



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO DE LA EXPRESION DEL RECEPTOR A  
PROGESTERONA EN EL HIPOTALAMO Y AREA PREOPTICA  
DE RATAS DESFEMINIZADAS**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
**P R E S E N T A :**  
**LETICIA BERENICE DIAZ IBAÑEZ**



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**

2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Jurado Asignado:

Presidente Prof. Arturo Víctor Rosales Olivares

Vocal Prof. Raquel Ortega Muñoz

Secretario Prof. Isabel Arrieta Cruz

1er. Suplente Prof. María Adelina Jiménez Arellanes

2do. Suplente Prof. Enrique Moreno Saenz

Sitio donde se desarrollo el Tema:

Laboratorio de Investigación en Endocrinología Molecular. Departamento de Biología. Facultad de Química. UNAM.

Asesor del Tema:



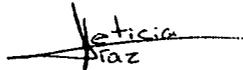
Med. Cir. Isabel Arrieta Cruz

Supervisor Técnico:



Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Sustentante:



Leticia Berenice Díaz Ibáñez

***La mitad de la vida es suerte; la otra mitad debe ser disciplina, pues sin esta no sabremos administrar la buena suerte.***

Voltaire

***Con la moral corregimos los errores de nuestros instintos y con el amor corregimos los errores de nuestra moral.***

José Ortega y Gasset

***La sabiduría suprema era tener sueños bastante grandes para no perderlos de vista mientras se persiguen.***

William Faulkner

***La venganza es una herencia de las almas débiles; nunca se cobija en los corazones fuertes.***

Karl Körner

***No hay criatura sin amor,  
ni amor sin celos,  
ni celos libres de engaños,  
ni engaños sin fundamentos.***

Tirso de Molina

***La libertad es como la vida, sólo la merece quien sabe conquistarla todos los días.***

Goethe

**Lo que representa este trabajo está dedicado:**

**A Dios, a la Virgen de Guadalupe, a San Chárbel y a San Judas Tadeo que me cubren todos los días con su manto protector.**

**A mi Abuelito Juan, espero ser lo más cercano a tus anhelos, haber cumplido uno de tus sueños, y porque sé que al final del camino tú estarás para guiarme a mi siguiente morada. Te extraño muchísimo.**

**A mi Papá que eres la fortaleza que necesito y la presencia que me da deseos de continuar. Te quiero mucho.**

**A mi Mamá por ayudarme a dar los primeros pasos y porque sigues pendiente de mí. Te quiero mucho.**

**A Javier y a Rodrigo por ser mis hermanos, mis compañeros de juegos y de penas, gracias por darme lecciones: muchas buenas, algunas dolorosas y por ser mis acompañantes en esta vida. Los quiero mucho.**

**A mi Abuelito Javier por que estuviste pendiente de mis logros y fracasos, por haber estado orgulloso de mí, por tenerme en tus pensamientos. Esperando algún día encontrarnos en la siguiente morada.**

**Al Sr. Ramón Monreal-Vera y a la Sra. Hilda Ruiz por ser mis amigos, muchas veces mis maestros y otras tantas: mis padres.**

**A Lety M-V. por ser la hermana que no tengo, por prestarme a tus papás cada vez que los necesitaba, por ser tú.**

**A Ivette, Karin y Bivian por ser parte en mi vida, mis amigas, mi niña querida (Bibis), por querer a mi madre.**

**A Mis amigos de la "Prado" (Ariane, Pancho, Julieta y Magally) por la antigüedad, por todos esos buenos momentos, por las grandes carcajadas (P y M), por las puntadas, por ser mis hermanos, porque los quiero.**

**A Marcela porque los años vividos no han sido en balde; hemos reído, llorado, sufrido, peleado juntas ante todo y ante todos, seguimos con el lazo más firme y con los sueños más resueltos, gracias por significar tanto para mí, por ser mi hermana y mi amiga.**

**A Mis amigas de la Prepa 6 (Adriana, Claudia, Alejandra y Nadia) por todos los buenos ratos, las excelentes pláticas, por escuchar mis estadísticas, por soportar mis rabiets, por quererme y porque yo las quiero, hermanas.**

**A Mis amigos de la FQ (Diana, Octavio, Joel, Jesús, Maribel, Elvira, Raquel, Miguel M, Miguel V, Claudia S, Angel, Carlos, Nayelly, Erika, Tama, Jorge, Yeriley, Jéssica, Paty, Alvaro, Lety R, Yeni, Vicky, Iván, Adrián, Vero T, Marcela M) porque sufrimos las mismas penas, los mismos triunfos y salimos adelante. Porque espero que el día que nos encontremos nos recordemos con cariño. Los quiero.**

**A Josefina por enseñarme que se puede tener fortaleza en la adversidad, por ser tan luchona, tan paciente y por ser mi amiga.**

**A Fernando por ser como eres, por escucharme, por hacerme ver que las situaciones no son tan malas como parecen, por tenerme tanta confianza y por creer en mí, gracias amigo.**

**A LuzMa que hemos compartido penas, salimos triunfadoras y optimistas, gracias por darme palabras de aliento y por enseñarme el camino de Dios sin mencionarlo.**

**A Laura gracias por tenerme confianza, por darme buenos y malos consejos, por hacer más llevadera la vida, por contagiarme tu locura, por ser mi amiga.**

**A Lety D. por todas esas horas de angustias contagiadas, por darme palmadas de aliento en los momentos críticos, por enseñarme que no son malos o peores los ratos pasados, por ser mi compañera de banca, de vida y mi amiguita.**

**A Vero, te agradezco el escucharme, por compartir tus pensamientos, por darme todos esos consejos, por ayudarme a buscar el lado lógico de todo lo que nos pasa, por tus analogías, por tu amistad.**

**A Nelly por darme la oportunidad de conocerte, por todo ese apoyo tanto en lo escolar como en lo personal, por los cientos de pláticas. Gracias amiga**

**A la M en C Rebeca Ugalde, le agradezco el que me escuche, el que crea en mí, el haber depositado su confianza en su alumna, por ser mi maestra.**

**A la QFB Alicia Cervantes, le agradezco el que me haya permitido el ser parte de su equipo, tenerme confianza en realizar parte de su labor y el aprender de usted como persona y como maestra.**

**A Isabel por tenerme confianza como tu alumna y como amiga, gracias por compartir muy buenos momentos y también por los malos, porque estos me dejaron grandes enseñanzas.**

**A Paola y Mauricio gracias por apoyarme, por creer en mí, por el par de ojos que necesité de más (M), por todas esas largas charlas: de chisme, de la vida y de nuestro tema del Viernes, por ser mis amigos.**

**A mis compañeros y amigos del Lab 202 (Adriana, Gaby M., Luciano, Lupita, Dr. García T, Martín, Gaby G., Aliesha, Olga, Andrea, Christian, Elizabeth, José, Mago, Sylvia, Tere, Angélica, Marcela, Carmen, Rosalba, Dra. Quintero, Dr. Camacho y nuevos miembros del equipo) por la buena y mala música, por sus porras, por los momentos de convivencia, las pláticas en la comida, por su compañía y por haber pasado en mi vida.**

**Al cariño más sincero que recibo día a día: Cotorri y Bali.**

**A la UNAM (ENP 6 Antonio Caso y Facultad de Química), por todos los conocimientos, la formación profesional y personal, por los recuerdos y las personas.**

**Agradecimientos:**

**Dra. Isabel Arrieta.** Te agradezco que me hayas permitido el formar parte de tu proyecto, que hayas compartido tantas y tantas horas de trabajo y conocimiento y que con el paso del largo tiempo de tesis hemos logrado un buen resultado.

**Dr. Marco Cerbón.** Le agradezco la confianza que me tuvo en ser parte de su equipo de trabajo, el apoyo que recibí y las enseñanzas día a día.

**Dra. Adriana Mendoza, Dr. Mauricio Rodríguez, M. en C. Nelly Téllez, Dra. Paola Arteaga, QFB Gabriela Monroy, QFB Luciano Mendoza y Dra. Norma Moreno.** Les agradezco la asistencia técnica para la término de este trabajo.

**A los miembros del Jurado los Profesores: Arturo Rosales, Raquel Ortega, Adelina Jiménez y Enrique Moreno.** Les agradezco las correcciones y comentarios realizados en el trabajo escrito.

## INDICE

<b>1.0 Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>2.0 Introducción .....</b>	<b>4</b>
<b>3.0 Antecedentes.....</b>	<b>6</b>
3.1 Estructura y función de las hormonas esteroides.....	6
3.1.1 Generalidades.....	6
3.2 Estructura y función de los receptores a hormonas esteroides.....	9
3.3 Mecanismo de acción de las hormonas esteroides.....	11
3.4 Receptor a progesterona.....	12
3.4.1 Generalidades.....	12
3.4.2 Papel del receptor a progesterona en el Sistema Nervioso Central .....	15
3.5 Efecto de las hormonas gonadales sobre la diferenciación sexual del hipotálamo.....	17
3.5.2 Regulación neuroendocrina durante la diferenciación sexual del cerebro.....	17
3.5.3 Modelo farmacológico de la desfeminización hipotalámica.....	21
<b>4.0 Objetivo general.....</b>	<b>25</b>
4.1 Objetivos específicos.....	25
<b>5.0 Planteamiento del problema.....</b>	<b>26</b>
<b>6.0 Hipótesis.....</b>	<b>27</b>
<b>7.0 Materiales y métodos.....</b>	<b>28</b>
7.1 Animales de experimentación.....	28
7.2 Diseño experimental.....	28

7.3 Obtención de tejidos.....	29
7.4 Análisis inmunohistoquímico.....	33
<b>8.0 Resultados.....</b>	<b>34</b>
<b>9.0 Discusión.....</b>	<b>41</b>
<b>10.0 Conclusiones.....</b>	<b>44</b>
<b>11.0 Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>45</b>
<b>12.0 Apéndice.....</b>	<b>53</b>
<b>13.0 Abreviaturas.....</b>	<b>58</b>

## 1.0 RESUMEN

Las hormonas esteroideas sexuales juegan un papel muy importante en la diferenciación, el desarrollo y la función del cerebro de los mamíferos. Los estrógenos inducen la formación de vías neuronales durante la vida fetal y neonatal, que modulan la actividad de las conexiones neuronales en el adulto.

El objetivo del presente estudio fue determinar el patrón de expresión de la proteína del receptor a progesterona (RP) en el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) y en la región del hipotálamo posterior (HYP) después de la administración de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y testosterona (T) durante el periodo crítico de la diferenciación postnatal del cerebro de la rata hembra. Ratas de 3 días de edad ( $n = 24$ ) recibieron por vía subcutánea una dosis única de  $E_2$  (200  $\mu\text{g}$ ) o de enantato de T (200  $\mu\text{g}$ ) o aceite de maíz (ratas control). El POA-AHA y el HYP de estos animales tratados a los 3 días de edad, se obtuvieron el día de la apertura vaginal (AV). Un grupo de animales previamente tratados ( $n = 12$ ), se les administró por vía intraperitoneal  $E_2$  (5  $\mu\text{g}$ ) en el tiempo de la AV; el HYP y el POA-AHA de estos animales se obtuvieron 3 horas después. Mediante la técnica inmunohistoquímica se detectó y se cuantificó la expresión de la proteína del RP en la región del POA-AHA (que incluye el núcleo preóptico medial (NPM) y el núcleo paraventricular (PVN)) y en la región del HYP (que incluye el núcleo ventromedial (VMN) y el núcleo arcuato (ARC)); estas áreas están involucradas en el proceso de la diferenciación sexual. Los resultados muestran que las ratas tratadas a los 3 días de edad con T y  $E_2$  presentan un incremento en la expresión de la proteína del RP en las diferentes regiones a estudiar, en el día de la AV, en comparación con los animales controles. En contraste, los animales desfeminizados con T que recibieron el tratamiento agudo de  $E_2$  por vía intraperitoneal en el día de la AV, no mostraron modificación en la expresión de la proteína del RP. Resulta interesante que en los animales desfeminizados con  $E_2$  se observó una disminución significativa de la expresión del RP al estímulo agudo con  $E_2$ . Estos resultados demuestran que la administración temprana de hormonas esteroideas sexuales en el periodo crítico de la diferenciación sexual del cerebro, produce cambios bioquímicos y moleculares que alteran la expresión de la proteína del RP en las regiones del POA-AHA y del HYP.

## 2.0 INTRODUCCION

Las hormonas esteroides desempeñan un papel importante en la regulación de múltiples procesos biológicos de los mamíferos, entre los que se destaca la homeostasis, el dimorfismo sexual, la función reproductiva y la respuesta al estrés. Entre las hormonas esteroides sexuales se encuentran los estrógenos, las progestinas y los andrógenos.

Estas hormonas modifican la actividad celular al interactuar con sus receptores específicos. Los receptores a hormonas esteroides sexuales son moléculas proteicas, que se localizan en el núcleo de la célula y son parte de la familia de factores de la transcripción, que inducen o inhiben la expresión de genes específicos a través de su interacción con distintas secuencias específicas en el DNA, denominadas elementos de respuesta esteroides (EREs)(Litwack y Schmidt, 2001).

Las hormonas esteroides gonadales participan en diversas funciones del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, tales como la diferenciación neuronal, la organización sexual del cerebro, la reproducción, la conducta sexual y la excitabilidad neuronal. En el SNC los estrógenos regulan la expresión de múltiples genes, entre los cuales se encuentran: el que codifica para su propio receptor, para el RP y para enzimas de síntesis de neurotransmisores y neuropéptidos. (McEwen y Alves, 1999)

Se ha demostrado que el gen del RP es regulado a la alta por estrógenos en el HYP y el POA de la rata, esta regulación está mediada por el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) localizado en la región promotora de este gen. Estudios ontogénicos en la rata indican que el RNAm y la proteína del RP se expresan durante el periodo neonatal en el HYP, el POA y las regiones de la corteza cerebral, y esta expresión cambia en estas áreas durante el desarrollo. Estudios como el de Kato y colaboradores han demostrado que el RP es requerido para la conducta sexual de la hembra normal en los mamíferos. (Kato y Onouchi, 1983).

Se conoce que la exposición de roedores a altos niveles de E<sub>2</sub> o T durante los primeros cinco días de vida postnatal producen cambios en la fisiología

reproductiva de animales en etapas adultas. La administración de E<sub>2</sub> o T, en el periodo crítico postnatal de la diferenciación sexual del cerebro de la rata induce desfeminización. Los animales desfeminizados presentan un síndrome de estro persistente caracterizado por: desarrollo anormal de genitales externos, cornificación vaginal, anovulación, alteración permanente en la secreción de gonadotropinas, supresión de la conducta sexual de la hembra. (Gorski, 1968).

### **3.0 ANTECEDENTES**

#### **3.1 Estructura y función de las hormonas esteroideas.**

##### **3.1.1 Generalidades.**

Las hormonas esteroideas son lípidos no saponificables, solubles en diversos disolventes orgánicos; estructuralmente presentan un núcleo químico básico: el ciclo pentanoperhidrofenantreno (hidrocarburo cíclico constituido por diecisiete átomos de carbono, dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono y otro anillo con cinco átomos de carbono). El término esteroide se deriva de la palabra griega *estéreas* = sólido. La mayoría de estos esteroideos son sintetizados en el ovario, el testículo y las glándulas adrenales utilizando al colesterol como precursor (Zhang *et al.*, 1996).

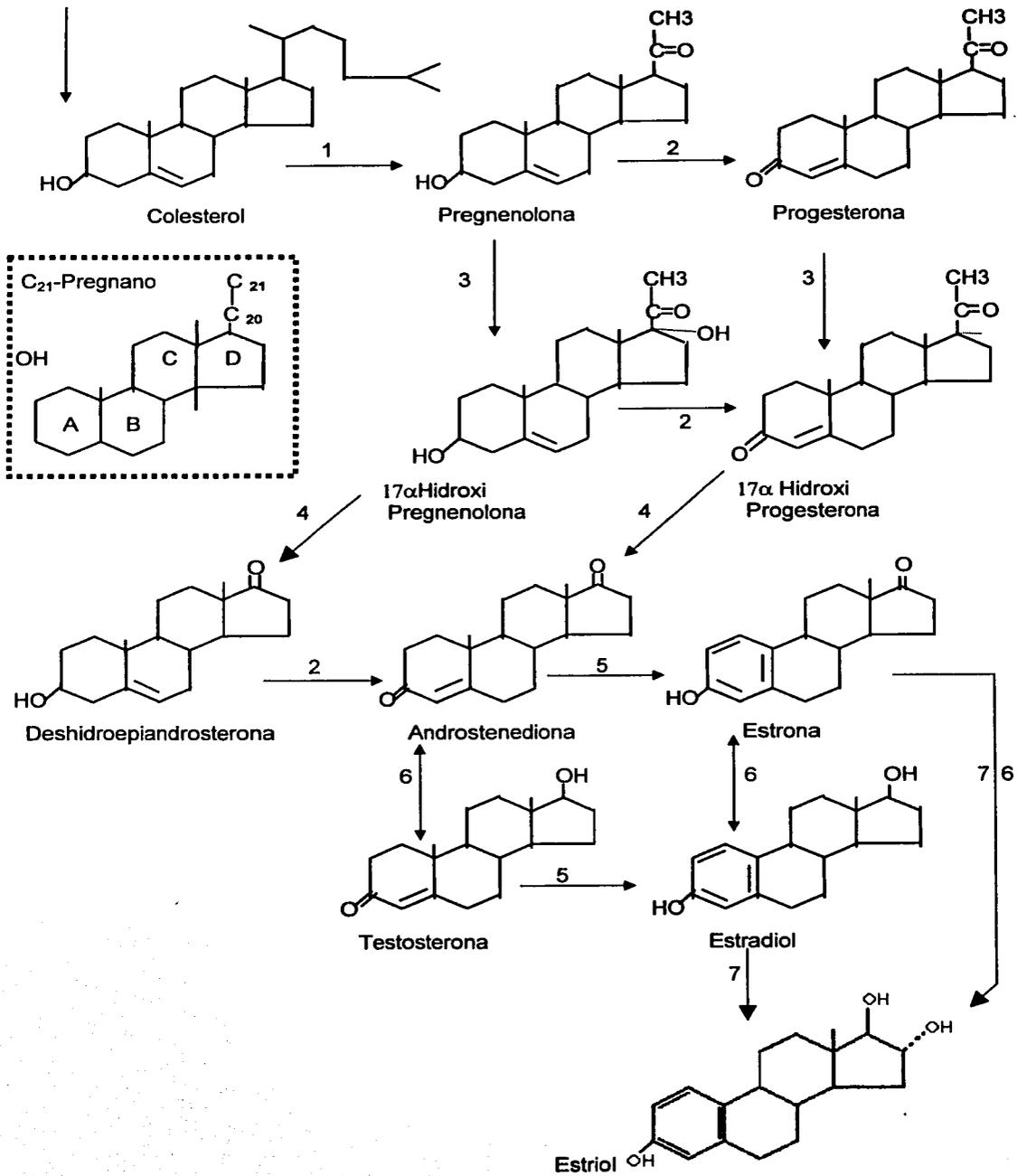
El estrógeno natural más potente en los seres humanos es el E<sub>2</sub>, seguido por la estrona y el estriol. Cada una de esas moléculas es un esteroide de 18 átomos de carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β-hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a su receptor. El E<sub>2</sub> es sintetizado en el ovario por células de la granulosa a partir de andrógenos proporcionados por la células de la teca. El E<sub>2</sub> secretado se oxida de manera reversible hasta generar estrona mediante la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, y esos dos estrógenos pueden convertirse en estriol. Esas transformaciones ocurren principalmente en el hígado (Shoham y Schachter, 1996).

La T es secretada en los testículos y es el principal andrógeno en el plasma de los machos. En las hembras, tanto los ovarios como las glándulas suprarrenales sintetizan pequeñas cantidades de esta hormona. En muchos tejidos blanco para andrógenos, la T se reduce en la posición 5α hacia dihidrotestosterona (DHT), que sirve como mediador intracelular de todos los efectos de T. La T, pero no la DHT también puede aromatizar hacia E<sub>2</sub> en diversos tejidos extraglandulares, como algunas áreas del SNC, vía que explica la mayor parte de la síntesis de estrógenos en los machos y las mujeres postmenopáusicas (Simpson, 2002).

La progesterona (4-pregnen-3,20-diona) ( $P_4$ ) pertenece al grupo de las hormonas esteroideas, 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) está constituido por 21 átomos de carbono. La  $P_4$  se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso, de 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 hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y los agentes  $\beta$ -adrenérgicos (Graham y Clarke 1997). Otros órganos donde también se ha demostrado la síntesis de  $P_4$  en la corteza suprarrenal, la placenta (Pomata *et al.*, 2000) y el testículo este último que biosintetiza la  $P_4$  como intermediario de la formación de otras hormonas esteroideas (Weisz y Ward, 1980). Ver Figura 1.

**Figura 1 (Página siguiente). Síntesis de los principales esteroides sexuales.** 1) 20, 22 Desmolasa; 2)  $3\alpha$ -OH-esteroide deshidrogenasa. 3)  $17\alpha$ -hidroxilasa, 4) 17, 20-esteroide liasa (desmolasa), 5) aromatas, 6)  $17\alpha$ -OH-esteroide deshidrogenasa 7)  $16\alpha$ -hidroxilasa. En el recuadro se encuentra la estructura del pregnano al igual que de las letras con las que se denominan a cada uno de los anillos de la estructura principal de las hormonas esteroideas (A, B, C, D) (Gore-Langton, 1988).

Acetato

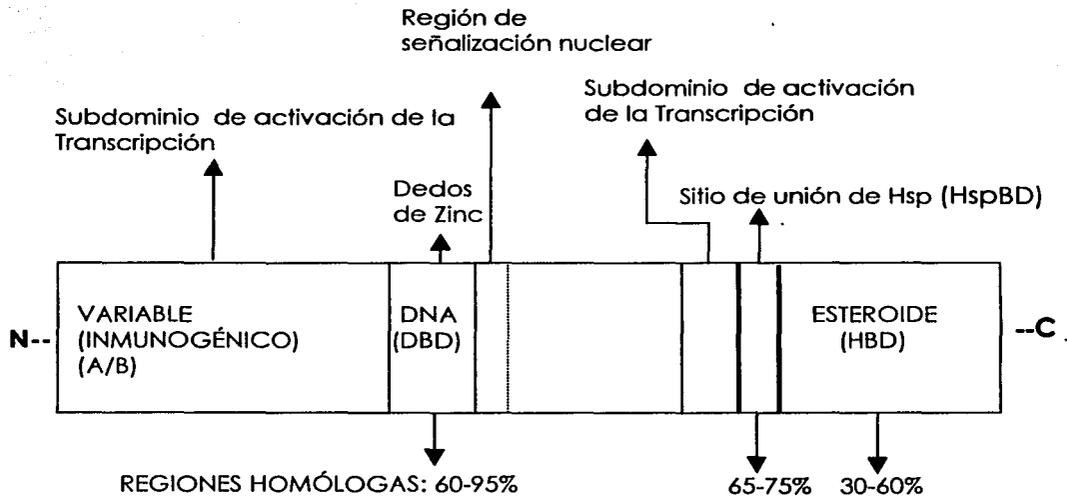


### 3.2 Estructura y función de los receptores a hormonas esteroideas.

Las hormonas esteroideas ejercen su efecto a través de su unión con receptores específicos. Estos receptores están localizados en el núcleo y el citoplasma de las células blanco, regulan la transcripción de complejas redes de genes y por lo tanto controlan diversos aspectos del crecimiento, el desarrollo y la homeostasis. Se han caracterizado receptores a hormonas esteroideas, hormonas tiroideas, ácido retinoico, vitamina D, así como una gran variedad de proteínas de las cuales se desconoce su ligando, los llamados receptores huérfanos (Graham y Clarke, 1997).

Se han realizado estudios estructurales y funcionales de los receptores a hormonas esteroideas con el objetivo de entender cómo regulan la transcripción de genes específicos. Todos los miembros de receptores a hormonas esteroideas comparten características estructurales y funcionales. Los receptores de esta familia tienen tres dominios estructuralmente conservados, localizados en el extremo carboxi-terminal, estos dominios son: 1) el de unión a la hormona llamado *Hormone Binding Domain* (HBD), que es importante para la regulación de la transcripción del receptor; 2) el dominio de unión al DNA llamado *DNA Binding Domain* (DBD), que es una región altamente conservada entre los miembros de la familia de receptores a hormonas esteroideas, además es importante para la integridad estructural y la función de unión al DNA; y 3) el dominio de unión a proteínas de choque térmico llamado *Heat shock protein Binding Domain* (HspBD) cuya función es la localización nuclear del receptor (Evans, 1988).

En el extremo amino-terminal del receptor se encuentra un dominio variable (A/B). Este dominio varía tanto en tamaño como en secuencia y está involucrado en la regulación de la transcripción génica tejido y promotor específico (Berry y Pescovitz, 1990), así como en la formación de homodímeros y heterodímeros con otros factores de transcripción (Landers y Spelsberg, 1992). Ver Figura 2.



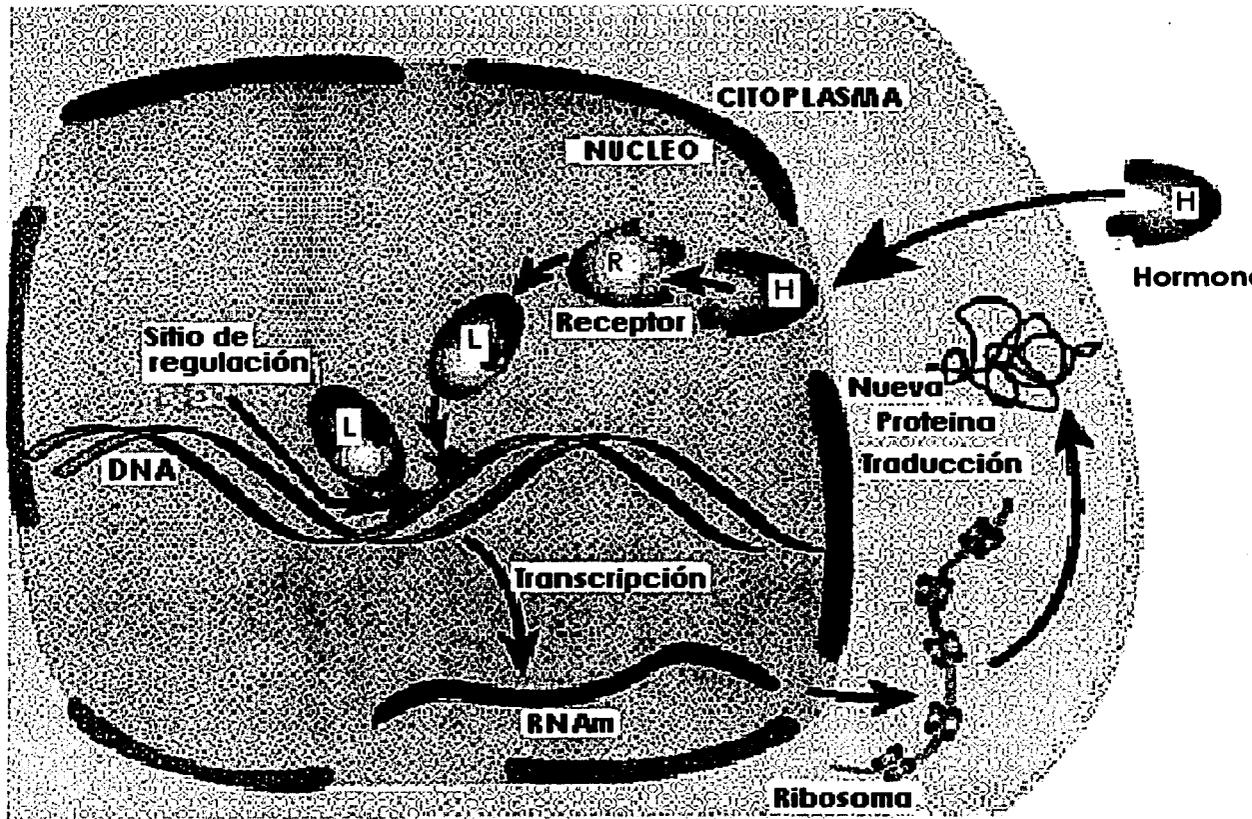
**Figura 2. Modelo del gen que codifica para un receptor a hormona esteroide.** El extremo amino-terminal (N) es una región variable (A/B) que activa la transcripción; el extremo carboxilo-terminal (C) comparte homología con la superfamilia de receptores a hormonas esteroideas (HBD); también contiene el sitio de unión al DNA (DBD), el de unión a proteína de choque térmico (HspBD) y la región de señalización nuclear. (Evans, 1988).

### **3.3 Mecanismo de acción de las hormonas esteroideas.**

Los mecanismos moleculares por medio de los cuales los esteroideos sexuales realizan sus efectos biológicos son los siguientes:

El esteroide libre se difunde pasivamente dentro su célula blanco hasta llegar al núcleo, ahí es retenido por medio de la formación de un complejo de alta afinidad con el receptor específico. La unión del esteroide con su receptor genera cambios conformacionales en este último. Estos cambios en la estructura permiten que el complejo hormona-receptor se una con alta afinidad a los ERE. Estos elementos reguladores son secuencias palindrómicas de DNA de 15-20 pares de bases localizadas en el extremo 5' (o incluso dentro del gen) de genes regulados por hormonas. Se han caracterizado cuatro clases de ERH: 1) el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), 2) el elemento de respuesta a andrógenos (ERA), 3) el elemento de respuesta a progesterona (ERP), 4) el elemento de respuesta a mineralocorticoides (ERM), todos estos tienen una secuencia consenso común, GTACAnnnTGTCT, por medio de la cual actúan. La secuencia consenso del ERE, AGGTCAnnnTGACCT, es muy parecida al elemento de respuesta a hormonas tiroideas (ERHT), solamente que ésta no tiene los nucleótidos separadores (TCAGGTCA TGACCTGA) (Fuller, 1991).

La unión del complejo hormona-receptor al ERH activa la transcripción de genes regulado por hormonas, generando la síntesis de RNA mensajero, que posteriormente se traducirá en una proteína, y ésta ejercerá su efecto en su propia célula o fuera de ella. Ver Figura 3.



**Figura 3. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides.** En este modelo la hormona (H) difunde a través de la membrana citoplasmática hacia el núcleo uniéndose a su receptor (R). Este complejo hormona-receptor (L) se une a secuencias específicas en el DNA activando la transcripción de genes regulados por esteroides. El RNAm es traducido a una nueva proteína. (Adaptado de Chan y O'Malley, 1976).

### 3.4 Receptor a progesterona

#### 3.4.1 Generalidades.

La P<sub>4</sub> lleva a cabo sus efectos en la célula blanco a través de la interacción con su receptor, el cual pertenece a la superfamilia de receptores a hormonas esteroides (Kastner *et al.*, 1990). El RP es un factor de transcripción que regula la

expresión de genes a través de la interacción con consecuencias específicas en el DNA.

El RP es codificado por un solo gen localizado en el cromosoma 11q22-23, el tamaño del cDNA es de aproximadamente 36 kb y comprende 5 exones y 4 intrones en la rata (Szabo *et al.*, 2000).

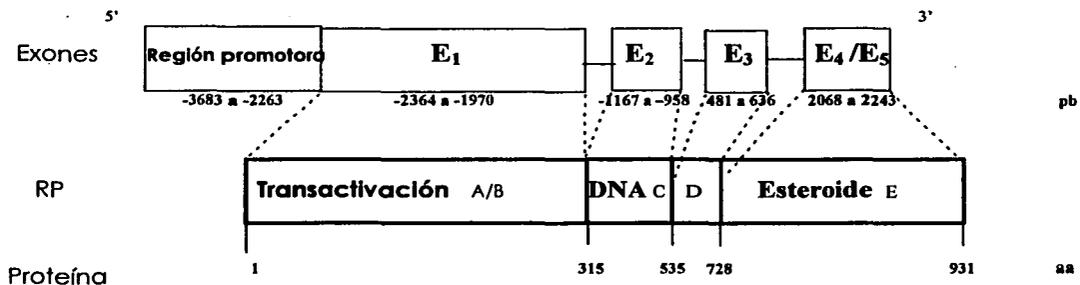
Estructuralmente, el RP está compuesto por 5 dominios que llevan a cabo diferentes funciones:

(1) Dominio de transactivación (A/B): exon 1 (393 pb). Participa en la regulación de la transcripción de genes blanco.

(2) Dominio de unión al DNA (C): exones 2 (209 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): exon 3 (155 pb). Participa en procesos de estabilización del receptor y en la translocación al núcleo.

(4) Dominio de unión al esteroide (E): exones 4 y 5 (175 pb). Interacción con el ligando y función de transactivación (Kraus *et al.*, 1993 y 1994). Ver Figura 4



**Figura 4. Estructura del gen del RP de rata.** El gen del RP está constituido por una región promotora, una región terminal de transactivación (A/B), una región de unión al DNA (C), una región de unión a Hsp (D) y una región de unión a la hormona (E). Este gen constituido por 5 exones (Kraus *et al.*, 1993 y 1994).

Se ha detectado la presencia del RP en diferentes tejidos del aparato reproductivo de distintas especies de vertebrados (aves, roedores, conejos, perros, vacas, primates superiores); en células de la granulosa del ovario (Milgrom y Baulieu, 1970; Feil *et al.*, 1972), en las trompas de Falopio, vagina (Graham y Clarke, 1997), testículo (Terner *et al.*, 1977); en células de músculo de arterias uterinas (Perrot-Applanat *et al.*, 1988); así como en el oviducto y bolsa de Fabricio del pollo (Ylikomi *et al.*, 1985; González-Moran y Camacho-Arroyo, 1998). El RP se localiza también en la glándula mamaria tanto en tejido normal como en neoplásico (Pollow *et al.*, 1977; Horwitz y McGuire 1975), así como en distintas áreas del cerebro tales como el HYP ventromedial, POA y la corteza cerebral (Warembourg *et al.*, 1989; Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). También se encuentra en el timo (Fujii-Hanamoto *et al.*, 1990), islotes pancreáticos (Green *et al.*, 1978); en células osteoblásticas (Graham y Clarke, 1997) y pulmón (Camacho-Arroyo *et al.*, 1998).

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 (Hsp). Cuando la hormona circulante entra por difusión a través de las membranas citoplásmica y nuclear (Jensen, 1996) se une al receptor, causando los distintos cambios conformacionales que promueven la fosforilación de éste (en residuos dependiente de ciclina A) y la disociación de Hsp (Allan *et al.*, 1992; Mirashi *et al.*, 1993; Clemm *et al.*, 2000)

El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por sitios en el DNA denominados elementos de respuesta, la formación de esta unión permite reclutar factores de transcripción hacia la región promotora para iniciar y regular la síntesis de RNA mensajero (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 de la transcripción se desensamblan del gen blanco y el receptor regresa a la fase de inactivación (Rodríguez *et al.*, 1990).

El RP es regulado transcripcionalmente a la alta por estrógenos y a la baja por P<sub>4</sub> en muchos tejidos blanco, como el útero de mamíferos (Graham y Clarke, 1997; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 1999).

### **3.4.2 Papel del RP en el SNC**

Las hormonas esteroideas tienen una participación muy importante en el funcionamiento del SNC, dentro de sus principales efectos se encuentran su participación en la regulación de la reproducción y la conducta sexual, la diferenciación, la excitabilidad y la proliferación neuronal (Mc Ewen y Alves, 1999).

Las hormonas esteroideas modulan estas funciones al actuar sobre sus células blanco y modificar la expresión de diferentes genes. Las hormonas esteroideas actúan en las neuronas a través de su interacción con: receptores intracelulares específicos, sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores y canales iónicos. Por ejemplo, la P<sub>4</sub> ejerce su acción principalmente a nivel nuclear y está mediada por la activación de receptores intracelulares, modificando el funcionamiento de distintas regiones del SNC a corto, mediano y largo plazo (Camacho-Arroyo *et al.*, 1995).

En la corteza cerebral de la rata se ha detectado el RNA mensajero del RP a los dos días de edad y estudios realizados en ratones de ocho días de edad indican un dimorfismo sexual en el contenido del RP en corteza cerebral y POA, siendo mayor en las hembras que en los machos (Shughrue *et al.*, 1991). Diversos trabajos realizados en cerebro de la rata muestran diferencias en la expresión del RP en diversas etapas del desarrollo, observándose que existen niveles significativos del RP en la hipófisis y el núcleo arcuato (ARC) en animales prepúberes mientras que en el POA y el núcleo ventromedial (VMN) el mayor nivel del RP se encuentra en etapas adultas de las hembras mientras que en los machos no hay diferencias significativas de los niveles del RP en diversas estructuras del SNC (Bogic *et al.*, 1988; Kato *et al.*, 1983; Williams y Blaustein, 1988).

Se ha estudiado la expresión del gen del RP en diversas etapas del desarrollo prenatal y postnatal en el cerebro de la rata hembra observándose

cambios muy marcados en la expresión del RP en el HYP y en el POA, así como en la corteza cerebral. El RNA mensajero del RP en el cerebro es detectable alrededor de dos días antes del nacimiento incrementando sus niveles en etapas postnatales tempranas. Estos datos sugieren que la expresión del gen de RP depende de la región y de la etapa del desarrollo específica (Kato *et al.*, 1983).

En los ratones hembra transgénicos para el gen de ER $\beta$  (ER $\beta$ KO), se ha encontrado la influencia del estrógeno en la inducción de cambios en células inmunoreactivas para el ER y el RP en diversas regiones del cerebro. La inmunoreactividad para RP en hembras silvestres se ve incrementada con la administración de E<sub>2</sub>, tanto en POA como en VMN; en contraste, ER $\beta$ KO hembras no responden a esta hormona, mientras los machos presentan mayor inmunoreactividad en el ARC, POA y VMN, salvo que los machos silvestres tienen cambio de reactividad considerable en el núcleo ARC (Temple *et al.*, 2001).

En el modelo de ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas con benzoato de estradiol (BE), P<sub>4</sub> y las antiprogesterinas RU38486 y ZK98299, se demostró que estos animales presentan lordosis; en este mismo estudio usaron oligonucleótidos sentido y antisentido para RP administrados en el tercer ventrículo cerebral para demostrar que el antisentido suprimía la conducta sexual facilitada por P<sub>4</sub>, aunque el mecanismo de acción del oligonucleótido no está claro. Esta secuencia también inhibe la acción del E<sub>2</sub> cuando es administrado para inducir RP, en células hipotalámicas. El E<sub>2</sub> actúa a nivel de DNA nuclear para incrementar la expresión del gen de RP en el VMN del hipotálamo; la lordosis facilitada por estradiol está mediada por P<sub>4</sub> y la activación de su receptor (Mani *et al.*, 1994).

### **3.5 Efecto de las hormonas gonadales sobre la diferenciación sexual del hipotálamo.**

#### **3.5.1 Regulación neuroendócrina durante la diferenciación sexual del cerebro**

Con base a los parámetros morfológicos y fisiológicos, el desarrollo de la rata hembra se ha dividido en 4 fases (Ojeda *et al.*, 1986):

- 1) Neonatal. Se inicia en el nacimiento y termina a los 7 días de vida postnatal.
- 2) Infantil. Se extiende desde el día 8 hasta el 21.
- 3) Prepúber o juvenil. Termina alrededor de los 32-39 días de edad. El límite más preciso es que se presenten las primeras manifestaciones del aumento de la actividad estrogénica, expresada por la presencia del líquido en la luz del útero (Ojeda *et al.*, 1985). El final de la fase juvenil puede ser considerado por el establecimiento de diferencias matutinas y vespertinas en la liberación pulsátil de hormona luteinizante (LH).
- 4) Peripuberal. Tiene una duración variable e incluye los días que preceden y suceden la primera ovulación.

En la fase neonatal, el ovario es relativamente insensible a las gonadotropinas, por lo menos hasta los cuatro o cinco días y no secreta estrógenos. Al parecer, la falta de respuesta del ovario a gonadotropinas se debe al bajo contenido de receptores a gonadotropinas o a la deficiencia de enzimas esteroidogénicas (Funkenstein *et. al.*, 1980)

La castración en el animal recién nacido no provoca el aumento de las concentraciones plasmáticas e hipofisarias de las gonadotropinas, por lo que los efectos inhibitorios que en el animal adulto ejercen los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas, no son efectivas en esta fase de la vida. Esta falta de respuesta no se debe a la ausencia de receptores a estrógenos en el hipotálamo y la hipófisis, sino a la deficiencia de la alfafetoproteína en concentraciones elevadas en el suero y los tejidos. La alfafetoproteína es una molécula que tiene la capacidad de unirse a los estrógenos e impedir que estén disponibles para unirse a sus receptores. Este hecho permite postular que la alfafetoproteína protege al cerebro de los efectos de los estrógenos en el cerebro

y regula la disponibilidad de éstos a los sistemas neuronales sensibles a ellos (Ojeda *et al.*, 1986).

En la fase infantil ocurre una serie de cambios en el eje hipotálamo- hipófisis que presentan los primeros eventos neuroendócrinos que se producen y tienen un impacto directo sobre el momento en el que se inicia la pubertad. Las concentraciones séricas de la hormona folículo estimulante (FSH) se incrementan hasta alcanzar valores máximos alrededor del día 12 y declinan progresivamente hasta llegar a valores muy bajos, poco antes del primer proestro. La FSH induce la actividad de la enzima aromataza en el ovario, lo que se traduce en la liberación de estrógenos (Ojeda *et al.*, 1986).

La concentración de la hormona folículo estimulante (FSH) plasmática parece que se eleva de manera tónica, el incremento de la LH es de manera pulsátil (Doler *et al.*, 1975). Este modelo de secreción de FSH y la LH que caracteriza a la fase infantil de la rata hembra, puede ser interpretado como el efecto de los eventos de maduración que ocurren en el SNC y la adenohipófisis, y se asume que los estrógenos juega un papel definitivo en la modulación de tales eventos (Ojeda *et al.*, 1986).

Hacia el día 16 de edad disminuye la concentración sérica de la alfabetoproteína y por lo tanto aumenta la concentración de estrógenos libres en la circulación y en el SNC (Andrews *et al.*, 1981). Este cambio posibilita que los estrógenos ejerciten su acción inhibitoria, lo que puede explicar la disminución de la concentración de la FSH plasmática después del día 12 de vida postnatal (Andrews y Ojeda, 1977).

Conforme aumenta el número de folículos en crecimiento también lo hace la concentración plasmática de estradiol, lo que es seguido de un breve incremento en la liberación de progesterona alrededor del día 15 de edad, que declina antes que termine la fase infantil. Durante esta fase el útero se sensibiliza a la estimulación estrogénica (Ojeda *et al.*, 1985).

Debido a que en la fase infantil de los ovarios de la rata producen androstenediona y T, se sugiere que el inicio de la retroalimentación inhibitoria ejercida por los esteroides sobre la secreción de las gonadotropinas, se realiza por medio de los andrógenos aromatizables. No se conoce si el efecto de la T es

debido a su capacidad androgénica o porque es aromatizada a estrógenos en el HYP (Andrews *et al.*, 1981). Sin embargo, se ha observado que entre los días 16 y 20 días de vida postnatal se requiere que aumente la secreción de esteroides para que aumente la secreción de LH (Ojeda *et al.*, 1985).

En la fase juvenil desaparece la secreción pulsátil de la LH, disminuyen las concentraciones plasmáticas de la FSH y sobre todo las de la alfafetoproteína y hay más estrógenos libres (Ojeda *et al.*, 1986).

Con el inicio de la fase juvenil o prepúber (día 22 de edad) el animal responde al aumento de las concentraciones plasmáticas de estrógenos, con la liberación de LH en cantidades similares a las del proestro (Andrews *et al.*, 1981). En este tiempo, la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es regulada de manera inhibitoria por los estrógenos, los que reemplazan a los andrógenos aromatizables que juegan un papel predominante durante la fase infantil, aunque los andrógenos siguen contribuyendo en este proceso.

Por otro lado, aún cuando en esta fase se presentan ondas de crecimiento y atresia folicular, los folículos todavía no alcanzan el estado ovulatorio. La adquisición de esa capacidad en el momento de la pubertad está regulada por múltiples factores hormonales y neurogénicos que operan bajo la dirección del SNC (Ojeda *et al.*, 1986).

Además de la FSH y la LH, la adenohipófisis secreta otras hormonas, la prolactina y la hormona del crecimiento o somatotropina, las cuales juegan un papel importante en la pubertad de la rata hembra. Al inicio de la fase juvenil, la secreción de ambas hormonas es baja pero va incrementando gradualmente (Doler y Wuttke, 1975; Andrews y Ojeda, 1977).

En la fase peripuberal, conforme se alcanza la pubertad, los ovarios adquieren gradualmente la capacidad para secretar estrógenos en respuesta a la estimulación gonadotrópica (Ojeda *et al.*, 1986). Este cambio está asociado con dos eventos: el primero, es un incremento en el número de receptores a la LH, que aunque ya se manifestó durante el desarrollo de la fase infantil, la cantidad de receptores aumenta hacia la cuarta semana de vida; y el segundo, es una disminución en el número de receptores a la GnRH que se inicia durante la

segunda mitad de la fase juvenil (Dalkin et. al., 1981) y es más pronunciado durante los días que acompañan a la primera ovulación. Dado que la GnRH inhibe la función gonadal se puede sugerir que la disminución en el contenido de receptores a la GnRH refleja una disminución de la influencia inhibitoria del péptido sobre el desarrollo folicular. Así, el incremento simultáneo de los receptores a la LH provee la amplificación necesaria para su acción estimuladora (Ojeda et al., 1986).

El inicio de la pubertad está determinado por manifestaciones neuroendocrinas que tienen su origen durante la fase infantil, y que se mantienen después de la cuarta semana de vida. En este tiempo (fase peripuberal) las concentraciones plasmáticas de la prolactina y la hormona del crecimiento se incrementan significativamente respecto a las observadas durante la fase juvenil, lo mismo que la secreción de estrógenos por el ovario en respuesta al estímulo gonadotrópico (Advis et. al., 1979; Andrews y Ojeda, 1977; Ojeda et al., 1986).

Los cambios diurnos en el patrón de secreción de la LH que no son detectables en ratas juveniles de 22 a 24 días de edad, son demostrables en las de 28 ó 29 días y son fácilmente detectables entre los 35 y 39 días de vida. Alrededor de la quinta semana de vida postnatal aumenta la magnitud de los pulsos vespertinos, así como la liberación de la LH basal, lo que estimula la secreción de los esteroides (Urbanski y Ojeda, 1985).

El hecho de que las concentraciones preovulatorias de E<sub>2</sub> pueden estimular la liberación de LH, tan temprano como se inicia la fase juvenil (día 21), parece indicar que el tiempo de la pubertad depende de que el ovario adquiera la capacidad de producir concentraciones altas de E<sub>2</sub>. En contraste, el cambio en la liberación de la LH pulsátil, que señala el inicio de la pubertad, es originado en el SNC y es un evento independiente de las gónadas (Advis et. al., 1981; Fink, 1986).

De acuerdo con los criterios de clasificación morfológica, la pubertad en la rata hembra está dividida en las siguientes fases: 1) *Anestro*. Pertenece a la fase juvenil tardía; comienza la liberación de LH; ocurre alrededor del día 30 de vida postnatal, las ratas son pequeñas (menos de 100 g peso corporal); no se detecta fluido intrauterino, la vagina está cerrada. 2) *Proestro temprano*. En esta fase el

útero se agranda y hay presencia de fluido intraluminal; la vagina está cerrada. 3) *Proestro tardío*. Es el día del primer proestro; el útero está lleno de fluido; la vagina está cerrada. 4) *Estro*. Es en el día de la primera ovulación, el fluido uterino no es abundante; el cuerpo lúteo es fácilmente distinguible, la vagina está abierta y en la citología vaginal predomina la presencia de células cornificadas. 5) *Primer diestro*. La citología vaginal presenta en mayoría leucocitos, así como la presencia de cuerpo lúteo maduro en los ovarios (Ojeda y Urbanski, 1994). La apertura vaginal se presenta como la presencia de fluido en la vagina ( $36\pm 3$  días) (Ojeda et al., 1986).

Todos estos eventos inducen la aceleración del crecimiento y la maduración folicular que culmina con la ovulación (Advis et. al., 1981; Fink, 1986).

En estudios realizados en las décadas de los años sesentas y setentas, se demostró que los andrógenos capaces de inducir la diferenciación sexual de los mecanismos de regulación de la secreción gonadotrópica, son aquellos que pueden ser aromatizados y convertidos a estrógenos. Esto se basa en el hecho de que una inyección de estradiol a ratas hembras neonatales, también causa esterilidad anovulatoria conocido como síndrome de estrogenización o desfeminización; que se caracteriza con la pérdida de la capacidad de liberar la GnRH de manera cíclica en respuesta al estímulo con estrógenos y de la capacidad de presentar respuesta de lordosis (Feder, 1981; Gorski, 1963). Esto es apoyado por el hecho de que un antiestrógeno sintético bloquea la acción masculinizante de los andrógenos sobre el modelo de secreción de las gonadotropinas (McDonald y Doughty, 1972). Los andrógenos que pueden ser convertidos a estrógenos (andrógenos aromatizables) son más efectivos en la inducción de la virilización del sistema regulador de las gonadotropinas (McDonald y Doughty, 1974).

### **3.5.2 Modelo farmacológico de la desfeminización hipotálamica**

La diferenciación sexual del cerebro es el proceso durante el cual las hembras y los machos, experimentan transformaciones celulares y anatómicas,

que determinan diferencias en la actividad cerebral de ambos sexos. El establecimiento de dichas diferencias no es sólo el resultado directo de la expresión genómica, sino que depende en gran medida del medio hormonal en el cual esté en contacto el cerebro durante un periodo crítico de su desarrollo. (Gorski, 1968).

Las acciones de las hormonas esteroides son de dos tipos: 1) activacionales, son aquellos efectos que ejercen las hormonas dentro de un órgano blanco, ya consolidado, activando algún mecanismo específico; y 2) organizacionales, son aquellas acciones que ejercen las hormonas sobre un tejido en desarrollo, para dirigir permanentemente la organización de dicho tejido (Arnold y Gorski, 1984).

La diferenciación sexual del cerebro es una consecuencia de la acción organizacional de hormonas esteroides; es decir, las hormonas esteroides ejercen su efecto sobre áreas específicas del SNC, como es el POA y el HYP que se manifiestan en el animal adulto en alteraciones permanentes de su fisiología reproductiva (Kato y Onouchi, 1983).

En estudios realizados hace más de tres décadas, se mostró que las hormonas esteroides tienen efectos en el desarrollo del POA y del HYP, que se manifiestan en el animal adulto como alteraciones permanentes en la fisiología reproductiva como son: cambios en la receptividad sexual, alteraciones vaginales y actividad ovárica, así como variaciones en los niveles de hormona liberadora de GnRH en las hembras (Herrenkohl y Scott, 1984; Pinilla *et al.*, 1993). En el caso de los machos se impide la androgenización de estructuras cerebrales que determinan la secreción fásica de la GnRH (Van der Schoot y Zeilmaker, 1972).

La diferenciación sexual de los mamíferos, es un proceso dinámico, secuencial, ordenado, el cual se lleva a cabo en varias etapas consecutivas: el establecimiento del sexo cromosómico durante la fertilización, la etapa pregonadal, el desarrollo del sexo gonadal y la definición de los genitales internos y externos, que condicionan el sexo fenotípico. La determinación sexual es primordialmente genética y el control de la diferenciación está dada por el cromosoma Y (López-López *et al.*, 1996). Sin embargo, la diferenciación sexual

depende de la presentación de los eventos moleculares y morfológicos en el momento y en la secuencia adecuados durante la ontogenia.

Muchas de las diferencias que se manifiestan entre ambos sexos durante el desarrollo dependen del medio hormonal al cuál están expuestos, no sólo los tejidos reproductivos sino también el SNC durante el periodo crítico del desarrollo. En roedores se ha observado que existe un periodo crítico entre 25-35 días post-fertilización en el cual la presencia o ausencia de hormonas esteroides determina de manera irreversible el tipo de patrón de liberación de la GnRH (Arnold y Gorski, 1984).

La desfeminización neonatal de la hembra se manifiesta en el animal adulto como estro continuo, falta de ovulación cíclica, disminución del peso ovárico y aumento del peso corporal. La falta de ovulación cíclica provocada por la desfeminización neonatal es debida a alteraciones en la sensibilidad del HYP y ARC al igual que en el POA a los estímulos que provocan normalmente ovulación. Se sabe que se induce la anovulación permanente al implantar esteroides en el HYP pero no en el POA o en la formación reticular mesencefálica (Wagner *et al.*, 1966).

En los primeros estudios sobre el papel de las hormonas esteroides en la diferenciación sexual se emplearon diversos andrógenos, como la T o el propionato de testosterona (PT), los cuales inducen desfeminización en ciertas áreas del SNC. Posteriormente se administraron E<sub>2</sub> o benzoato de estradiol (BE), los cuales inducen desfeminización a nivel del HYP (Christensen y Groski, 1978). Estudios subsecuentes sugirieron que el compuesto desfeminizante es el estrógeno derivado de la aromatización de T y no el andrógeno mismo.

En la actualidad se sabe que: 1) los compuestos androgénicos no aromatizables no son virilizantes mientras que los aromatizables sí virilizan, 2) los estrógenos naturales o sintéticos inducen desfeminización aún en dosis menores que los andrógenos, 3) la administración simultánea de los estrógenos y antiestrógenos así como los inhibidores de la aromatización bloquean la acción desfeminizante de los estrógenos, y 4) en la etapa perinatal existen enzimas responsables de la aromatización de los andrógenos en el HYP y en el sistema límbico de ambos sexos. En la etapa postnatal la actividad de esas enzimas

disminuye y en el núcleo de las neuronas hipotalámicas de ambos sexos hay expresión de receptores a E<sub>2</sub> y a P<sub>4</sub> (RP) (MacLusky *et al.*, 1981; McEwen, 2002).

Hasta el momento se desconoce qué genes participan en el proceso de diferenciación sexual hipotalámica regulado por hormonas esteroides. Los mecanismos moleculares exactos involucrados en los efectos fisiológicos a corto y a largo plazo de las hormonas esteroides sexuales administradas durante el periodo crítico del desarrollo postnatal, también se desconocen. En este trabajo se estudiaron los efectos del E<sub>2</sub> y la T administrados durante el periodo crítico del desarrollo postnatal sobre la expresión de la proteína del RP en el HYP y el POA-AHA de ratas hembras.

## **4.0 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión de la proteína del RP total a largo plazo en el HYP y POA-AHA de ratas hembras tratadas neonatalmente con hormonas esteroides sexuales durante el desarrollo.

### **4.1 Objetivos particulares**

- ◇ Determinar y evaluar la expresión de la proteína del RP en el día de la AV, en las regiones del POA-AHA (PVN y NPM) y del HYP (VMN y ARC) de ratas hembras tratadas neonatalmente con vehículo o con E<sub>2</sub> .
- ◇ Determinar y evaluar la expresión de la proteína del RP en el día de la AV, en las regiones del POA-AHA (PVN y NPM) y del HYP (VMN y ARC) de ratas hembras tratadas neonatalmente con vehículo o con T .
- ◇ Determinar y comparar la expresión de la proteína del RP total de las diferentes regiones a estudiar en el tiempo de la AV a la administración aguda de E<sub>2</sub> en ratas desfeminizadas.

## **5.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Se ha demostrado que la presencia del RP en el HYP es importante para que se lleve a cabo la conducta sexual en los mamíferos; y que la expresión de la proteína del RP en esta área del cerebro es inducida por estrógenos. Se sabe, que la administración de hormonas esteroideas sexuales en el periodo crítico del desarrollo postnatal de la rata hembra produce cambios morfológicos y conductuales en áreas cerebrales relacionadas con la diferenciación sexual en los roedores. Sin embargo, no existe hasta el momento ningún estudio a nivel molecular que demuestre la participación de la proteína de RP en un modelo farmacológico de diferenciación sexual del cerebro.

Utilizando la técnica de inmunohistoquímica se pretende demostrar la presencia del RP en los núcleos relacionados con la diferenciación sexual cerebral, siendo diferente la inmunoreactividad entre cada tratamiento y entre cada núcleo.

## **6.0 HIPOTESIS**

La expresión de la proteína del receptor a progesterona en el hipotálamo será mayor en las ratas tratadas con E<sub>2</sub> y con T en el periodo crítico de la diferenciación sexual del cerebro, en comparación con las ratas control en el tiempo de la apertura vaginal.

## 7.0 MATERIALES Y METODOS.

### 7.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Sprague Dawley de tres días de edad (Harlan, México). Las cuales se organizaron en tres diferentes grupos, constituido cada grupo por ocho animales.

### 7.2 Diseño experimental

Los diferentes grupos de animales fueron tratados como se muestra en la siguiente tabla:

Sexo	Tratamiento al día postnatal tres	Dosis de administración hormonal
Hembra Control (C) (n = 8)	Aceite de maíz (vehículo)	100 $\mu$ L
Hembra Testosterona (T) (n = 8)	Propionato de testosterona	200 $\mu$ g/100 mL
Hembra Estradiol (E) (n = 8)	17- $\beta$ -estradiol	200 $\mu$ g/100 mL

Un grupo de cuatro animales de cada tratamiento fue sacrificado en el tiempo de la AV. A un grupo de animales (n = 12) al tiempo de la AV, se le administró por vía intraperitoneal una dosis única de E<sub>2</sub> (5  $\mu$ g por cada 100 g de peso corporal), sacrificándolas 2 horas después de la administración.

### 7.3 Obtención de tejidos.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital a una dosis (1 mg por cada 100 g de peso corporal) por vía intraperitoneal e inmediatamente perfundidos por punción cardíaca, en el ventrículo izquierdo, utilizando una aguja de calibre 21, conectada a una bomba de perfusión a una velocidad constante de 2mL/min; para la salida de las soluciones se realizó un corte en la arteria aorta del corazón. Para la perfusión se usó primero la solución de cloruro de sodio al 0.9% (250 mL) y después, la solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS (250 mL).

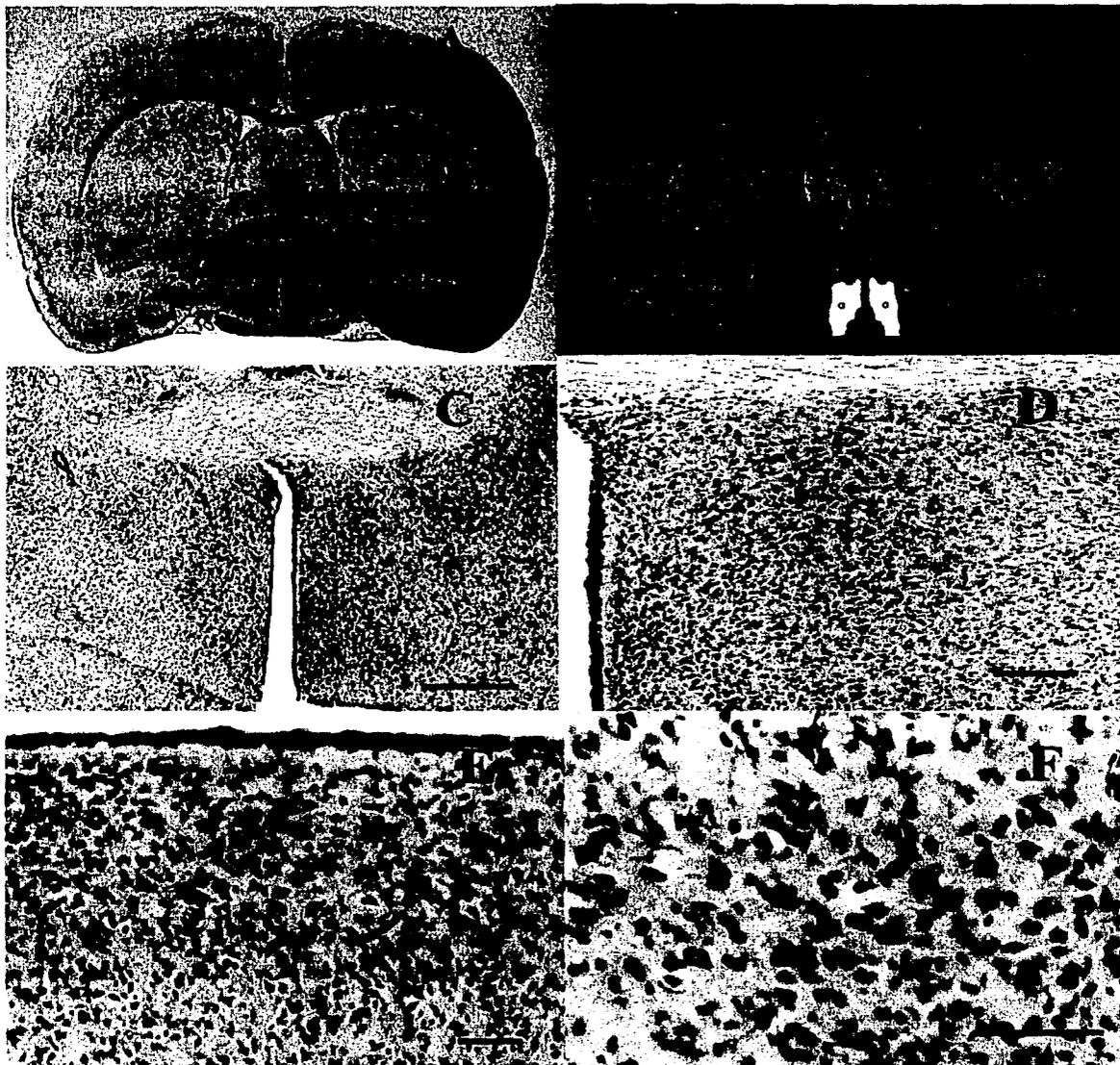
Al término de la perfusión, se obtuvieron los cerebros y los ovarios. Los cerebros se postfijaron en paraformaldehído 24-72 horas y posteriormente en KPBS sacarosa al 10%, 24-72 horas, previo al corte por congelación.

Se seleccionaron algunos cortes para identificación de los diferentes núcleos a estudiar, para ello fueron teñidos con violeta de cresilo. Las referencias anatómicas con las coordenadas Bregma  $-0.26$  mm a Bregma  $-3.60$  mm, basadas en un Atlas (Pellegrino *et al.*, 1979; Paxinos y Watson, 1998) del cerebro de la rata, estudiándose el POA (figura 5), PVN (figura 6) y el HYP (figura 7).

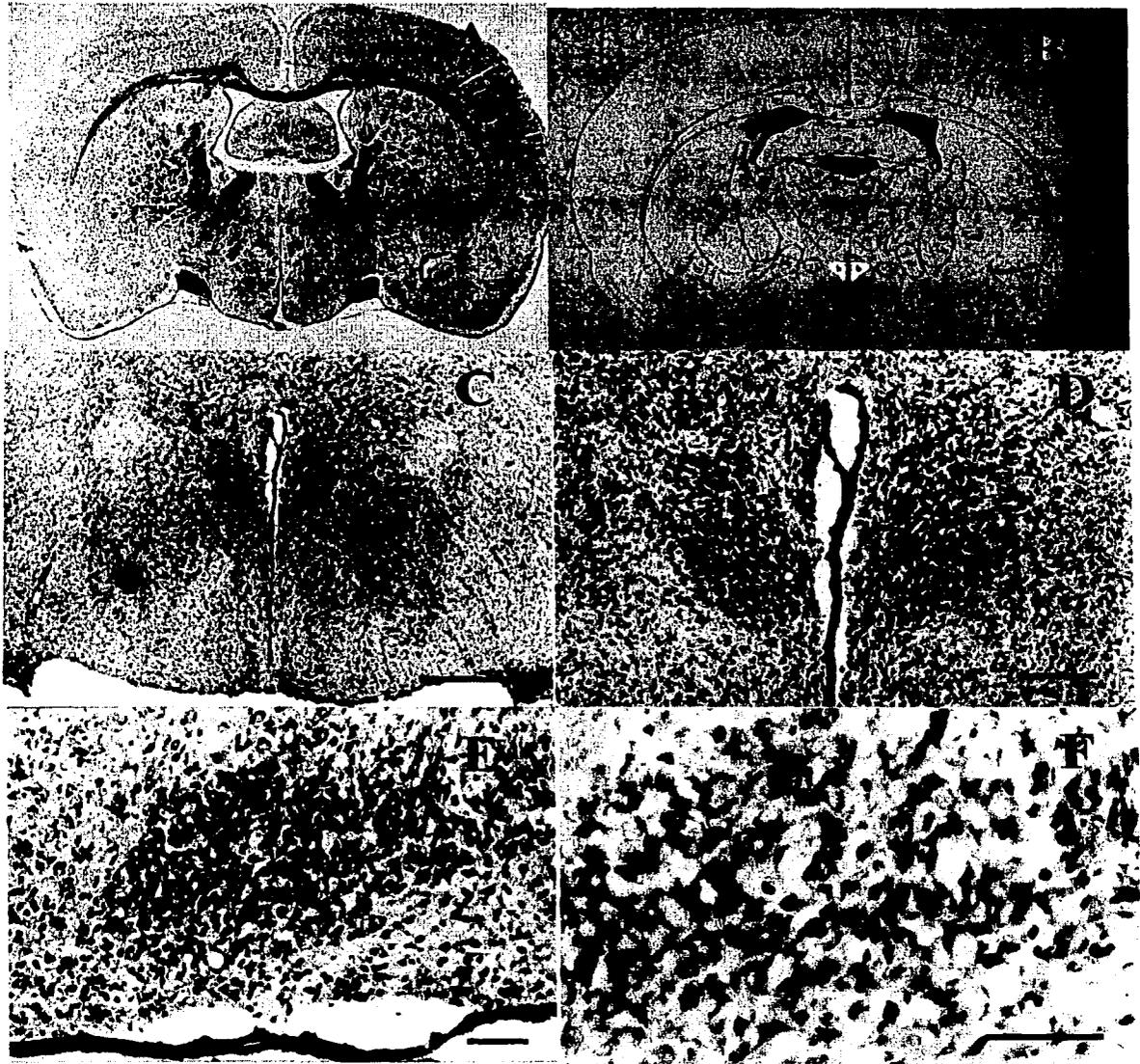
Para esto se realizaron cortes a nivel del POA-AHA y del HYP, de  $50 \mu\text{m}$  en crióstato y colocados en una solución anticongelante para su almacenamiento a  $-20^\circ\text{C}$ , hasta su uso.

Los ovarios fueron deshidratados, posteriormente se incluyeron en parafina para cortes en microtomo de  $8 \mu\text{m}$  y se colocaron en portaobjetos tratados con poly-L-lisina. Estos cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina para observar su morfología.

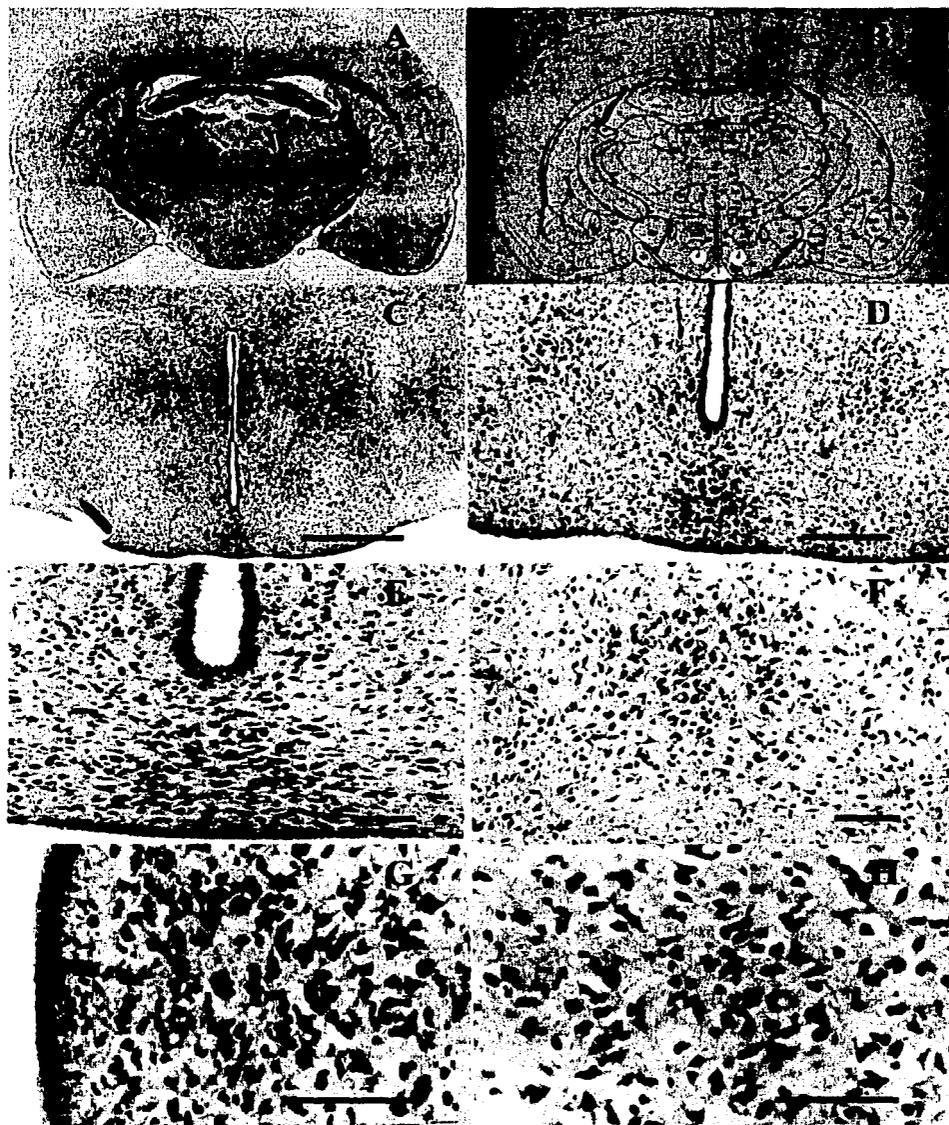
En el día de AV, a los animales se les tomó un frotis vaginal para confirmar el estado de estro permanente (presente en animales desfeminizados), se sacrificaron las ratas por decapitación y se recolectó la sangre para determinar los niveles hormonales de  $\text{P}_4$  y  $\text{E}_2$  en suero por radioinmunoensayo.



**Figura 5. Descripción histológica de la región del área preóptica medial (POA).** **A)** Fotomicrografía de una sección coronal representativa del POA tomada de Pellegrino *et al.*, 1979. **B)** Representación esquemática modificada del POA (a, en la zona blanca se observa el núcleo preóptico medial) tomada de Paxinos y Watson, 1998. **C)** Fotomicrografías de una sección coronal representativa del POA localizada en microscopio de luz en un corte de 30  $\mu\text{m}$  teñido con violeta de cresilo (4X), [barra=200 $\mu\text{m}$ ]. **D)** (10X) [barra=100  $\mu\text{m}$ ]. **E)** (20X) [barra=25  $\mu\text{m}$ ]. **F)** (40X) [barra=25  $\mu\text{m}$ ].



**Figura 6. Descripción histológica de la región hipotálamica anterior (AHA).** **A)** Fotomicrografía de una sección coronal representativa de AHA tomada de Pellegrino *et al.*, 1979. **B)** Representación esquemática modificada de AHA (b, en la zona blanca se observa el PVN) tomada de Paxinos y Watson, 1998. **C)** Fotomicrografía de sección coronal representativa de PVN localizada en microscopio de luz en un corte de 30  $\mu\text{m}$  teñido con de violeta de cresilo [barra=200 $\mu\text{m}$ ] (4X). **D)** [barra=100 $\mu\text{m}$ ] (10X). **E)** (20X) [barra=25 $\mu\text{m}$ ]. **F)** (40X) [barra=25 $\mu\text{m}$ ].



**Figura 7. Descripción histológica de la región del hipotálamo posterior (HYP). A)** Fotomicrografía de sección coronal representativa de HYP tomada de Pellegrino *et al.*, 1979. **B)** Representación esquemática modificada de HYP (c, en la zona blanca se observa el ARC y d, el VMN) tomada de Paxinos y Watson, 1998. **C)** Fotomicrografía de sección coronal representativa del VMN y del ARC localizada en microscopio de luz en un corte de 30  $\mu\text{m}$  teñido con violeta de cresilo (4X) [barra=200 $\mu\text{m}$ ]. **D)** VMN y ARC (10X) [barra= 100 $\mu\text{m}$ ]. **E)** ARC (20X) [barra= 25  $\mu\text{m}$ ]. **F)** VMN (20X) [barra= 25  $\mu\text{m}$ ]. **G)** ARC (40X) [barra=25  $\mu\text{m}$ ]. **H)** VMN (40X) [barra=25  $\mu\text{m}$ ].

#### 7.4 Análisis inmunohistoquímico

Una vez que se identificó el nivel del núcleo a estudiar, se procedió a seleccionar cortes para la evaluación de la expresión de la proteína del RP.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó en cortes por flotación, utilizando el siguiente protocolo:

- 1) Lavar con KPBS dos veces por 10 minutos.
- 2) Agregar solución de peróxido de hidrógeno al 1% en agua desionizada o KPBS por 10 minutos.
- 3) Lavar con KPBS dos veces por 10 minutos.
- 4) Agregar solución de borohidruro de sodio al 1% en KPBS por 6-8 minutos.
- 5) Lavar en KPBS cada 5 minutos hasta que no haya burbujas.
- 6) Agregar el tejido en anticuerpo primario a una dilución 1:50 por 48 h a 4° C
- 7) Lavar en KPBS dos veces por 10 minutos.
- 8) Agregar Anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-conejo (Vector Vectastain), a una dilución 1:100 por 2 h a temperatura ambiente.
- 9) Lavar en KPBS dos veces por 10 minutos.
- 10) Agregar complejo Avidina-Biotina por 2 h a temperatura ambiente.
- 11) Lavar en KPBS 2 veces por 10 minutos.
- 12) Revelar con una solución de DAB a temperatura ambiente de 2 a 5 minutos.
- 13) Inactivar la reacción con agua destilada dos veces por 5 minutos.

Inmediatamente se procedió a la deshidratación. Los cortes se colocaron en laminillas tratadas con poly-L-lisina, se secaron a 37 °C por 2h. La deshidratación consistió en lavados de 15 segundos en agua destilada, etanol 50%, 70%, 90%, 96%, absoluto, etanol/xilol, xilol, xilol y se cubrieron con resina.

Se procedió a observar los cortes en el microscopio óptico para determinar el área de interés. Se cuantificaron las regiones inmunoreactivas para RP en las diferentes áreas a estudiar, a través del analizador de imágenes KS300 (Karl Zeiss).

## 8.0 RESULTADOS

### Características fenotípicas de los animales desfeminizados.

En este trabajo se estudió el patrón de expresión de la proteína del RP en diferentes áreas del SNC en ratas desfeminizadas.

Los valores obtenidos de la talla y el peso de las ratas tratadas con E<sub>2</sub> y T durante el periodo crítico de la diferenciación sexual postnatal del cerebro no se modifica en comparación con las ratas controles. En cambio, la longitud de la vulva en las ratas desfeminizadas con E<sub>2</sub> y T es más grande que en los controles. A pesar de que en la distancia ano genital no existen diferencias estadísticamente significativas, se observa una tendencia a ser ligeramente mayor en las ratas desfeminizadas que en los controles. Ver Tabla 1.

**Tabla 1. Características fenotípicas de las ratas en el tiempo de la apertura vaginal (AV).**

Tratamiento	Talla (cm)	Peso (g)	Genitales(cm)	Distancia ano-genitales (cm)
CAV	17.6±1.239	164±19.46	0.28±0.02	1.32±0.09
EAV	16.6±18.71	134±4.69	0.44±0.04*	1.48±0.08
TAV	17.88±0.55	173.3±4.68	0.55±0.12*	1.6±0.08
CAV + E <sub>2</sub>	19.13±1.23	178.8±18.22	0.38±0.047	1.55±0.03
EAV+E <sub>2</sub>	16.0±0.06	136.7±3.52	0.4±0.0*	1.7±0.06
TAV+E <sub>2</sub>	17.63±0.71	178.0±14.43	0.65±0.03*	1.93±0.25

Los animales fueron tratados con vehículo (CAV), estradiol (EAV) y testosterona (TAV) a los tres días de edad y sacrificados en el día de la AV. Las mediciones fueron realizadas minutos antes de sacrificar a los animales. Los datos son expresados como el promedio ±ES de 4 animales por grupo. \*p < 0.05, se comparó los grupos con el tratamiento agudo de E<sub>2</sub> (CAV+E<sub>2</sub>, EAV+E<sub>2</sub> y TAV+E<sub>2</sub>) con los grupos sin tratamiento agudo de E<sub>2</sub> (CAV, EAV y TAV), respectivamente.

En los animales tratados con T (ratas testosterona, TAV), la AV ocurre de manera temprana (30±3 días, después de la administración) comparada con los

vehículo (ratas control, CAV) ( $38 \pm 2$  días) o E<sub>2</sub> (ratas estradiol, EAV) ( $37 \pm 2$  días). Tanto en las ratas CAV como las tratadas fueron estudiados durante el día del estro, bajo las condiciones experimentales antes descritas, la AV ocurre en la fase temprana del estro. Esto fue confirmado mediante un análisis citológico (frotis), el cual presentó una predominancia de células epiteliales cornificadas. También se demostró la anovulación de los animales desfeminizados, mediante un análisis histológico del ovario. Ver Tabla 1

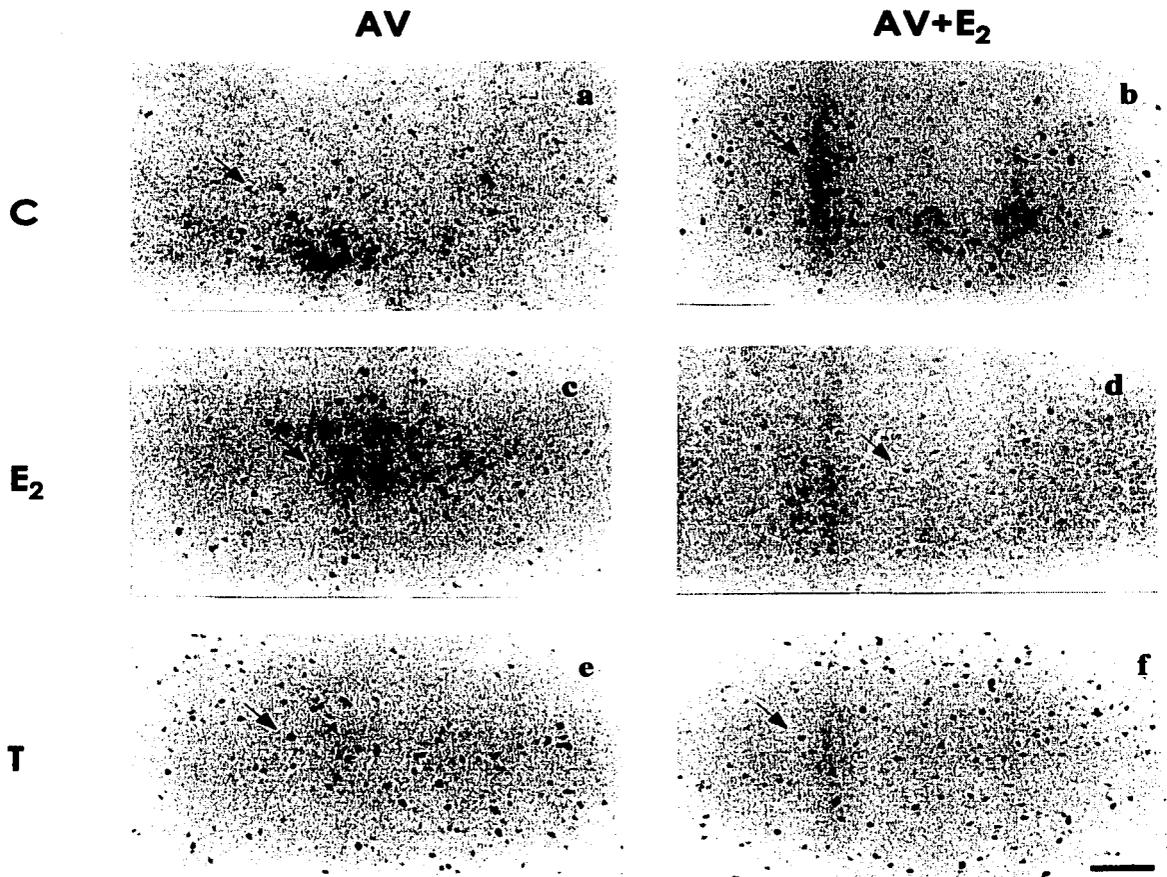
### **Detección del patrón de la proteína del RP.**

El patrón de la expresión de la proteína del RP se detectó utilizando la técnica de inmunohistoquímica; observándose un aumento en la inmunoreactividad en las regiones del POA-AHA y del HYP de las ratas EAV y TAV, sacrificadas en el día de la AV, en comparación con las ratas CAV.

La administración aguda de E<sub>2</sub> en el día de la AV produce un incremento significativo de la expresión de la proteína del RP en el grupo control en las regiones del POA-AHA y del HYP (CAV+E<sub>2</sub>). Ver Figuras 8 y 9. Interesantemente, la expresión de RP no es inducida por la administración aguda de E<sub>2</sub> en los animales desfeminizados. El grupo desfeminizado con E<sub>2</sub> muestra una disminución en la expresión de la proteína del RP en ambas regiones del cerebro (EAV+ E<sub>2</sub>). Ver Figuras 8 y 9. En cambio, las ratas desfeminizadas con T no presentan cambios en la expresión de la proteína del RP al estímulo agudo (TAV+ E<sub>2</sub>). Ver Figuras 8 y 9.

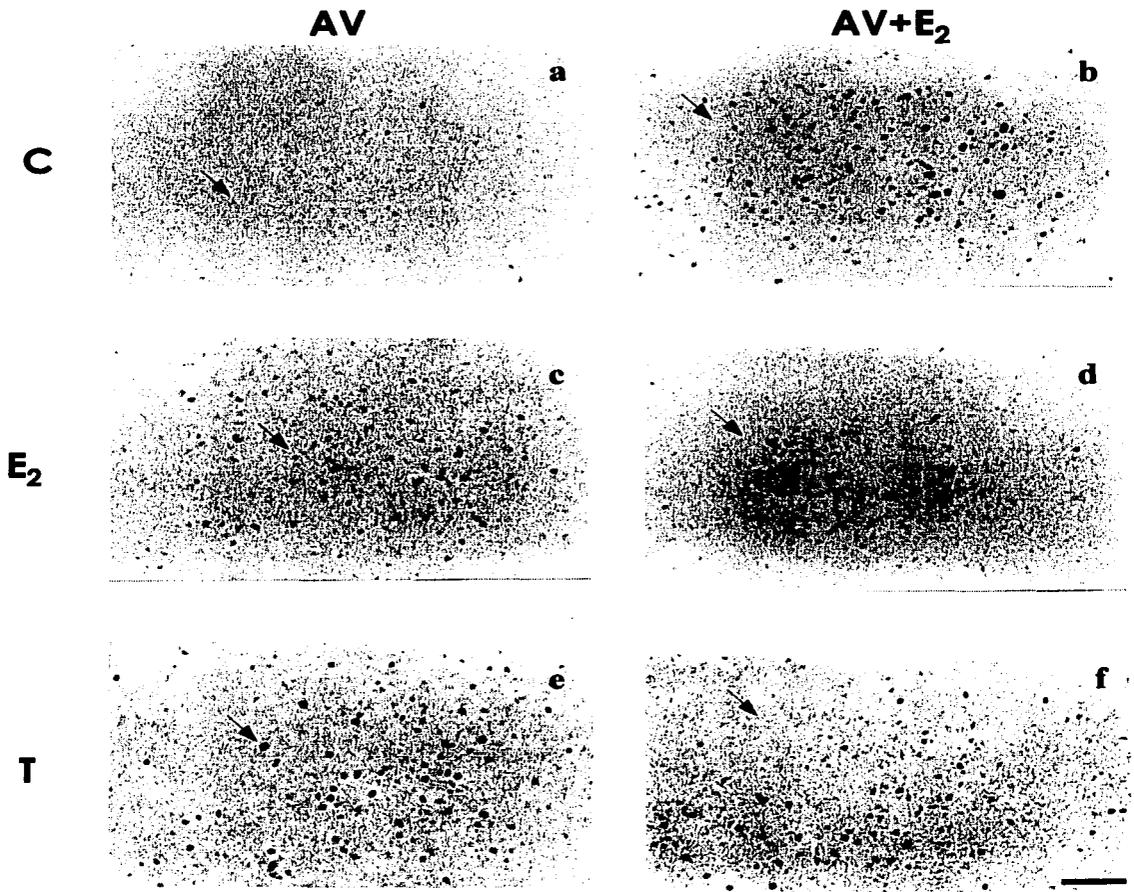
El análisis cuantitativo estimado para la inmunoreactividad del RP en toda la región del POA-AHA y del HYP muestra un incremento estadísticamente significativo en las ratas EAV y TAV. Ver Figuras 10 y 11. Mientras que los animales EAV no solo no responden, sino que disminuye la expresión de la proteína del RP al estímulo agudo. Ver Figuras 10 y 11. Con respecto a las ratas TAV no hubo cambios estadísticamente significativos. Ver Figuras 10 y 11.

## Area Preóptica



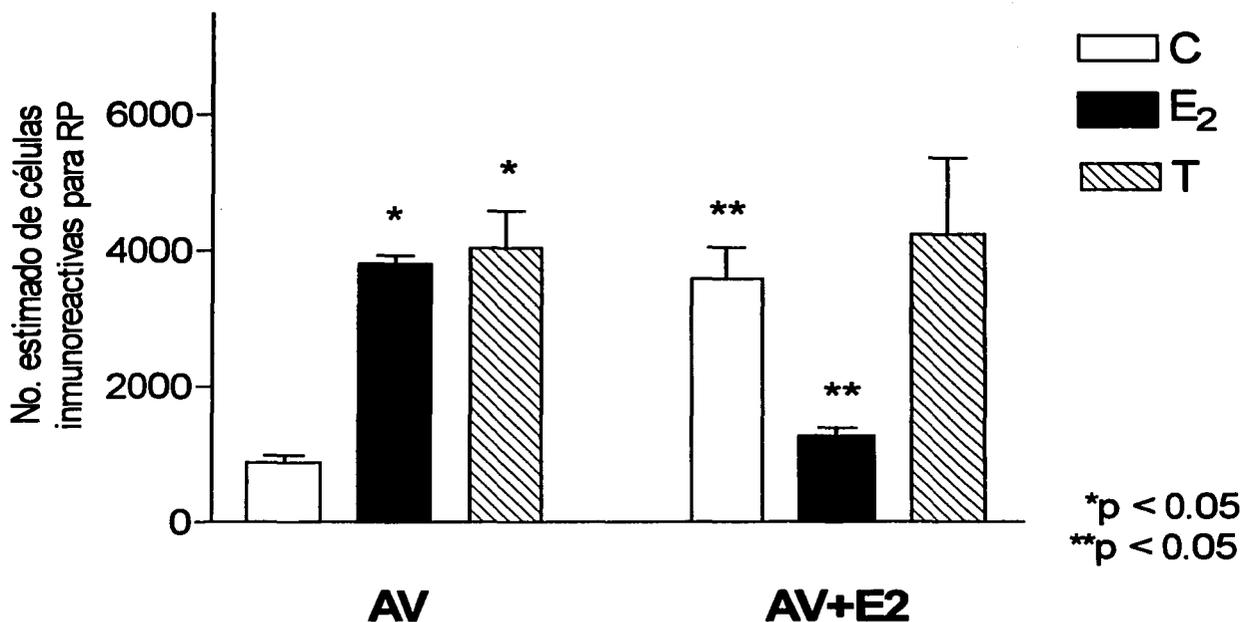
**Figura 8.** Expresión de la proteína de RP en el POA-AHA de ratas **desfeminizadas** en el día de la **apertura vaginal (AV)**. Los animales fueron tratados con vehículo (CAV), estradiol (EAV) y testosterona (TAV) a los 3 días de edad y sacrificados el día de la AV (**a, c, e**). Otro grupo de animales fueron inyectadas i.p. con 17- $\beta$ -estradiol (5  $\mu$ g) en el día de la apertura vaginal y sacrificadas dos horas después del tratamiento agudo (**b, d, f**). Todas las fotografías fueron tomadas a partir de un objetivo 20X. (barra= 50  $\mu$ m). Las flechas señalan núcleos inmunoreactivos.

## Hipotálamo



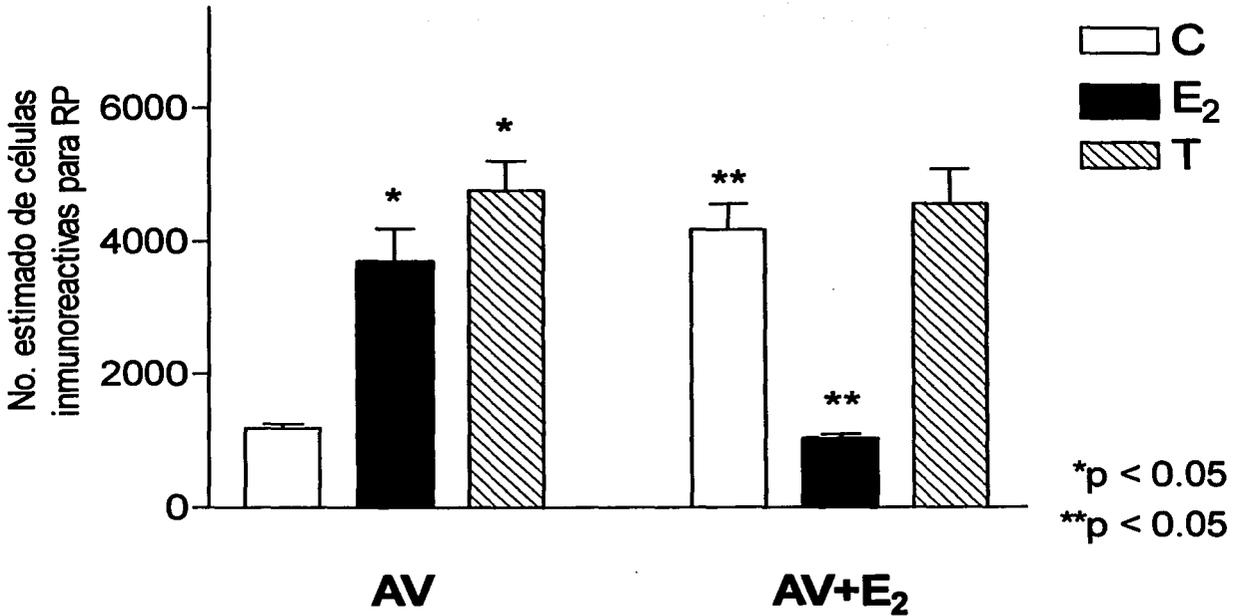
**Figura 9. Expresión de la proteína de RP en el HYP en el día de la apertura vaginal (AV).** Los animales fueron tratados con vehículo (CAV), estradiol (EAV) y testosterona (TAV) a los 3 días de edad y sacrificados el día de la AV (**a**, **c**, **e**). Otro grupo de animales fueron inyectadas i.p. con 17- $\beta$ -estradiol (5  $\mu$ g) en el día de la apertura vaginal y sacrificadas dos horas después del tratamiento agudo (**b**, **d**, **f**). Todas las fotografías fueron tomadas a partir de un objetivo 20X. (barra= 50  $\mu$ m). Las flechas señalan núcleos inmunoreactivos.

# POA-AHA



**Figura 10. Análisis cuantitativo de la expresión de la proteína de RP en ratas defeminizadas en el día de la apertura vaginal (AV).** Número estimado de células inmunoreactivas por rata en el área del POA-AHA. Los animales fueron tratados con vehículo (C), estradiol (E<sub>2</sub>) y testosterona (T) a los 3 días de edad y sacrificados en el día de la AV. Otro grupo de animales defeminizados fueron inyectados i. p. Con 17-β-estradiol (5μg) y sacrificados dos horas después de la administración aguda (AV+E<sub>2</sub>). Los resultados son expresados como el promedio ± ES (n= 4) por rata. \*p < 0.05 comparado con C. \*\*p<0.05 comparados con C y E<sub>2</sub> en el día de la AV.

# HYP



**Figura 11. Análisis cuantitativo de la expresión de la proteína de RP en ratas defeminizadas en el día de la apertura vaginal (AV).** Número estimado de células inmunoreactivas por rata en el área del HYP. Los animales fueron tratados con vehículo (C), estradiol (E<sub>2</sub>) y testosterona (T) a los 3 días de edad y sacrificados en el día de la AV. Otro grupo de animales defeminizados fueron inyectados i. p. Con 17- $\beta$ -estradiol (5 $\mu$ g) y sacrificados dos horas después de la administración aguda (AV+E<sub>2</sub>). Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  ES (n=4) por rata. \*p < 0.05 comparado con C. \*\*p < 0.05 comparados con C y E<sub>2</sub> en el día de la AV.

### **Determinación de Hormonas Esteroides en suero de animales desfeminizados.**

Para determinar que el incremento en la expresión de la proteína del RP en animales EAV y TAV, no se debe a los altos niveles circulantes de E<sub>2</sub> endógeno ; se llevó a cabo la cuantificación, por RIA, de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en el suero de esos animales.

No se observan cambios en los niveles de hormonas esteroides esteroides (E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub>) en el suero de animales desfeminizados en comparación con los controles en el día de la AV. Sin embargo, los animales que recibieron el tratamiento agudo (AV + E<sub>2</sub>) sí se observa un incremento en los niveles hormonales circulantes.

**Tabla 2. Niveles de esteroides sexuales en el suero de ratas en el día de la apertura vaginal (AV).**

<b>Tratamiento</b>	<b>Estradiol (pg/ml)</b>	<b>Progesterona (ng/ml)</b>
<b>CAV</b>	77.86 ± 6.202	5.053 ± 0.5753*
<b>EAV</b>	79.33 ± 4.079	1.608 ± 0.5069
<b>TAV</b>	81.61 ± 3.461	2.542 ± 0.3845
<b>CAV+E<sub>2</sub></b>	117.9 ± 9.615*	5.560 ± 0.9125
<b>EAV+E<sub>2</sub></b>	211.9 ± 18.88*	3.968 ± 0.8940*
<b>TAV+E<sub>2</sub></b>	145.7 ± 16.07*	2.275 ± 0.5234

Los animales fueron tratados con vehículo (CAV), estradiol (EAV) y testosterona (TAV) a los tres días de edad y sacrificados en el día de la AV. Los niveles de los esteroides fueron determinados por radioinmunoensayo. Los datos son expresados como el promedio ± ES de 6 animales por grupo. \*p < 0.05, se comparó los grupos con el tratamiento agudo de E<sub>2</sub> (CAV+E<sub>2</sub>, EAV+E<sub>2</sub> y TAV+E<sub>2</sub>) con los grupos sin tratamiento agudo de E<sub>2</sub> (CAV, EAV y TAV), respectivamente.

## 9.0 DISCUSION

Los resultados indican que la administración temprana de E<sub>2</sub> y T durante el periodo crítico postnatal de la diferenciación sexual cerebral induce importantes cambios en la expresión de la proteína del RP, que es sensible a estrógenos, en el POA-AHA e HYP de la rata en el día de la AV. Esto demuestra que la proteína del RP participa en el establecimiento de los mecanismos celulares involucrados en la regulación de la fisiología reproductiva y conductual normal de la rata hembra.

Los efectos a largo plazo de la administración del E<sub>2</sub> durante el periodo crítico postnatal de la diferenciación sexual del cerebro sobre la expresión de la proteína del RP no había sido previamente estudiada.

Para estudiar la sensibilidad a estradiol del RP en animales desfeminizados, se realizaron una serie de experimentos en el día de la AV administrando una dosis única aguda de E<sub>2</sub>. Se encontró que las ratas control expresan mayor cantidad de proteína del RP en el POA-AHA y en el HYP, esto permitió confirmar estudios previos donde se ha demostrado que el E<sub>2</sub> regula a la alta el gen y la proteína del RP en diversas áreas del SNC (Blaustein *et al.*, 1988; Romano *et al.*, 1988). Sin embargo, se observó que los animales desfeminizados con E<sub>2</sub> no sólo no responden al estímulo agudo del E<sub>2</sub>, sino que disminuye significativamente dicha expresión, lo que ha derivado en proponer que la regulación a la alta en el modelo de ratas desfeminizadas, que se lleva a cabo a nivel de la transcripción, se expresa deficientemente a nivel de la traducción; esto puede deberse a que en el POA-AHA existen diferentes núcleos, como el NPM y el PVN, que responden diferente al estímulo con E<sub>2</sub> en condiciones fisiológicas normales (Kato y Onouchi, 1983). En cuanto a las ratas tratadas con T, no se observó cambios estadísticamente significativos en la expresión de la proteína de RP. Estos datos sugieren que la impronta con hormonas esteroides (E<sub>2</sub> o T) en el periodo crítico de la diferenciación sexual del cerebro ejerce efectos moleculares y bioquímicos diferentes, esto significa que no es lo mismo desfeminizar con E<sub>2</sub> que con T, como ya se ha demostrado en genes hormono-regulados, por ejemplo el trabajo realizado por Arrieta y colaboradores en este mismo modelo de ratas en el gen de c-fos, en el POA y el HYP de ratas desfeminizadas (Arrieta *et al.*, 2000). Sin

embargo, se observó una regulación diferencial de la expresión de la proteína del RP al tratamiento agudo con E<sub>2</sub> en el tiempo de la AV entre los animales desfeminizados con E<sub>2</sub> y los desfeminizados con T. Esto sugiere que las vías moleculares y celulares que dan lugar a la expresión de la proteína del RP podrían estar alteradas a nivel de la transcripción o de la traducción.

Estudios realizados en paralelo con el gen del RP son congruentes con lo encontrado en la expresión de la proteína del RP en los animales tratados en el periodo crítico postnatal. Sin embargo, los animales que recibieron tratamiento agudo el día de la AV presentan datos contradictorios a nivel de la transcripción con respecto a la traducción. Con la técnica de RT-PCR, se ha encontrado una mayor expresión del gen del RP con el tratamiento agudo en los animales control (CAV+ E<sub>2</sub>), sin cambios significativos en los animales tratados con E<sub>2</sub> (EAV+ E<sub>2</sub>) y una expresión a la baja en los animales tratados con T (TAV + E<sub>2</sub>). Esto puede deberse a que el RNA obtenido está constituido por todos los núcleos de las áreas a estudiar. Y por lo tanto, la técnica inmunohistoquímica permite localizar con precisión los núcleos de interés. Para la técnica de RT-PCR se disecciona POA e HYP por separado lo que no impide el tener parte de algún otro núcleo cerebral que altere los resultados; lo que lleva a proponer la técnica de inmunohistoquímica como la indicada para diferenciar y evaluar la expresión de receptores a hormonas esteroideas en el modelo usado para este estudio. En estudios posteriores en este mismo modelo se usará la técnica de hibridación *in situ*, que permitirá detectar la expresión del RNAm en los núcleos del POA-AHA y del HYP, para confirmar los resultados de la expresión de la proteína del RP por inmunohistoquímica.

Aunque en este estudio, tanto los animales control como los tratados, presentaron AV en el día del estro, varios reportes han demostrado cambios en la secreción de gonadotropinas y esteroides sexuales en ratas desfeminizadas (Pillina, et al., 1993), sugiriendo que los valores endógenos de estrógenos circulantes en el día de la AV podrían ser diferentes entre las ratas control y las desfeminizadas. Sin embargo, para confirmar que la expresión de la proteína del RP en los animales desfeminizados no se debía a la concentración de E<sub>2</sub> endógeno; se cuantificó los niveles de E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> en suero, encontrándose que las

cantidades de estas hormonas es similar en los animales controles y defeminizados. Esto sugiere que la administración de E<sub>2</sub> y T postnatal en el periodo crítico del desarrollo, deja una impronta permanente en el POA-AHA y en el HYP de estos animales.

La expresión de la proteína del RP está regulada a la alta por estrógenos, los resultados obtenidos en el grupo de ratas defeminizadas con T, sugiere que la hormona es aromatizada a E<sub>2</sub>, ejerciendo así un efecto en la transcripción de genes regulados por estrógenos como es el RP, participando en la diferenciación sexual del cerebro.

Los resultados contribuyen para entender el marcado efecto que se observa en los roedores que han sido manipulados hormonalmente en el periodo crítico postnatal de la diferenciación sexual del cerebro. La presencia de hormonas esteroides durante dicho periodo, altera de manera permanente el desarrollo del sistema nervioso en hembras, las cuales presentan una típica conducta de machos en la etapa adulta (Cooke *et al.*, 1998).

Nuestros resultados apoyan datos recientes sobre la expresión del RP en el macho, donde se demuestra la dependencia a E<sub>2</sub> y T (que es aromatizada a E<sub>2</sub>) de la expresión de RP y la diferenciación sexual del cerebro. Así como el cambio de los volúmenes y la expresión de la proteína del RP similar a las ratas defeminizadas en comparación con machos controles; y en machos castrados y tratados con E<sub>2</sub> y T donde se observa un cambio contrario en la expresión de la proteína de RP comparando con el modelo que se utilizó en este estudio.

## 10. CONCLUSIONES

1. La cantidad de la expresión de la proteína del RP es mayor en los núcleos del POA-AHA e HYP en las ratas desfeminizadas con estradiol que en las ratas control en el día de la AV.
2. La cantidad de la expresión de la proteína del RP es mayor en los núcleos del POA-AHA e HYP en las ratas desfeminizadas con testosterona que en las ratas control en el día de la AV.
3. La cantidad de la expresión de la proteína del RP aumenta en los núcleos del POA-AHA e HYP después de la administración del tratamiento agudo con estradiol en las ratas control en el día de la AV.
4. La cantidad de la expresión de la proteína del RP disminuye en los núcleos del POA-AHA e HYP después de la administración del tratamiento agudo con estradiol en las ratas desfeminizadas con estradiol en el día de la AV.
5. La cantidad de la expresión de la proteína del RP no cambia en los núcleos del POA-AHA e HYP después de la administración del tratamiento agudo con estradiol en las ratas desfeminizadas con testosterona en el día de la AV.

## 11.0 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ♣ Advis, J. P., Smith-White S., Ojeda S. R. Changes in ovarian steroidal and prostaglandin E responsiveness to gonadotropins during the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*. 104: 653-8, 1979.
- ♣ Allan G. F., Tsai S. Y., Tsai M. J., O'Malley B. W. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89(24):11750-4, 1992.
- ♣ Andrews, W. W., Mizejewski G. J., Ojeda S. R. Development in estradiol positive feedback on luteinizing hormone release in the female rat: A quantitative study. *Endocrinology*. 109: 1404-1413, 1981.
- ♣ Andrews, W. W. y Ojeda S. R. On the feedback actions of estrogen on gonadotropin and prolactin release in infantile female rats. *Endocrinology*. 101: 1517-23, 1977.
- ♣ Arnold A. P. y Gorski R. A. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 7:413-42, 1984.
- ♣ Arrieta I., Camacho-Arroyo I., Mendoza-Rodriguez C. A., Cerbon M.A. c-Fos gene expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of defeminized rats. *Brain Res*. 86:1-2:100-6, 2000.
- ♣ Beato M., Chalepakis G., Schauer M., Slater E. P. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem*. 32(5):737-47, 1989.
- ♣ Berry S. A. y Pescovitz O. H. Ontogeny and pituitary regulation of testicular growth hormone-releasing hormone-like messenger ribonucleic acid.. 127(3):1404-11. 1990.
- ♣ Blaustein J. D., King J. C., Toft D. O., Turcotte J. Immunocytochemical localization of estrogen-induced progesterin receptors in guinea pig brain. *Brain Res*. 474 (1)1-15, 1988.
- ♣ Bogic L., Gerlach J. L., McEwen B. S. The ontogeny of sex differences in estrogen-induced progesterone receptors in rat brain. *Endocrinology*. 122(6):2735-41, 1988.

- ♣ Camacho-Arroyo I., Pasapera A. M., Pérez-Palacios G., Cerbón M. A. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev Invest. Clin.* 47(4): 329-40, 1995.
- ♣ Camacho-Arroyo I., Mendez-Cruz S. T., Guerra-Araiza C., Cerbon M. A. Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J Endocrinol* 157(1):71-4, 1998.
- ♣ Chan L. y O'Malley B. W. Mechanism of action of the sex steroid hormones. *N Engl J Med.* 294:1322-8, 1372-82, 1429-37; 1976
- ♣ Christensen L. W. y Gorski R. A. Independent masculinization of neuroendocrine systems by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat. *Brain Res.* 12;146(2):325-40, 1978.
- ♣ Clemm D. L., Sherman L., Boonyaratanakornkit V., Schrader W., Weigel N., Edwards D. P. Differential Hormone-Dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol.* 14(1):52-65, 2000.
- ♣ Cooke B., Hegstrom C. D., Vileneuve L. S. y Breedlove S. M. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles y mechanisms. *Frnt. Neuroendocrinol.* 19: 323-62, 1998.
- ♣ Dalkin A. C., Bourne G. A., Pieper D. R., Regiani S., Marshall J. C. Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology* 108(5):1658-64, 1981.
- ♣ Doler K. D. y Wuttke W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 97: 898-907, 1975.
- ♣ Evans R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240 .889, 1988.
- ♣ Feder H. H. Hormonal actions on the sexual differentiation of the genitalia and the gonadotropin regulating systems En: *Neuroendocrinology of Reproduction. Physiology and Behavior.* Eds. Adler N. T. Plenum Press, New York & London 86-126, 1981.

- ♣ Feil P. D., Glasser S. R., Toff D. O., O'Malley B. W. Progesterone binding in the mouse and rat uterus. *Endocrinol.* 91(3):738-46, 1972.
- ♣ Fink G. The endocrine control of ovulation. *Sci Prog.* 70(2793):403-23, 1986.
- ♣ Fujii-Hanamoto H., Grossman C. J., Roselle G. A., Mendenhall C. L., Seiki K. Nuclear progestin receptors in rat thymic tissue. *Thymus.* 15(1):31-45, 1990.
- ♣ Fuller P. J. The steroid receptor superfamily: mechanism of diversity. *FASEB J.* 5:3092-9, 1991.
- ♣ Funkenstein B., Nimrod A., Lindner H. R. The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal rat ovaries. *Endocrinology* 106: 98-106, 1980.
- ♣ González-Morán G. y Camacho-arroyo I. 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(4):277-82, 1998.
- ♣ Gore-Langton R. E. Cyclosporine differentially affects estrogen and progesterone synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 57(3):187-98, 1988.
- ♣ Gorski R. A. Modification of ovulatory mechanisms by postnatal administration of estrogen to the rat. *American Journal of Physiology* 205:842, 1963.
- ♣ Gorski R. A. Influence of age on the response to prenatally administered of a low dose of androgen. *Endocrinology* 82(5):1001-4, 1968.
- ♣ Graham J. D. y Clarke C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18(4):502-19, 1997.
- ♣ Green I. C., Howell S. L., El Seifi S., Perrin D. Binding of 3H-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetol.* 15:349-355, 1978.
- ♣ Guerra-Araiza C. y Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev Invest Clin.* 52(6):686-91, 2000.
- ♣ Harrison S. C. A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353:715-9, 1991.
- ♣ Herrenkohl L. R. y Scott S. Prenatal stress and postnatal androgen: effects on reproduction in female rats. *Experientia* 40(1):101-3, 1984.

- ♣ Horwitz K. B. y McGuire W. L. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids*. 25:497-505, 1975.
- ♣ Hsueh A. J., Adashi E. Y., Jones P. B., Welsh T. H. Jr. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 5(1):76-127, 1984.
- ♣ Hutchinson J. S., Nelson P. B., Zeleznik A. J. effects of different gonadotropin pulse frequencies of *corpus luteum* function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology* 119(5):1964-71, 1986.
- ♣ Jensen E. V. Steroid hormones, receptors, and antagonists. *Ann N Y Acad Sci* . 784:1-17, 1996.
- ♣ Kastner P., Krust A., Turcotte B., Stropp U., Tora L., Gronemeyer H., Chambon P. two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9(5):1603-14, 1990.
- ♣ Kato J., Hirata S., Nozawa A., Yamada-Mouri N. Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm Behav.* 28(4):454-63, 1994.
- ♣ Kato J. y Onouchi T. Progesterone receptors in female rat brain and hypophysis in the development from fetal to postnatal stages. *Endocrinology.* 113(1):29-36. 1983.
- ♣ Kraus W. L., Montano M. M., Katzenellenbogen B. S. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol.* 7(12):1603-16, 1993.
- ♣ Kraus W. L., Montano M. M., Katzenellenbogen B. S. Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol Endocrinol.* 8(8):952-69 1994.
- ♣ Landers J. P., Spelberg T. C. New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit. Rev. Euk. Gene Expres.* 2:19-63, 1992.
- ♣ Litwack G. y Schmidt T. J. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations* En: Devlin, T. M. (5th ed.). Wiley-Liss, 2001.

- ♣ López-López M., Cervantes-Peredo A., Kofman-Alfaro S. Progress in the knowledge on the genetic process of sexual differentiation in humans. *Rev Invest Clin.* 48(2):129-37, 1996.
- ♣ MacLusky N. J., Naftolin F., Krey L. C., Franks S. The catechol estrogens. *J Steroid Biochem.* 15:111-24, 1981. Mahesh V., Brann D., Hendry L. Diverse mode of action of progesterone and its metabolites. *J. Neurosurg. Sci.* 36(1):27-30, 1996..
- ♣ Mahesh V. B., Brann D. W., Hendry L. B. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 56(1-6 Spec No):209-19, 1996.
- ♣ Mani S. K., Blaustein J. D., Allen J. M., Law S. W., O'Malley B. W., Clark J. H. Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology.* 135(4):1409-14, 1994.
- ♣ McDonald P.G. y Doughty C. Comparison of the effect of neonatal administration of testosterone and dihydrotestosterone in the female rat. *J Reprod Fertil.* 30(1):55-62, 1972.
- ♣ McDonald P. G. y Doughty C. Effect of neonatal administration of different androgens in the female rat: correlation between aromatization and the induction of sterilization. *J Endocrinol.* 61(1):95-103, 1974.
- ♣ McEwen B. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res.* 57:357-84, 2002.
- ♣ McEwen B. S. y Alves S. E. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20(3):279-307, 1999.
- ♣ Mendoza-Rodríguez C. A., Camacho-Arroyo I., García G. A., Cerbón M. A. 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(5):339-43, 1999.
- ♣ Milgrom E. y Baulieu E. E. progesterone in the uterus and the plasma. II. The role of the hormone availability and metabolism on selective binding to uterus protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40(3):723-3, 1970.

- ♣ Misrashi M., Venencie P. Y., Saugier-veber P., Sar S., Dessen P., Milgrom E. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochem. Biophys. Acta* 121(2):289-92, 1993.
- ♣ Ojeda S. R. y Urbanski H. F. Puberty in the rat. En: *The Physiology of reproduction*. 2a. ed. Knobil E. y Neill J. D. (eds.) 363-409, 1994.
- ♣ Ojeda S. R., Urbanski H. F., Katz K. H., Costa M. E. Stimulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production enhances hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release without increasing prostaglandin E2 synthesis: studies in prepubertal female rats. : *Endocrinology*. 117(3):1175-8, 1985.
- ♣ Ojeda S. R., Urbanski H. F., Ahmed C. E. The onset of female puberty: Studies in the rat. *Recent Progress in Hormone Research* 42: 385-440, 1986.
- ♣ Paxinos G. y Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York. 1998.
- ♣ Pellegrino, L. J., Pellegrino A. S., Cushman A. J. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain*. Segunda ed., Plenum, NY 1979.
- ♣ Pérez-Palacios G., Larrea F., Cerbón M. A. y Vilchis F. Mecanismos de acción de hormonas esteroides. En *Bioquímica e Inmunología*. Vol. 2. cap. VI. Ed Hicks J. y Díaz-Zagoya J. C. UNAM. México. pp 93-127, 1985.
- ♣ Perrot-Applanat M., Groyer-Picard M. T., Garcia E., Lorenzo F., Milgrom E. Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology*. 123(3):1511-9, 1988.
- ♣ Pinilla L., Trimino E., Garnelo P., Bellido C., Aguilar R., Gaytan F., Aguilar E. Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats. *J Reprod Fertil*. 97(1):13-20.1993
- ♣ Pollow K., Boquoi E., Baumann J., Schmidt-Gollwitzer M., Pollow B. Comparison of the in vitro conversion of estradiol 17-beta to estrone of normal and neoplastic human breast tissue. *Mol. Cell. Endocrinol*. 6(4-5):333-48, 1977.

- ♣ Pomata P. E., Colman-Lerner A. A., Baranao J. L., Fiszman M. L. In vivo evidences of early neurosteroid synthesis in the developing rat central nervous system and placenta. *Brain Res Dev Brain Res.* 120(1):83-6, 2000.
- ♣ Rodriguez R., Carson M. A., weigel N. L., O'Malley B. W., Schrader W. T. Dimerization of the chicken progesterone receptor in vitro can occur in the absence of hormone and DNA. *Mol. Endocrinol.* 4(12):1782-90,1990.
- ♣ Romano G. J., Krust A. y Plaff D. W. Expression and Estrogen Regulation of progesterone receptor mRNA in neurons of the mediobasal hypothalamus: an *in situ* hybridization study. *ENDO.* 2(8):1295-1300, 1989.
- ♣ Rothchild I. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy En: Bardin C. W., Milgrom E., Mauvais-Jarvis P. (eds) *Progesterone and progestins* Raven Press, New York, pp 219-229, 1983.
- ♣ Savourey J. F., Mirashi M., Milgrom E. Molecular action of progesterone *Int J. Biochem.* 22(6):579-94, 1990.
- ♣ Shoham Z. y Schachter M. Estrogen biosynthesis regulation, action, remote effects, and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril.* 65(4):687-701,1996 .
- ♣ Shughrue P. J., Stumpf W. E., Elger W., Schulze P. E., Sar M. Progesterin receptor cells in the 8-day-old male and female mouse cerebral cortex: autoradiographic evidence for a sexual dimorphism in target cell number. *Endocrinology.* 128(1):87-95,1991.
- ♣ Simpson E. R. Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. *Fertil Steril.* 77 Suppl 4:6-10, 2002.
- ♣ Szabo M., Kilen S. M., Nho S. J., Schwartz N. B. Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. *Biol Reprod.* 62(1):95-102, 2000.
- ♣ Temple J. L., Fugger H. N., Li X., Shetty S. J., Gustafsson J., Rissman E. F. Estrogen receptor beta regulates sexually dimorphic neural responses to estradiol. *Endocrinology.* 142(1):510-3, 2001.
- ♣ Turner C. Progesterone and progestins in the male reproductive system. *Ann. NY Acad. Sci.* 286:313-320, 1977.

- ♣ Urbanski H. F. y Ojeda S. R. In vitro simulation of prepubertal changes in pulsatile luteinizing hormone release enhances progesterone and 17 beta-estradiol secretion from immature rat ovaries. *Endocrinology*. 117(2):638-43, 1985.
- ♣ Van der Shoot P. y Zeilmaker G.H. Aspects of the function of ovarian grafts in neonatally castrated male rats. *Endocrinology*. 91(2):389-95, 1972.
- ♣ Wagner J. W., Erwin W., Critchlow V. Androgen sterilization produced by intracerebral implants of testosterone in neonatal female rats. *Endocrinology* 79(6):1135-42, 1966.
- ♣ Warembourg M., Jolivet A., Milgrom E. Immunohistochemical evidence of the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res.* 20:480(1-2):1-15, 1989.
- ♣ Weisz J. y Ward I. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetusses and neonatal offspring. *Endocrinology* 106(1):306-16, 1980.
- ♣ Williams C. L. y Blaustein J. D. Steroids induce hypothalamic progestin receptors and facilitate female sexual behavior in neonatal rats. *Brain Res.* 24:449(1-2):403-7, 1988.
- ♣ Ylikomi T., Gasc J. M., Isola J., Baulieu E. E., Tuohimaa P. Progesterone receptor in the chick bursa of Fabricius: Characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology* 117(1):155-60, 1985.
- ♣ Zhang X., Jeyakumar M., Bagchi M. Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 271(25):14825-33, 1996.

## 12.0 APENDICE

### Alcohol-ácido

99 ml de etanol 70% y 1 mL de HCl concentrado.

Solución anticongelante.

Sacarosa.....300 g

Buffer de fosfatos de sodio 0.05 M .....1L

Etilenglicol.....600 mL

H<sub>2</sub>O desionizada..... c. b. p. 2L

Almacenar a 4 °C

Buffer de fosfatos de sodio 0.1 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M(27.6 g/L H<sub>2</sub>O).....115 mL

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 M(28.4 g/L H<sub>2</sub>O).....385 mL

H<sub>2</sub>O desionizada..... c. b. p. 1L

### Deshidratación de ovarios

- Lavar con agua por 3 h
- Etanol 50% por 2h\*
- Etanol 70% por 1h\*
- Etanol 80% por 1h\*
- Etanol 96% por 1h\*
- Etanol 96% por 1h\*
- Etanol 100% por 1h\*
- Etanol 100% por 1h\*
- Etanol/xilol por 1 h\*
- Xilol por 1h\*
- Xilol por 12 h\*.
- Parafina líquida (60 °C) por 2 h
- Parafina líquida (60 °C) por 6 h

\* con agitación constante

## Eosina

### Solución stock

Eosina Y.....10 g

Agua destilada.....200 mL

Etanol 96%..... 800 mL

Se mezcla en frío y se filtra, filtrar cada que se utilice.

Para usarse: 375 mL de etanol 80%, 25 mL de la solución stock y 2.5 mL de ácido acético glacial 5% v/v.

## Hematoxilina de Harris

Hematoxilina.....1 g

Oxido rojo de mercurio.....0.5 g

Alumbre (sulfato de aluminio, amonio o potasio).....20g

Etanol absoluto.....10 mL

Agua destilada.....200 mL

Disolver la hematoxilina en el etanol a baño María y tapado; por otra parte disolver el alumbre en la mitad de agua destilada, se mezclan ambas soluciones y se les adiciona el resto del agua. Al hervir se le adiciona el óxido de mercurio (cuidado) hasta coloración rojo-púrpura; enseguida se enfría con hielo y se filtra 10 veces. Se le agregan 3-5 gotas de ácido acético por cada 10 mL de solución. Filtrar antes de usar.

## KPBS

$K_2HPO_4$  ..... 0.45 g

$KH_2PO_4$ .....3.81 g

NaCl.....9.0 g

H<sub>2</sub>O desionizada..... c. b. p. 1L

pH 7.4

## PBS

NaCl.....8.0 g

KCl.....0.2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....1.44 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0.24 g

H<sub>2</sub>O destilada..... c. b. p. 1L

pH 7.4

## Solución de poly-L-lisina

50 µg/mL de poly-L-lisina en Tris-HCl 10 mM (1.5764g en 1000 mL de agua destilada o desionizada) a pH 8. almacenar a 4° C, se recomienda utilizar en los 15 días siguientes de su preparación.

## Tinción de hematoxilina-eosina

- Desparafinar por 20 min a 60° C
- Enfriar por 5 seg\*
- Xilol por 2 min\*
- Xilol por 2 min\*
- Etanol-xilol por 2 min \*
- Etanol 100% por 2 min\*
- Etanol 100% por 2 min \*
- Etanol 96% por 2 min \*
- Etanol 96% por 2 min \*
- Etanol 70% por 2 min \*
- Etanol 50% por 2 min \*
- Agua destilada por 15 seg
- Hematoxilina por 4 min
- Agua destilada hasta el cambio de color azul
- Agua destilada por 5 seg
- Solución de etanol 70% con HCl% (99:1)
- Agua destilada hasta el cambio de color café-rosado

- Solución saturada de carbonato de litio hasta cambio de color azul
- Agua destilada por 5 seg
- Etanol 70% por 1 min
- Eosina por 6 min
- Agua destilada por 5 seg
- Etanol 50% por 15 seg
- Etanol 70% por 15 seg
- Etanol 96% por 15 seg
- Etanol 96% por 15 seg
- Etanol 100% por 15 seg
- Etanol 100% por 15 seg
- Etanol-xilol por 15 seg
- Xilol por 15 seg
- Xilol por 2 min
- Medio de montaje

#### Tinción de violeta de cresilo

- Desparafinar por 20 min a 60° C \*
- Enfriar por 5 seg\*
- Xilol por 15 seg\*
- Xilol por 15 seg\*
- Etanol-xilol por 15 seg\*
- Etanol 100% por 15 seg\*
- Etanol 100% por 15 seg\*
- Etanol 96% por 15 seg\*
- Etanol 96% por 15 seg\*
- Etanol 70% por 15 seg\*
- Etanol 50% por 15 seg\*
- Agua destilada por 15 seg
- Violeta de cresilo por 5-10 min
- Agua destilada por 15 seg
- Etanol 50% por 15 seg

- Etanol 70% por 15 seg
- Etanol 96% por 15 seg
- Etanol 96% por 15 seg
- Etanol 100% por 15 seg
- Etanol 100% por 15 seg
- Etanol-xilol por 15 seg
- Xilol por 15 seg
- Xilol por 15 seg
- Medio de montaje

\*No aplica en cortes en congelación

Se utilizó agua destilada para la preparación de las soluciones con etanol

### 13.0 ABREVIATURAS

ARC	Núcleo arcuato
AV	Apertura vaginal
CAV	Control apertura vaginal
CAV + E <sub>2</sub>	Control apertura vaginal con administración aguda de 17- $\beta$ -estradiol
DBD	DNA binding domain
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTH	Dihidrotestosterona
E <sub>2</sub>	17- $\beta$ -estradiol
EAV	Estradiol apertura vaginal
EAV + E <sub>2</sub>	Estradiol apertura vaginal con administración aguda de 17- $\beta$ -estradiol
ERA	Elemento de respuesta a andrógenos
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
ERG	Elemento de respuesta a gonadotropinas
ERH	Elemento de respuesta a hormonas
ERHT	Elemento de respuesta a hormonas tiroideas
ERP	Elemento de respuesta a progesterona
ER $\beta$ KO	Animal transgénico para el gen de receptor a estrógenos $\beta$
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotropinas
HBD	Hormone binding domain
HYP	Hipotálamo
i. p.	Intraperitoneal
LH	Hormona luteinizante
NPM	Núcleo Preóptico Medial
OVX	Ratas ovariectomizadas
P <sub>4</sub>	Progesterona
POA	Area preóptica
POA-AHA	Area preóptica hipotalámica anterior
PVN	Núcleo paraventricular
RFC	Receptores a factores de crecimiento

RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RP	Receptor a progesterona
SNC	Sistema nervioso central
T	Testosterona
TAV	Testosterona apertura vaginal
TAV + E <sub>2</sub>	Testosterona apertura vaginal con administración aguda de 17-β-estradiol
VMN	Núcleo ventromedial del hipotálamo