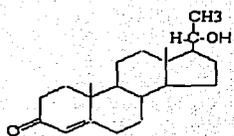


dihidroprogesterinas

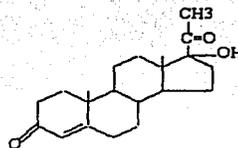


tetrahidroprogesterinas

B) Metabolitos modificados en C-17 y C-20



20  $\alpha$  hidroxiprogesterona



17  $\alpha$  hidroxiprogesterona

Fig. 3. Principales metabolitos de la P<sub>4</sub>. A) Metabolitos reducidos en el anillo A en C-5 y C-3 por la 5 $\alpha$ -esteroide reductasa y la 3 $\alpha$ -esteroide reductasa, respectivamente. B) metabolitos reducidos en C-17 y C-20 sintetizados por la 17 $\alpha$ -esteroide hidroxilasa y la 20 $\alpha$ -esteroide reductasa, respectivamente.

Los principales órganos blanco de la P<sub>4</sub> son: El útero, en donde regula su proliferación y diferenciación; el miometrio, en donde controla su contractilidad y mantiene las condiciones adecuadas para la implantación del embrión (Graham et al., 1997); en el ovario, en donde interviene en la maduración y liberación del ovocito maduro; en la glándula mamaria, en donde promueve la proliferación y diferenciación del tejido alveolar

de la misma, además de la secreción de leche después del nacimiento (Graham et al., 1997). En el cerebro regula la excitabilidad neuronal, el sueño, la reproducción y la conducta sexual (Camacho-Arroyo et al., 1994, 1995 y 1999), así como la temperatura corporal durante el ciclo menstrual (Ganong et al., 1993).

Otro de los efectos estudiados de la  $P_4$  es su participación en el ciclo celular y para ello se han utilizado como modelo células de cultivo de cáncer de mama T47-D (las cuales son positivas para RP); cuando se tratan estas células con  $P_4$  se observa un aumento en la progresión del ciclo celular, lo cual está relacionado con una inducción de genes asociados con la regulación del ciclo celular como las ciclinas (CD-1; Musgrove et al., 1991, 1993); factores de crecimiento (EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ; Murphy et al., 1986, Musgrove et al., 1993) y protooncogenes asociados con la actividad proliferativa (c-myc, c-fos; Wong et al., 1991; Musgrove et al., 1991). La inducción del ciclo celular por progestinas se ve reflejada en un aumento del número de células que entran a la fase S. Así también, se ha observado que esta inducción puede ser bloqueada con el antagonista de la  $P_4$  RU486.

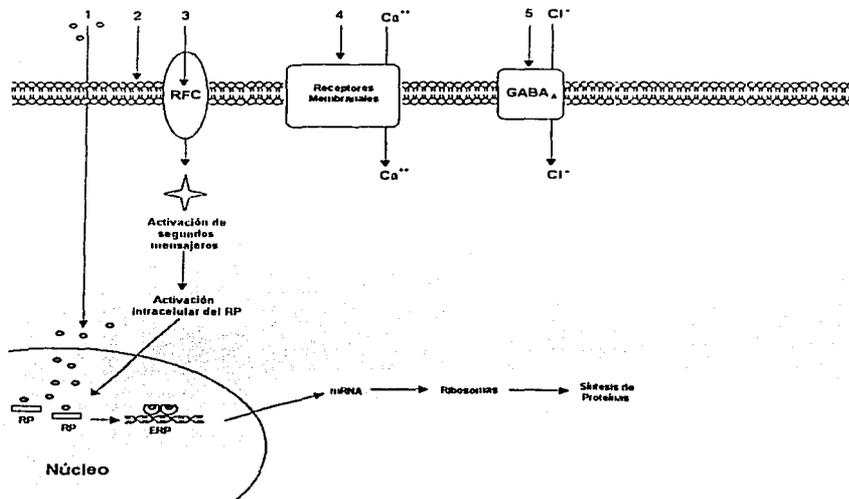
Las progestinas pueden inhibir también la expresión de genes involucrados en la supresión de genes involucrados en la supresión de la división celular como el gen p53. Se ha observado que hay un decremento en la expresión de p53 producido por  $P_4$  en las células T47-D (Hurd et al., 1995) sugiriendo que ésta puede estimular la proliferación celular por medio de la remoción de los efectos inhibidores de esta proteína.

TABLA 1. Acciones fisiológicas demostradas para la P<sub>4</sub>.

Tejido	Función
Útero/Ovario	Liberación del ovocito (1)
	Facilitación de la implantación (2)
	Mantenimiento del embarazo (3)
	Estimulación de la regeneración del estroma (4)
Glándula mamaria	Desarrollo alveolar (5)
	Regulación de la síntesis de leche durante el embarazo (6)
Cerebro	Regulación de la respuesta sexual (7)
	Excitabilidad neuronal, sueño (8)
	Ovulación (7)
	Neuroprotección (9, 10)
Pulmón	Incremento de la ventilación durante el ciclo menstrual y el embarazo (11)
Hueso	Regulación de la masa del hueso (12)

(1) Susuki et al., 1994; (2) Graham et al., 1997; (3) Rotchild et al., 1983; (4) Clarke et al., 1993, (5) Topper et al., 1980; (6) Savourete et al., 1990; (7) Camacho-Arroyo et al., 1995; (8) Camacho-Arroyo et al., 1999; (9) González et al., 1998; (10) Vongher y Frye, 1999; (11) Brodeur et al., 1986; (12) Wei et al., 1993.

Se han determinado dos mecanismos de acción por los cuales la P<sub>4</sub> actúa dentro de la célula, conocidos como genómico y no genómico. El mecanismo genómico involucra la unión con su receptor intracelular específico (RP) para regular la transcripción de genes específicos. El mecanismo no genómico involucra la acción de la P<sub>4</sub> sobre las bicapas fosfolipídicas de la membrana celular, sistemas de segundos mensajeros, interacción con receptores membranales específicos e interacción con receptores a neurotransmisores como el GABA<sub>A</sub> (Mahesh et al., 1996; Fig. 4).



**Fig. 4. Mecanismos genómicos y no genómicos de acción de la (P<sub>4</sub>).** 1) Unión con un receptor intracelular específico (RP) regulando así la transcripción de genes específicos a través de elementos de respuesta a P<sub>4</sub> (ERP). Mecanismos no genómicos: 2) La acción de la P<sub>4</sub> sobre bicapas fosfolípicas. 3) Sistemas de receptores acoplados a segundos mensajeros como el de dopamina y los receptores de factores de crecimiento (RFC). 4) Interacción con receptores membranales a P<sub>4</sub>. 5) Interacción con receptores a neurotransmisores como el receptor GABA<sub>A</sub> (Mahesh et al., 1996).

Una vez que la P<sub>4</sub> y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

1. La reducción en el carbono 20 y del anillo A en los carbonos 3 y 5.
2. La formación de los glucuronidos, donde se incrementa la polaridad de la molécula formando compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción por vía urinaria.

El proceso de reducción de la  $P_4$  ocurre inicialmente en el carbono 20 dando lugar a la formación de la  $20\alpha$  y  $20\beta$  dihidroprogesterona que tienen actividad biológica. Posteriormente se reduce el anillo A en la formación de ocho pregnantrioles o pregnantrioles los cuales al reducirse a glucuronidos son excretados por la orina (Fig. 5).

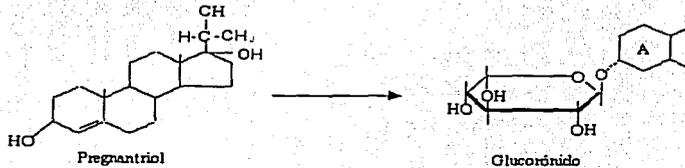


Fig. 5. Principales catabolitos de la  $P_4$ .

### 3.2 Receptor a Progesterona.

#### 3.2.1 Características principales del RP.

La  $P_4$  lleva a cabo la mayoría de sus efectos en la célula a través de la interacción con el receptor a  $P_4$  (RP), el cual pertenece a la superfamilia de receptores a hormonas esteroideas cuyos miembros coordinan la morfogénesis y la homeostasis en respuesta a la unión con su ligando (Kastner et al., 1990). El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de genes a través de la interacción con secuencias específicas en el DNA (elementos de respuesta hormonal).

El RP humano es codificado por un solo gen localizado en el cromosoma 11q22-23, el tamaño del cDNA es de aproximadamente 90 kb y comprende 8 exones y 7 intrones (Fig. 6; Savouret et al., 1990; Misrahi et al., 1993) y da lugar a un RNA mensajero de 3014 pb (Theveny et al., 1987).

Estructuralmente, el RP está compuesto por dominios que llevan a cabo las siguientes funciones:

- 1) **Dominio de transactivación (A/B):** Exón 1 (2380 pb). Participa en la regulación de la transcripción de genes blanco.
- 2) **Dominio de unión al DNA (C):** Exones 2 (152 pb) y 3 (117 pb). Participa en la dimerización con otro receptor y en la unión al DNA a través de la presencia de dedos de Zinc.
- 3) **Dominio de unión a proteínas de choque térmico (Hsp90; D):** Exón 4 (306 pb). Participa en procesos de estabilización del receptor y en la translocación al núcleo.
- 4) **Dominio de unión al esteroide (E):** Exones 5 (145), 6 (131), 7 (158), 8 (153 pb). Interacción con el ligando y función de transactivación.

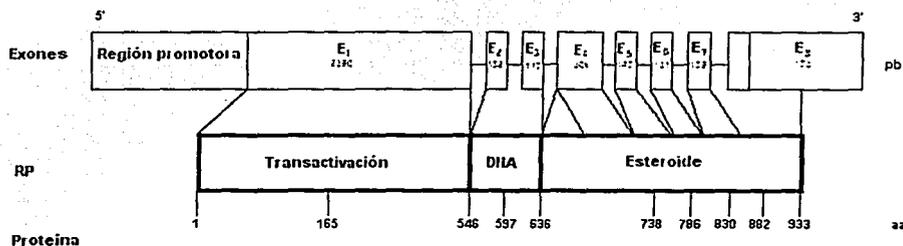


Fig. 6 Estructura del gen del RP humano. El gen del RP está constituido por una región promotora, una región terminal de transactivación, una región de unión al DNA y una región de unión a la hormona. Este gen constituido por 8 exones codifica para una proteína que pesa aproximadamente 120 kDa (Mirashi et al., 1993).

Se ha detectado la presencia del RP en diferentes tejidos del aparato reproductivo de distintos grupos de vertebrados (aves, reptiles, roedores, conejos, perros, vacas, primates); en las células de la granulosa en el ovario (Milgrom et al., 1970; Fiel et al.,

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1972) en las trompas de falopio, vagina, testículo (Terner et al., 1977); en las células de músculo de arterias uterinas (Perrot-Appianat et al., 1988); así como en el oviducto y bolsa de Fabricio de pollo (Ylikomi et al., 1985; González-Morán et al., 1998). El RP se ha localizado también en la glándula mamaria tanto en tejido normal como neoplásico (Pollow et al., 1977; Horwitz et al., 1975) así como en distintas áreas del cerebro tales como el hipotálamo ventro-medial, el área preóptica y la corteza cerebral (Warembourg et al., 1989; Camacho Arroyo et al., 1998). También se encuentra en el timo (Pearce et al., 1983), islotes pancreáticos (Green et al., 1978); en células osteoblásticas (Gunn et al., 1999) y el pulmón (Camacho-Arroyo et al., 1994).

El mecanismo general de acción del RP activado por el ligando es el siguiente:

En ausencia del ligando específico, el RP se encuentra transcripcionalmente inactivo formando complejos oligoméricos con proteínas de choque térmico como las Hsp (70, 90, 59) (Beato, 1987; Chambrud et al., 1990; Schowalter et al., 1991). Cuando la hormona circulante entra por difusión a través de las membranas citoplásmica y nuclear (Litwack et al., 1992) se une al receptor causando los distintos cambios conformacionales que promueven la fosforilación de éste (en residuos dependientes de ciclina A) y la disociación de las Hsp (Allan et al., 1992; Mirashi et al., 1987; Passinen et al., 1999; Clemen et al., 2000).

El RP es una fosfoproteína cuya actividad puede ser regulada por fosforilación (Sheridan et al., 1998; Zhang et al., 1997). Existe evidencia de que la regulación de las vías de señalización celular alteran la actividad y la fosforilación del RP (Beck et al., 1992; Takimoto et al., 1996) así como de otros receptores a hormonas esteroides (Ignar-Trowbridge et al., 1992; Rogatsky et al., 1999). Algunos de estos cambios se deben a alteraciones directas en la fosforilación del RP, mientras otros parecen ser afectados por proteínas asociadas (Rowan et al., 2000). La fosforilación es un evento muy importante para que se lleve a cabo la transactivación de genes mediada por P<sub>α</sub>. Se ha demostrado

que el RP tiene catorce sitios de fosforilación, de éstos se ha demostrado en sistemas *in vivo* que se fosforilan los residuos Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>130</sup>, Ser<sup>162</sup>, Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>213</sup>, Ser<sup>400</sup> y Ser<sup>676</sup>; en sistemas *in vitro* se fosforilan los residuos Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>213</sup>, Thr<sup>430</sup>, Ser<sup>554</sup> y Ser<sup>676</sup> en ausencia de la hormona; y después del estímulo con P<sub>4</sub> se induce la fosforilación temporal de otros tres residuos que son Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>294</sup> y Ser<sup>345</sup> (Zhang et al., 1995). Se han detectado seis sitios de fosforilación que son exclusivos para la isoforma B del hRP en los residuos Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>130</sup> y Ser<sup>162</sup>, y ocho sitios de fosforilación que son comunes para ambas isoformas en los residuos Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>213</sup>, Ser<sup>294</sup>, Ser<sup>345</sup>, Ser<sup>400</sup>, Thr<sup>430</sup>, Ser<sup>554</sup> y Ser<sup>676</sup> (Knotts et al., 2001) (Fig. 7).

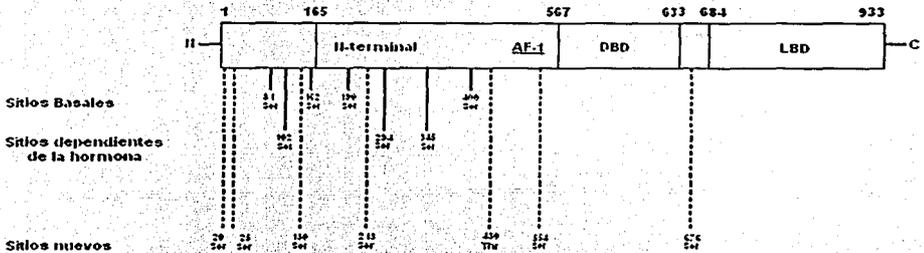
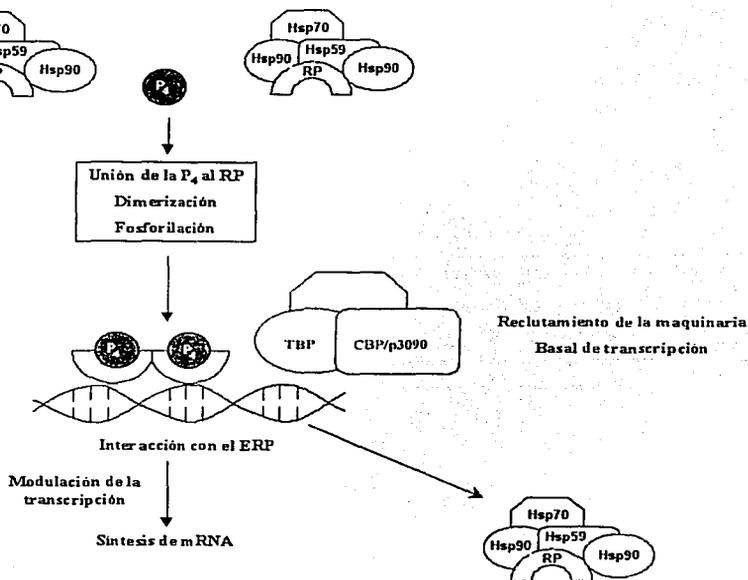


Fig. 7 Sitios de fosforilación en el RP humano (hRP). Residuos de fosforilación en el hRP identificados hasta la fecha. Tomado de Knotts et al., 2001.

Muchos de los sitios de fosforilación en los receptores a hormonas esteroides contienen motivos Ser/Thr-Pro. Se ha demostrado que en caso de RP de pollo los cuatro motivos de este tipo son fosforilados (Denner et al., 1990; Poletti et al., 1993). El hRP contiene quince de estas secuencias de las cuales la mayoría han sido identificadas como sitios de fosforilación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por sitios en el DNA denominados elementos de respuesta a  $P_4$ , la unión del RP activado a su elemento de respuesta permite reclutar factores de transcripción hacia la región promotora para iniciar y regular la síntesis del RNAm (Mahesh et al., 1996; Beato et al., 1989). Una vez que se ha llevado a cabo la transcripción del gen, el RP y la maquinaria transcripcional se desensamblan del gen blanco y el receptor regresa a la fase de inactivación (Rodríguez et al., 1990) (Fig. 8).



**Fig. 8 Mecanismo general de activación del RP por su ligando.** La  $P_4$  entra al núcleo y se une a su receptor. Esta unión produce un cambio conformacional en el receptor que aumenta su afinidad al DNA y así el complejo ligando-receptor interactúa con secuencias específicas llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE) lo cual modifica la transcripción del gen blanco (Giagrande et al., 1997).

El RP es regulado a la alta por estrógenos y a la baja por  $P_4$  en muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo (Graham et al., 1997; Camacho-Arroyo et al., 1994; Mendoza-Rodríguez et al., 1999).

En otros estudios se demostró mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que la expresión del gen del RP es regulada por hormonas sexuales esteroideas en el hipotálamo y en la corteza cerebral, al igual que en el útero en conejas adultas; presentando una regulación a la alta por estrógenos y a la baja por la misma  $P_4$  (Camacho-Arroyo et al., 1996).

### 3.2.2 Isoformas del RP.

En algunas especies de vertebrados (aves, roedores y primates) se han identificado dos isoformas del RP denominadas A (80,000-94,000 Daltones) y B (108,000-120,000 Daltones; Schrader et al., 1981; Horwitz et al., 1996; Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por distintos elementos de respuesta que se encuentran contenidos en el promotor y son inducidos por estrógenos (Fig. 9).

En el ser humano (Kasnter et al., 1990; Fig. 9) y en la rata (Kraus et al., 1993) las isoformas del RP son originadas por distintos mensajeros, mientras que en las aves se originan por un procesamiento alternativo de un mismo RNAm (Connely et al., 1989).

Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad tanto a la  $P_4$  como al elemento de respuesta a  $P_4$  (Christensen et al., 1991). El RP tiene la capacidad de unirse al DNA como tres especies diméricas: AA, AB, BB. Se ha demostrado que la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman

homodímeros o heterodímeros e interactúan con agonistas y antagonistas (Tora et al., 1988).

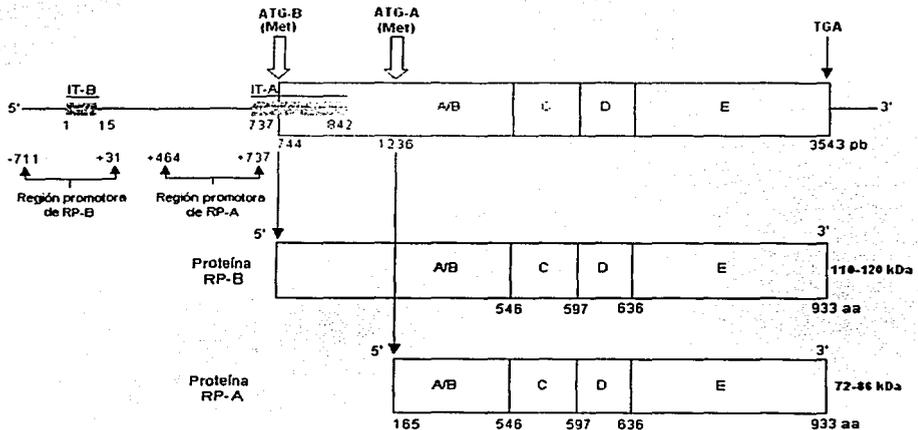


Fig. 9 Organización de las isoformas del RP humano. Los números indican la posición de las bases y de los aminoácidos en el gen y en las proteínas de las isoformas de RP respectivamente. IT-B e IT-A: Sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; A-E: dominios funcionales del RP; ATG-B y ATG-A: Inicio de la traducción de RP-B y RP-A respectivamente; Met: Metionina; TGA: Sitio de término de la transcripción (Kastner et al., Fujimoto et al., 1997).

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

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

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

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

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

4. Los dímeros formados por B:B tienen mayor capacidad de unirse a secuencias blanco del DNA (Schoonen et al., 1998), mientras que los heterodímeros son más inestables y presentan diferentes propiedades de unión al DNA.

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

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

Estas observaciones sugieren que una alteración en la expresión o actividades de ambas isoformas pueden tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la  $P_4$ . La tasa de expresión de las dos isoformas varía en diferentes órganos y tejidos blanco (Ing et al., 1993; Castren et al., 1990), sugiriendo que la expresión diferencial puede ser crítica para la respuesta celular apropiada a la  $P_4$  (Camacho-Arroyo et al.,

1998). RP-A es predominante en el útero de roedores (50:1) así como en el sistema reproductivo de monos y humanos (2:1; Lessey et al., 1983).

Por otro lado, los coactivadores de receptores nucleares son una clase de proteínas correguladoras que interactúan con miembros de la superfamilia de receptores nucleares de manera ligando específica para potenciar su efecto en la transcripción de genes blanco (Fig. 10). Funcionalmente los coactivadores sirven como puentes moleculares que unen al receptor a la maquinaria basal de transcripción (McKenna et al., 1999). Se ha observado que algunos coactivadores tienen actividades enzimáticas que contribuyen a potenciar la transcripción de genes. SRC-1, SRC-2, SRC-3 (Coactivadores de Receptores a Esteroides), p300/CBP y PCAF (Factor Asociado a p300/CBP) tienen actividad de histona acetiltransferasa (HAT) y miembros del complejo SWI/SNF presentan actividad de ATPasa (Sterner et al., 2000). La actividad HAT modifica la estructura represiva de la cromatina neutralizando la carga positiva de las histonas, interrumpiendo las interacciones iónicas entre las histonas cargadas positivamente y el esqueleto de DNA cargado negativamente.

La actividad HAT es la primera función enzimática implicada en la transcripción dependiente de los receptores a hormonas (Spencer et al., 1997). Los coactivadores que tienen actividad ATPasa físicamente son capaces de abrir la estructura local represiva de la cromatina permitiendo un fácil acceso de otras proteínas auxiliares de la transcripción (Jenster et al., 1997). La existencia de coactivadores representa otro nivel de regulación para la activación del RP.

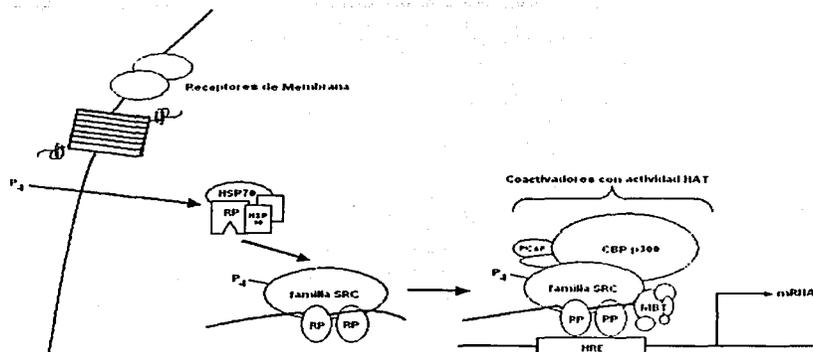


Fig. 10. Activación del RP. El RP está presente en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico (HSP); cuando la P<sub>4</sub> se une al RP las HSP se disocian y el RP sufre cambios conformacionales que le permiten unirse a un elemento de respuesta a hormonas (HRE), reclutar la maquinaria basal de transcripción (MBT) y coactivadores de la familia SRC. El complejo formado puede reclutar otros factores al promotor que pueden 1) Abrir la estructura de la cromatina a través de su actividad de Histona Acetiltransferasa (HAT) y, 2) contribuir a la estabilización del complejo de preiniciación. Las vías de señalización que regulan la actividad de cinasas y fosfatases en la célula contribuyen a la activación del RP, modificando su fosforilación y la de los cofactores (Rowan y O'Malley, 2000).

### 3.2.3 Regulación de la expresión de las isoformas del RP.

Se ha reportado la expresión del RP en diversas regiones cerebrales como el tálamo, el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, el cerebelo, la corteza cerebral, la amígdala y el tallo cerebral (Camacho-Arroyo et al., 1994; Cerbón et al., 1989; MacLusky y McEwen, 1978, Kastrop et al., 1999). Se ha detectado la presencia del RP desde etapas embrionarias en el hipotálamo de roedores de ambos sexos, su expresión diferencial en distintas regiones cerebrales, así como su modificación a lo largo del desarrollo (Wagner et al., 1998; Brown et al., 1990), en diferentes condiciones hormonales como sucede durante los ciclos estral, menstrual o en animales ovariectomizados tratados con

estrógenos o P<sub>4</sub> (Camacho-Arroyo et al., 1998; Bethea et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2000).

En la mayoría de los tejidos estudiados se ha observado que la expresión del RP está regulado de manera positiva por estrógenos y de manera negativa por P<sub>4</sub>. La regulación por estrógenos sucede principalmente a nivel transcripcional y está mediada por elementos de respuesta a estrógenos localizados en la región promotora del gen del RP o en regiones intragénicas del mismo (Kraus et al., 1993; Savouret et al., 1991). En el SNC de la rata la expresión del RP es inducida por estrógenos en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo, mientras que dicha inducción no sucede en la amígdala y el cerebelo (Cerbón et al., 1989; MacLusky y McEwen, 1978; Camacho-Arroyo et al., 1998).

Se ha observado que la regulación del RP por estrógenos a niveles transcripcional y traduccional en algunas áreas del cerebro no es concordante, así, los estrógenos inducen un aumento en los niveles de RNAm del RP en la corteza cerebral de conejas ovariectomizadas, sin embargo éste incremento no se observa a nivel de la proteína, lo cual sugiere una regulación a nivel post-transcripcional (Camacho-Arroyo et al., 1994; Camacho-Arroyo et al., 1996).

Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación a la baja por P<sub>4</sub> son hasta el momento desconocidos. Debido a la carencia de elementos de respuesta a P<sub>4</sub> en el gen del RP en mamíferos, es posible que tal regulación ocurra a nivel de la proteína (Kraus et al., 1993; Savouret et al., 1991).

La tasa de expresión de las isoformas del RP varía de manera tejido-específica, en respuesta a los estímulos hormonales y de acuerdo a la etapa del desarrollo en la que se encuentre el organismo, sin embargo se ha reportado que hay una expresión diferencial entre las isoformas del RP, ya que se ha encontrado que para la corteza cerebral, el área preóptica y el hipotálamo la isoforma predominante en la rata recién nacida es la RP-B,

pero esta expresión se modifica al rededor del día 12, cuando la isoforma predominante es la RP-A (Kato et al., 1993).

En el útero de roedores y primates la isoforma predominante es la RP-A, aunque su tasa de expresión varía durante los ciclos reproductivos (Ilenchuk y Walters, 1987; Mangal et al., 1997 y Duffy et al., 1997), para el caso de la mujer se sabe que la expresión de ambas isoformas alcanza su máximo durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual, sin embargo, la tasa de expresión RP-A:RP-B es  $> 10:1$  durante la primera semana del ciclo; en los días 9-13 es aproximadamente de 5:1; de los días 14-16 es 2:1 y hacia el final del ciclo RP-B es prácticamente indetectable (Mangal et al., 1997). Recientemente se han reportado cambios en la expresión de las isoformas del RP en la hipófisis de la rata durante el ciclo estral, siendo notorio el aumento de la expresión de ambas isoformas en la mañana del proestro (Szabo et al., 2000). Además se han observado claras diferencias en la regulación de la expresión de las isoformas del RP a nivel del RNAm (Camacho-Arroyo et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2000). En el hipotálamo de ratas ovariectomizadas, la expresión de ambas isoformas del RP fue inducida por estrógenos y reducida por  $P_4$ , y en el área preóptica éstos cambios sólo se presentaron en RP-B, mientras que en hipocampo la isoforma que presentó inducción con estrógenos fue RP-A, sin que la  $P_4$  tuviera efectos en la expresión de ambas isoformas (Camacho-Arroyo et al., 1998). En condiciones fisiológicas como en ciclo estral, RP-B fue predominante en el hipotálamo y en el área preóptica, mientras que en el hipocampo no se detectó una diferencia importante entre la expresión de las dos isoformas a nivel del RNAm (Guerra-Araiza et al., 2000).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La  $P_4$  ejerce múltiples acciones fisiológicas en distintos tejidos. En el cerebro participa en la regulación de la respuesta sexual, la excitabilidad neuronal, la ovulación y la neuroprotección.

La vía de acción genómica de la  $P_4$  está directamente relacionada con la interacción con su receptor nuclear, el cual tiene dos isoformas, denominadas RP-A y RP-B. El papel de las isoformas del RP en la regulación de las acciones de la  $P_4$  es fundamental, por lo que el conocimiento de la expresión de las isoformas del RP es básico para comprender los diversos procesos fisiológicos en los que participa la  $P_4$  en el SNC.

En algunas regiones del SNC como el hipotálamo y el área preóptica el E2 regula positivamente la expresión del RP, mientras que la  $P_4$  regula negativamente la expresión del RP, tanto a nivel del RNAm como a nivel de la proteína del receptor total. Sin embargo, se desconoce el patrón de expresión a nivel de la proteína de ambas isoformas en regiones cerebrales como el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza, y su regulación por E2 y  $P_4$ .

Esta información es importante para conocer los mecanismos por los cuales la  $P_4$  ejerce sus efectos en el SNC, ya que las isoformas del RP regulan diferentes genes y por lo tanto distintas funciones. Por lo que en este proyecto se estudió el patrón de expresión y la regulación de las isoformas del RP a nivel de la proteína en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza cerebral de ratas hembras ovariectomizadas después de la administración de E2 y  $P_4$ , usando la técnica de Western blot.

## 5. HIPÓTESIS

Si la expresión de las isoformas del RP es regulada de manera tejido-específica por E2 y P<sub>4</sub> a nivel del RNAm y esto se refleja a nivel de la proteína, entonces:

- En el hipotálamo habrá una inducción en la expresión de ambas isoformas con E2 y una regulación negativa por P<sub>4</sub>.
- En el área preóptica habrá una inducción en la expresión de la isoforma B con E2 y una regulación negativa por P<sub>4</sub>.
- En el hipocampo se inducirá la expresión de la isoforma A con E2 y no habrá cambios con P<sub>4</sub>.
- En la corteza cerebral no habrá cambios en la expresión de ambas isoformas con la administración de E2 o de P<sub>4</sub>.

## 6. OBJETIVOS

### General

- Determinar la regulación de la expresión de las isoformas del RP a nivel de la proteína en el SNC de la rata.

### Particulares

- Estudiar la regulación de la expresión de las isoformas del RP en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza cerebral de la rata después de la administración de E2 y P<sub>4</sub>.
- Determinar cuál de las isoformas del RP se expresa predominantemente a nivel de la proteína en cada región cerebral estudiada.
- Determinar si existe una relación entre la expresión de las isoformas del RP a nivel del RNAm y a nivel de la proteína.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague Dawley (250 g) que se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad 12:12 horas, con agua y alimento disponible *ad libitum*.

Los animales se ovariectomizaron bajo anestesia total con ketamina a una dosis de 80 mg/kg vía i.p. Quince días después de la cirugía se les aplicaron distintos tratamientos con E2 y P<sub>4</sub>.

### 7.2 Preparación de las hormonas.

#### 1) Preparación de la progesterona (P<sub>4</sub>)

Se disolvieron 12 mg de P<sub>4</sub> en etanol absoluto al 10% (200 µl) más 2 ml de aceite de maíz.

#### 2) Preparación del estradiol (E2)

Se disolvieron 6 mg de 17-β estradiol en etanol absoluto al 10% (300 µl) más 3 ml de aceite de maíz.

### 7.3 Tratamientos.

Quince días después de la cirugía, los animales fueron tratados con aceite de maíz como vehículo, P<sub>4</sub> y E2 vía subcutánea de la siguiente manera:

- 1) Vehículo por 2 días consecutivos.
- 2) E2 (5 µg/100 g) por 2 días consecutivos.

- 3)  $P_4$  (400  $\mu\text{g}/100$  g) al tercer día, previa dosis de E2, como se indicó anteriormente.
- 4) Los animales fueron sacrificados 24 h después de la última dosis, excepto los tratados con  $P_4$  cuyo sacrificio se realizó 3, 6, 12, 24 y 48 horas después.

### 7.4 Obtención de las diferentes regiones cerebrales.

Inmediatamente después de sacrificar a los animales se realizó la disección del cerebro, obteniendo las siguientes regiones: el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza cerebral.

### 7.5 Extracción de proteínas totales.

Se homogenizaron las diferentes regiones cerebrales en buffer de lisis TDG con un coctel de inhibidores de proteasas (Tris-HCl 10 mM, ditiotreitól 1 mM, glicerol al 30 %, tritón al 1 %, azida de sodio 15 mM, EDTA 1mM, leupeptina 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , aprotinina 22  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PMSF 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM) en una relación de 1ml de buffer/1 g de tejido a 4° C.

Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 15,000 rpm durante 15 minutos a 4° C para obtener en el sobrenadante las proteínas totales.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

### 7.6 Western Blot.

Las proteínas totales obtenidas de cada región cerebral (80  $\mu\text{g}$ ) se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 7.5% a 80 volts durante 2 horas. Cada muestra se preparó con buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol al 10%, SDS al 2%,  $\beta$ -mercapto etanol al 5%) en un volumen 1:1

y se hirieron durante 5 minutos para posteriormente cargarse en los geles antes mencionados.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 75 volts durante 4 horas a 4° C. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% y albúmina al 0.5% en TBS 1X.

Las membranas fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente, con un anticuerpo primario monoclonal que reconoce a ambas isoformas con la misma afinidad, anti-RP (IgG) (Santa Cruz sc-810) en una concentración de 1µg/ml, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween (TBS+Tween al 0.1%) 3 veces por 5 minutos; posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24 µg/ml (Santa Cruz sc-2005). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las isoformas del RP. En este sistema, la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario actúa sobre el peróxido de luminol en presencia de un potenciador de la reacción y se detecta una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada pozo se determinó la cantidad de actina en cada experimento. Se lavaron las membranas con glicina ácida (glicina 0.1 M SDS 0.5 % pH 2.5) toda la noche a 4°C y 30 minutos a 37°C para posteriormente incubarlas con un anticuerpo primario anti-actina en una concentración de 1µg/ml (Santa Cruz sc-1615) durante 2 horas a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween (TBS+Tween al 0.1%) 3 veces por 5 minutos; después se incubaron una hora con un anticuerpo secundario anti-cabra (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de

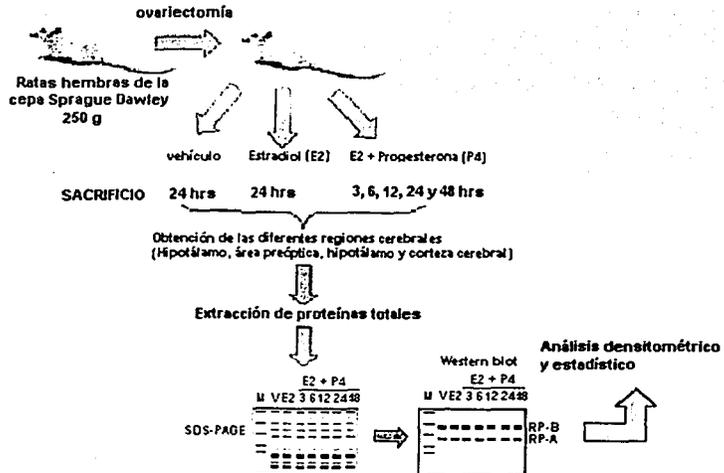
0.24  $\mu\text{g/ ml}$  (Santa Cruz sc-2033). Se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

### **7.7 Análisis de resultados.**

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico utilizando el programa Scion Image, para cuantificar la expresión de las isoformas del RP y actina, de acuerdo a la intensidad de cada banda.

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de t-Student. Se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) para calcular los valores de probabilidad.

DISEÑO EXPERIMENTAL



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## 8. RESULTADOS

Para observar los efectos del E2 y la  $P_4$  sobre la expresión de las isoformas del RP a nivel de la proteína se extrajeron proteínas totales del hipotálamo, del área preóptica, del hipocampo, y de la corteza cerebral de ratas Sprague Dawley ovariectomizadas y tratadas con V, E2 y E2 +  $P_4$ ; y se realizaron ensayos de Western blot como se describió en la sección de Materiales y Métodos.

En la figura 11 se muestra la detección de las isoformas del RP en el hipotálamo. Se observaron dos bandas de 120 y 80 kDa que corresponden a las isoformas B y A respectivamente. Como se observa en esta figura no hubo cambios en la expresión de ambas isoformas en las distintas condiciones experimentales, lo cual se refleja en la figura 12, donde se observa que no hubo diferencias significativas en la expresión de ambas isoformas del RP con ninguno de los tratamientos administrados.

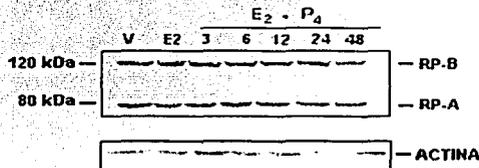
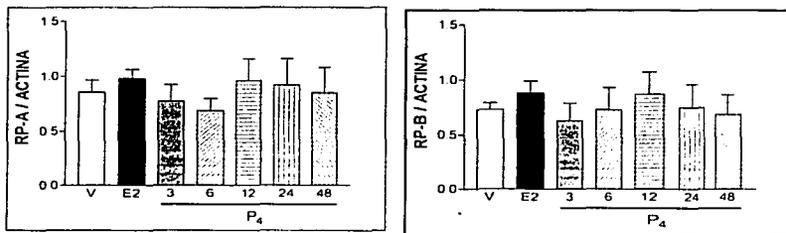


Fig. 11. Ensayo de Western blot de las isoformas del RP en el hipotálamo de la rata. Ensayo representativo de 3 experimentos de Western Blot. Ratas ovariectomizadas tratadas con V, E2 o E2 +  $P_4$ . Los animales tratados con V y E2 se sacrificaron 24 h después del último tratamiento, mientras que los animales tratados con E2 +  $P_4$  se sacrificaron 3, 6, 12, 24 y 48 h después del último tratamiento con  $P_4$ . Se homogenizó el hipotálamo de cada animal por separado, se extrajeron y cuantificaron las proteínas totales, éstas últimas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5%, y en cada carril se cargaron 80  $\mu$ g de proteína. Posteriormente se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa para ser incubadas con un anticuerpo anti-RP que reconoce a ambas isoformas con la misma afinidad. El complejo RP-anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (ECL). Se muestra un Western blot para actina, que se utilizó como control de carga de proteína.



**A** **B**  
 Fig.12 Expresión de las isoformas A y B del RP en el hipotálamo de la rata. Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la actina. A) RP-A y B) RP-B. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. de 3 ensayos.

Por otro lado, al calcular la relación en la expresión de RP-A/RP-B en el hipotálamo se encontró que no hubo predominio de alguna de las isoformas entre los distintos tratamientos, es decir, que la tasa de expresión de RP-A/RP-B fue alrededor de 1. (Fig. 13).

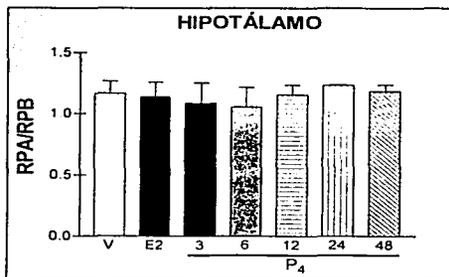


Fig. 13. Relación RP-A/RP-B en el hipotálamo de la rata. Se realizó el análisis densitométrico de 3 ensayos de Western blot, posteriormente se calculó la relación RP-A/ RP-B en las diferentes condiciones experimentales. En la gráfica se muestra el promedio  $\pm$  E. S.

En la figura 14 se muestra la detección de las isoformas del RP en el área preóptica. Las dos isoformas muestran un aumento en su expresión después del tratamiento con E2 y con P<sub>4</sub> siendo más evidente esta inducción en la isoforma A. En

la figura 15 se observa que ambas isoformas están reguladas positivamente por E2 sin que la P<sub>4</sub> regulara negativamente a su receptor. En ambas isoformas la inducción por E2 se mantuvo aún después de 48 horas después del tratamiento con P<sub>4</sub>.

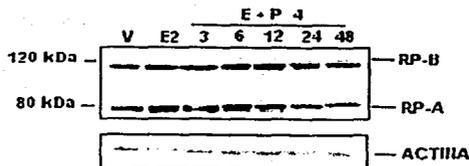


Fig. 14. Ensayo de Western blot de las isoformas del RP en el área preóptica de la rata. Ensayo representativo de 3 experimentos de Western Blot. Ratas ovariectomizadas tratadas con V, E2 o E2 + P<sub>4</sub>. Los animales tratados con V y E2 se sacrificaron 24 h después del último tratamiento, mientras que los animales tratados con E2 + P<sub>4</sub> se sacrificaron 3, 6, 12, 24 y 48 h después del último tratamiento con P<sub>4</sub>. Posteriormente se procedió como se indica en la Fig. 11. Se muestra un Western blot para actina, que se utilizó como control de carga de proteína.

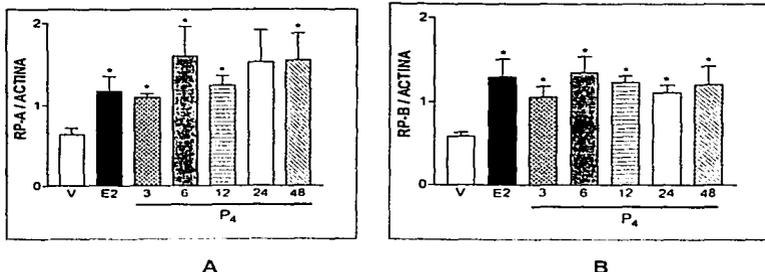


Fig.15 Expresión de las isoformas A y B del RP en el área preóptica de la rata. Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la actina. A) RP-A y B) RP-B. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. de 3 ensayos. \*  $p < 0.05$  comparado con los animales tratados con V.

En el área preóptica no se encontraron diferencias en la tasa de expresión de las isoformas del RP además de no mostrar diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 16).

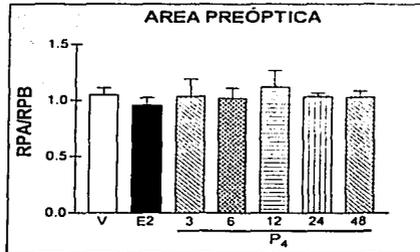


Fig.16. Relación RP-A/RP-B en el área preóptica de la rata. Se realizó el análisis densitométrico de 3 ensayos de Western blot, posteriormente se calculó la relación RP-A/ RP-B en las diferentes condiciones experimentales. En la gráfica se muestra el promedio  $\pm$  E. S.

En la figura 17 se muestra la detección de las isoformas A y B del RP en el hipocampo. En esta figura se observa una ligera disminución en la expresión de ambas isoformas después del tratamiento con P<sub>4</sub> a diferentes tiempos. En la figura 18 se puede observar que aunque hay una tendencia al aumento en la expresión de la isoforma A por E2, éste no es estadísticamente significativo; sin embargo la isoforma A muestra a las 12 y a las 24 horas una regulación negativa por P<sub>4</sub> que es significativa respecto al control y al tratamiento con E2., mientras que la isoforma B se reguló negativamente por P<sub>4</sub> a las 6 y 12 horas con respecto al control y al tratamiento con E2.

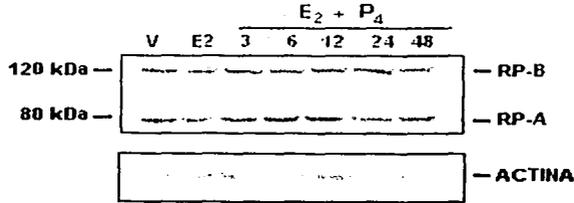


Fig.17. Ensayo de Western blot del RP en el hipocampo de la rata. Ensayo representativo de 5 experimentos de Western Blot. Ratas ovariectomizadas tratadas con V, E2 o E2 + P<sub>4</sub>. Los animales tratados con V y E2 se sacrificaron 24 h después del último tratamiento, mientras que los animales tratados con E2 + P<sub>4</sub> se sacrificaron 3, 6, 12, 24 y 48 h después del último tratamiento con P<sub>4</sub>. Posteriormente se procedió como se indica en la Fig. 11. Se muestra un Western blot para actina, que se utilizó como control de carga de proteína.

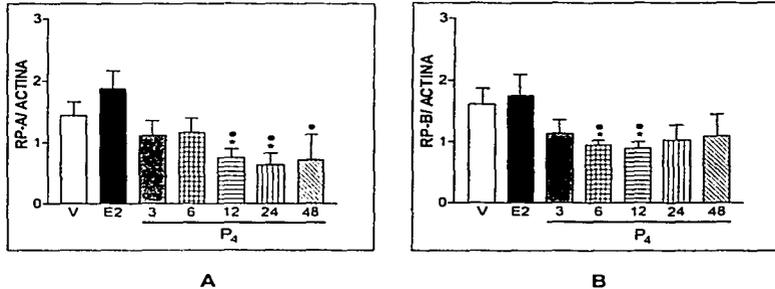
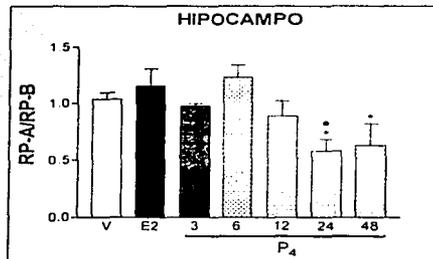


Fig.18 Expresión de las isoformas A y B del RP en el hipocampo de la rata. Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la actina. A) RP-A y B) RP-B. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. de 5 ensayos. \*  $p < 0.05$  comparado con los animales tratados con V, y  $\bullet$   $p < 0.05$  comparado con los animales tratados con E2.

Para el caso del hipocampo no hubo diferencias en la tasa de expresión de RP-A/RP-B, salvo en el tratamiento con P<sub>4</sub> a las 24 y 48 horas en donde se observa un predominio de la isoforma B (Fig. 19). También se observa que hubo diferencias entre el tratamiento con E2, y a las 24 y 48 horas después del tratamiento con P<sub>4</sub>, respecto al vehículo, así como a las 24 horas después del tratamiento con P<sub>4</sub> respecto al tratamiento con E2.



**Fig.19** Relación RP-A/RP-B en el hipocampo de la rata. Se realizó el análisis densitométrico de 5 ensayos de Western blot, posteriormente se calculó la relación RP-A/RP-B en las diferentes condiciones experimentales. En la gráfica se muestra el promedio  $\pm$  E. S. \*  $p < 0.05$  comparado con los animales tratados con V y \*  $p < 0.05$  comparado con los animales tratados con E2.

En la figura 20 se muestra la detección de las isoformas del RP en la corteza cerebral. Ambas isoformas muestran una inducción con E2 y una regulación diferente por  $P_4$  en distintos periodos. En la figura 21 se observa que la expresión de las isoformas A y B es inducida por E2, aunque sólo en la isoforma A el aumento es estadísticamente significativo. A las 3 h después del tratamiento con  $P_4$  se observa una regulación negativa de la isoforma A, mientras que a las 6, 12 y 48 horas hay un aumento significativo respecto al control; la isoforma B no modificó su expresión con la administración de  $P_4$  y de E2.

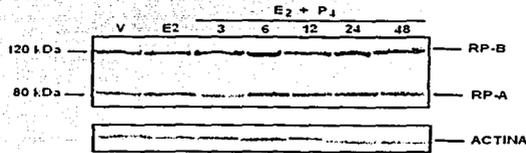


Fig. 20. Ensayo de Western blot del RP en la corteza cerebral de la rata. Ensayo representativo de 5 experimentos de Western Blot. Ratas ovariectomizadas tratadas con V, E<sub>2</sub> o E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub>. Los animales tratados con V y E<sub>2</sub> se sacrificaron 24 h después del último tratamiento, mientras que los animales tratados con E<sub>2</sub> + P<sub>4</sub> se sacrificaron 3, 6, 12, 24 y 48 h después del último tratamiento con P<sub>4</sub>. Posteriormente se procedió como se indica en la Fig. 11. Se muestra un Western blot para actina, que se utilizó como control de carga de proteína.

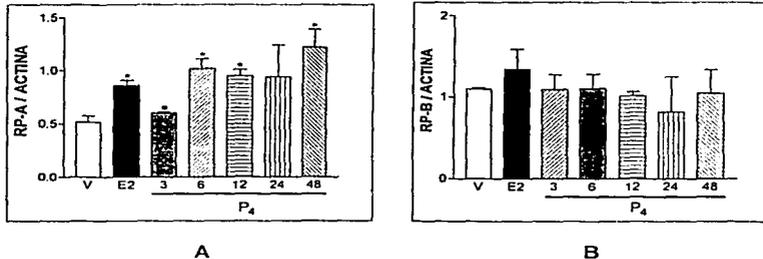


Fig.21 Expresión de las isoformas A y B del RP en la corteza cerebral de la rata. Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la actina. A) RP-A y B) RP-B. Las gráficas muestran el promedio  $\pm$  E.S. de 5 ensayos. \*  $p < 0.05$  comparado con los animales tratados con V y \*  $p < 0.05$  comparado con los animales tratados con E<sub>2</sub> y con los tratamientos con P<sub>4</sub> a las 6, 12 y 48 h.

En la corteza cerebral con los tratamientos con vehículo, con E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> a las 3 horas predominó la expresión de la isoforma B, mientras que de las 6 a las 48 horas no hubo diferencias en la tasa de expresión de ambas isoformas del RP (Fig. 22). En esta región hubo diferencias significativas en los tratamientos con P<sub>4</sub> de las 12 a las 48 horas respecto al vehículo y al tratamiento con E<sub>2</sub>.

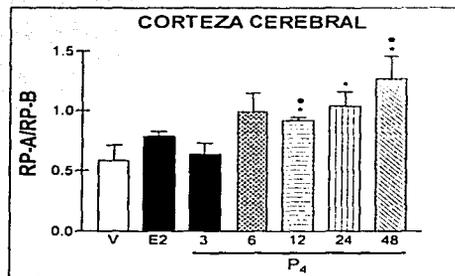


Fig. 22 Relación RP-A/RP-B en la corteza cerebral de la rata. Se realizó el análisis densitométrico de 5 ensayos de Western blot, posteriormente se calculó la relación RP-A/RP-B en las diferentes condiciones experimentales. En la gráfica se muestra el promedio  $\pm$  E. S.

\*  $p < 0.05$  comparado con los animales tratados con V y \*  $p < 0.05$  comparado con los animales tratados con E2.

## 9. DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la expresión a nivel de la proteína de las isoformas del RP en el SNC de ratas hembras ovariectomizadas y tratadas con E2 y P<sub>4</sub> mediante el uso de la técnica de Western blot.

Los resultados obtenidos muestran que existe una regulación diferencial entre las isoformas del RP y entre las regiones cerebrales estudiadas. Así, en el área preóptica se indujo la expresión de ambas isoformas al administrar E2, mientras que en la corteza cerebral sólo la isoforma A aumentó su expresión significativamente por el tratamiento con E2.

Por otro lado, el efecto de la P<sub>4</sub> en la expresión de RP-A y RP-B fue diferente en el área preóptica y en la corteza cerebral, ya que al administrar P<sub>4</sub> en el área preóptica la inducción en la expresión de ambas isoformas por E2 se mantuvo; sin embargo en la corteza cerebral, con el mismo tratamiento, la isoforma B no tuvo modificaciones en su expresión después del tratamiento con P<sub>4</sub>.

En el hipocampo no se observó una inducción en la expresión de las isoformas del RP al administrar E2; sin embargo la P<sub>4</sub> reguló negativamente la expresión de ambas isoformas desde las 6 hasta las 48 horas en esta estructura.

Finalmente, en el hipotálamo no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de las isoformas del RP con los distintos tratamientos. Sin embargo, se ha visto que a nivel de la proteína hay una inducción en la expresión del RP total después de la administración de E2 en diversos núcleos del hipotálamo del cobayo, así como en el núcleo arcuato anterior, medio y posterior y el núcleo ventrolateral anterior (Dufourny, et al., 1997); contrario a lo que se obtuvo en el presente trabajo, lo cual sugiere que existen núcleos específicos con diferente regulación del RP, que con la técnica de Western blot no fue posible detectar, por lo que es necesario utilizar una técnica más sensible para detectar la expresión de las isoformas del RP, como una doble inmunohistoquímica que permita observar dicha expresión en los diferentes núcleos de cada región estudiada.

En el caso del área preóptica se ha analizado el contenido de RP total en diversos núcleos de dicha región cerebral, encontrándose que hay una inducción del receptor al administrar E2 en el núcleo paraventricular y en el área preóptica medial (Brown et al., 1996), que concuerda con la inducción por E2 de las isoformas del RP observada en el presente trabajo, lo que sugiere mayor homogeneidad en esta estructura respecto a la regulación del RP.

Por otro lado, se sabe que la expresión de cada una de las isoformas tiene diferentes funciones, por lo tanto es importante saber cual de ellas se expresa predominantemente en las regiones cerebrales estudiadas; se observó que en el hipotálamo y en el área preóptica no hubo predominio de ninguna isoforma; para el caso del hipocampo sólo predominó la isoforma B a las 24 y 48 horas después del tratamiento con P<sub>4</sub>; en el resto de los tratamientos no hubo diferencias en la expresión de ambas isoformas. En la corteza cerebral predominó también la isoforma B con los tratamientos de vehículo, E2, y después del tratamiento con P<sub>4</sub> de las 3 a las 48 horas.

Se ha reportado la presencia de las isoformas del RP en monos Rhesus ovariectomizados, donde se encontró que en el endometrio RP-A se expresó 5 veces más que RP-B y 1.6 veces más en la hipófisis comparada con la expresión de RP-B, mientras que la relación en el hipotálamo fue 1:1 (Bethea, 1998) lo cual concuerda con nuestros resultados en cuanto a la relación entre las isoformas, no así en inducción por E2.

Datos previos nos indican que en el hipotálamo la expresión de las isoformas del RP a nivel del mensajero se induce con E2 y es regulada negativamente por P<sub>4</sub>. En el área preóptica sólo se observa este patrón de regulación en la isoforma B, mientras que en el hipocampo la expresión de la isoforma A aumenta con E2 y la P<sub>4</sub> no modifica la expresión de ambas isoformas. En la corteza no se observa ninguna modificación en la expresión de las isoformas (Guerra-Araiza, 2002 in press) (Tabla 1).

	RP-A				RP-B			
	RNAm E2	RNAm P <sub>4</sub>	PROTEÍNA E2	PROTEÍNA P <sub>4</sub>	RNAm E2	RNAm P <sub>4</sub>	PROTEÍNA E2	PROTEÍNA P <sub>4</sub>
REGIÓN CEREBRAL HIPOTÁLAMO	↑	↓	-	-	↑	↓	-	-
ÁREA PREÓPTICA	-	-	↑	↑	↑	↓	↑	↑
HIPOCAMPO	↑	-	-	-	-	-	-	↓
CORTEZA	-	-	↑	↑	-	-	-	-

Tabla 1. Comparación de la expresión de las isoformas del RP a nivel del RNAm y a nivel de la proteína en las regiones cerebrales estudiadas. (↑ aumento; ↓ disminución; - sin cambios)

Estas diferencias en el patrón de expresión de las isoformas del RP en el SNC nos indican la importancia de su papel en la regulación de las acciones de la P<sub>4</sub> en regiones específicas del SNC, ya que se sabe que en cerebro las acciones de la P<sub>4</sub> están involucradas funciones fisiológicas como la regulación de la respuesta sexual (Camacho-Arroyo et al., 1995); la excitabilidad neuronal y el sueño (Camacho-Arroyo et al., 1999); la ovulación (Camacho-Arroyo et al., 1995); y la neuroprotección (González et al., 1998 y Vongher y Frye, 1999).

Los RNAm de RP-A y RP-B en la rata dan origen a proteínas de 80 y 120 kDa respectivamente. Estas proteínas son las que finalmente van a ejercer las acciones genómicas de la P<sub>4</sub> en las diferentes regiones del SNC, por lo que es importante saber si los cambios que se presentan a nivel del RNAm se reflejan a nivel de la proteína. En el caso del hipotálamo de coneja hay una relación directa entre la expresión del RNAm y de la proteína, mientras que en el caso la corteza frontal no se observa el mismo patrón, lo que sugiere una regulación post-transcripcional, transcripcional o traduccional de la expresión de las isoformas del RP en dicha región (Camacho-Arroyo 1994, Camacho-Arroyo 1996).

En el hipotálamo las isoformas del RP se regulan positivamente por E2 y negativamente por P<sub>4</sub> a nivel del RNAm, sin embargo a nivel de la proteína no se observó ningún tipo de regulación con ninguno de los tratamientos. En el área preóptica no se observa una variación en la cantidad del RNAm de la isoforma A con

ambos tratamientos mientras que a nivel de la proteína se reguló dicha isoforma positivamente por E2 y P<sub>4</sub>; la isoforma B se reguló positivamente por E2 y negativamente por P<sub>4</sub> a nivel del RNAm y a nivel de la proteína se observó un aumento en la expresión por E2 y P<sub>4</sub>. La isoforma A del RP en el hipocampo se reguló positivamente por E2 a nivel del RNAm mientras que a nivel de la proteína no se observó ningún cambio; de manera interesante a nivel del RNAm la isoforma A no mostró ser regulada por P<sub>4</sub> y a nivel de la proteína hubo una regulación negativa. En esta misma región la isoforma B no mostró cambios a nivel del RNAm con ninguno de los tratamientos, mientras que a nivel de la proteína solo se reguló negativamente por P<sub>4</sub>. En la corteza cerebral sólo la isoforma A indujo su expresión a nivel de la proteína tanto por E2 como por P<sub>4</sub> sin haber observado cambios a nivel de RNAm con ninguno de los tratamientos.

Por lo anterior se sugiere que en la regulación de la expresión de las isoformas del RP intervienen elementos que regulan la transcripción como pueden ser coactivadores y correpresores específicos de los receptores a hormonas esteroides (McKenna, 1999), de los que se ha reportado una distribución diferencial en el SNC de la rata (Meijer 2000).

Algunas de estas proteínas interactúan sobre alguna de las isoformas con diferente afinidad, como es el caso del correpresor denominado silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT), que tiene mayor afinidad por la isoforma A que por la isoforma B. La isoforma A del RP es incapaz de reclutar eficientemente a los coactivadores transcripcionales GRIP-1 (proteína que interactúa con el receptor a glucocorticoides) y el coactivador del receptor a hormonas esteroides (SRC-1), este último también presenta isoformas que difieren en su capacidad de potenciar la transcripción de las isoformas del RP; estas proteínas son reguladas diferencialmente por E2 en la hipófisis de la rata (Misiti, 1998) lo cual sugiere que probablemente pudieran regularse diferencialmente por hormonas esteroides en las diferentes regiones del SNC.

Por otro lado, es importante considerar los mecanismos de degradación proteínica, en los que la fosforilación y la ubiquitinación marcan a la proteína para su posterior degradación; existen registros de que la fosforilación del residuo Ser<sup>284</sup> mediada por proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) es una señal para la degradación del RP por ubiquitinación en el sistema del proteosoma 26S, siendo éste uno de los posibles mecanismos de regulación del contenido de las isoformas del RP a nivel de la proteína.

Otro posible mecanismo de regulación de la expresión de las isoformas del RP es la estabilidad del RNAm, es decir, que el E2 y la P<sub>4</sub> pudieran regular de manera diferente la estabilidad del mensajero dependiendo del tejido y aunque se ha reportado que el E2 aumenta la síntesis del mensajero del RP total sin modificar su degradación, no se sabe como la P<sub>4</sub> pudiera regular la estabilidad de estos mensajeros.

Por lo anterior se puede decir que la regulación de la expresión de las isoformas del RP por hormonas esteroides se presenta de manera célula y tejido-específica, que requiere de mecanismos de regulación muy finos tanto a nivel del RNAm como de la proteína.

A pesar de haber ampliado el panorama de la expresión de las isoformas del RP, es necesario un estudio más preciso en núcleos celulares específicos presentes en cada región cerebral para determinar la regulación y función de las isoformas del RP en las distintas regiones cerebrales; también se requiere de un estudio que demuestre los efectos que tienen los coactivadores y la degradación por el proteosoma 26S en la regulación de la expresión de las isoformas del RP para lograr un mejor entendimiento del papel fisiológico de los efectos de la P<sub>4</sub> mediados por su receptor.

11. CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

- Las isoformas del RP a nivel de la proteína presentan un patrón diferencial de expresión después del tratamiento con E2 y P<sub>4</sub> en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza cerebral de ratas hembras ovariectomizadas.

- A nivel de la proteína la expresión de las isoformas del RP se modificó en el hipotálamo al administrar E2 o E2+P<sub>4</sub>.

En el área preóptica se observó una inducción en la expresión de las isoformas A y B del RP por E2 que se mantuvo con la administración de P<sub>4</sub>.

En el hipocampo se observó una regulación negativa por P<sub>4</sub> en ambas isoformas, sin haber efectos con la administración de E2.

En la corteza cerebral se indujo la expresión de la isoforma A por E2 que se mantuvo con la administración de P<sub>4</sub>, sin que la expresión de la isoforma B mostrara cambios con los mismos tratamientos.

- En el hipotálamo y en el área preóptica no hubo predominio en la expresión de alguna de las isoformas del RP a nivel de la proteína.

En el hipocampo predominó la expresión de la isoforma B a nivel de la proteína a las 24 y 48 horas después de haber administrado P<sub>4</sub> y.

En la corteza cerebral predominó la expresión de la isoforma B a nivel de la proteína al administrar vehículo, E2 y a las 3 horas después de haber administrado P<sub>4</sub>.

- Sólo hubo relación directa en la expresión de la isoforma B del RP de la rata a nivel del RNAm y a nivel de la proteína en el caso del área preóptica, donde se observó una regulación positiva por E2.

## 11. REFERENCIAS

- Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW., 1992. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89:11750-11754.
- Bain DL, Franden MA, McManaman JL, Takimoto GS, Horowitz KB., 2000. The N-terminal region of the human progesterone A-receptor. Structural analysis and the influence of the DNA binding domain. *J. Biol. Chem.* 275:7313-7320.
- Beato M., 1987. Induction of transcription by steroid hormones. *Biochem. Biophys. Acta.* 910:95-102.
- Beato M., 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56:335-344.
- Beck CA, Weigel NL, Edwards DP. 1992. Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol. Endocrinol.* 6:607-620.
- Beier HM., 1968. Uteroglobulin a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochem. Biophys. Acta.* 160:289-291.
- Bethea CL, Widmann AA. 1988. Differential expression of progestin isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of Rhesus macaques. 1988. *Endocrinology.* 139:677-687.
- Brodeur P, Mockus M, McCullough R, Moore LG. 1986. Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. *J. Appl. Physiol.* 60:590-595.
- Brown TJ, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. 1990. Comparison of age and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progestin receptor induction in the rat brain. *Endocrinology.* 126:2965-2972.
- Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA., 1994. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J. Endocrinol.* 142:311-316.
- Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM, Cerbón MA., 1994. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and cerebral cortex of the rabbit. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 50:299-303.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA., 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev. Invest. Clin.* 47:329-340.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Cerbón MA., 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of rabbit. *Neurosci. Lett.* 214:25-28.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA., 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport.* 9(18):3993-3996.

- Camacho-Arroyo I, Hernández Gollas R, Manjarrez J, Alvarado R., 1999. Progesterone microinjections into the pontine reticular formation modify sleep in male and female rats. *Neurosci. Lett.* 269:9-12.
- Cerbón MA, Martínez M, Pérez-Palacios G. 1989. Oestrogen-insensitive progesterone receptors in the central nervous system: physicochemical and immunoreactive characteristic. *J. Neuroendocrinol.* 1:292-298.
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE., 1990. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of heat shock protein-90 complex. *J Biol. Chem.* 265:20686-20691.
- Christensen K, Estes PA, Onate SA, Beck CA, DeMarzo A, Altman M, Liberman BA, St John J, Nordeen SK, Edwards DP., 1991. Characterisation and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol. Endocrinol.* 5:1755-1770.
- Clarke PB, Ovarian steroid hormone receptors and their mechanism of action: In race GE, Brennecke SP (eds) Molecular aspects of placental and fetal Autacoids. CRP Press, Inc, Boca Raton, FL, pp 27-54.
- Clement PB, Young RH, Scully RE., 1991 Clinical syndromes associated with tumors of the female genital tract. *Semin. Diagn. Pathol.* 84:234-249.
- Clemm DL, Macy BL, Santiso-Mere D, McDonnell DP., 1995. The critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 53:487-495.
- Clemm DL, Sherman L, Boonyaratanakornkit V, Schrader W, Weigel N, Edwards DP., 2000. Differential Hormone-Depend phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol.* 14:52-65.
- Conneley OM, Keffelberger DM, Tsa W, Schrader WT, O'Maley B., 1989. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of alternative translation initiation event. *J. Biol. Chem.* 264:14062-14064.
- Csapo AI, Resch BA., 1979. Induction of preterm labor in the rat by antiprogesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 134:823-827.
- Dalkin AC, Paul SJ, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Yasin M, Marshall JC. 1992. Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J. Endocrinol.* 132:39-45.
- Denner LA, Schrader WT, O'Malley BW, Weigel NL. 1990. Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.* 265:16548-16555.
- Denner LA, Weigel NL, Maxwell BL, Schrader WT, O'Malley BW. 1990. Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. *Science.* 250:1740-1743.

- Dluzen DE, Ramírez VD., 1991. Modulatory effects of progesterone upon dopamine release from the corpus striatum of ovariectomized estrogen-treated rats are sterea-specific. *Brain Res.* 538:176-179.
- Duffy MD, Wells TR, Haluska JG, Stouffer RL. 1997. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol. Reprod.* 57:693-699.
- Feil PD, Glasser SR, Toft DO, O'Malley BW., 1972. Progesterone binding in the mouse and rat uterus. *Endocrinol.* 91:738-746.
- Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. 1997. Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 62:449-454.
- Ganong WF., 1993. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of pituitary gland. *Front. Neuroendocrinol.* 14:233-239.
- Giangrande PH, Pollio G, McDonnell., 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 32889-32900.
- Giangrande PH, McDonnell DP., 1999. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent. Prog. Horm. Res.* 54:291-313.
- González-Arenas AA, Reyna-Neyra A, Gomez MJ, Mendez I, Larrieta-Carrasco ME, Haces ML, Jimenez B, Camacho-Arroyo I. 2001. Los mensajeros químicos del sistema neuroendócrino. *Educ. Quím.* 3:158-162.
- González-Morán G, Camacho-Arroyo I., 1998. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat. Histol. Embryol.* 27:277-282.
- González-Vidal MD, Cervera-Gavira M, Ruelas R, Escobar A, Morali G, Cervantes M. 1998. Progesterone: protective effects on the rat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch. Med. Res.* 29:117-124.
- Gore-Langton RE. 1988. Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 57:187-198.
- Goroscope WC, Freeman ME., 1985. Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion in vitro. *Biol. Reprod.* 32:279-283.
- Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL., 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 55:5063-5068.
- Graham JD, Clarke CL., 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18:502-519.

- Green IC, Howell SL, El Seifi S, Perrin D., 1978. Binding of 3h-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetol.*15:349-355.
- Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. 2000. Progesterone receptor isoforms expresión pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci.* 73: 1743-1752.
- Gunnet JW, Granger K, Cryan E, Demarest KT. 1999. Characterization of the progestin receptors in the human TE85 and murine MC3T3-E1 osteoblast-like cell lines. *J. Endocrinol.* 163:139-147.
- Horwitz KB, McGuire WL., 1975. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids.* 25:497-505.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takamoto GS, Tung L., 1996. Nuclear receptor coactivators and represors. *Mol. Endocrinol.*10:1167-1177.
- Hurd C, Khatteere N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK., 1995. Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47-D human breast carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* 270:28507-28510.
- Hsue AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr., 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.*5:76-127.
- Huse B, Verca SB, Matthey P, Rusconi S., 1998. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.*12:1334-1342.
- Hutchison JS, Nelson PB, Zeleznik AJ., 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on *corpus luteum* function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology.*119:1964-1971.
- Hurd C, Khatteere N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK. 1995. Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47-D human breast carcinoma cell line. *J. Biol. Chem.* 270:28507-28510.
- Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS. 1992. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4658-4662.
- Ing NH, Beekman JM, Kessler DJ, Murphy M, Jayaraman K, Zenguei JG, Hogan ME, O'Malley BW, Tsai MJ., 1993. *In vivo* transcription of a progesterone responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic. Acids Res.* 21:2789-2796.
- Ilenchuk T, Walters M. 1987. Rat uterine progesterone receptor analyzed by 3H-R5020 photoaffinity labeling, evidence that A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology.* 120:1449-1456.
- Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1997. Steroid receptor induction of gene transcription a two step model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:7879-7884.

- Karavolas HJ, Hodges DR., 1990. Neuroendocrine metabolism of progesterone and related progestins. *Ciba Found Symp.*153:22-44.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9:1603-1614.
- Kastrup Y, Hallbeck M, Amandusson A, Hirata S, Hermanson O, Blomquist A. 1999. Progesterone receptor expression in the rat brainstem of the female rat. *Neurosci. Lett.* 275: 85-88.
- Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N. 1993. The ontogeny of gene expression of progesterone receptors in the female rat brain. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 47:173-182.
- Ke FC, Ramirez VD., 1987. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalamia in vitro. *Neuroendocrinology* 45:514-517.
- Knobil E. 1988.The hypothalamic gonadotrophic hormone releasing hormone (GnRH) pulse generator in the rhesus monkey and its neuroendocrine control. *Hum. Reprod.* 3:29-31.
- Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, Weigel NL. 2001. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J. Biol. Chem.*. 276:8475-8483.
- Kraus WL, Katzenellenbogen BS., 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone end sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology.* 132:2371-2396.
- Lessey BA, Alexander PS, Horowitz KB., 1983. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity labelling. *Endocrinology.* 112:1267-1274.
- Litwack G., 1992. Remembrance: steps leading to the identification, purification, and characterization of the glucocorticoid receptor. *Endocrinology.* 130:2433-2434.
- MacLusky Mj, McEwen BS. 1978. Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature.* 274:276-278.
- Mahesh V, Brann D., Hendry L., 1996. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 56:209-219.
- Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, Weigel LN. 1997. Differential expression of uterine progesterone receptors forms A and B during the menstrual cycle. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 63:195-202.

- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20:321-344.
- Meizel S, Turner KO., 1991. Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol. Cell. Endocrinol.* 77:R1-5.
- Mendoza-Rodriguez CA, Camacho-Arroyo I, Garcia GA, Cerbón MA., 1999. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception.* 59:339-343.
- Milgrom E, Baulieu EE., 1970. Progesterone in uterus and the plasma. II. The role of hormone availability and metabolism on selective binding to uterus protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40:723-733.
- Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E., 1987. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143:740-748.
- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E. 1993. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochem. Biophys. Acta.* 1216:289-292.
- Murphy LJ, Sutherland RL, Stead B, Murphy LC, Lazarus L., 1986. Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* 46:728-734.
- Musgrove EA, Lee Cs, Sutherland RL., 1991. Progestins both stimulate and inhibit breast cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, c-fos and c-myc genes. *Mol. Cell. Biol.* 11:5032-5043.
- Musgrove EA, Hamilton JA, Lee Cs, Sweeney KJ, Watts CK, Sutherland RL., 1993. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation on cyclin gene expression associated with changes in T47-D human breast cancer cell progression. *Mol. Cell. Biol.* 13:3577-3587.
- Passinen S, Haverinen M, Pekki A, Rauta J, Paranko J, Syvala H, Tuohimaa P, Yikomi T., 1999. Only a small portion of cytoplasmic progesterone receptor is associated with Hsp 90 in vivo. *J. Cell. Biochem.* 74:458-467.
- Pearce PT, Khalid BAK, Funder JW., 1983. Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology.* 113:1287-1291.
- Pérez-Palacios, 1985. Mecanismos de acción de hormonas esteroides en bioquímica e inmunología. Vol 2. Cap VI, Ed. Hicks, J y Díaz-Agaya J.C: UNAM. México. 346-370.
- Perrot-Appianat M, David-Ferreira JF., 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. *Cell Tissue Res.* 223:1511-1519
- Perrot-Appianat M, Groyer-picard MT, Garcia E, Lorenzo F, Milgrom E., 1988. Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in

- muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology*. 123:1511-1519.
- Petetti N, Etgen AM., 1992. Progesterone promotes rapid desensitization of alpha 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology*. 55:1-8.
  - Poletti A, Weigel NL. 1993. Identification of a hormone-dependent phosphorylation site adjacent to the DNA-binding domain of the chicken progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 7:241-246.
  - Pollow K, Boquoi E, Baumann J, Schmidt-Gollwitzer M, Pollow B., 1977. Comparison of the in vitro conversion of estradiol-17 beta to estrone of normal and neoplastic human breast tissue. *Mol. Cell. Endocrinology*. 6:333-348.
  - Rodriguez R, Carson MA, Weigel NL, O'Malley BW, Schrader WT., 1990. Dimerization of the chicken progesterone receptor in vitro can occur in the absence of hormone and DNA. *Mol. Endocrinol.* 4:1782-1790.
  - Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. 1999. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J. Biol. Chem.* 274:22296-22302.
  - Rotchild I, 1983. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin CW, Milgromm E, Mauvais-Jarvis P (eds) Progesterone and progestins. *Raven Press, New York*. pp 219-229.
  - Rowan B, Garrison N, Weigel NL, O'Malley BW. 2000. Progesterone receptor coactivators. *Mol. Cell. Biol.* 20:8720-8730.
  - Sartorius CA, Groshong SD, Miller LA, Powell RL, Tung L, Takimoto GS, Horwita KB., 1994. New T47-D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B and A receptors: only antiprogestin occupied B receptors are switched to transcriptional agonist by cAMP. *Cancer Res.* 54:3868-3877.
  - Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E., 1990. Molecular action of progesterone. *Int. J. Biochem.* 22:579-594.
  - Savouret JF, Baily A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A, Milgrom E. 1991. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J.* 10:1875-1883.
  - Schaeffer C, Roos J, Aron C. 1990. Lordosis behavior in intact male rats: effects of hormonal treatment and/or manipulation of the olfactory system. *Horm. Behav.* 24:50-61.
  - Schrader WT, Birnbaumer ME, Hughes MR, Weigel NL, Grody W W, O'Malley BW., 1981. Studies on the structure and function of the chicken progesterone receptor. *Recent. Prog. Horm. Res.* 37:583-633.
  - Schowalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson ADW, Soneely , O'Malley BW, Toft DO., 1991. Characterization of progesterone receptor binding to the 90 and 70-kDa heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266:21165-21173.

- Schoonen WG, Dijkema R, de Ries RJ, Wagenaars JL, Joosten JW, de Gooyer ME, Deckers GH, Kloosterboer HJ., 1998. Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells. II. Comparison of binding transactivation and ED50 values of several synthetic (anti) progestagens in vitro in CHO and MCF-7 cells and in vivo in rabbits and rats. *J. Steroids Biochem. Mol. Biol.* 64:157-170.
- Sheridan PL, Krett NL, Gordon JA, Horwitz KB. 1988. Human progesterone receptor transformation and nuclear down-regulation are independent of phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* 2:1329-1342.
- Sheridan PL, Evans RM, Horowitz KB. 1989. Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J. Biol. Chem.* 264:6520-6528.
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, et al. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature.* 389: 194-198.
- Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptor in human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum. Reprod.* 9:1589-1595.
- Stein DC. 2001. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trend neurosci.* 24:386-391.
- Szabo M, Kilien SM, Nho SJ, Schwartz NB. 2000. Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. *Biol. Reprod.* 62:95-102.
- Takimoto GS, Holland AR, Taste DM, Melvin MY, Tung L, Horwitz KB., 1996. Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 271:13308-13311.
- Terner C. 1977. Progesterone and progestins in the male reproductive system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 286:313-20.
- Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Fenichel P, Fehlmann M., 1992. Progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane. *FEBS Lett.* 1308:116-120.
- Theveny B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E., 1987. Association of DNA-bound progesterone receptors. *Nature.* 329:79-81.
- Topper YJ, Freeman CS. 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* 60:1049-1060.
- Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P., 1988. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature.* 333:185-188.
- Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horowitz KB., 1993. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol. Endocrinol.* 7:1256-1266.

- Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K. 1999. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology*. 140:805-813.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP., 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7:1244-1255.
- Vongher JM, Fry CA. 1999. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64:777-785.
- Wagner BL, Norris JD, Knotts TA, Weigel NL, McDonnell DP. 1998. The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. *Mol Cell. Biol.* 18:1369-1378.
- Warembourg M, Jolivet A, Milgrom E., 1989. Immunohistochemical evidence the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea-pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res.* 480:1-15.
- Wei LL, Krett NL, Francis MD, Gordon DF, Wood WM, O'Malley BW, Horwitz KB. 1988. Multiple human progesterone receptor messenger ribonucleic acids and their autoregulation by progestin agonists and antagonists in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 2:62-72.
- Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM. 1993. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195:525-532.
- Weisz J, Ward IL. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology*. 106:306-316.
- Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP., 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:8356-8364.
- Wong MSJ, Murphy LC, 1991. Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T47-D human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39:39-44.
- Ylikomi T, Gasc JM, Isola J, Baulieu EE, Tuohimaa P., 1985. Progesterone receptor in the chick bursa of fabricius: characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology*. 117:155-160.
- Zhang X, Jeyakumar M, Bagchi M., 1996. Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 271:14825-14833.
- Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK., 1998. A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 12:513-524.

- Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement JPM, Prendergast P, Yip TT, Hutchens TW, Edwards DP, Weigel NL. 1997. Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol. Endocrinol.* 11:823-832.
- Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL. 1995. *Mol. Endocrinol.* 9:1029-1040
- Zwain IH, Yen SS. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* 140:3843-3852.

12. APÉNDICE

TBS

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
* pH 7.5	

Solución de corrida

Tris	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1 %
* pH 8.3	

Solución de transferencia 4X

Tris	153.6 mM
Glicina	0.73 M

Solución de transferencia 1X

Tris	38 mM
Glicina	180 mM
metanol	20 %

Solución de bloqueo

leche descremada en polvo	5 %
---------------------------	-----

albúmina	0.5 %
----------	-------

\* preparar en TBS 7.5

Buffer de lisis

DTT	1mM
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1mM
Glicerol	30 %
leupeptina	4 µg/ml
aprotinina	22.5 µg/ml
PMSF	1 mM
Ortovanadato	1 mM
Azida	15 mM
Tritón	1 %

\*Preparar en TBS pH 7.5

**Buffer de carga**

Tris	50 mM
SDS	2 %
Mercapto	5 %
Bromofenol	0.1 %
glicerol	10 %

**Anticuerpos utilizados**

- Anticuerpo monoclonal anti-RP (IgG) 1 $\mu$ g/ml (Santa Cruz sc-810).
- Anticuerpo anti-ratón (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa 0.24  $\mu$ g/ml (Santa Cruz sc-2005).
- Anticuerpo anti-actina 1 $\mu$ g/ml (Santa Cruz sc-1615)
- Anticuerpo anti-cabra (IgG-HRP)conjugado a peroxidasa 0.24  $\mu$ g/ml (Santa Cruz sc-2033).

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**