

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

ESTUDIO DE LA EXPRESION DE GENES HORMONO-
REGULADOS DURANTE LA DIFERENCIACION SEXUAL
POSTNATAL EN LA RATA HEMBRA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOMEDICAS)

P R E S E N T A :

MED. CIR. ISABEL ARRIETA CRUZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

pdcb/grad/103Jur/2003

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

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico de Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 27 de agosto del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Méd. Cir. ISABEL ARRIETA CRUZ, con número de expediente 12982700 y número de cuenta 89022089 con la tesis titulada: **"ESTUDIO DE LA EXPRESION DE GENES HORMONO-REGULADOS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL POSTNATAL EN LA RATA HEMBRA"**, dirigida por el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

PRESIDENTE: DR. MANUEL SALAS ALVARADO
SECRETARIO: DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES
VOCAL: DRA. MARIA ESTHER CRUZ BELTRAN
VOCAL: DRA. GABRIELA GONZALEZ MARISCAL
VOCAL: DRA. GABRIELA MORALI DE LA BRENA
SUPLENTE: DR. ENRIQUE PEDERNERA ASTEGIANO
SUPLENTE: DRA. MARIA TERESA MORALES GUZMAN

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 4 de diciembre del 2003.

Dr. Gabriel Roldán Roldán
Responsable
Facultad de Medicina

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

Dedicatoria

A la mujer que más admiro, mi **MAMÁ FRANCISCA**, por el gran amor, apoyo y dedicación que siempre me ha demostrado en cada momento de mi vida. Gracias por escucharme y entenderme.

A un hombre ejemplar, mi **PAPÁ GUSTAVO**, por enseñarme que el trabajo constante y bien hecho da muchas satisfacciones. Gracias por estar siempre pendiente y aceptar este otro camino en la medicina. Te quiero mucho.

A mi amado **ROGER**, por el gran apoyo, esfuerzo y estímulo que me has brindado para terminar con este proyecto. Gracias por mantener la esperanza viva cada día para seguir juntos.

A mi querida hermana **TANIA**, que siempre me ha apoyado y ha respetado mi espacio. Gracias por compartir cada momento.

A mi querido hermano **GUS**, por tener siempre una sonrisa y una palabra de aliento en los buenos o difíciles momentos.

A **TODOS USTEDES** por ser mi mayor inspiración, muchas gracias por estar a mi lado. Los amo mucho.

Agradecimientos

A la UNAM por ser mi casa de estudios por más de 15 años y darme una sólida formación profesional.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y permitirme elegir libremente el camino a seguir en este proyecto. Gracias por el apoyo incondicional en cada etapa de mi formación doctoral.

Al Dr. Roger Gutiérrez Juárez por su apoyo solidario e interés decidido en este proyecto y por todas las facilidades brindadas para aprender y crecer académicamente. Por revisar y trabajar intensivamente en la revisión de esta tesis, mi más sincero reconocimiento. Mi más profunda gratitud por todas tus sugerencias y por seguir siendo mi maestro, mi amigo y mi compañero.

A los miembros de mi comité tutorial: al Dr. Adolfo García Sainz y al Dr. Enrique Pedernera Astegiano por sus observaciones a este proyecto en cada etapa del doctorado.

Al Dr. Manuel Salas Alvarado, a la Dra. Esther Cruz Beltrán, a la Dra. Gabriela González Mariscal, a la Dra. Gabriela Morali de la Brena y a la Dra. Teresa Morales Guzmán, por la revisión realizada a esta tesis.

A la Dra. Norma Moreno Mendoza y al Dr. Horacio Merchant Larios por las facilidades proporcionadas en su laboratorio para la realización de la parte de inmunohistoquímica de este proyecto.

A todos los compañeros de trabajo del laboratorio 202 por el agradable ambiente que encontré al integrarme a su equipo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM por la beca proporcionada para la realización de esta tesis.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. La dirección de este proyecto estuvo a cargo del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes. Este trabajo fue apoyado por los proyectos: CONACyT (34861-N) y PAEP (202365 y 202301). Isabel Arrieta Cruz fue becaria del CONACyT (Reg. 125182).

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 6 |
| Abstract..... | 8 |
| 1. Introducción..... | 10 |
| 1.1 Hormonas esteroides..... | 11 |
| 1.2 Eventos neuroendócrinos durante el desarrollo postnatal de la rata..... | 14 |
| 1.3 Diferenciación sexual del hipotálamo..... | 18 |
| 1.4 Estructura y función de los receptores a hormonas esteroides..... | 22 |
| 1.5 Regulación de la transcripción por hormonas esteroides..... | 26 |
| 1.6 El proto-oncogen c-fos..... | 29 |
| 1.6.1 Estructura del proto-oncogen c-fos..... | 30 |
| 1.6.2 Regulación de la expresión del proto-oncogen c-fos..... | 31 |
| 1.6.3 Expresión de c-fos por hormonas esteroides..... | 33 |
| 1.6.4 Funciones de c-fos en el SNC | 35 |
| 1.6.5 Expresión de c-fos en el SNC por hormonas esteroides..... | 36 |
| 1.7 El receptor a progesterona..... | 38 |
| 1.7.1 Estructura y función del receptor a progesterona..... | 39 |
| 1.7.2 Expresión del receptor a progesterona en el SNC..... | 41 |
| 2. Planteamiento del problema..... | 44 |
| 3. Objetivos..... | 45 |
| 3.1 General..... | 45 |
| 3.2 Particulares..... | 45 |
| 4. Hipótesis..... | 47 |
| 5. Materiales y Métodos..... | 48 |
| 5.1 Animales de experimentación..... | 48 |

| | |
|---|----|
| 5.2 Obtención del RNA total..... | 50 |
| 5.3 Diseño de oligonucleótidos..... | 50 |
| 5.4 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)..... | 51 |
| 5.5 Electroforesis de los productos de la PCR..... | 52 |
| 5.6 Análisis densitométrico..... | 52 |
| 5.7 Obtención de tejidos para la inmunohistoquímica..... | 52 |
| 5.8 Análisis inmunohistoquímico..... | 53 |
| 5.9 Cuantificación de la inmunoreactividad..... | 54 |
| 5.10 Radioinmunoensayo..... | 54 |
| 5.11 Análisis estadístico..... | 54 |
| 5.12 Expresión diferencial de RNAs mensajeros por RT-PCR (<i>Differential Display</i>)..... | 55 |
| 5.12.1 Clonación de las bandas expresadas diferencialmente..... | 57 |
| 5.12.2 Análisis de la secuencia de las bandas expresadas diferencialmente..... | 58 |
| 5.13 Diseño de oligonucleótidos para el gen AW528658..... | 59 |
| 6. Resultados..... | 60 |
| 6.1 Características fenotípicas de ratas hembras desfeminizadas..... | 60 |
| 6.2 Expresión del gen de c-fos durante el desarrollo postnatal..... | 61 |
| 6.3 Expresión de la proteína de c-fos en ratas desfeminizadas..... | 66 |
| 6.4 Expresión del gen del RP durante el desarrollo postnatal..... | 72 |
| 6.5 Expresión de la proteína del RP en ratas desfeminizadas..... | 77 |
| 6.6 Concentraciones hormonales séricas en ratas desfeminizadas..... | 81 |
| 6.7 Expresión diferencial de RNAs mensajeros..... | 82 |

| | |
|---|-----|
| 6.8 Identificación de nuevos genes expresados..... | 85 |
| 6.9 Expresión del gen AW528658 en la rata adulta..... | 86 |
| 7. Discusión..... | 88 |
| 7.1 Expresión de c-fos y del RP en el POA-AHA y en el HYP de ratas tratadas con esteroides sexuales durante el período neonatal..... | 88 |
| 7.2 Identificación de nuevos genes en el POA-AHA y en el HYP de ratas tratadas durante el período neonatal con esteroides sexuales.. | 94 |
| 8. Conclusiones..... | 102 |
| 9. Perspectivas..... | 103 |
| 10. Referencias..... | 105 |
| 11. Apéndice..... | 125 |
| Artículo no. 1..... | 125 |
| Artículo no. 2..... | 126 |

Resumen

Las hormonas esteroides sexuales (HES) participan en la diferenciación sexual del cerebro en los mamíferos. Durante este proceso se establecen diferencias anatómicas, bioquímicas y fisiológicas, fundamentalmente en el hipotálamo (HYP), entre hembras y machos. La adecuada diferenciación del HYP permite el establecimiento del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, así como la expresión normal de la conducta sexual en la etapa adulta. En los roedores las diferencias en el HYP se deben al efecto del estradiol (E_2) o de la testosterona (T) durante el período crítico de la diferenciación de esta región del cerebro que abarca del día 18 prenatal a los primeros cinco días del período postnatal. Las HES ejercen la mayoría de sus efectos mediante cambios en la expresión de diversos genes. El E_2 , por ejemplo, activa la transcripción del proto-oncogen c-fos (c-fos) y del receptor a progesterona (RP) en el HYP, genes que están involucrados en la diferenciación y crecimiento neuronal. Se ha observado que existe un dimorfismo sexual en la expresión de estos genes durante el desarrollo ontogénico de la rata. Sin embargo, se requiere de estudios más sistemáticos para determinar como c-fos y el RP están involucrados en el proceso de la diferenciación sexual del cerebro. Aun más, es necesario determinar qué otros genes son regulados por E_2 o por T en el HYP y que podrían estar involucrados en éste proceso.

Para intentar contestar esas preguntas se realizó el presente estudio, el cual consta de dos partes. En la primera parte, se determinó la expresión del RNA mensajero (RNAm) y de la proteína de dos genes, c-fos y RP, en diferentes etapas del desarrollo postnatal, en el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) y en el HYP de ratas hembras tratadas a los tres días de edad con E_2 o con T. En la segunda parte se utilizó la tecnología del "*differential display*" (DD) para identificar otros genes inducidos por E_2 o T en el POA-AHA y en el HYP de ratas hembras tratadas con esteroides sexuales a los tres días de edad.

Los resultados muestran un incremento significativo en la expresión del RNAm tanto de c-fos como del RP en el POA-AHA a las 2 horas y en el día de la

apertura vaginal (AV) después de la administración del E₂ o la T. En el HYP sólo se observó un incremento significativo de la expresión de estos genes en el día de la AV. Además, la expresión de la proteína c-fos y del RP también se incrementó significativamente en el POA-AHA y en el HYP en el día de la AV. Estos hallazgos indican que los esteroides sexuales administrados en el período crítico postnatal de la diferenciación sexual del cerebro inciden en el ulterior patrón de expresión de c-fos y del RP en el HYP durante la pubertad de la rata.

Por otra parte, a través del DD se detectaron más de 100 diferentes transcritos en el día de la AV, de éstos 45 fueron inducidos por E₂ y 57 inducidos por T en la región del POA-AHA y del HYP. De entre esos transcritos, se caracterizó con mayor detalle dos genes inducidos por E₂ en el POA-AHA, cuyas secuencias son idénticas a 1) el RNAm putativo identificado como AW528658 en una biblioteca de expresión (*expressed sequence tag* o *EST*) obtenida de hipocampo de rata, y 2) la proteína L30 ribosomal (número de acceso del GeneBank NM_022699). La secuencia AW528658 parece ser un fragmento de RNAm del cual se desconoce tanto la secuencia completa como el producto génico (proteína) correspondiente. En este trabajo se muestra que la secuencia AW528658 se expresa tanto en el HYP como en otros tejidos (hígado) de ratas adultas. Sin embargo, se requiere una mayor caracterización para determinar la identidad y función de este gen inducido por HES en el cerebro. Por su parte, la proteína L30 ribosomal, componente de la "maquinaria" ribosomal para la síntesis de proteínas, está altamente conservada en las diferentes especies. L30 se ha identificado como uno de los genes cuya expresión está aumentada en tumores primarios humanos de cáncer mamario dependiente de estrógenos. Queda por establecer si AW528658 o L30 participan en la diferenciación sexual del HYP.

Abstract

Sex steroid hormones (SSH) are responsible for the sexual differentiation of the brain in mammalian organisms. During this process the hypothalamus (HYP) undergoes a series of anatomical, biochemical and physiological changes specific to either males or females. In fact, proper differentiation of HYP is necessary for the establishment of the hypothalamus-hypophysis-gonad axis as well as for the normal development of sexual behavior in the adult. In rodents, sexual dimorphism of the HYP is due to the action of estradiol (E₂) or testosterone (T) during the critical period of sexual differentiation of the brain, which spans from day 18 before birth to postnatal day 5. Most of SSH effects are mediated through transcriptional activation of various genes. For example, in the HYP E₂ activates the transcription of the proto-oncogene *c-fos* (*c-fos*) and the progesterone receptor (PR), two genes that are involved in neuronal growth and differentiation. It has also been observed that these genes display a sexually dimorphic expression pattern during ontogenic development of the rat. More detailed studies are however required to understand how *c-fos* and PR are involved in the sexual differentiation of the brain. Furthermore, it is necessary to determine what other genes are regulated by E₂ or T in the HYP which may therefore be involved in the differentiation process.

To address these problems I performed the current two-part study in female rats treated with either E₂ or T at day 3 of age. In the first part, *c-fos* and PR (mRNA and protein) expression was determined in the preoptic area-anterior hypothalamic area (POA-AHA) and HYP at different developmental stages. In the second part, a differential display (DD) strategy was undertaken in order to identify genes regulated by either E₂ or T in POA-AHA and HYP.

The results showed a significant increase in the expression of *c-fos* and PR at the mRNA level in the POA-AHA at 2 hours and on the day of vaginal opening (VO) in animals treated either with E₂ or the T on day 3 of age. By contrast, in the HYP the expression of these genes was increased only on the day of VO. In

addition, the protein expression of c-fos and PR was increased significantly in both the POA-AHA and the HYP on the day of VO. These results suggest that treatment with sex steroids during the postnatal critical period of sexual differentiation has far-reaching effects altering the normal expression pattern of c-fos and PR in HYP during the puberty of the rat.

The DD expression experiments yielded over a hundred transcripts induced by either E₂ (45 transcripts) or T (57 transcripts) on the day of VO in the POA-AHA and HYP. Among the transcripts induced by E₂ in the POA-AHA, two were further characterized, their sequences were identical to: 1) a putative mRNA with GeneBank Access number AW528658 from a rat hippocampus EST (expression sequence tag) library; and 2) the L30 ribosomal protein (GeneBank Access number NM_022699). AW528658 seems to be a fragment of an mRNA whose full-length sequence and gene product are unknown. PCR experiments reported in this work show that this sequence is expressed in HYP and non-neural tissues like the liver of adult rats. A more detailed characterization is thus necessary to determine the identity and function of this gene induced by SSH in the brain. The L30 ribosomal protein, on the other hand, is a highly conserved protein that forms part of the ribosomal translational machinery. The expression of L30 is increased in estrogen-dependent primary breast cancers. It remains to be established whether or not either L30 or AW528658 plays a role in the sexual differentiation of the HYP.

1. Introducción

Las hormonas esteroideas sexuales (HES) participan en diversas funciones del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, como son la diferenciación neuronal, la organización sexual del cerebro, la reproducción, la conducta sexual y la excitabilidad neuronal entre otros (Alonso y López-Coviella, 1998). En los roedores, la exposición a altas concentraciones de estradiol (E₂) o de testosterona (T) durante los primeros 5 días de vida postnatal produce cambios en su fisiología reproductiva durante la etapa adulta. En la rata hembra, la administración de E₂ o T en esta etapa crítica postnatal provoca desfeminización o androgenización, que se caracterizan por defectos en la fisiología normal reproductiva, como son: estro permanente, desarrollo anormal de los genitales externos, anovulación y falta de formación del cuerpo lúteo, alteración permanente de la secreción de gonadotropinas, supresión de la conducta sexual femenina y esterilidad (McEwen, 1983; Arnold y Gorski, 1984).

Se sabe bien que las acciones de las HES están mediadas por receptores intracelulares específicos que funcionan como factores de transcripción activados por su ligando. En el núcleo celular, el complejo hormona-receptor interactúa con elementos de respuesta a hormonas esteroideas presentes en el DNA activando la expresión de genes regulados por estas hormonas. En el SNC, los estrógenos regulan la expresión de varios genes, a saber: el propio receptor a estrógenos (RE), el receptor a progesterona (RP), enzimas para la síntesis de neurotransmisores y neuropéptidos, así como factores de transcripción tales como el proto-oncogen c-fos (McEwen y Alves, 1999).

El proto-oncogen c-fos se induce por un gran número de estímulos físicos y químicos por lo cual su expresión se utiliza como un marcador de la actividad neuronal. En ratas ovariectomizadas tratadas con E₂ o durante el ciclo estral se han evaluado por medio de técnicas como la de RT-PCR, la hibridación in situ y la inmunohistoquímica, los efectos del E₂ sobre la expresión del RNA mensajero y la proteína de c-fos en el SNC. De esta forma se ha demostrado que la expresión de

c-fos es inducida por E₂ en el mesencéfalo, el hipotálamo (HYP) y el hipocampo de la rata (Auger y Blaustein, 1995; Camacho-Arroyo y cols., 1998).

Por otro lado, se sabe que los estrógenos inducen la expresión del RNA mensajero y de la proteína del RP en diversas regiones del cerebro anterior de la rata, demostrándose que el RP es regulado a la alta por E₂ en el área preóptica (POA) y en el HYP de animales ovariectomizados (Camacho-Arroyo y cols., 1998). Esta regulación está mediada por los elementos de respuesta a estrógenos localizados en la región promotora de este gen (Truss y Beato, 1993).

Sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado en detalle el patrón de expresión de genes regulados por HES, como es el proto-oncogen c-fos y el RP, en modelos de diferenciación sexual del cerebro. Incluso se desconoce el número y la identidad de otros genes regulados por HES en el HYP por lo que se requiere su caracterización.

1.1 Hormonas esteroides

Los esteroides son moléculas lipídicas que forman parte de un grupo de sustancias químicas que incluye muchas hormonas y vitaminas, cuya estructura básica es el ciclo pentanoperhidrofenantreno. El colesterol es el precursor de las hormonas esteroides, estas son agrupadas en cinco clases: los progestágenos, los andrógenos, los estrógenos, los glucocorticoides y los mineralocorticoides. La mayoría de estas hormonas esteroides son sintetizadas en el ovario, el testículo y las glándulas adrenales (Voet y Voet, 1995).

La progesterona (4-pregnen-3,20-diona) (P₄) es el progestágeno más importante, cuya participación es fundamental para mantener el producto durante la gestación. La P₄ y sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) están constituidos por 21 átomos de carbono. La P₄ se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo en el ovario durante la fase lútea del ciclo menstrual (Hsueh y cols., 1984; Hutchison y cols., 1986). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la hormona luteinizante

(LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y los agentes β -adrenérgicos (Graham y Clarke, 1997). Otros órganos en los que también se ha demostrado la síntesis de P_4 incluyen la corteza suprarrenal, la placenta (Pomata y cols., 2000) y el testículo. Este último biosintetiza P_4 como intermediario de la formación de otras hormonas esteroides (Weisz y Ward, 1980).

El principal andrógeno en los mamíferos es la testosterona (T) que se secreta en los testículos y es la hormona más abundante en el plasma de los machos. En las hembras, tanto en los ovarios como en las glándulas suprarrenales se sintetizan cantidades variables de esta hormona. En muchos tejidos blanco para andrógenos, la T se reduce en la posición 5α para formar dihidrotestosterona (DHT), el andrógeno natural más potente, que funciona como mediador intracelular de varios de los efectos de la T. La T puede también aromatizarse y producir E_2 en diversos tejidos no glandulares, como es el caso en algunas áreas del SNC, esta vía explica la mayor parte de la síntesis de estrógenos en los machos y en las mujeres postmenopáusicas (Simpson, 2002).

El estrógeno natural más potente en los mamíferos es el estradiol (E_2) seguido por la estrona y el estriol. Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 átomos de carbono, que contiene un anillo fenólico A, 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_2 es sintetizado en el ovario por las células de la granulosa a partir de andrógenos proporcionados por las células de la teca. El E_2 secretado se oxida de manera reversible hasta generar estrona mediante la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa, y éstos dos estrógenos pueden convertirse en estriol. Esas transformaciones ocurren principalmente en el hígado (Shoham y Schachter, 1996). Ver figura 1.

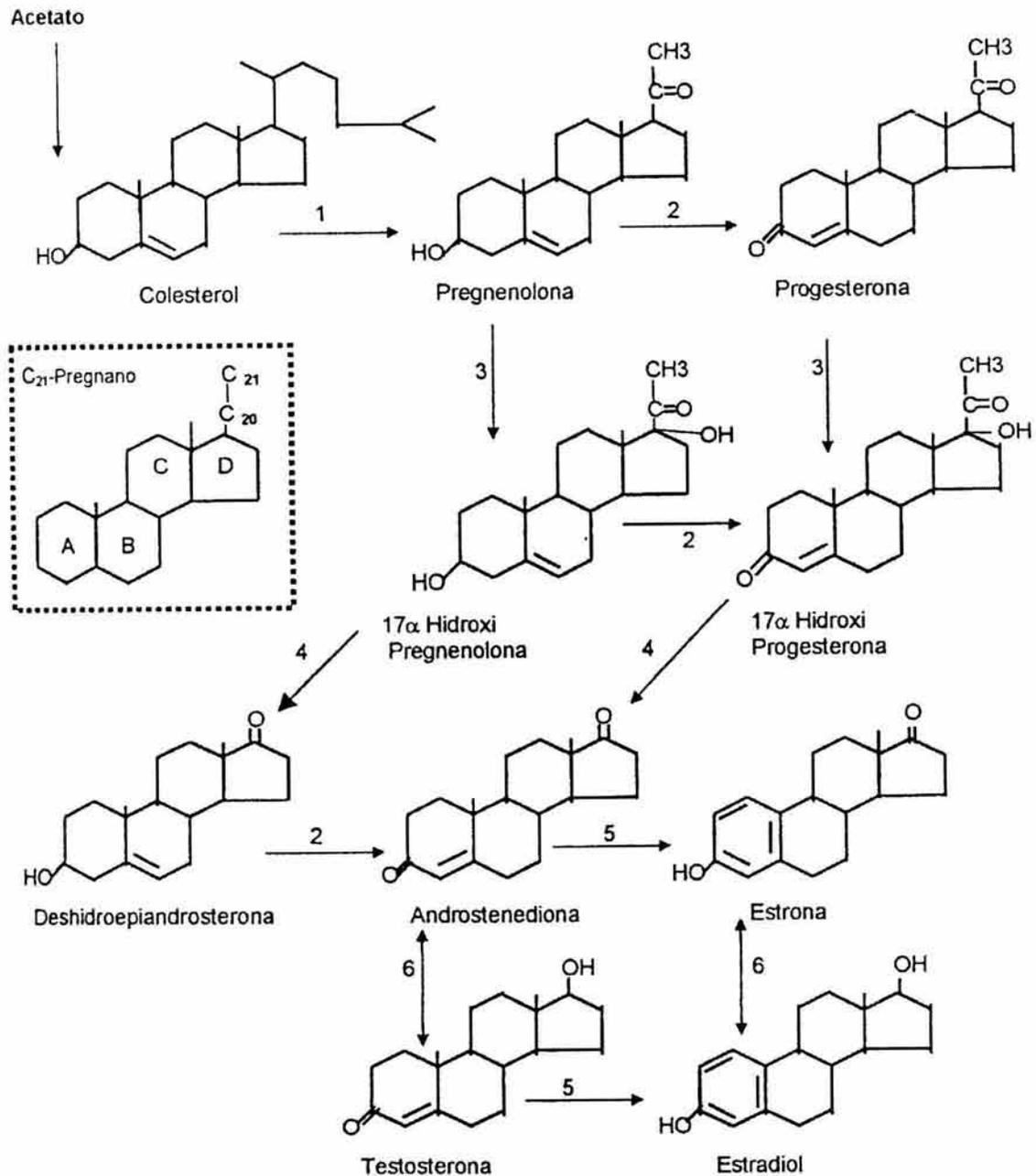


Figura 1. Síntesis de los principales esteroides sexuales. Las enzimas que catalizan cada una de las reacciones en esta vía metabólica están marcadas con un número: 1) 20,22 desmolasa; 2) 3 β -OH-esteroides deshidrogenasa; 3) 17 α -hidroxilasa; 4) 17,20-esteroide liasa (desmolasa); 5) aromatasa; 6) 17 β -OH-esteriodes. En el recuadro se encuentra la estructura básica de los esteroides sexuales y las letras con que se denomina a cada uno de los anillos en que está constituida. (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

1.2 Eventos neuroendócrinos durante el desarrollo postnatal de la rata.

Para tratar de entender los mecanismos involucrados en la diferenciación sexual del cerebro, es importante conocer los eventos fisiológicos durante las primeras etapas del desarrollo postnatal que marcan el comienzo de una serie de eventos tan complejos e inter-relacionados que involucran tanto al sistema nervioso como al sistema endócrino.

Con base en los parámetros morfológicos y fisiológicos, el desarrollo de la rata hembra se ha dividido en 4 fases (Ojeda y Urbanski, 1994):

- 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 día 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 en la actividad estrogénica, expresada por la presencia del líquido en la luz del útero (Ojeda y cols., 1985). El final de la fase juvenil puede ser considerado por el establecimiento de las diferencias matutinas y vespertinas de la liberación pulsátil de la LH.
- 4) Peripuberal. Tiene una duración variable e incluye los días que preceden y suceden a 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 y cols., 1980). La castración en el animal recién nacido no provoca aumento en 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 gonadotropinas, no son efectivas en esta fase de la vida. Esta falta de respuesta se debe a la deficiencia de la alfabetoproteína 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 esta proteína 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 y Urbanski, 1994).

Durante la fase infantil se presentan una serie de cambios en el eje hipotálamo-hipófisis, los primeros eventos neuroendócrinos que se producen tienen un impacto directo sobre el momento en el que se inicia la pubertad. Las concentraciones séricas de la 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 enzimática de la aromatasas en el ovario, lo que se traduce en la liberación de estrógenos (Ojeda y Urbanski, 1994). La concentración plasmática de la FSH permanece en concentraciones basales mientras que la LH es pulsátil, variando su concentración dependiendo de la edad del animal (Doler y Wuttke, 1975). Este modelo de secreción de la FSH y de la LH que caracteriza a esta 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, asumiéndose que los estrógenos juegan un papel definitivo en la modulación de tales eventos (Ojeda y Urbanski, 1994).

Hacia el día 16 disminuye la concentración sérica de la alfafetoproteína y por tanto aumenta la concentración de estrógenos libres en la circulación y en el SNC (Andrews y cols., 1981). Este cambio permite que los estrógenos ejerzan 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 E_2 , lo que es seguido de un breve incremento en la liberación de P_4 alrededor del día 15 de edad, el cual declina antes de que termine la fase infantil. Durante esta fase el útero se sensibiliza a la estimulación estrogénica (Ojeda y cols., 1985).

Debido a que en la fase infantil los ovarios de la rata producen androstendiona y T, se sugiere que el inicio de la retroalimentación inhibitoria ejercida por los esteroides sobre la secreción de las gonadotropinas, se realizó por medio de los andrógenos aromatizables en el HYP (Andrews y cols., 1981). Sin embargo, se ha observado que entre los días 16 y 20 de edad de vida postnatal se requiere que aumente la secreción de esteroides para que aumente la secreción de LH (Ojeda y cols., 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 y Urbanski, 1994).

Con el inicio de la fase juvenil o prepúber (día 22 de edad), la rata responde al aumento de las concentraciones plasmáticas de estrógenos, al inducirse la liberación de LH en cantidades similares a las del poestro (Andrews y cols., 1981). En este tiempo, la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es regulada de manera inhibitoria por los estrógenos y las concentraciones de andrógenos aromatizables disminuyen considerablemente. Por otro lado, aun cuando en esta fase se presentan ondas de crecimiento y atresia folicular, los folículos todavía no alcanzan el estado ovulatorio. La adquisición de esta capacidad en el momento de la pubertad está regulada por múltiples factores hormonales y neurogénicos que operan bajo la dirección del SNC (Ojeda y Urbanski, 1994).

Además de la FSH y la LH, la adenohipófisis secreta otras hormonas, la prolactina y la hormona de crecimiento. Al inicio de la fase juvenil la secreción de estas hormonas es baja pero va aumentando gradualmente (Doler y Wuttke, 1975; Andrews y Ojeda, 1977).

En la fase peripuberal, conforme se alcanza la pubertad, los ovarios adquieren gradualmente la capacidad de secretar estrógenos en respuesta a la estimulación gonadotrópica (Ojeda y Urbanski, 1994). Este cambio esta asociado con dos eventos; el primero, es un incremento en el número de receptores a la LH,

que ya está presente en la fase infantil hacia la cuarta semana de vida; y el segundo, es una disminución en el número de receptores a la GnRH que se inicia en la segunda mitad de la fase juvenil (Dalkin y cols., 1981), siendo más pronunciado cerca de la primera ovulación.

El comienzo de la pubertad está determinada por manifestaciones neuroendócrinas que tiene 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 prolactina y de hormona de crecimiento se incrementan significativamente respecto a las observadas en la fase juvenil, lo mismo ocurre con la secreción de estrógenos de origen ovárico, en respuesta al estímulo gonadotrópico (Andrews y Ojeda, 1977; Advis y cols., 1979; Ojeda y Urbanski, 1994).

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, se muestran entre los 28 y 29 días de edad, sin embargo 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 (Ojeda y Urbanski, 1994).

El hecho de que las concentraciones preovulatorias de E₂ puedan estimular la liberación de LH, indica que de esto depende que el ovario adquiera la capacidad de producir concentraciones altas de E₂. 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 y cols., 1982; 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; ocurre alrededor del día 30 de edad, cuyo peso de la rata es de menos de 100 g de 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 se mantiene cerrada; 3) *Proestro tardío*. Es el día del

primer proestro, el útero está lleno de fluido pero la vagina permanece cerrada; 4) *Estro*. Es 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 y 5) *Primer diestro*. La citología vaginal presenta gran cantidad de leucocitos, así como la presencia de cuerpos lúteos maduros en los ovarios. La apertura vaginal se detecta con la presencia de fluido en la vagina (36 ± 3 días) (Ojeda y Urbanski, 1994). Todos estos eventos inducen la aceleración del crecimiento y la maduración folicular que culmina con la ovulación (McCann y cols., 1981; Fink, 1986).

1.3 Diferenciación sexual del hipotálamo

El proceso de la diferenciación sexual en los mamíferos es dinámico, secuencial y ordenado, el cual se lleva a cabo en varias etapas consecutivas: 1) el establecimiento del sexo cromosómico durante la fertilización; 2) la etapa pregonadal; 3) el desarrollo del sexo gonadal y 4) 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 determinada por el cromosoma Y (López-López y cols., 1996).

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 fisiología cerebral de uno y otro sexo. El establecimiento de dichas diferencias no es sólo el resultado directo de la expresión genética, sino que depende en gran medida del medio hormonal en el cual esté en contacto el cerebro durante el período crítico de su desarrollo (Gorski, 2002).

Se ha caracterizado el efecto de las hormonas esteroides gonadales sobre la diferenciación sexual del cerebro por medio de dos vías: 1) activacionales, son aquellos efectos que ejercen las hormonas esteroides dentro de un órgano blanco, ya consolidado, el cual activa algún mecanismo específico y 2) organizacionales, que son las acciones que ejerce la hormona sobre un tejido en desarrollo, para

dirigir permanentemente la organización de dicho tejido. Con todo esto, la diferenciación sexual del cerebro es una consecuencia de la acción organizacional de las hormonas esteroides; es decir, los estrógenos o los andrógenos aromatizables ejercen su efecto sobre áreas específicas del SNC, como es el caso del POA y el HYP, cuya alteración se manifiesta en el animal adulto como alteraciones permanentes de su fisiología normal reproductiva (Arnold y Gorski, 1984).

Uno de los modelos más explorados para entender los mecanismos involucrados en la diferenciación sexual del cerebro ha sido el estudio del núcleo preóptico medial (NPM), originalmente éste núcleo se llamó núcleo sexualmente dimórfico del POA, el volumen de este núcleo en la rata macho adulto es de cinco a siete veces más grande que en la rata hembra adulta. (Gorski y cols., 1978, 1980; Davis y cols., 1996). Las diferencias sexuales en el volumen del NPM son resultado de una exposición diferencial de machos y hembras a la T o a su metabolito, el E₂, durante períodos críticos del desarrollo. En los roedores, se ha caracterizado dos períodos donde la T circulante ejerce su efecto en el HYP para generar estas diferencias en el cerebro; la primera ocurre entre el día 18 y 19 de la gestación y la segunda en los primeros cinco días de vida postnatal. Algunos autores han demostrado que este período de sensibilización a los estrógenos puede extenderse hasta los primeros 10 días de vida extrauterina (Cooke y cols., 1998). Una vez que la T se encuentra dentro de la neurona es metabolizada a E₂ por la enzima aromatasa y esta conversión es la responsable de producir muchas de las diferencias sexuales en el cerebro (Gorski, 2002). Esto se basa en el hecho de que grupos de investigación indujeron masculinización hipotalámica, al utilizar T o su éster (propionato de testosterona), o E₂ o su éster (benzoato de estradiol) en ratas prepúberes (Barraclough, 1966). Trabajos posteriores utilizaron compuestos androgénicos no aromatizables en los que mostraron que no causaban masculinización (Arai y Gorski, 1968); mientras que los estrógenos naturales o sintéticos sí inducen ésta, (Christensen y Gorski, 1978) y que los antiestrógenos o

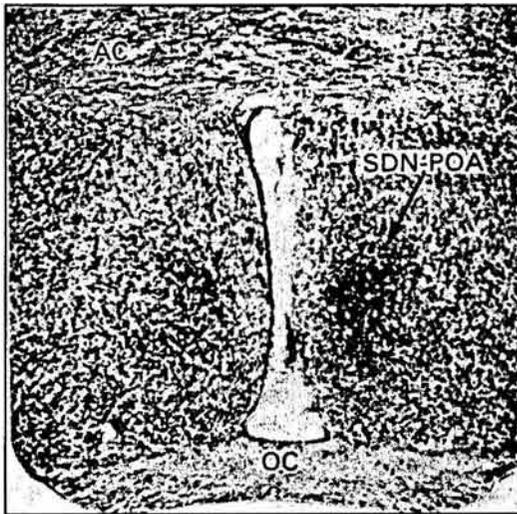
inhibidores de la aromatización bloquean la acción masculinizante de los esteroides (Brown-Grant, 1974). Ver figura 2.

Se ha observado que ratas hembras adultas que fueron expuestas a propionato de testosterona o al estrógeno sintético dietilestilbestrol durante el período prenatal tienen más grande el volumen del NPM que los animales controles (Döhler y cols., 1984; Rhees y cols., 1990a, 1990b). En el caso de ratas machos adultos que fueron castrados en el día del nacimiento o que recibieron un inhibidor de la aromatasa en la etapa perinatal tienen reducido el volumen del NPM (Houtsmuller y cols., 1994; Davis y cols., 1996). Una de las posibles explicaciones para entender los efectos de la T y el E₂ en el NPM durante este período es que existe una disminución en la muerte celular programa en las neuronas de este núcleo (Davis y cols., 1996; Chung y cols., 2000).

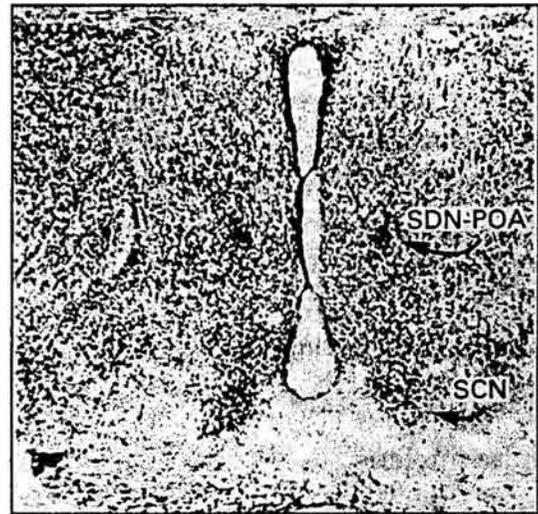
Dos regiones del POA de la rata son especialmente sensibles a los efectos de la T y su metabolito el E₂ durante el desarrollo se trata del NPM y el núcleo anteroventral periventricular (NAPv). Estas áreas son sexualmente dimórficas en su estructura, neuroquímica y función. Por ejemplo, el volumen del NAPv y un subnúcleo del NPM son sexualmente dimórficos en sistemas de neuropéptidos y de neurotransmisores en estas dos regiones (Bleier y cols., 1982; Simerly y cols., 1985; Sumida y cols., 1993; Davis y cols., 1996). Adicionalmente, el NPM regula la conducta sexual, mientras que el NAPv regula el patrón de secreción de las gonadotropinas el cual es sexualmente dimórfico. Muchas de las diferencias anatómicas y funcionales de éstas regiones son resultado de la exposición de machos y hembras a la T y subsecuentemente al E₂ durante el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro (Meisel y Sachs, 1994; Numan, 1994).

Otros estudios demostraron que una sola inyección de E₂ a ratas hembras durante la etapa neonatal causó esterilidad en la etapa adulta de estos animales. A las alteraciones ocasionadas en la fisiología reproductiva se le conoció como síndrome de estrogenización o desfeminización, que se caracteriza con la pérdida de la capacidad para liberar la GnRH de manera cíclica en respuesta al

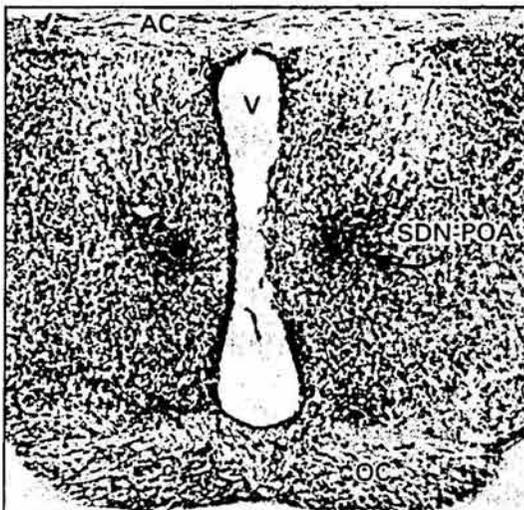
a) Rata macho adulto



b) Rata hembra adulta



c) Rata hembra adulta
expuesta a testosterona



d) Rata hembra adulta
expuesta a estradiol

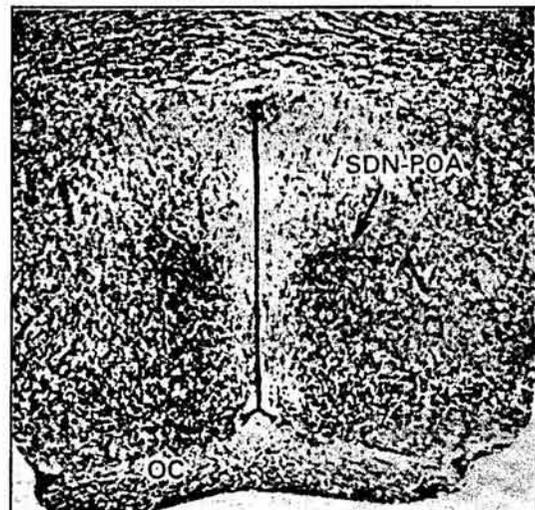


Figura 2. Efecto de las hormonas esteroides sexuales sobre la diferenciación sexual del hipotálamo. Fotomicrografías de cortes coronales de cerebro que muestran el núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica en ratas adultas, se observa que este núcleo es de 5 a 7 veces más grande en el macho que en la hembra (a y b). La exposición a testosterona o estradiol dentro de los primeros 5 días de edad de la rata modifica el volumen y número de neuronas del núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica en la etapa adulta (c y d). AC= comisura anterior; OC= quiasma óptico; SCN= núcleo supraquiasmático; SDN-POA= núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica y V= tercer ventrículo. (Gorski, 2002).

estímulo con estrógenos y de la incapacidad para inducir conducta de lordosis (Gorski, 1963; Feder, 1981). Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que la administración de un antiestrógeno sintético bloqueaba la acción masculinizante de los andrógenos (McDonald y Doughty, 1972; 1974).

En estudios realizados en ratas hembras hace más de tres décadas se mostró que las hormonas esteroides sexuales administradas en el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro, tienen efectos en el desarrollo del POA y del HYP, que se manifiesta en el animal adulto como: cambios en la receptividad sexual, alteraciones vaginales y de la actividad ovárica, así como variaciones en las concentraciones plasmáticas de las hormonas gonadotrópicas (Herrenkohl y Scott, 1984; Pinilla y cols., 1993). En el caso de los machos se impide la virilización de estructuras cerebrales que determinan la secreción tónica de la GnRH (Van der Schoot y Zeilmaker, 1973).

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 en el peso corporal. La falta de ovulación cíclica provocada por la desfeminización neonatal se considera que es debida a alteraciones en la sensibilidad del núcleo arcuato (ARC) en el HYP y del POA a los estímulos que dirigen normalmente la ovulación (Wagner y cols., 1966).

Estos hechos llevan a plantear que en el proceso de la desfeminización hipotalámica, el E₂ y la T participan activamente en la regulación de vías que controlan este evento durante el desarrollo postnatal de la rata. Y resulta interesante estudiar si algunos genes que son regulados por estrógenos en el HYP están involucrados en este proceso como posibles marcadores en la regulación de la diferenciación neuronal.

1.4 Estructura y función de los receptores a hormonas esteroides

Las hormonas esteroides ejercen sus efectos por medio de su unión con receptores específicos. Estos receptores están localizados en el núcleo y en el

citoplasma de las células blanco, regulan la transcripción de distintos genes que controlan y promueven diversos aspectos de la proliferación y la diferenciación celular, el crecimiento, el desarrollo y la homeostasis. Los receptores a hormonas esteroideas (RS) pertenecen a una superfamilia de factores de transcripción, formada por tres diferentes grupos. Los receptores tipo I, están compuestos por los receptores a hormonas esteroideas [progesterinas (RP), estrógenos (RE), andrógenos (RA), glucocorticoides (RG) y mineralocorticoides (RM)]; los receptores tipo II: agrupan a los receptores a hormonas tiroideas (RT), el receptor al ácido trans (RAR) y cis (RXR) retinoico y el receptor a la vitamina D (RVD) y por último el grupo III: que está constituido por una gran variedad de proteínas de las cuales se desconoce su ligando, los llamados receptores huérfanos (Tsai y O'Malley, 1994).

Los RS se transportan al núcleo en ausencia del ligando (de ahí que se llamen receptores nucleares) uniéndose a proteínas de choque térmico (HSP), en éste estado no se unen al DNA por lo que carecen de actividad transcripcional. A diferencia de los receptores tipo I, los receptores tipo II poseen actividad transcripcional frecuentemente en ausencia del ligando, de reconocer y unirse a secuencias específicas del DNA para inhibir (silenciamiento) la transcripción. Los receptores tipo I, se activan cuando se unen al ligando, formando homodímeros, heterodímeros o ambos que interactúan con secuencias palindrómicas, llamadas elementos de respuesta a la hormona (ERH), presentes en el DNA (Katzenellenbogen y Katzenellenbogen, 1996).

El análisis detallado de la estructura y la función de estos RS ha permitido establecer características generales de los miembros de la superfamilia. En la región amino terminal (dominio A/B) está localizada la función de transactivación o AF-1; en la región central (dominio C) se encuentra el sitio de unión al DNA (DBD), así como una región de bisagra (dominio D) que participa en el cambio conformacional, y en el extremo carboxilo terminal (dominio E) del receptor se encuentra el sitio de unión al ligando (LBD) (Gronemeyer, 1992). El dominio A/B varía tanto de tamaño como en secuencia entre los miembros de la familia de los

RS. Este dominio está involucrado en la regulación de la transcripción tejido y promotor-específico (Berry, et al., 1990), y en la formación de homodímeros y heterodímeros con otros factores de transcripción (Landers y Spelsberg, 1992).

El dominio de unión al DNA (DBD) es la región más conservada entre los miembros de la familia de los RS. Este dominio contiene dos iones de zinc coordinados tetraédricamente con ocho residuos de cisteína. La coordinación del zinc es importante para la función de unión al DNA. El DBD tiene dos subdominios, CI y CII, que son codificados por dos exones distintos. Cada uno de ellos está compuesto por un motivo lazo-hélice y cada uno tiene un ión zinc ligado por dos cisteínas ubicadas en el inicio del lazo y por dos cisteínas situadas en el extremo amino-terminal de la α -hélice. Las dos hélices se encuentran empaçadas, una contra la otra, en un ángulo casi recto (Harrison, 1991). Los residuos de aminoácidos de estos dos subdominios se pliegan para formar un solo dominio estructural, que contiene el motivo hélice-vuelta-hélice, presente en diversas proteínas que se unen al DNA, incluyendo a los factores de transcripción. Este *motif* se une al surco mayor del DNA produciendo cambios en la transcripción de genes regulados por esteroides. En tanto, los aminoácidos que se encuentran entre las primeras dos cisteínas del segundo dedo de zinc forman una región de dimerización (Trus y Beato, 1993). Este dominio controla la dimerización del DNA con el RS y la regulación del gen por el receptor. Al menos tres aminoácidos del extremo carboxilo-terminal del primer dedo de zinc son críticos para el reconocimiento del elemento de respuesta apropiado (Mader y cols., 1989). Ver figura 3.

Con excepción del RG, los RS están localizados en el núcleo de la célula en ausencia de la hormona. Cuando la hormona se une al receptor, el complejo hormona-receptor se une al DNA (Picard, et al., 1990). La región de bisagra es rica en aminoácidos básicos (lisinas y argininas) y esta localizada en la vecindad del segundo dedo de zinc, y contiene la señal de localización nuclear (Figura 3) (Picard y Yamamoto, 1987; Guiochon-Mantel y cols., 1989; Green y Chambon, 1991).

El dominio de unión al esteroide (HBD) está localizado en el extremo carboxilo-terminal de la proteína y es importante en la regulación de la actividad transcripcional del receptor, ya que en esta región se encuentra localizada otra función de activación (AF-2), la cual es muy similar a los “dominos de activación ácidos” de ciertos factores de transcripción, no relacionados con los RS. La actividad de esta región depende de la unión de ligandos agonistas (Webster y cols., 1988). La formación de homodímeros es una característica general de la familia de los RS. Otra región de dimerización menos definida se traslapa con el HBD y su función parece depender de la unión de la hormona (Fawell y cols., 1990). Asimismo, este dominio es el responsable de la interacción con las proteínas de choque térmico (HSP), en este dominio también se han identificado algunas señales de localización nuclear (Housley y cols., 1990), (Figura 3).

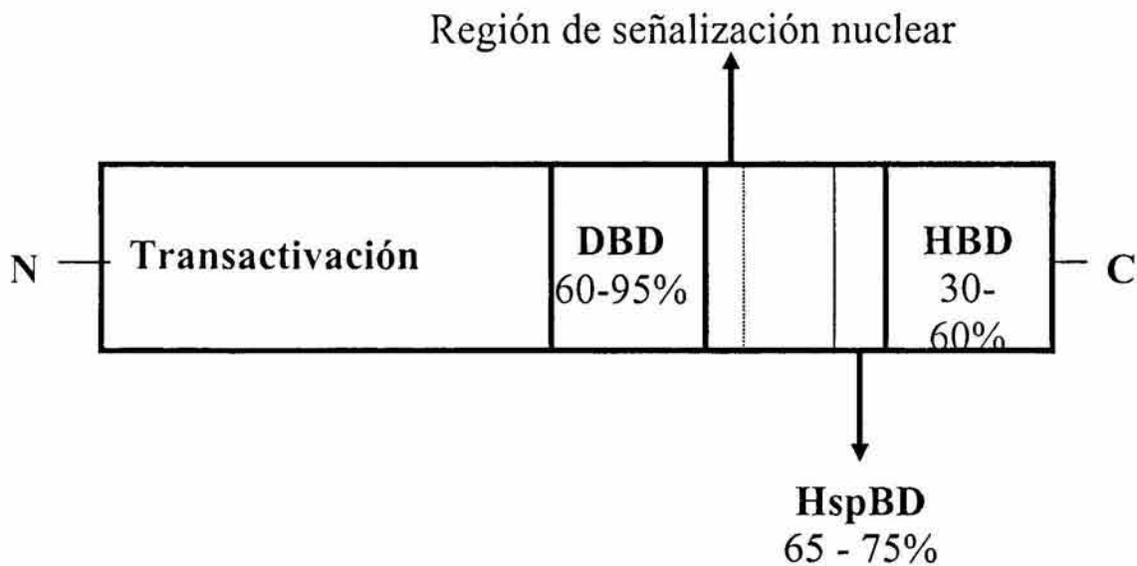


Figura 3. Estructura básica de un receptor a hormona esteroide. En el esquema se muestra la región amino-terminal (N), la cual es una región variable entre los miembros de la familia de receptores a esteroides y corresponde al dominio A/B para la activación de la transcripción; hacia el extremo carboxilo-terminal (C) se localiza el dominio de unión a la hormona (HBD) y corresponde al dominio E; el sitio de unión a proteínas de choque térmico (HspBD) llamado dominio D y finalmente se localiza el sitio de unión al DNA (DBD), el cual es el más conservado en toda la familia de los receptores, denominado el dominio C. Los porcentajes representan el grado de homología entre los diferentes receptores a hormonas esteroides. (Evans, 1988).

1.5 Regulación de la transcripción por hormonas esteroides

Se ha propuesto que el mecanismo de acción por el cual las hormonas esteroides ejercen sus efectos transcripcionales en la célula blanco es por medio del modelo clásico denominado mecanismo genómico, que consiste en que el esteroide libre difunde hasta el núcleo de la célula blanco en donde es retenido mediante la formación de un complejo de alta afinidad con el receptor específico. La unión del esteroide conduce la "activación" de la molécula del receptor, mediante cambios conformacionales en la estructura terciaria y cuaternaria en el receptor. Estos cambios permiten que el complejo hormona-receptor se una con alta afinidad a secuencias específicas del DNA, los llamados ERH. Estos elementos reguladores son secuencias palindrómicas de DNA de 15-20 pares de bases localizadas en el extremo 5' no codificante (o incluso dentro del gen) de genes regulados por hormonas. Se han caracterizado cuatro clases de ERH: la primera clase corresponde a los elementos de respuesta para las progestinas, los andrógenos, los glucocorticoides y los mineralocorticoides (secuencia consenso GTACAnnnTGTTCT); en la segunda clase, el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) (AGGTCAnnnTGACCT) es muy parecido al elemento de respuesta a hormonas tiroideas (THRE), salvo que este último no tiene los nucleótidos separadores (TCAGGTCA TGACCTGA), de tal forma que tanto los homodímeros como los heterodímeros del RAR se unen al THRE. La cuarta y última clase es el receptor huérfano COUP que se une a la secuencia GTGTCAA AGGTCA (Fuller, 1991; Hager y cols., 2000).

La unión del dímero del RS al ERH regula la transcripción de uno o varios genes "reguladores" minutos después de que el esteroide entra en la célula blanco. Existen diversas vías mediante las cuales estos genes "reguladores" causan sus efectos (Figura 4):

1. Algunas de las proteínas que se sintetizan por la expresión de genes regulados por hormonas esteroides tienen actividad enzimática en el citoplasma o en la membrana, por ejemplo, las cinasas o las proteasas, las cuales a su vez

podrían inducir cambios en el transporte de la membrana, síntesis proteica, procesamiento o secreción de proteínas (Norvitch y cols., 1989; Falkenstein y cols., 2000).

2. La proteína reguladora enzimática puede modificar factores nucleares, los cuales a su vez, pueden regular la estructura de la cromatina (Hager y Archer, 1991) o posiblemente activar el procesamiento del RNA, interfiriendo en la vida media del RNA mensajero (Forsthoefel y Thompson, 1987; Fink y cols., 1988; Lau y cols., 1990; Barrett y Spelsberg, 1998).

3. Las proteínas reguladoras pueden ser factores nucleares que actúen directamente como factores de transcripción activando la expresión de genes tempranos (minutos) o tardíos (horas) (Landers y Spelsberg, 1992; Barrett y Spelsberg, 1998).

Se ha demostrado que los RS son capaces de reclutar proteínas correguladoras. A la fecha, se ha indentificado alrededor de 30 diferentes proteínas coactivadoras que están involucradas en la activación de la transcripción de genes por receptores nucleares (McKenna y cols., 1999). Muchos de estos coactivadores son bifuncionales ya que no sólo contribuyen a activar la transcripción de genes sino que además, tienen una actividad enzimática, que a su vez modifica la transcripción. Se han caracterizado diferentes funciones como de acetiltransferasa, metiltransferasa, ATPasa, cinasa y ubiquitin-ligasa, que actúan sobre histonas, receptores, complejos de cofactores y factores generales de transcripción basal facilitando la entrada subsecuente de diferentes complejos, lo que prepara al promotor para la iniciación de la transcripción. El incremento en la acetilación del extremo amino terminal de las histonas se ha correlacionado con la activación de la transcripción, mientras que la hipoacetilación se ha asociado con represión. En la actualidad se considera que la hiperacetilación de los extremos amino-terminales de las histonas resulta en alteraciones de las interacciones entre las cargas positivas de las histonas y las cargas negativas del DNA, creando un ambiente más accesible a los factores de transcripción (Wolffe y Pruss, 1996). Además la

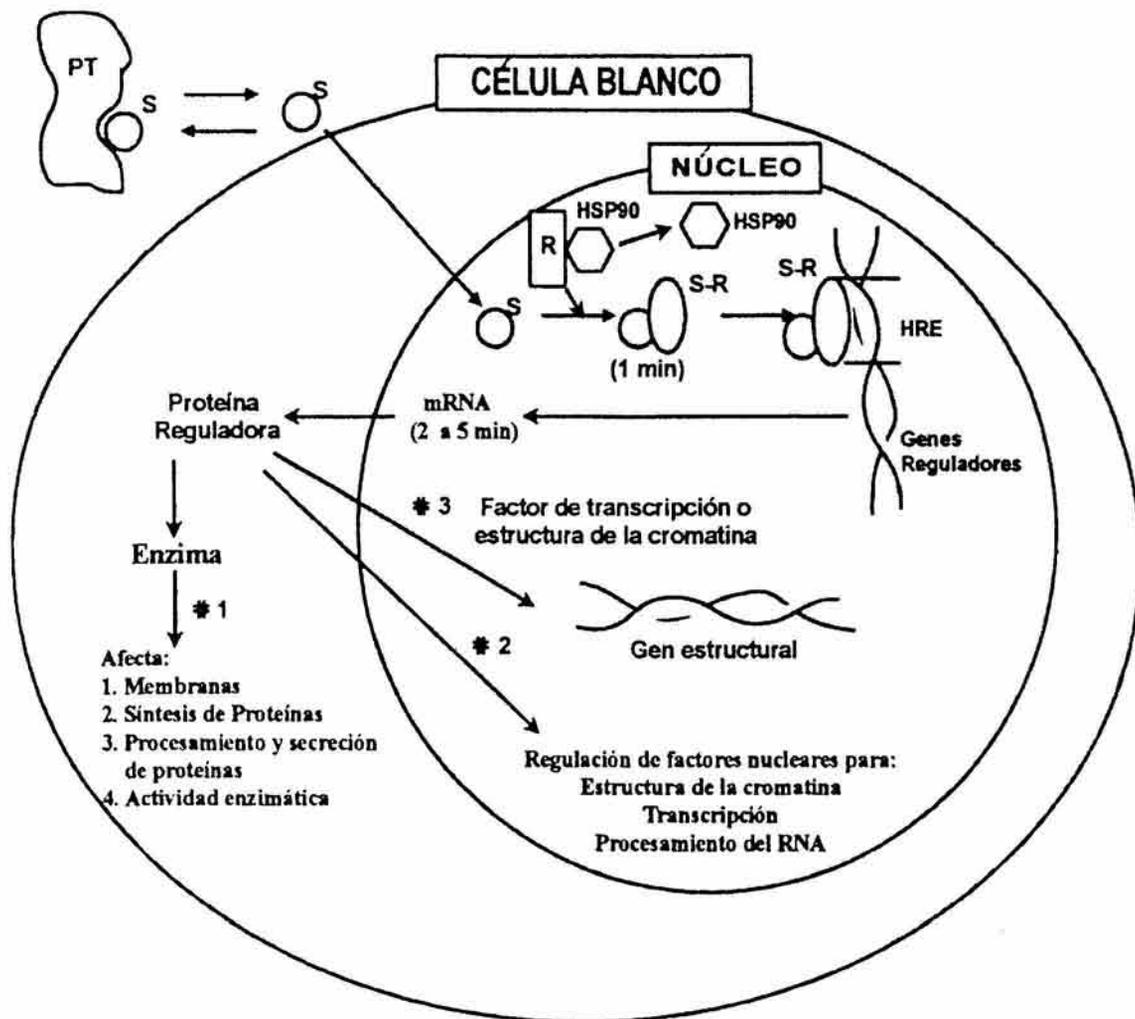


Figura 4. Mecanismo general de acción de las hormonas esteroides. El receptor activado por la hormona esteroide se une a un elemento de respuesta hormonal localizado en el extremo 5' de un gen regulador (también llamado gen temprano o primario). Esta unión regula la transcripción del gen regulador minutos después de que la hormona entre a la célula. Dentro de la célula blanco pueden existir varios genes reguladores que responden a una hormona en particular y cuya proteína participa en una variedad de eventos dentro de la célula. PT= proteína transportadora, R= receptor, S= esteroide, S-R= receptor activado, HRE= elementos de respuesta a hormonas esteroides, HSP90= proteína de choque térmico. (Landers y Spelsberg, 1992). Los números 1, 2 y 3 en el esquema representa las vías por las cuales los genes causan sus efectos. Para mayor detalle revisar el texto.

acetilación de los residuos de lisina de los extremos amino terminales de las histonas altera la estructura de la cromatina (Rhodes, 1997). Algunos cofactores con actividad de acetiltransferasa son: p300, CBP (CREB binding protein), PCAF (p300/CBP-associated factor) y la familia de proteínas SRC (steroid receptor coactivator). Otros coactivadores que alteran la estructura del nucleosoma son aquellos que tienen actividad intrínseca de ATPasa como los productos de los genes *brm* (brahma) y *brg-1* (brahma-related gene 1) (McKenna y cols., 1999). Todos estos coactivadores producen alteraciones en el nucleosoma, en la región del aumentador/promotor, estableciendo un vínculo directo con los factores generales de transcripción y la RNA Pol II, que estabiliza al complejo de preiniciación y la transcripción (McKenna y O'Malley, 2000).

A continuación se hará una descripción de algunos factores de transcripción regulados por estrógenos, que están involucrados en el control de procesos tales como la proliferación y la diferenciación celular, la fisiología reproductiva y la actividad neuronal.

1.6 El proto-oncogen c-fos

Los proto-oncogenes son genes celulares que al sufrir mutaciones pueden transformarse en oncogenes activos. Los proto-oncogenes se clasifican funcionalmente en tres grandes categorías: a) factores de crecimiento y sus receptores; b) mediadores de vías de la transducción de señales intracelulares y c) factores de transcripción (Bishop, 1987). La interacción y cooperación entre los productos de las diferentes clases de proto-oncogenes juega un papel muy importante durante el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo celular. Algunos proto-oncogenes que codifican proteínas nucleares son *myc*, *myb*, *fos*, *jun*, *erbA*, *ski*, *rel* y *E1A*.

El proto-oncogen *c-fos* fue descrito originalmente como el homólogo celular del oncogen presente en el retrovirus murino FBJ-MuSV (Van Beveren y cols., 1983). *c-fos* pertenece a una familia de genes conocidos como genes de expresión

temprana, por el hecho de que su expresión es inducida rápidamente por una variedad de estímulos extracelulares, aún en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas. Se ha propuesto que los genes de expresión temprana llevan a cabo su acción al acoplar el estímulo de corto plazo a cambios a largo plazo en el fenotipo celular, como en el caso del crecimiento y la diferenciación celular. Esta hipótesis fue reforzada por el descubrimiento de que la proteína FOS actúa como regulador de la transcripción (Curran y Franza, 1988).

1.6.1 Estructura del proto-oncogen c-fos

El gen c-fos codifica para una fosfoproteína nuclear que está constituida por 380 aminoácidos y tiene un vida media corta (20-90 minutos). Fos contiene un dominio en el que se repiten periódicamente cada siete aminoácidos un residuo de leucina. A este dominio se le denomina "*zipper*" de leucina. Adyacente al *zipper* se encuentra un dominio rico en aminoácidos básicos. La región del *zipper* de leucina forma una α -hélice, en la que los residuos de leucina quedan alineados a lo largo de una cara de la hélice. Los residuos de leucina de una α -hélice interaccionan con los residuos de leucina presentes en otra α -hélice de una proteína diferente, con lo cual se facilita la dimerización por medio de interacciones hidrofóbicas. Así, el dominio de *zipper* de leucina facilita la formación de heterodímeros. Esta secuencia está presente en diversos factores de transcripción, tales como las proto-oncoproteínas Fos, Myc y Jun, los factores de transcripción de las levadura GCN4 y AP-1 y la proteína que se une al elemento de respuesta a cAMP (CREB). La región conservada está compuesta de una región rica en aminoácidos básicos (arginina y lisina) y por el *zipper* de leucina (Hope y Struhl, 1987; Kouzarides y Ziff, 1988; Dang, et al., 1989; Landschultz y cols., 1988; González y cols., 1989).

El dominio del *zipper* de leucina es necesario para que Fos forme un heterodímero con miembros de la familia de Jun llamado AP-1 (Sassone-Corsi y cols., 1988). Sin embargo, la presencia del *zipper* de leucina no es condición suficiente para la formación de dímeros. Fos no forma homodímeros y ni Fos ni

Jun pueden formar dímeros con GCN4. Todas las proteínas de la familia de jun (cJun, JunB y JunD) pueden formar tanto homodímeros como heterodímeros, mientras que las proteínas de la familia de fos (cFos, FosB, Fra1 y Fra2) solamente se asocian con las proteínas de la familia de jun. Todos los diferentes complejos que se forman reciben el nombre de AP-1 (O'Shea y cols., 1989).

La región rica en aminoácidos básicos media la unión del AP-1 a una región específica del DNA, ya que inserciones o pérdidas en esta región disminuyen o anulan la unión al DNA sin interferir con la formación del dímero. Las mutaciones que anulan la unión al DNA son arginina (R) 144, R155 y R159 de la proteína de c-fos por valina o los aminoácidos R262, R273 y lisina 276 por valina de la proteína de c-jun (Ransone y cols., 1990). El dímero se une a regiones promotoras que contienen el elemento a respuesta a TPA (12-ó-tetradecanoil-forfol-13 acetato) llamado TRE (TPA response element) o sitio de unión a AP-1, cuya secuencia consenso es TGA G/C TCA. Los diferentes complejos AP-1 presentan diferentes actividades de unión al DNA. Los heterodímeros Fos:Jun tienen mayor actividad de unión al DNA que los homodímeros Jun:Jun, este aumento en la afinidad al DNA se refleja en su termoestabilidad, ya que se disocian entre 37° y 42° C (Halazonetis y cols., 1988; Angel y Karin, 1991).

En Fos se han localizado en el extremo carboxilo-terminal, después de la región del zipper de leucina, tres regiones involucradas en la transactivación de la transcripción. Dos de estas regiones son homólogas a dos de las regiones de activación de Jun ubicadas hacia el extremo amino-terminal y reciben el nombre de HOB1 y HOB2 (Homology Box 1 y 2) (Sutherland y cols., 1992). Además de las tres regiones mencionadas anteriormente se ha determinado otro dominio de transactivación en Fos ubicado en el extremo amino-terminal (Jooss y cols., 1994).

1.6.2 Regulación de la expresión del proto-oncogen c-fos

La expresión del proto-oncogen c-fos es inducida por una gran variedad de agentes y estímulos, tales como mitógenos, factores de diferenciación y de

crecimiento, agentes farmacológicos (ésteres de forbol, nicotina, bario y ácido fosfatídico) así como por estrés y choque calórico. La inducción es rápida y transitoria y ocurre sobre la transcripción. La expresión del gen c-fos aparece pocos minutos después del estímulo, alcanzando su máxima expresión entre 30-120 minutos y es indetectable después de 3 a 8 horas dependiendo del tipo celular del que se trate y del estímulo (Ransone y Verma, 1990). La expresión de c-fos se lleva a cabo aún en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas; se ha observado que el tratamiento con estos inhibidores genera la "superinducción" de c-fos debido a la estabilización del RNA mensajero (RNAm) y a la eliminación de la autorepresión de la transcripción (Angel y Karin, 1991).

Se sabe que algunos de los agentes que inducen la expresión de c-fos activan las vías de transducción de señales que involucran tanto a la proteína cinasa C como a la proteína cinasa A (dependiente de AMP cíclico). El análisis de la región promotora del gene c-fos de la rata (Wang y Howells, 1994), ver figura 5, revela la presencia de un elemento de respuesta dependiente de cAMP (CREs) entre las posiciones -60 a -35 (respecto al sitio del inicio de la transcripción) que es necesario para la inducción de c-fos por agonistas de la vía del adenilato ciclasa. Localizado entre las posiciones -308 a -289 se encuentra el elemento de respuesta a suero (SRE), es esencial para la inducción por suero así como por diversos factores de crecimiento: epidérmico (EGF), de fibroblastos (FGF), derivado de plaquetas (PDGF) y el nervioso (NGF). También por ésteres de forbol, por luz ultravioleta y por los oncogenes src y ras (Ransone y Verma, 1990). La proteína de 67 KDa que se une al SER es llamada factor de respuesta al suero (SRF), actuando como dímero y requiere de fosforilaciones para la activación transcripcional de genes que contienen en su región promotora SER. Otra proteína de 62 KDa también ha sido implicada en la unión a SER ya que forma un complejo terciario con SRF. Inmediatamente hacia el extremo 3' de SER, entre las posiciones -288 a -282, hay un sitio AP-1 capaz de unir los complejos Fos/Jun. El elemento inducible-sis (SIE) se encuentra entre las posiciones -341 a -327, a este sitio se le une el factor

inducible *sis*, el cual se activa en respuesta al tratamiento con *c-sis*/PDGF. Una secuencia similar al GRE se encuentra entre las posiciones -268 a -254. La secuencia de la región 5' del gen de *c-fos* está altamente conservada: en el gen de rata es de 93% idéntico al del ratón y 77% idéntico al del humano. Se ha identificado en la región promotora del gen *c-fos* del humano, entre la posición -1060 a -1300, un ERE (Weisz y Rosales, 1990). En el caso del proto-oncogen *c-fos* murino se han identificado ERE tanto en el extremo 5' (región entre -278 a -135) como en el extremo 3' (Hyder y cols., 1991a; Hyder y cols., 1991b).

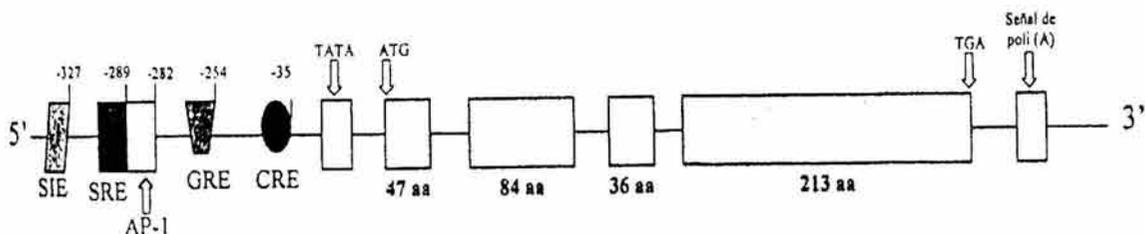


Figura 5. Estructura del gen *c-fos*. Diagrama esquemático del proto-oncogen *c-fos* de la rata en el que se presenta la localización de diferentes elementos reguladores: AP-1, elemento de respuesta a la proteína activadora -1; CRE, elemento de respuesta a cAMP; GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides; SIE, elemento inducible-*sis*; SRE, elemento de respuesta a suero (Wang y Howells, 1994).

1.6.3 Expresión de *c-fos* por hormonas esteroideas

Los primeros trabajos que se realizaron para conocer el efecto modulador de los estrógenos sobre la expresión de los proto-oncogenes demostraron que de 22 proto-oncogenes estudiados solo *c-fos*, *c-myc*, *n-myc* y *c-jun* respondieron al estímulo hormonal con un aumento en su transcripción (Loose-Mitchell y cols., 1988; Weisz y cols., 1990).

Se ha observado que en el útero de ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas con 17β -estradiol se induce la expresión de los proto-oncogenes nucleares *c-myc*,

n-myc (Murphy y cols., 1987), c-fos, c-jun, jun-B y jun-D (Weisz y Bresciani, 1988; Cicatiello y cols., 1992). La cantidad de RNAm de estos proto-oncogenes comienza a incrementarse de 15 a 30 minutos después del tratamiento hormonal; mientras que para c-myc y jun-B, dicho aumento se observa de 60 a 90 minutos después de la administración de la hormona.

En útero y en cerebro de ratas OVX c-fos alcanza un máximo de expresión (10 a 40 veces) entre los 30 y 180 minutos después del tratamiento con E₂, bajando a valores basales a las 18 horas, pero vuelve a registrar un segundo valor máximo de expresión (5 a 8 veces) de las 24 a las 33 horas. (Loose-Mitchell y cols., 1988; Weisz y Bresciani, 1988; Cattaneo y Maggi, 1990). Se ha propuesto que este segundo valor máximo de expresión se debe a la inducción tardía de estos proto-oncogenes por factores de crecimiento (Huet-Hudson y cols., 1990; Curtis y cols., 1996).

El incremento en la concentración del RNAm de c-fos inducido por E₂ es bloqueado por actinomicina D (inhibidor de la transcripción), pero no por puromicina o cicloheximida (inhibidores de las síntesis de proteínas) (Loose-Mitchell y cols., 1988; Weisz y cols., 1990). Todo esto, junto con los ensayos de "*nuclear run-on transcription*", indican que los efectos del E₂ sobre la expresión de c-fos ocurren en la transcripción (Weisz y Bresciani, 1988; Cicatiello, et al., 1992). En la células del epitelio luminal y glandular de útero de rata adulta, la inducción del RNAm de c-fos por E₂ se traduce en un incremento en la proteína de este proto-oncogen de dos a tres horas después de la administración de la hormona (Papa y cols., 1991).

Los efectos de los estrógenos sobre la regulación de la expresión de proto-oncogenes nucleares son tejido-específico, la expresión de algunos proto-oncogenes no es inducida por E₂ en el pulmón, el riñón, el hígado, el músculo, el bazo, el corazón y en el intestino grueso (Murphy y cols., 1987; Weisz y Bresciani, 1988; Weisz y cols., 1990). Estas diferencias reflejan el contenido de factores de transcripción tejido-específico que son importantes para la regulación de esos proto-oncogenes (Schuchard y cols., 1993). Asimismo se ha observado, que estos

efectos también son hormona específicos, ya que mientras los estrógenos inducen la expresión de ciertos proto-oncogenes, por ejemplo c-fos, en el útero de ratas OVX, otras hormonas como glucocorticoides, andrógenos o P₄ no inducen la expresión de estos genes (Loose-Mitchell y cols., 1988; Webb y cols., 1993; Nephew y cols., 1993; 1995).

1.6.4 Funciones de c-fos en el Sistema Nervioso Central

En roedores han demostrado que c-fos y otros genes de expresión temprana son inducidos por diversos estímulos físicos y químicos en el SNC, lo que indica que estos genes son importantes reguladores de las respuestas neuronales. Se ha documentado una activación rápida y transitoria de los genes de c-fos, fra-1, zif/268, nur/77, jun-B y c-jun, en neuronas corticales después del incremento en la excitabilidad neuronal inducida por drogas convulsivantes, como el pentilinetetrazol (Morgan y cols., 1987; Dragunow y Robertson, 1988; Saffen y cols., 1988; Watson y Milbrandt, 1989) o antagonistas de la vitamina B6 (Mizuno y cols., 1989).

En el SNC se ha detectado tanto la expresión del RNAm como la proteína de c-fos en modelos animales *in vivo* como *in vitro*. Entre otros estímulos que inducen la expresión de c-fos está la actividad eléctrica en las células granulares del hipocampo (Dragunow y Robertson, 1987; White y Gall, 1987); la estimulación sensorial periférica en neuronas del asta dorsal de la médula espinal (Hunt y cols., 1987), y la privación de agua durante 24 horas en los núcleos supraóptico y paraventricular del HYP que participan en el control de la sed (Sagar y cols., 1988).

Varios estudios inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ* en cerebro han revelado que la expresión de c-fos muestra un patrón de expresión específico lo que permite mapear vías de excitación en el SNC. Por ejemplo, se ha observado que en regiones de la corteza piriforme y cingulada y en el sistema límbico, la máxima expresión de c-fos se da 60 minutos del estímulo con metrazol y regresa a

sus valores basales a los 180 minutos (Dragunow y Robertson, 1987; Morgan y cols., 1987; Sagar y cols., 1988).

Debido a la inducción rápida y transitoria de c-fos en el SNC por una gran variedad de estímulos como factores farmacológicos (metrazol, cocaína, cafeína, alcohol, morfina, etc.) y fisiológicos (estrés, estimulación eléctrica, privación de sueño, privación de alimento, trauma, etc.), como resultado de los estudios anteriores, el incremento en la expresión del gen c-fos y su proteína FOS se han propuesto como marcadores de actividad neuronal y como herramienta para el mapeo metabólico de la célula (Sheng y Greenberg, 1990; Morgan y Curran, 1991; Mistry y cols., 1994; Yang y cols., 1994; Svenningsson y cols., 1995).

1.6.5 Expresión de c-fos en el SNC por hormonas esteroides

Los estrógenos ejercen un papel modulador en el SNC de los mamíferos, al participar en la formación de varios circuitos neuronales durante el desarrollo fetal, neonatal o ambos, que funcionarán en los adultos controlando diferentes funciones cerebrales (Maggi y Pérez, 1985). Estos efectos están mediados por receptores intracelulares específicos presentes en varias regiones cerebrales, entre las que destacan la corteza, el HYP, el POA, el hipocampo, la amígdala y el mesencéfalo (Blaustein y cols., 1992).

Utilizando metodología como la inmunohistoquímica se ha detectado la proteína FOS después de la administración con E₂ en el POA medial, el núcleo medial de la amígdala y el núcleo ventral del HYP de la rata, regiones ricas en RE. En la rata, dependiendo de la región, el incremento en la expresión de la proteína FOS se observa entre 12 y 24 horas después del tratamiento hormonal (Insel, 1990). Se ha observado que en el POA medial, el HYP medio dorsal y la amígdala medial de la rata, la proteína de FOS aumentan entre una y tres horas después de la administración de E₂ (Auger y Blaustein, 1995).

En el hipocampo y en el mesencéfalo de ratas OVX, la expresión del RNAm de c-fos, se detectó desde los 30 minutos de la administración de E₂ hasta llegar a la

hora en ambas áreas del cerebro, retornando la expresión a valores basales a las tres horas. En estas mismas condiciones se observó un segundo valor máximo en la expresión a las 24 horas, este aumento fue mayor que el observado a la hora. El primer valor máximo de expresión sólo se observó en el mesencéfalo y en el útero, lo que indica que hubo una regulación bifásica por los estrógenos sobre la expresión del gen de c-fos (Cattaneo y Maggi, 1990).

En ratas con estimulación cérvico-vaginal y tratadas con E₂ y P₄ se observó aumento tanto en el RNAm como en la proteína de c-fos en el POA, en el núcleo paraventricular y ventral del HYP así como en la amígdala medial, regiones donde abunda RE. Lo mismo se observó en ratas hembras copulando y tratadas con E₂ y P₄ (Pfaus y cols., 1993).

Otros estudios que han dado pauta para entender la regulación de c-fos por hormonas esteroides son los realizados durante el ciclo estral de la rata, donde se observa una clara relación entre las concentraciones endógenas de E₂ y la expresión de c-fos. Por ejemplo, en neuronas GnRHérgicas del HYP y del POA se ha observado, tanto en ratas como en hamsters, que la expresión máxima de la proteína FOS sólo está presente en la tarde (18:00 h) del proestro (día del ciclo estral donde se encuentra la más alta concentración de E₂ en el plasma) antes del "pico" de la LH; no observándose la proteína en ningún otro día del ciclo estral (Lee y cols., 1990; Doan y Urbanski, 1994).

Se ha detectado la proteína FOS en otras áreas del cerebro que no son blanco principal para estrógenos durante el ciclo estral de algunos roedores. Por ejemplo, en el hamster, en la banda diagonal de Broca; o en neuronas noradrenérgicas del núcleo medial del tracto solitario de la rata donde la expresión de FOS se presenta de manera significativa durante el proestro y el estro, mientras que en el diestro la expresión es baja (Berriman y cols., 1992; Jennes y cols., 1992).

También se ha estudiado la expresión del RNAm de c-fos durante el ciclo estral de la rata en diversas áreas del cerebro anterior utilizando RT-PCR. Encontrándose un incremento marcado en la expresión del gen c-fos en el HYP, el

POA y la corteza frontal en comparación con el hipocampo donde la expresión fue menor en el día del proestro. El valor máximo de expresión del gen de c-fos que se detectó durante el proestro fue a las 13:00 horas, correlacionando este incremento con lo observado en un aumento en la concentración sérica de E₂ entre las 11:00 y 13:00 horas. Estos resultados son similares a lo encontrado con la proteína FOS en las mismas regiones cerebrales y relacionados con la liberación de gonadotropinas durante el proestro (Camacho-Arroyo y cols., 1998).

1.7 El receptor a progesterona

La P₄ no sólo participa en la regulación del desarrollo y el funcionamiento de los tejidos reproductivos, también regula diversos procesos en el SNC, como es la excitabilidad neuronal, los centros neurales que controlan la función reproductiva y el despliegue de la conducta sexual en los mamíferos (Camacho-Arroyo y cols., 1995; Graham y Clarke, 1997). La P₄ ejerce sus efectos en las células blanco por medio de dos mecanismos principales: 1) genómico y 2) no genómico (Schumacher y cols., 1999). Los efectos genómicos de la P₄ están mediados por su interacción con receptores nucleares que reconocen específicamente a la hormona (RP). La hormona se une al RP, éste se dimeriza y se une a secuencias reguladoras en el DNA (ERH) que activan la transcripción de diversos genes (Trus y Beato, 1993; Schumacher y cols., 1999).

La importancia fisiológica del RP se ha comprobado utilizando modelos de ratones transgénicos que presentan alteración en el gen del RP, llamándose a estos animales "ratones PRKO". Estos animales son infértiles, tienen deficiencias en el despliegue de la conducta sexual, malformaciones en el desarrollo de la glándula mamaria, así como cambios en las concentraciones circulantes de la LH, la FSH y la prolactina (Lydon y cols., 1995; Chappell y cols., 1997).

Las acciones no genómicas de la P₄ están mediadas tanto por receptores membranales, diferentes al RP, como por sitios alostéricos presentes en los receptores a neurotransmisores como por ejemplo, el receptor GABA_A. Los

receptores membranales a la P₄ se han caracterizado en el SNC de la rata (Tischkau y Ramírez, 1993); en la membrana del espermatozoide donde participan en la regulación de la reacción acrosomal (Calogero y cols., 2000). En el SNC, se han observado un gran número de efectos membranales de la P₄, como son: cambios en la excitabilidad neuronal, liberación de neuropéptidos y neurotransmisores y la modulación de canales iónicos y receptores a neurotransmisores (Schumacher y cols., 1999).

1.7.1 Estructura y función del receptor a progesterona

EL RP actúa como un factor de transcripción que regula la expresión de genes al interactuar con el DNA. En roedores, en el pollo, en los primates y en el ser humano, se han caracterizado ampliamente dos isoformas del RP. Estas isoformas son: RP-B (110-120 KDa) y RP-A (72-86 KDa), la diferencia entre éstas son 164 aminoácidos presentes en el extremo amino-terminal del RP-B (Kraus, y cols., 1993). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por distintos promotores. En la rata (Kraus y cols., 1993) y en el ser humano (Kastner y cols., 1990) son originadas por distintos RNAs mensajeros. Las propiedades funcionales de las isoformas del PR han sido analizadas ampliamente en sistemas de transcripción *in vitro* en diferentes células de mamíferos. A pesar de tener afinidad similar por diversos agonistas y antagonistas (Schoonen y cols., 1998), las isoformas tienen diferente función. RP-B actúa como un activador transcripcional de genes, como el del virus tumoral mamario del ratón, el gen que codifica a la tirosina aminotransferasa y el de la timidina cinasa. Mientras que, el RP-A no activa la transcripción pero funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por RP-B como por otros RS, como los RE, RG, RM y RA (Vegeto y cols., 1993; McDonnell y Goldman, 1994).

Las diferencias en la actividad transcripcional de las isoformas del RP están dadas por diferentes factores de transcripción, uno de ellos es la estructura básica de cada una. El RP contiene tres funciones de activación (AF1, AF2 y AF3), las dos

primeras están presentes en ambas isoformas, mientras que AF3 solamente se encuentra en el RP-B (Giangrande y cols., 1997). Por otro lado, se ha descrito la función inhibidora (IF) localizada en la región adyacente a AF1 que sólo es funcional en RP-A, observándose que IF inhibe a AF1 y a AF2 pero no a AF3 presente en RP-B (Hovland y cols., 1998; Huse y cols., 1998), ver figura 6. Otra característica importante en la actividad transcripcional del RP es la alta afinidad de unión que presenta a cofactores. PR-A presenta mayor afinidad por el corepresor SMRT (silenciador mediador para el RT y el RXR) y es incapaz de reclutar eficientemente a los coactivadores transcripcionales como GRIP-1 (proteína que interactúa con el RG) y SRC-1 (coactivador de los RS) comparado con la actividad de RP-B (Giangrande y McDonnell, 1999; Giangrande y cols., 2000).

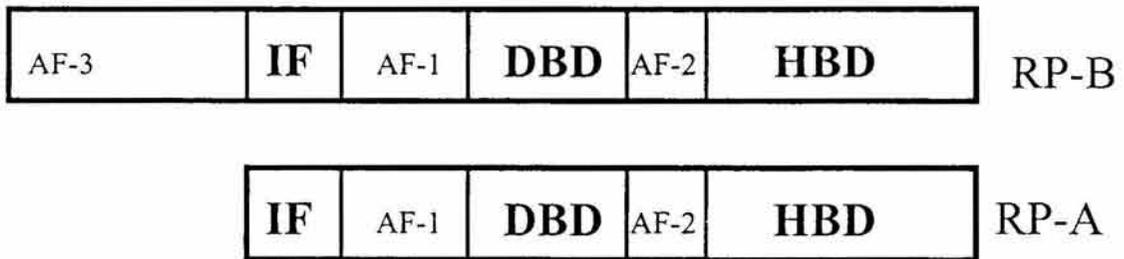


Figura 6. Estructura de las isoformas A y B del receptor a progesterona. Se muestra en el diagrama la organización de los diferentes dominios que forman a cada receptor. Se señala a los dominios de: función de activación (AF1, AF-2 y AF-3), de inhibición (IF), de unión al DNA (DBD) y de unión a la hormona (HBD). La diferencia entre estas dos proteínas radica en 164 aminoácidos más en la región amino-terminal de la isoforma B. (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000).

Se tiene evidencia de que existe una comunicación entre los RS y otras vías de transducción de señales. Las hormonas esteroideas pueden modular sistemas de segundos mensajeros y éstos a su vez regular la actividad transcripcional de los RS. La activación de algunas proteínas cinasas puede modificar la unión de alguna de las isoformas del RP al ligando y al DNA (Power y cols., 1992; Schumacher y cols., 1999), observándose que el RP humano es fosforilado al menos en siete residuos de serina, tres de estos sitios se encuentran sólo en RP-B, mientras que los otros cuatro los comparten ambas isoformas (Takimoto y cols., 1996; Zhang y cols., 1997). La fosforilación mediada por proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), es una señal en la degradación del RP por ubiquitinación con la participación del proteosoma 26S, lo cual sugiere que otra función de la fosforilación es la señalización para la regulación negativa del RP por P₄ mediada por MAPKs (Lange y cols., 2000).

En diversos tejidos del aparato reproductivo de distintas especies de vertebrados (aves, roedores, conejos, perros, vacas y primates superiores) se ha detectado el RP, entre los que destaca las células de la granulosa del ovario, tubas uterinas, útero, vagina, testículo, glándula mamaria, células musculares de arterias uterinas (Conneely y cols., 2002). También se ha detectado RP en otros tejidos no reproductivos como el timo, los islotes pancreáticos, el tejido óseo, el pulmón y en diversas áreas del SNC (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Y se ha observado que el RP es regulado transcripcionalmente a la alta por estrógenos y a la baja por P₄ en muchos tejidos blancos, como sucede en el útero de la rata (Graham y Clarke, 1997; Mendoza-Rodríguez y cols., 1999).

1.7.2 Expresión del receptor a progesterona en el SNC

Los estrógenos tienen una participación muy importante en diversas funciones del SNC, para poder ejercer sus efectos necesitan actuar sobre sus células blanco, unirse en el núcleo a su receptor específico y modificar la expresión de

diferentes genes, este es el caso de la expresión del RP que está regulada por el E₂ en diversas áreas del cerebro de los mamíferos (McEwen y Alves, 1999).

En ratones de ocho días de edad y en ratas de dos días de edad, el RNAm del RP se ha detectado en la corteza cerebral, así como el contenido de la proteína del RP en la corteza cerebral y en el POA, la expresión del RP es mayor en las hembras que en los machos (Shughrue y cols., 1991). Estudios ontogénicos realizados en el cerebro de la rata, muestran diferencias en la expresión del RNAm y de la proteína del RP en diversas áreas del cerebro, con valores significativos de RP en la hipófisis y en el núcleo arcuato (ARC) del HYP en animales prepúberes; mientras que en el POA y el núcleo ventromedial (VMN) del HYP, la mayor expresión del RP se encuentra en la etapa adulta. Además, a esta edad el contenido de RP es mayor en hembras que en machos (Kato y Onouchi, 1983; Williams y Blaustein, 1988; Bogic y cols., 1998).

En el cerebro de la rata hembra se ha estudiado la expresión del gen del RP en diversas etapas del desarrollo prenatal y postnatal, por medio de RT-PCR, encontrándose cambios muy marcados en la expresión del RP en el HYP y en el POA, así como en la corteza cerebral. El RNAm del RP es detectable alrededor de los dos días antes del nacimiento, el cual aumenta en etapas postnatales tempranas. Estos datos sugieren que la expresión del gen del RP es tejido específico y depende de la etapa del desarrollo (Kato y cols., 1994).

Uno de los estudios que más información ha arrojado sobre la importancia de la regulación de la expresión del RP es el llevado a cabo en ratones hembra transgénicos, "knockout" para el gen del REβ (ERβKO), donde se ha encontrado la influencia del E₂ en la inducción del RP en diversas áreas del cerebro anterior. La inmunoreactividad para el RP en hembras silvestres aumenta con la administración del E₂, tanto en el POA como en el VMH del HYP. Por el contrario, las hembras ERβKO no responden al estímulo con la hormona. En el caso de los ratones macho ERβKO se observó una mayor expresión de la proteína del RP en el ARC y el VHM del HYP, así como en el POA en comparación con los machos

silvestres. Estos resultados mostraron que para que se exprese el RP es necesaria su regulación por estrógenos mediada por su receptor, cabe aclarar que esto ocurre solo en ratas hembras, mientras que en los machos sucede lo contrario y que el efecto se debe a la regulación por el RE β (Temple y cols., 2001; Wagner y cols., 2001).

En otros modelos experimentales con ratas OVX, la administración en el tercer ventrículo de nucleótidos antisentido contra el RP suprimió la conducta sexual facilitada por el tratamiento con E₂ y P₄. En estos mismos animales, se inhibió la expresión del RP inducida por E₂ en neuronas hipotalámicas, demostrando que para que los estrógenos tengan efectos en el cerebro de la rata hembra se requiere de la expresión del RP (Mani y cols., 1994).

2. Planteamiento del problema

En la rata hembra, se ha demostrado que la exposición a altas concentraciones de E₂ o T durante los primeros 5 días de la vida postnatal produce cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos en el HYP, modificando la conducta reproductiva de estos animales en la etapa adulta. La administración de estas hormonas en este período crítico del desarrollo postnatal induce desfeminización o androgenización en la rata hembra, que se caracteriza como: estro permanente, desarrollo anormal de los genitales externos, falta de ovulación y de la formación del cuerpo lúteo, alteración permanente de la secreción de gonadotropinas, supresión de la conducta sexual femenina y esterilidad. Por otro lado, se conoce bien el mecanismo de acción genómico de las hormonas esteroides sexuales en diversas áreas del SNC, que consiste en la unión de la hormona a su receptor específico nuclear y la afinidad de este complejo (hormona-receptor) a secuencias específicas del DNA para inducir la transcripción de genes regulados por estas hormonas. Asimismo, se ha demostrado que la expresión del proto-oncogen c-fos y el RP es inducido en el HYP y el POA de ratas OVX tratadas con E₂ o en el día del proestro o estro del ciclo estral, cuando las concentraciones séricas de E₂ son altas. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado la participación de c-fos, el RP y de otros genes nuevos en la desfeminización hipotalámica, y se desconoce si estos genes regulados por esteroides sexuales son importantes como marcadores de diferenciación durante el desarrollo postnatal del HYP en la rata hembra.

3. Objetivos

3.1 General

En ratas hembras tratadas con E₂ o con T en el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro, estudiar el patrón de expresión del RNAm y de la proteína de c-fos y del receptor a progesterona en diferentes etapas del desarrollo postnatal en el área preóptica-hipotalámica anterior (POA-AHA) y en el hipotálamo (HYP). Así como identificar otros nuevos genes que sean regulados por estas hormonas durante este período y que participen directamente en este modelo.

3.2 Particulares

1. En ratas hembras tratadas con E₂ o con T a los tres días de edad, determinar el nivel de expresión del RNA mensajero, a través de la RT-PCR, de los genes de c-fos y del receptor a progesterona a las 2 horas, 24 horas, 14 días y en el día de la apertura vaginal después de la administración hormonal en la región del POA-AHA y del HYP.

2. En ratas hembras tratadas con E₂ o con T a los tres días de edad, determinar el patrón de expresión de la proteína, a través de la inmunohistoquímica, de c-fos y del receptor a progesterona en el día de la apertura vaginal después de la administración hormonal en la región del POA-AHA y del HYP.

3. En ratas hembras tratadas con E₂ o con T a los tres días de edad, estudiar el efecto de la administración aguda del E₂ en el día de la apertura vaginal sobre la

expresión del RNA mensajero y de la proteína de c-fos y del receptor a progesterona en la región del POA-AHA y del HYP.

4. En ratas hembras tratadas con E₂ o con T a los tres días de edad, determinar por radioinmunoensayo las concentraciones séricas de estradiol y de progesterona en el día de la apertura vaginal.

5. En ratas hembras tratadas con E₂ o con T a los tres días de edad, identificar la expresión de otros nuevos genes, a través del *Differential Display*, a las 2 horas y en el día de la apertura vaginal después del tratamiento hormonal en la región del POA-AHA y en el HYP.

4. Hipótesis

En los roedores, la administración de las HES en el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro genera modificaciones funcionales en las neuronas produciendo cambios anatómicos, bioquímicos y fisiológicos en diversas regiones del HYP. Estas alteraciones se establecen tempranamente y son tan duraderas que se manifiestan a largo plazo modificando la actividad transcripcional de genes regulados por estrógenos en las células afectadas. Dichas alteraciones podrían deberse a las modificaciones en la programación de las redes neuronales durante el desarrollo, como es la alteración en la actividad celular de neuronas maduras para sintetizar y secretar neurotransmisores, neuropéptidos o moléculas importantes para el adecuado funcionamiento neuronal. En resumen, tales cambios en respuesta a las HES constituyen la base de la diferenciación sexual del cerebro en los mamíferos.

Por lo tanto la administración de E₂ o de T a ratas hembras en el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro modificará la funcionalidad neuronal en las diferentes etapas del desarrollo postnatal, que se traducirá en la expresión anormal tanto de c-fos como del receptor a progesterona en el POA-AHA y en el HYP.

Se espera encontrar diferencias en la expresión de c-fos y del receptor a progesterona a la respuesta del E₂ entre las ratas desfeminizadas con E₂ y con T en la región del POA-AHA y del HYP durante la pubertad. En ratas hembras tratadas con esteroides sexuales en los primeros 5 días de edad se anticipa un aumento en la expresión de nuevos genes que potencialmente participan en el proceso de la diferenciación sexual del HYP.

5. Materiales y Métodos

5.1 Animales de experimentación

En este estudio se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar (Harlan, México) que fueron apareadas con ratas machos expertos. Las crías resultantes permanecieron con las madres desde el nacimiento hasta el día del destete (21 días de edad). Todos los animales fueron mantenidos en un ciclo luz:oscuridad 14:10 horas, con agua y alimento para roedores (Purina) *ad libitum*.

Las ratas hembras recién nacidas se distribuyeron en tres grupos diferentes, recibiendo el tratamiento hormonal a los tres días de edad, como se muestra en la siguiente tabla:

| Grupo | Tratamiento | Dosis única | Vía de administración |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|
| 1. Control, (n=16) | Aceite de maíz | 100 μ l | Subcutánea |
| 2. Estradiol, (n=16) | 17 β -estradiol | 200 μ g/100 μ l | Subcutánea |
| 3. Testosterona, (n=16) | Enantato de testosterona | 200 μ g/100 μ l | Subcutánea |

Experimento 1. Determinación del RNA mensajero y de la proteína de c-fos y del RP en diferentes etapas del desarrollo postnatal.

| Momento en el que se sacrificó a los animales después del tratamiento hormonal a los 3 días de edad | Grupos de tx | Expresión de RNAm | Expresión de proteína | Estructuras cerebrales estudiadas |
|---|--------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| 2 horas | 1, 2 y 3 | c-fos y RP | ND | POA-AHA e HYP |
| 24 horas | 1, 2 y 3 | c-fos y RP | ND | POA-AHA e HYP |
| 14 días | 1, 2 y 3 | c-fos y RP | ND | POA-AHA e HYP |
| Apertura vaginal (AV) | 1, 2 y 3 | c-fos y RP | c-fos y RP | POA-AHA e HYP |

ND= No se determinó. 1, 2 y 3 corresponde a los tratamientos descritos en la primera tabla.

Este experimento se realizó con la finalidad de estudiar el patrón de expresión a corto y a largo plazo del RNA mensajero del proto-oncogen c-fos y del RP en el POA-AHA y en el HYP en la rata hembra. Solamente se cuantificó la proteína de c-fos y del RP en el día de la AV, de las ratas tratadas a los tres días de edad con E₂ y T en la región del POA-AHA y del HYP.

Experimento 2. Regulación de la expresión del RNA mensajero y de la proteína de c-fos y del RP por E₂ en el día de la AV en ratas hembras tratadas con E₂ o con T a los tres días de edad.

| Grupo* (1, 2 y 3) | Administración por vía i.p. de E ₂ (5 µg por cada 100 g de peso corporal) | Determinación de RNAm tres horas después del tx hormonal | Determinación de proteína tres horas después del tx hormonal | Estructuras cerebrales estudiadas |
|----------------------|--|---|---|---|
| AV | No | c-fos y RP | c-fos y RP | POA-AHA HYP |
| AV | Si | c-fos y RP | c-fos y RP | POA-AHA HYP |

*Ratas hembras tratadas con E₂ o con T o con aceite de maíz a los tres días de edad que en el día de la AV recibieron una dosis de E₂ por vía intraperitoneal (i.p.)

Este experimento se realizó con la finalidad de determinar la regulación del RNA mensajero y de la proteína de c-fos y del RP por estrógenos en el POA-AHA y en el HYP de ratas tratadas a los tres días de edad con esteroides sexuales. En este estudio, a los animales que recibieron tratamiento con HES y fueron sacrificados en el día de la AV se identificarán como desfeminizados. Todos los animales fueron sacrificados entre las 8:00 y 9:00 A.M.

A todos los animales sacrificados en el día de la AV se les midió la talla, el peso, la distancia ano-genital y la longitud de la vulva. También se realizó un análisis citológico de frotis vaginal para confirmar que todos los animales utilizados en esta etapa se encontraran en estro.

5.2 Obtención del RNA total

Los cerebros de las ratas fueron rápidamente removidos después de la decapitación y colocados en solución salina (0.9 %) fría para eliminar la mayor cantidad de sangre posible. Inmediatamente se procedió a la disección del POA-AHA y del HYP, de acuerdo a las referencias anatómicas descritas en el atlas del cerebro de la rata durante el desarrollo y en la etapa adulta (Paxinos y cols., 1994; Paxinos y Watson, 1998). Para obtener al menos 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA total se requirió combinar los tejidos de cuatro animales para cada etapa a estudiar ($n = 16$ animales por tratamiento). Todos los experimentos se realizaron por cuadruplicado. El RNA total se aisló del POA-AHA y del HYP, utilizando la solución TRIzol (Gibco-BRL) que se basa en la técnica de tiocionato de guanidina-fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol (Chomczynski y Sacchi, 1987). La concentración del RNA total se determinó por absorbancia a 260 nm y la integridad del RNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % en presencia de formaldehído al 2.2 M. Solamente se utilizaron muestras de RNA total íntegro y libre de contaminación con DNA genómico.

5.3 Diseño de oligonucleótidos

Para estudiar la expresión del RNAm del proto-oncogen c-fos, se diseñó un par de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 247 pb (+258 a +505) que corresponde a la secuencia reportada para el cDNA del gen c-fos de la rata (Curran y cols., 1987). Los oligonucleótidos usados para la amplificación del gen del RP se basan en la secuencia del cDNA de la rata (Park-Sarge y Mayo, 1994) que corresponde al dominio de unión a la hormona, este par de oligonucleótidos reconoce tanto a la isoforma A como a la isoforma B del RP, obteniéndose un fragmento de 517 pb (+2229 a +2745). Se utilizó como control de expresión constitutiva y de carga de RNA, el gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), obteniendo un fragmento de 453 pb (+517 a +969) según la secuencia de cDNA reportada para la rata (Fort y cols., 1985).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de c-fos, del RP y de GAPDH se muestran en la siguiente tabla:

| GENES | SECUENCIAS |
|-------|--|
| C-FOS | Sentido 5'-[CCC CTG TCA ACA CAC AGG AC]-3' |
| | Antisentido 5'-[CCG ATG CTC TGC GCT CTG C]-3' |
| RP | Sentido 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT G]-3' |
| | Antisentido 5'-[CCC GAA TAT AGC TTG ACC TC]-3' |
| GAPDH | Sentido 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' |
| | Antisentido 5'-[CAA TCG CAG CCC CAG CA]-3' |

5.4 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Para la retrotranscripción del RNAm al cDNA se utilizó buffer para RT (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂); DTT (10 mM); dNTPs (0.5 mM); enzima RT M-MLV (400 U); Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (0.05 µg) y RNA total (4 µg).

El volumen final para cada reacción de RT fue de 20 µl. La reacción se incubó a 37°C por 60 minutos, inmediatamente después las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso. El control negativo consistió en omitir de la reacción la enzima RT M-MLV.

La amplificación de los fragmentos para los genes de c-fos, de RP y de GAPDH en cada experimento se realizó en reacciones independientes procesadas simultáneamente en un termociclador Perkin Elmer PCR System, con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; seguido por 25 ciclos de 1 minuto a 95°C; 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C; con una extensión final de 72°C por 5 minutos. Para las reacciones de PCR se utilizó 5 µl del producto de la reacción de RT (cDNA) o de los controles sin RT, buffer para PCR (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl); MgCl₂ (1 mM); dNTPs (0.2 mM); oligo sentido (0.5 µM);

oligo antisentido (0.5 μ M) y Taq DNA polimerasa (2.5 U). El volumen final para cada reacción fue de 50 μ l. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

5.5 Electroforesis de los productos de la PCR

Los productos de la amplificación (25 μ l) se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio (10 mg/ml). Los geles se observaron en un transiluminador de rayos UV y se fotografiaron utilizando una película con negativo (Polaroid Co.). Las bandas obtenidas se analizaron por densitometría.

5.6 Análisis densitométrico

La intensidad de las bandas obtenidas para c-fos, RP y GAPDH se cuantificaron mediante análisis densitométrico usando un digitalizador de imágenes Scan Jet 3C. El nivel de la expresión de c-fos y del RP se normalizó respecto al nivel de expresión de GAPDH.

5.7 Obtención de tejidos para la inmunohistoquímica

En el día de la AV, los cerebros de las ratas se utilizaron para detectar por inmunoreactividad a c-fos y RP. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (100 mg/Kg de peso corporal) por vía intraperitoneal e inmediatamente perfundidos por punción cardíaca utilizando una aguja de calibre 21 conectada a una bomba de perfusión a flujo constante de 2 ml/min. Primero se utilizó una solución salina fisiológica al 0.9 % (250 ml) para eliminar la sangre en el tejido y después se utilizó una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS (250 ml) para fijar el tejido. Al término de la perfusión se obtuvo el cerebro y los ovarios.

Los cerebros se postfijaron en paraformaldehído al 4 % en PBS a 4°C de 24 a 72 horas y posteriormente se colocaron en KPBS-sacarosa al 10% a 4°C de 24 a 72 horas hasta el momento del corte en un crióstato (Leica). Se realizaron cortes coronales de 50 μ m los cuales se sumergieron en una solución anticongelante para

su almacenamiento a -20° C hasta su uso en la inmunohistoquímica. Cortes consecutivos de cada cerebro se organizaron en seis series, con lo cual se permite tener en cada serie todas las distintas regiones a estudiar. Las referencias anatómicas utilizadas para este estudio se basaron en un atlas del cerebro de la rata (Paxinos y Watson, 1998). Las coordenadas que se siguieron para obtener los cortes seriados abarcan del bregma -0.26 mm a -3.60 mm en el eje antero-posterior, que incluye la región del POA-AHA y del HYP. Una serie completa de cortes se colocaron en porta-objetos y se tiñeron con violeta de cresilo para detectar las regiones a estudiar. Los ovarios, por otra parte, fueron deshidratados e incluidos en parafina realizándose cortes de $8 \mu\text{m}$ en un microtómo (Leica); los cortes se colocaron en portaobjetos tratados con Poli-L-lysina y se tiñeron con hematoxilina-eosina para observación morfológica.

5.8 Análisis inmunohistoquímico

La inmunodetección de la proteína de c-fos y del RP en el POA-AHA y en el HYP se realizó por flotación. Las rebanadas de cerebro se lavaron con KPBS dos veces, cada una de 10 min a temperatura ambiente con agitación constante para eliminar la solución anticongelante. Se bloqueó la peroxidasa endógena con H_2O_2 al 1% en KPBS durante 10 min y se lavó inmediatamente después con KPBS dos veces, cada una de 10 min. Para eliminar los grupos aldehídos producidos por la fijación del tejido con paraformaldehído, se agregó la solución de borohidruro de sodio al 1% en KPBS durante 6 minutos, inmediatamente después se lavaron los cortes con KPBS. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario policlonal anti-c-fos y anti-RP (c-fos: sc-52 y RP: sc-539; Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) a una dilución 1:50 durante 72 horas a 4° C. Se lavaron los cortes con KPBS dos veces, cada una de 10 min. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario biotilnado de cabra anti-conejo (Vector, Vectastain) a una dilución 1:100 durante 2 horas a temperatura ambiente. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante dos lavados de KPBS, cada uno de 10 min. Se agregó el complejo

Avidina-Biotina por 2 horas y se realizó un último lavado con KPBS. Para el revelado se incubó las preparaciones en una solución de diaminobenzidina de 2 a 5 min. La reacción de revelado se inactivó mediante lavados con agua destilada dos veces, cada una de 5 minutos. Se montaron los cortes en porta-objetos tratados con Poly-L-lisina y 24 horas después se procedió a la deshidratación para finalmente cubrir los tejidos con resina para ser analizados en el microscopio óptico. El control negativo consistió en omitir el anticuerpo primario. La inmunoreactividad se observa como núcleos teñidos de color café.

5.9 Cuantificación de la inmunoreactividad

En cada corte seleccionado, las regiones inmunoreactivas del POA-AHA y del HYP fueron contadas bilateralmente de cada uno de los cortes de cada serie de tejido ($n = 4$ animales por tratamiento). Se utilizó un analizador de imágenes KS3000 (Karl Zeiss, Alemania) y con el método de Abercombie (Abercombie, 1946) se corrigió los errores por doble conteo.

5.10 Radioinmunoensayo

La cuantificación de E_2 y P_4 en el plasma se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) (Abraham, 1975). La sensibilidad del ensayo fue de 5.4 pg/ml para el E_2 y de 8.3 ng/ml para la P_4 . Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de $5.3 \pm 8\%$ y $6.5 \pm 10\%$ respectivamente.

5.11 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la RT-PCR, la inmunohistoquímica y del radioinmunoensayo fueron evaluados por medio de un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguida de una prueba de t-Student. Se utilizó el programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.) para calcular los valores de probabilidad y los errores estándar de la media (Media \pm e.e.m).

5.12 Expresión diferencial de RNAs mensajeros por RT-PCR (*Differential Display*)

Para este ensayo se utilizó el RNA total (veáse el apartado 5.2 de esta sección) obtenido del POA-AHA y del HYP de ratas hembras tratadas a los tres días de edad con E₂ y T y que fueron sacrificadas a las 2 horas y en el día de la AV. El RNA total se almacenó a -70° C hasta su uso.

Para asegurarse de que las muestras de RNA total están libres de DNA contaminante se trató 1 µg de RNA total con DNAsa I (1U) en 1 µl de buffer para DNAsa 10X más 7 µl H₂O-DEPC en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 15 min e inmediatamente después se terminó mediante la adición de 1 µl de EDTA (25 mM) e incubación a 65° C durante 15 min. Finalmente se agregó H₂O-DEPC hasta un volumen final de 100 µl y las muestras fueron re-extraídas con TRIzol.

Con la técnica de *differential display* es posible obtener una gran variedad de RNAs mensajeros en una sola reacción de amplificación por RT-PCR utilizando dos tipos de oligonucleótidos (ver cuadro abajo): 1) de anclaje, que consiste en un oligonucleótido de 10 a 12 nucleótidos de timina (oligo-dT), cuyo extremo 5' tiene una de las siguientes bases: adenina (A), guanina (G) o citosina (C) con el fin de obtener el mayor número posible de RNAs; 2) arbitrario, es un oligonucleótido de 10 a 20 bases de secuencia aleatoria el cual permite amplificar cDNAs de los diferentes RNA mensajeros obtenidos con los oligonucleótidos de anclaje (Martin y Pardee, 1999).

| Oligonucleótidos de anclaje | Oligonucleótidos aleatorios |
|-----------------------------|-----------------------------|
| DD1 = TTTTTTTTTTTCA | OPA 14 = TCT GTG CTG G |
| DD2 = TTTTTTTTTTTTCG | OPA 18 = AGG TGA CCG T |
| DD3 = TTTTTTTTTTTTCC | OPA 20 = GTT GCG ATC C |

Para la retrotranscripción del RNA total al cDNA se utilizó buffer para RT (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂); DTT (10 mM); dNTPs (12.5 μM); enzima RT M-MLV (400 U); oligo de anclaje (0.5 μM) y RNA total (1 μg).

El volumen final para cada reacción de RT fue de 20 μl. La reacción se incubó a 37°C por 60 minutos, inmediatamente después las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso. En el control negativo se omitió la enzima RT M-MLV.

Para las reacciones de PCR, se utilizó 2 μl del producto de la reacción de RT (cDNA) o del control sin RT con buffer para PCR (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl); MgCl₂ (0.5 mM); dNTPs (0.5 μM); oligo arbitrario (0.5 μM); oligo de anclaje (0.1 μM); ³⁵S-dATP (0.4 μM) y Taq DNA polimerasa (2.5 U). El volumen final para cada reacción fue de 20 μl. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador mediante el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 92° C por 5 minutos; seguido por 35 ciclos de 50 segundos a 92° C; 1 minuto a 40° C y 1 minuto a 72° C; con una extensión final de 72° C por 5 minutos. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20° C hasta su uso.

Los productos obtenidos por RT-PCR (8μl) se analizaron en un gel desnaturalizante de acrilamida con urea al 6 % en una cámara de electroforesis de secuenciación manual. El tiempo total de la electroforesis fue dos horas y media a 1800 V y 60 W. Al término del corrimiento se deshidrató el gel de acrilamida en una cámara de vacío sobre un repaldo de papel filtro grueso del no. 3. El gel seco y adherido al papel filtro se expuso a una película autoradiográfica en un cassette con pantallas intensificadoras a temperatura ambiente durante 3 a 5 días. Con base en la autoradiografía se seleccionaron las bandas expresadas diferencialmente, cada banda se cortó del papel filtro y se extrajo mediante incubación a 100° C durante 15 min en 400 μl de H₂O-DEPC. Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo estéril y se le agregó 40 μl de acetato de sodio (3 M), 880 μl de etanol absoluto y 2.5 μl de glucógeno. La mezcla se dejó precipitando a -20° C toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 minutos y el precipitado se lavó con etanol al

80% y se resuspendió en 10 µl de H₂O-DEPC para proceder a la re-amplificación de los productos por PCR.

Para la reamplificación de las bandas recuperadas se utilizó la mezcla siguiente: buffer para PCR (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl); MgCl₂ (0.6 mM); dNTPs (5 µM); oligo arbitrario (0.5 µM); oligo de anclaje (0.1 µM) y Taq DNA polimerasa (2.5 U). En reacciones individuales se agregó 10 µl del producto obtenido en la recuperación cada banda en un volumen final de 40 µl. Las muestras fueron re-amplificadas en un termociclador con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos; seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94° C; 1 minuto a 42° C y 30 segundos a 72° C; con una extensión final de 72° C por 5 minutos. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20° C hasta su uso. Los productos se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio, en los casos donde no se observó banda se re-amplificó nuevamente por PCR utilizando el último producto obtenido.

Cada producto reamplificado se purificó mediante cromatografía en columnas centrifugables (Qiagen). Los productos purificados se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

5.12.1 Clonación de las bandas expresadas diferencialmente

Los productos que se obtuvieron por re-amplificación fueron insertados en un vector (plásmido) para ulterior análisis. Cada producto de PCR purificado se ligó en el plásmido pCR 2.1 (Invitrogen) según la mezcla de reacción siguiente: 2 µl de buffer de ligasa (10x); 1 µl de DNA ligasa T4 (4U); 2 µl de Vector pCR 2.1 (0.025 µg) y 15 µl de producto de PCR purificado (volumen total 20 µl por reacción). Las reacciones se incubaron a 14° C por más de 18 horas. Se incluyó un control de autoligamiento en el que sólo se omitió de la mezcla el producto de PCR. Los productos de la reacción de ligamiento se transformaron en bacterias competentes (*E. Coli*, cepa: *XL1-Blue*), como sigue: se mezcló 10 µl de los productos de la reacción de ligamiento con 100 µl de bacterias competentes. Las muestras se

incubaron por 20 minutos a 0° C, después se aplicó un choque térmico durante 2 minutos a 42° C y finalmente una incubación de 2 minutos a 0° C. Cada mezcla se inoculó en 1 ml de medio LB sin antibióticos y se incubó 1 hora a 37° C. Las bacterias se recolectaron por centrifugación (4000 rpm durante 2 minutos), se resuspendieron en 100 µl del mismo medio sobrenadante y se sembraron en placas con medio sólido LB/agar/ampicilina para seleccionar las transformantes mediante incubación a 37° C toda la noche. Por cada producto ligado se escogieron 5 colonias transformantes y se inocularon en 12 ml de medio líquido de LB/ampicilina, se incubaron los cultivos durante toda la noche a 37° C en agitación constante. Se prepararon congelados de bacterias mezclando 900 µl de cultivo más 100 µl de DMSO que fueron almacenados a -70° C. El resto del medio de cultivo (~ 11 ml) se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante se eliminó y el precipitado obtenido fue procesado utilizando un sistema a base de columnas de cromatografía (Qiagen) para la purificación (*mini-preps*) de los plásmidos. Las muestras purificadas se almacenaron a -20° C hasta su análisis.

Para determinar cuáles muestras de plásmido contienen el inserto de interés se digirió cada plásmido con la enzima de restricción EcoRI, y los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1.2%. Como confirmación, en las muestras positivas se llevó a cabo una amplificación por PCR utilizando dos oligonucleótidos (M13 reversa y el T7), cuyas secuencias se encuentran flanqueando al inserto. El producto de esta reacción igualmente fue analizado en geles de agarosa al 1.2%. Los plásmidos con inserto se sometieron a análisis por secuencia.

5.12.2 Análisis de la secuencia de las bandas expresadas diferencialmente

Aproximadamente 400 ng de plásmidos recombinantes purificados fueron analizados en un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 3700 DNA Sequencer en el *Center for Cancer Research and Treatment* del *Albert Einstein College of Medicine* (Bronx, Nueva York). Las secuencias obtenidas fueron analizadas

utilizando el programa BLAST y diversas bases de datos de secuencias del *National Center for Biotechnology Information*, EUA (www.ncbi.nih.gov).

5.13 Diseño de oligonucleótidos para el gen AW528658

Para estudiar la expresión del RNAm del gen AW528658 se diseñaron dos pares de oligonucleótidos para amplificar dos fragmentos: 1) 240 pb (+89 a +329) y 2) 160 pb (+87 a +246) respectivamente, que corresponde a la secuencia reportada para un cDNA expresado en hipocampo de la rata adulta. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen AW528658 se muestran en el siguiente cuadro:

| GEN | SECUENCIAS |
|--------------------------|---|
| AW528658 (+89 a +329) | Sentido 5'-[AGA GCT TTC ATT ATG CCC AAG G]-3' |
| | Antisentido 5'-[CTG TCT GTG ATT GTG AGA ACA CTG]-3' |
| AW528658 (+87 a +246) | Sentido 5'-[GAA GAG CTT TCA TTA TGC CCA AGG]-3' |
| | Antisentido 5'-[ACC TAG AAG CAC CCA AGG CA]-3' |

De rata macho adulto, se obtuvo tejido de hipotálamo e hígado para extraer RNA total con el que se sintetizó cDNA de acuerdo a los protocolos mencionados en apartados previos. Las muestras se almacenaron a -70° C hasta su uso. Referirse al apartado 5.2, 5.4 y 5.5 de esta sección para detalles de método.

6. Resultados

6.1 Características fenotípicas de ratas hembras desfeminizadas

Los ratas hembras que fueron tratadas con E₂ o con T a los tres días de edad presentaron en el día de la AV una distancia ano-genital y una longitud de la vulva más grande que los animales controles (tabla 1). Con respecto a la talla y al peso de los animales no se observaron diferencias significativas.

En los animales desfeminizados con T, la AV ocurre tempranamente respecto a los tratados con vehículo (30 ± 3 días vs 38 ± 2 días, $p < 0.05$). La inyección de E₂ a los tres días de edad no modificó el tiempo de la AV (37 ± 3 días vs 38 ± 2 días). Todos los animales tratados con vehículo abrieron la vagina en la etapa del estro y los animales tratados con T no presentaron cuerpos lúteos en el ovario. En cambio, en los animales tratados con E₂, el número de cuerpos lúteos fue menor con respecto al grupo control (tabla 2).

Tabla 1. Mediciones somatométricas de ratas hembras desfeminizadas.

| Tratamiento | Talla (cm) | Peso (g) | Distancia ano-genital (cm) | Longitud de la vulva (mm) |
|-------------|----------------|---------------|----------------------------|---------------------------|
| CAV | 17.6 ± 0.5 | 164 ± 4.7 | 1.32 ± 0.09 | 2.8 ± 0.02 |
| EAV | 16.6 ± 0.6 | 173 ± 4.6 | $1.70 \pm 0.06^*$ | $5.5 \pm 0.05^*$ |
| TAV | 17.8 ± 0.5 | 178 ± 3.5 | $1.93 \pm 0.08^*$ | $6.5 \pm 0.03^*$ |

Los animales fueron tratados con vehículo (CAV), E₂ (EAV) y T (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 la media \pm e.e.m. de 8 animales por grupo. * $p < 0.05$ comparado con CAV.

Tabla 2. Número de cuerpos lúteos por ovario de ratas hembras desfeminizadas.

| Tratamiento | Cuerpos lúteos por ovario |
|-------------|---------------------------|
| CAV | 6.0 ± 0.2 |
| EAV | 1.3 ± 0.1* |
| TAV | 0.0* |

Los animales fueron tratados con vehículo (CAV), E₂ (EAV) y T (TAV) a los tres días de edad y sacrificados en el día de la AV. Los datos son expresados como la media ± e.e.m. de 8 animales por grupo. *p < 0.0001 comparado con CAV.

6.2 Expresión del gen de c-fos durante el desarrollo postnatal

La expresión del RNAm de c-fos fue inducida significativamente 2 horas después de la administración con E₂ y con T en el POA-AHA (figura 7). En cambio, no se observó un aumento significativo en el HYP (figura 8).

En el día de la AV, la expresión del RNAm de c-fos en el POA-AHA y en el HYP de los animales tratados a los tres días de edad con E₂ y con T fue significativamente más alta que lo observado en el grupo control (figuras 9 y 10). La administración de una dosis de E₂ en el día de la AV (AV + E₂) incrementa la expresión de c-fos en el POA-AHA y en el HYP del grupo control. Mientras que, en los animales desfeminizados, la administración de una dosis de E₂ en el día de la AV no induce la expresión del RNAm de c-fos en el POA-AHA y en el HYP (figuras 9 y 10), además los animales tratados con T mostraron una notable disminución en la expresión de c-fos en el POA-AHA (figura 9).

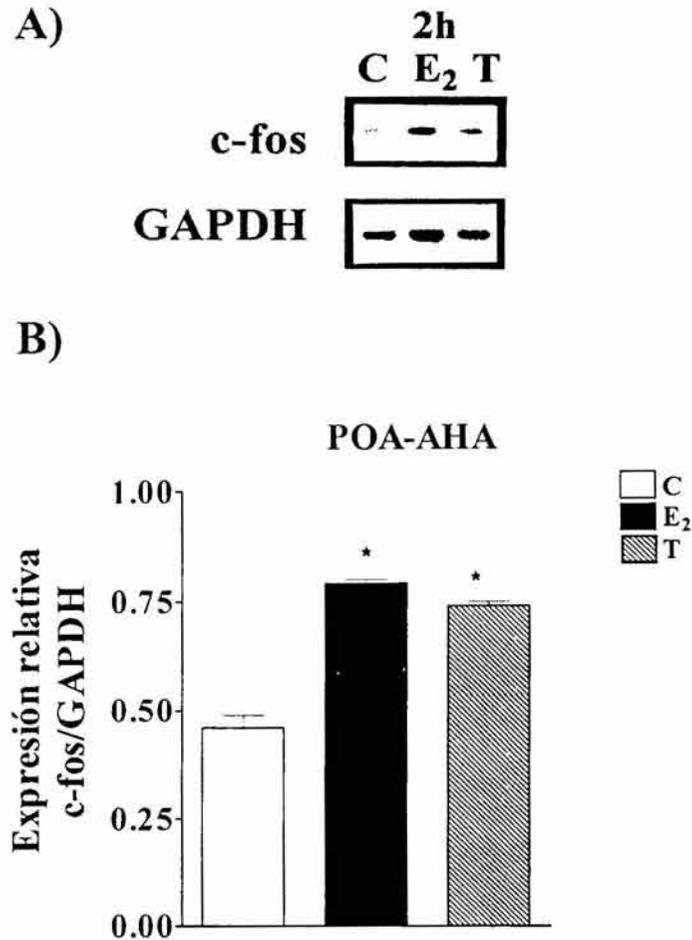


Figura 7. Expresión del gen de c-fos en el POA-AHA de ratas hembras de tres días de edad después del tratamiento con los esteroides sexuales. A) Se muestra una imagen representativa de los productos de la RT-PCR obtenidos de RNA total del POA-AHA de ratas tratadas con vehículo (C), 17 β -estradiol (E₂) o enantato de testosterona (T). Los animales fueron sacrificados a las 2 h después del tratamiento. B) Se muestra, el análisis densitométrico de la expresión del gen c-fos que fue corregido entre la expresión de GAPDH. Los resultados fueron expresados como la media \pm e.e.m (n = 4). *p < 0.05 comparado con el grupo control.

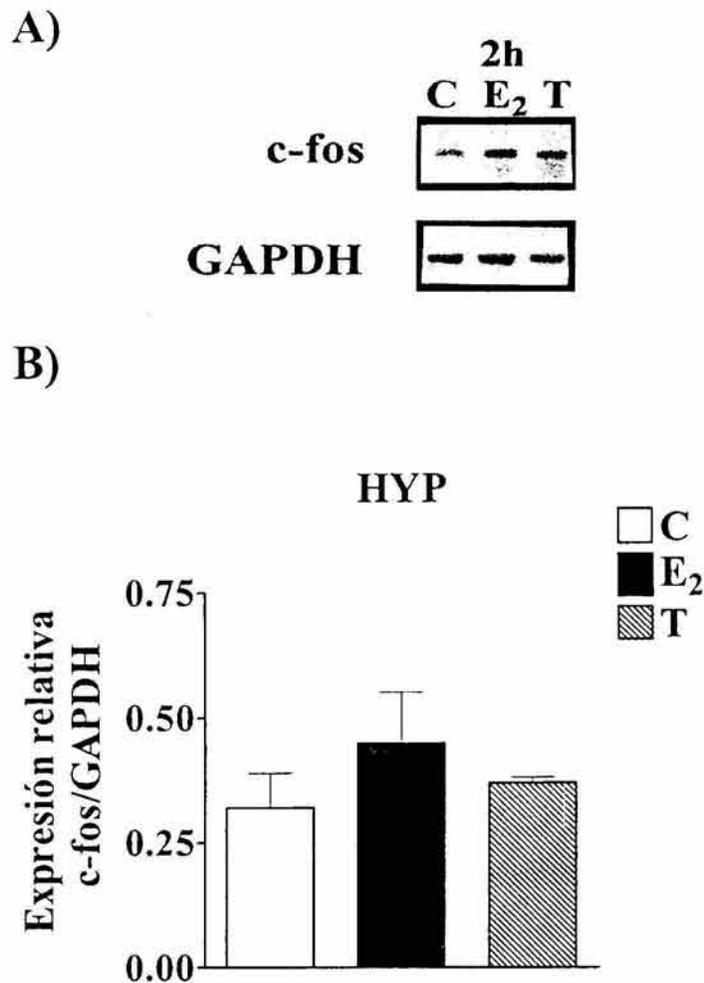


Figura 8. Expresión del gen de c-fos en el HYP de ratas hembras de tres días de edad después del tratamiento con los esteroides sexuales. A) Se muestra una imagen representativa de los productos de la RT-PCR obtenidos de RNA total del POA-AHA de ratas tratadas con vehículo (C), 17β-estradiol (E₂) o enantato de testosterona (T). Los animales fueron sacrificados a las 2 h después del tratamiento. B) Se muestra, el análisis densitométrico de la expresión del gen c-fos que fue corregido entre la expresión de GAPDH. Los resultados fueron expresados como la media ± e.e.m (n = 4).

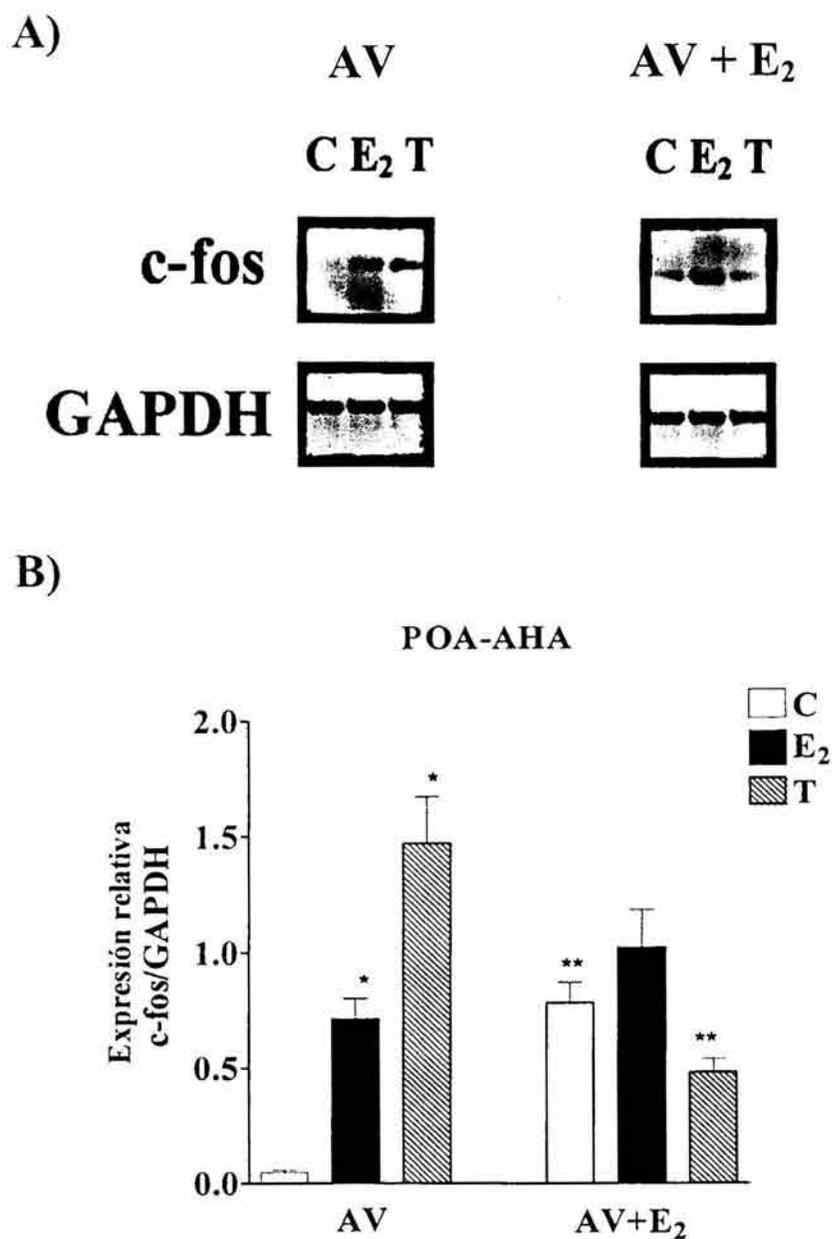


Figura 9. Expresión del gen de c-fos en el POA-AHA de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. A) Se muestra una imagen representativa de los productos de la RT-PCR obtenidos de RNA total del POA-AHA de ratas tratadas a los tres días de edad con vehículo (C), 17 β -estradiol (E₂) o enantato de testosterona (T). Los animales fueron sacrificados el día de la AV después de los tratamientos; otro grupo de animales previamente tratados como se menciona anteriormente fueron inyectados i.p. en el día de la AV con 17 β -estradiol (5 μ g) y sacrificados 3 horas después de la administración de esta hormona (AV + E₂). B) Se muestra, el análisis densitométrico de la expresión del gen c-fos que fue corregido entre la expresión de GAPDH. Los resultados fueron expresados como la media \pm e.e.m (n = 4). *p < 0.05 comparado con el grupo CAV. **p < 0.05 comparado con el grupo CAV y TAV.

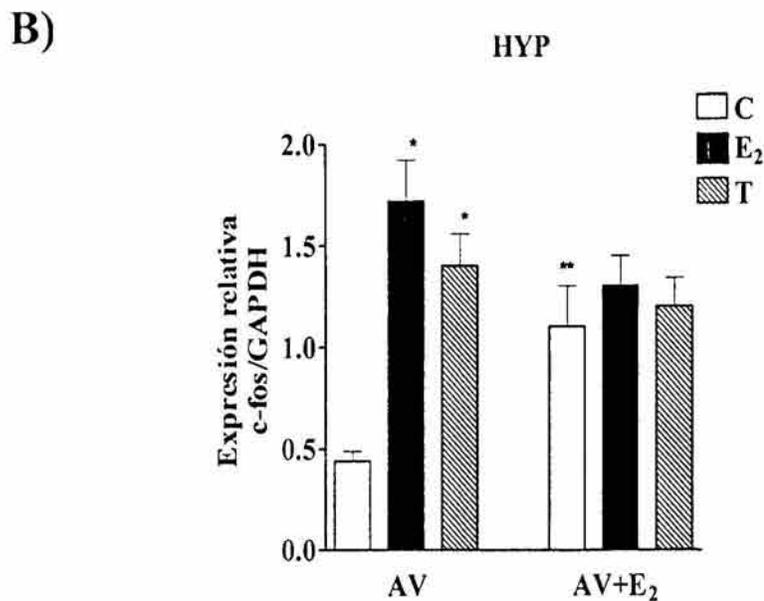
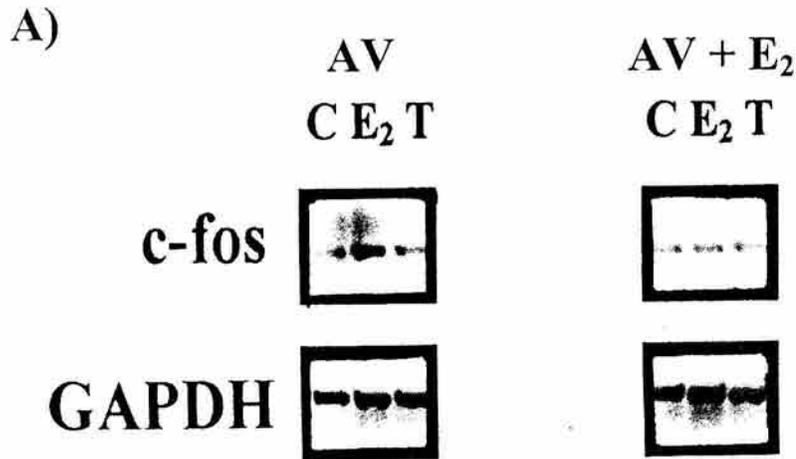


Figura 10. Expresión del gen de c-fos en el HYP de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. A) Se muestra una imagen representativa de los productos de la RT-PCR obtenidos de RNA total del HYP de ratas tratadas a los tres días de edad con vehículo (C), 17 β -estradiol (E₂) o enantato de testosterona (T). Los animales fueron sacrificados el día de la AV después de los tratamientos; otro grupo de animales previamente tratados como se menciona anteriormente fueron inyectados i.p. en el día de la AV con 17 β -estradiol (5 μ g) y sacrificados 3 horas después de la administración de esta hormona (AV + E₂). B) Se muestra, el análisis densitométrico de la expresión del gen c-fos que fue corregido entre la expresión de GAPDH. Los resultados fueron expresados como la media \pm e.e.m (n = 4). *p < 0.05 comparado con el grupo CAV. **p < 0.05 comparado con el grupo CAV.

6.3 Expresión de la proteína de c-fos en ratas desfeminizadas

La inmunoreactividad nuclear de c-fos (ir-c-fos) se determinó en toda la región del POA-AHA que incluye al núcleo preóptico medial, al núcleo preóptico mediano, al núcleo periventricular anteroventral, al núcleo supraóptico, al núcleo hipotalámico anterior, al núcleo paraventricular y al núcleo supraquiasmático (figura 11). La región del HYP abarcó a toda la región tuberal, que incluye al núcleo arcuato, al núcleo ventromedial y al núcleo dorsomedial hasta llegar al comienzo de la región mamilar (figura 12).

En el día de la AV, los animales desfeminizados con E₂ o con T mostraron una mayor ir-c-fos que los animales del grupo control (figuras 13 -15). La administración de E₂ en el día de la AV (AV + E₂) induce un incremento significativo en la ir-c-fos en el POA-AHA y en el HYP del grupo control (figuras 13 - 15). Esta ir-c-fos en POA-AHA no se modifica en los animales desfeminizados con E₂, pero disminuye en HYP, en los animales desfeminizados con T se observó una disminución de la ir-c-fos tanto en POA-AHA como en HYP cuando se inyectaron a los animales con E₂ en el día de la AV (figuras 13 - 15).

POA-AHA

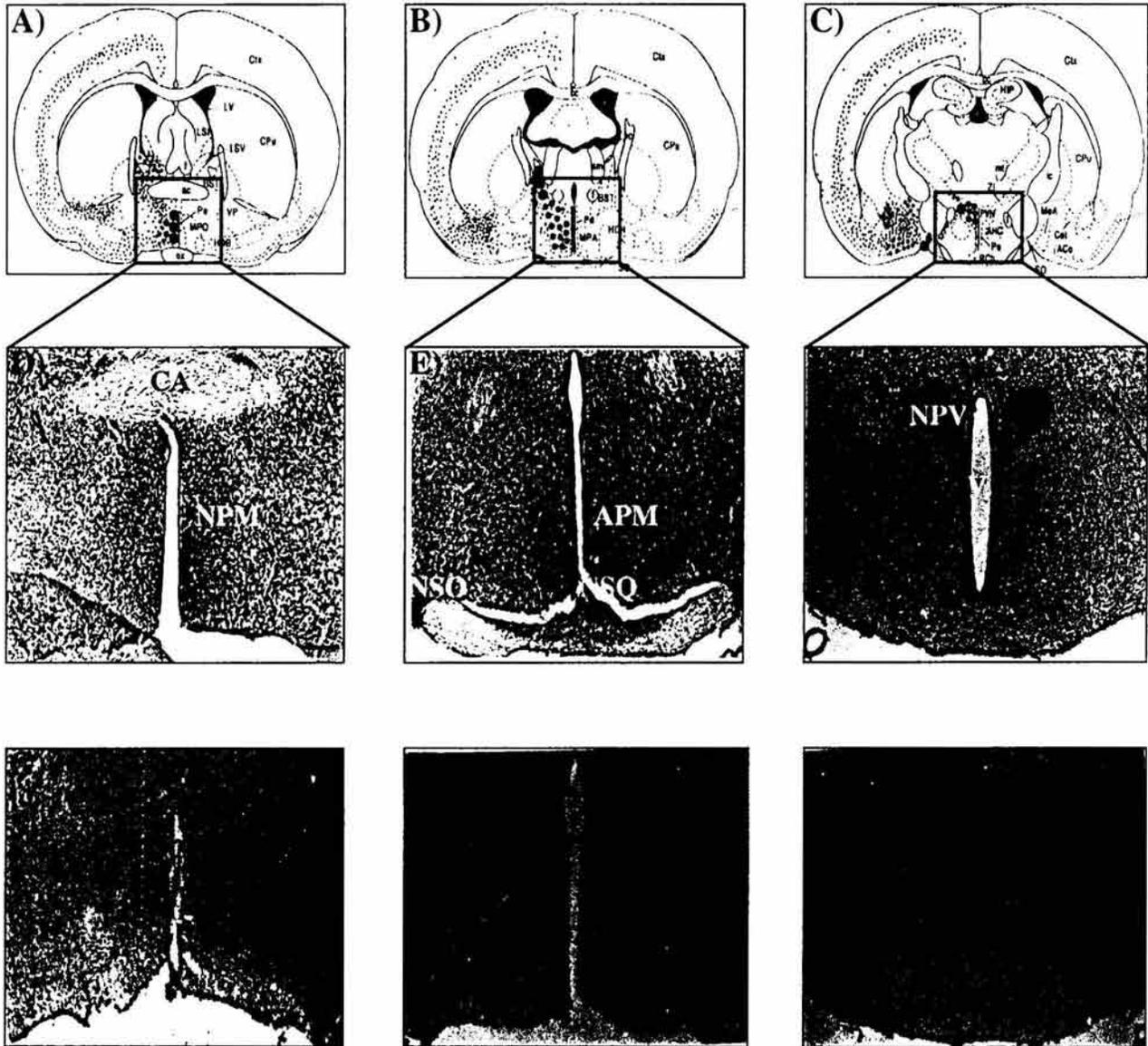


Figura 11. Región del POA-AHA de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. Se muestra esquemas de cortes coronales del cerebro de la rata en sentido antero-posterior (A, B y C) (Paxinos y Watson, 1998). Los recuadros en los esquemas indican la región analizada por inmunohistoquímica. Se observa fotomicrografías (objetivo 4 X) de cortes coronales de 50 μ m teñidos con violeta de cresilo para señalar las regiones del POA (D, E) y del AHA (F). En la imagen se observa ir-c-fos en las diferentes regiones de interés (G, H e I). CA= comisura anterior; NPM= núcleo preóptico medial; APM= área preóptica medial; NSQ= núcleo supraquiasmático; NSO= núcleo supraóptico; NPV= núcleo paraventricular; V= 3er ventrículo.

HYP

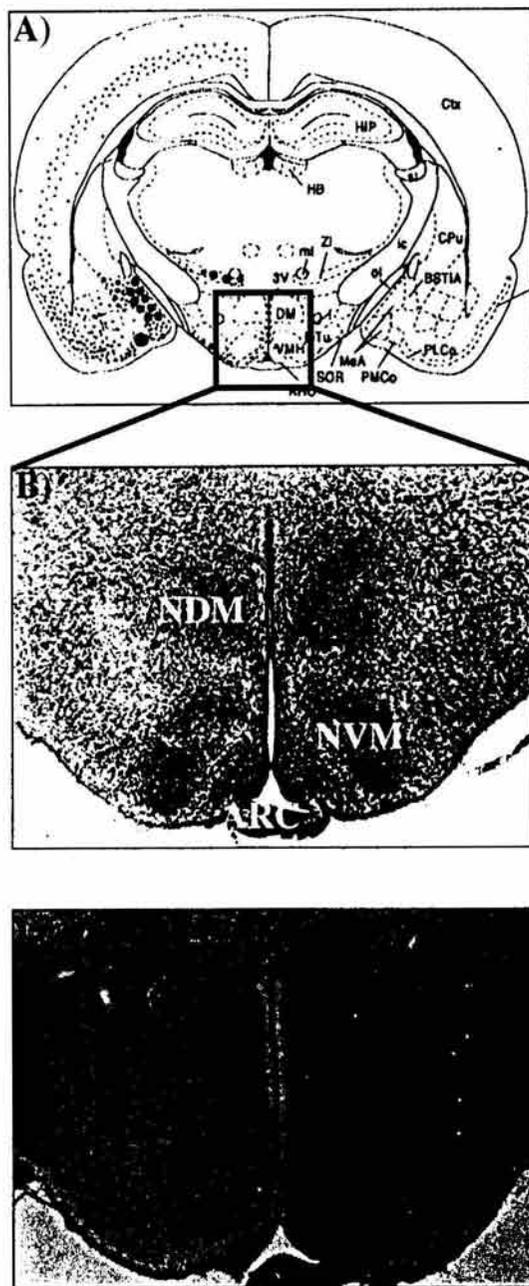


Figura 12. Región del HYP de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. Se muestra un esquema de un corte coronal del cerebro de la rata en sentido antero-posterior (A) (Paxinos y Watson, 1998). El recuadro en el esquema indica la región analizada por inmunohistoquímica. Se observa una fotomicrografía (objetivo 4 X) de un corte coronal de 50 µm teñido con violeta de cresilo para señalar la región del HYP (B). En la imagen se observa ir-c-fos en las diferentes áreas de interés (C). NDM= núcleo dorso medial; NVM= núcleo ventro medial; ARC= núcleo arcuato.

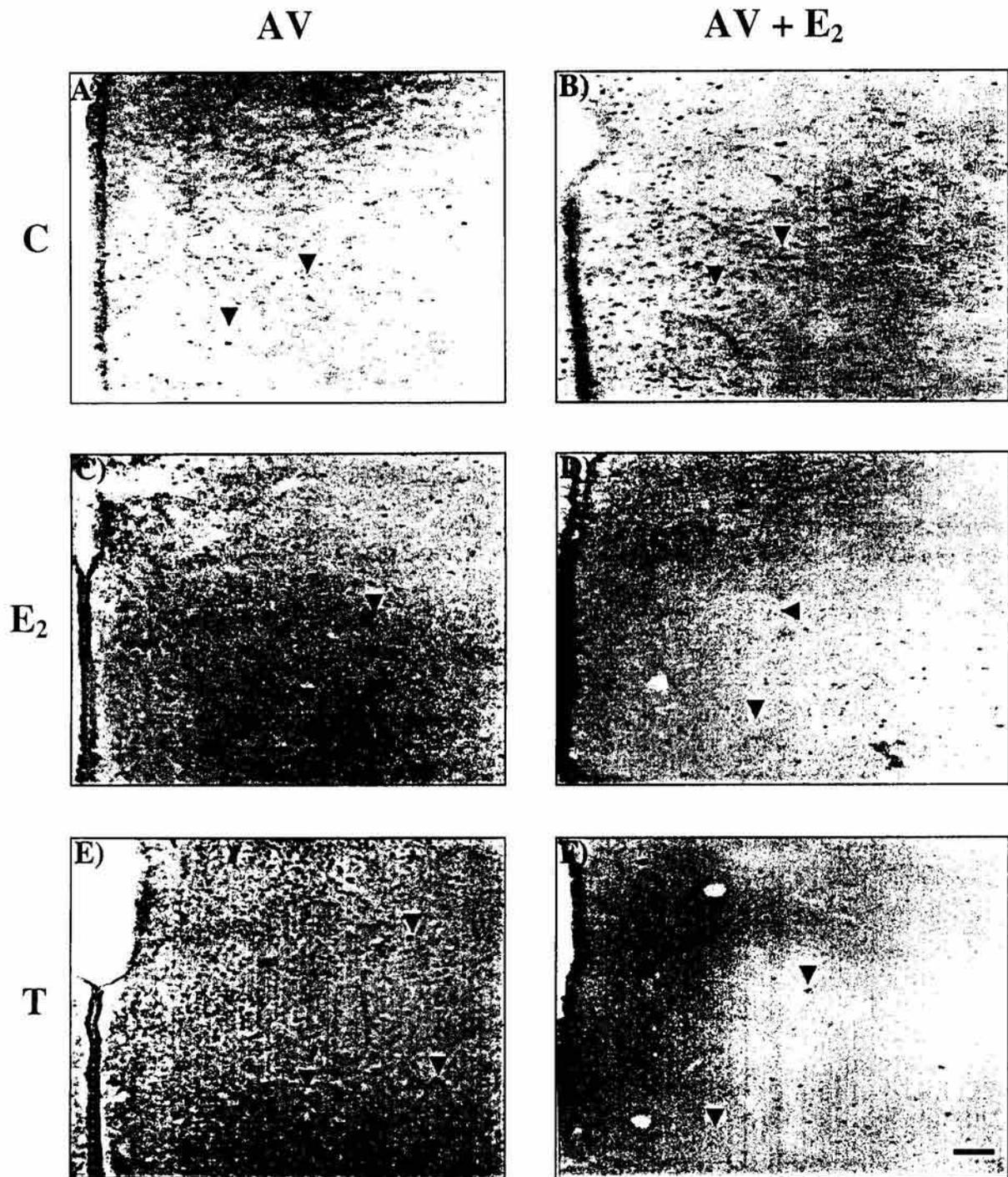


Figura 13. Expresión de la proteína de c-fos en el POA de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. Se muestra fotomicrografías (objetivo 10 X) representativas de la ir-c-fos en cortes de 50 μ m procesados por inmunohistoquímica (ver materiales y métodos). Las ratas hembras del grupo control (A) y los grupos que fueron tratados con estradiol (C) o testosterona (E) a los tres días de edad se sacrificaron en el día de la AV. Otro grupo de ratas tratadas a los tres días de edad con vehículo (B), estradiol (D) o testosterona (F) fueron sacrificadas 3 horas después de recibir una dosis de estradiol en el día de la AV (AV + E₂). La cabeza de las flechas indica la inmunolocalización nuclear de c-fos.

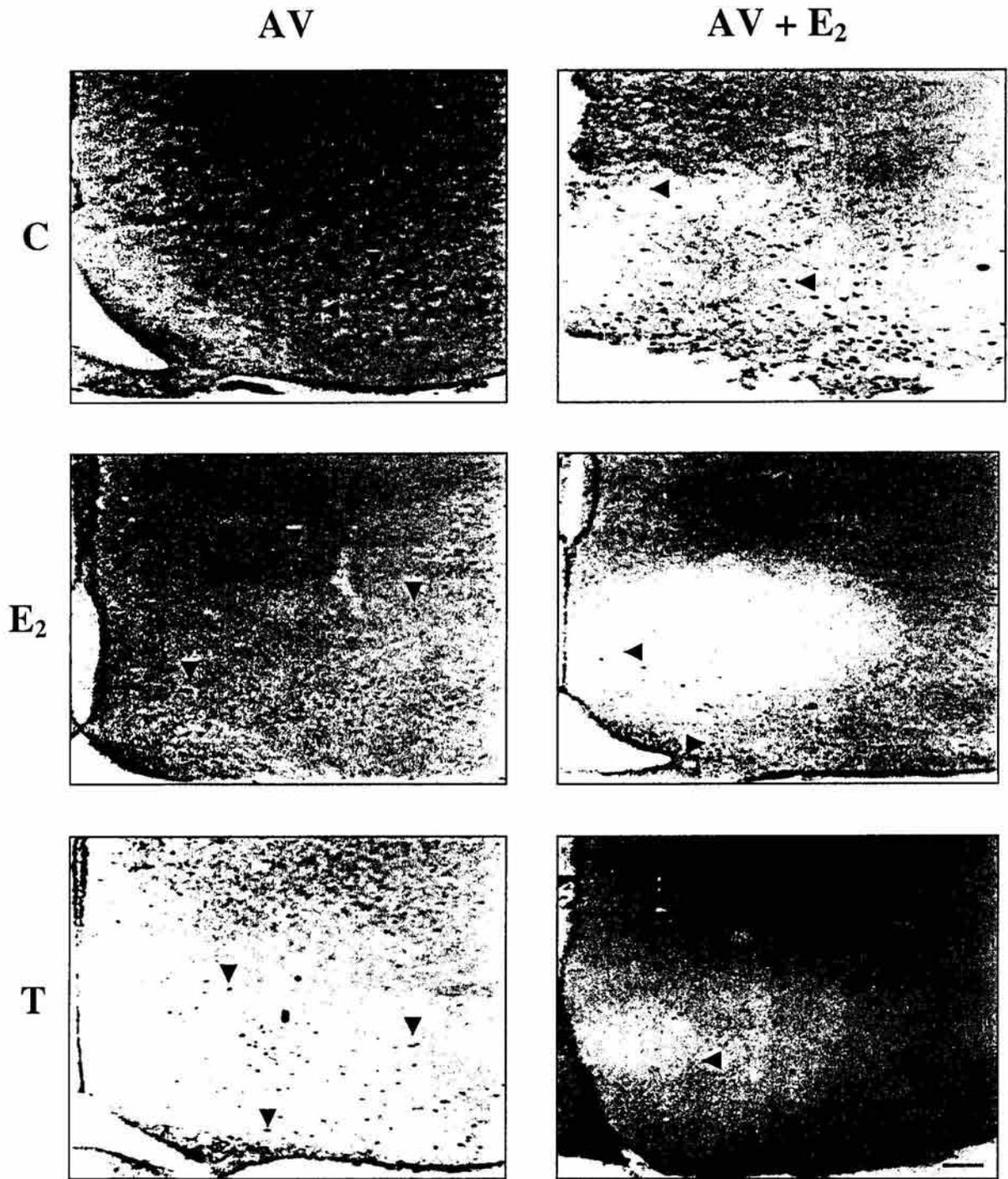


Figura 14. Expresión de la proteína de c-fos en el HYP de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. Se muestra fotomicrografías (objetivo 10 X) representativas de la ir-c-fos en cortes de 50 μ m procesados por inmunohistoquímica (ver materiales y métodos). Las ratas hembras del grupo control (A) y los grupos que fueron tratados con estradiol (C) o testosterona (E) a los tres días de edad se sacrificaron en el día de la AV. Otro grupo de ratas tratadas a los tres días de edad con vehículo (B), estradiol (D) o testosterona (F) fueron sacrificadas 3 horas después de recibir una dosis de estradiol en el día de la AV (AV + E₂). La cabeza de las flechas indica la inmunolocalización nuclear de c-fos.

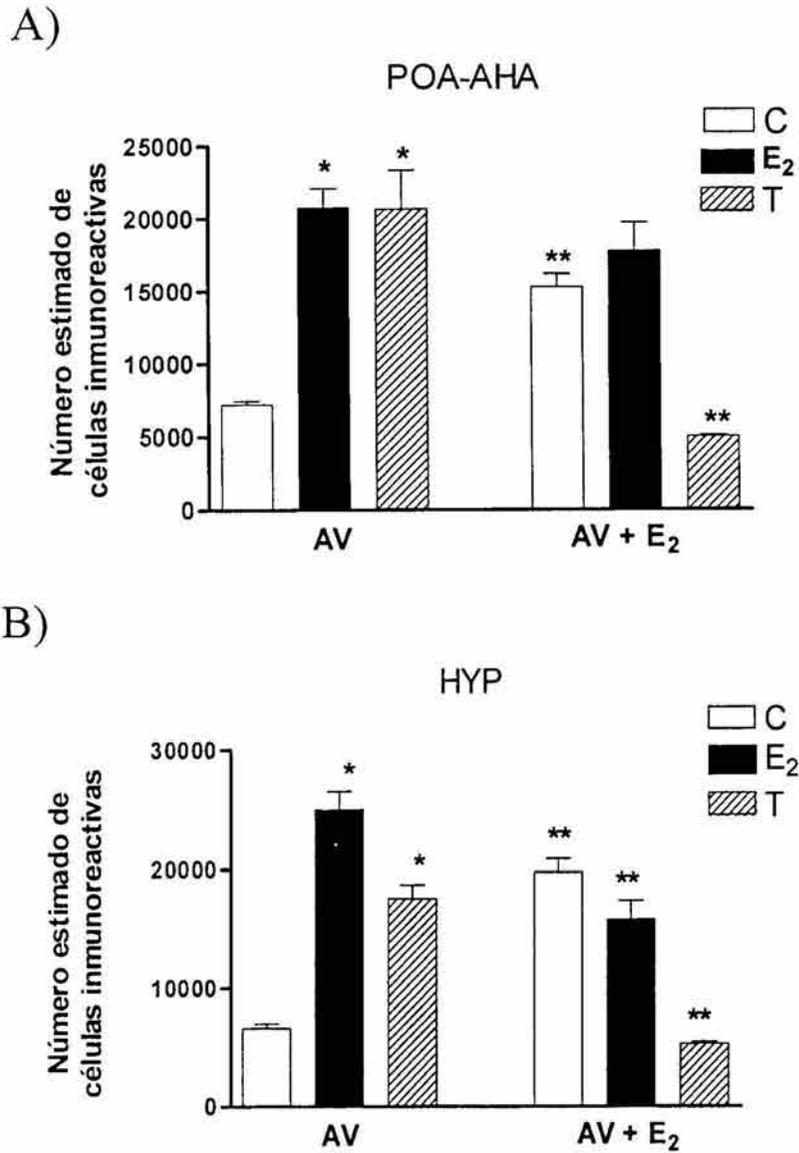


Figura 15. Cuantificación de células inmunoreactivas para c-fos (ir-c-fos) en el POA-AHA y en el HYP de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. Las gráficas muestran el número estimado de ir-c-fos en el área total del POA-AHA (A) y en el HYP (B) en el día de la AV y después de la administración aguda de estradiol en el día de la AV (AV + E₂). Los resultados son expresados como la media ± e.e.m (n = 4). *p < 0.05 comparado con CAV, **p < 0.001 comparado con su respectivo grupo de tratamiento en AV.

6.4 Expresión del gen del RP durante el desarrollo postnatal

La expresión del RNAm del RP fue significativamente inducida 2 horas después de la administración con E₂ y T en el POA-AHA (figura 16) a los tres días de edad, mientras que en el HYP no hubo un incremento significativo después del tratamiento con los esteroides (figura 17).

En el tiempo de la AV, la expresión del RP en el POA-AHA de animales desfeminizados con E₂ o con T fue significativamente más alta que los observado en el grupo control (figura 18); en el HYP no se observó un incremento significativo en la expresión del RP (figura 19). En el POA-AHA y en el HYP, la administración de E₂ en el día de la AV (AV + E₂) induce un incremento significativo sobre la expresión del RNA mensajero del RP en los animales del grupo control (figuras 18 y 19). En los animales desfeminizados con E₂ la expresión del RNAm del RP en POA-AHA no es inducida por el E₂ administrado en el día de la AV, mientras que el tratamiento con T la disminuyó (figura 18). En el HYP, ambos esteroides disminuyeron la expresión del RP por el tratamiento agudo de E₂ en el día de la AV (figura 19).

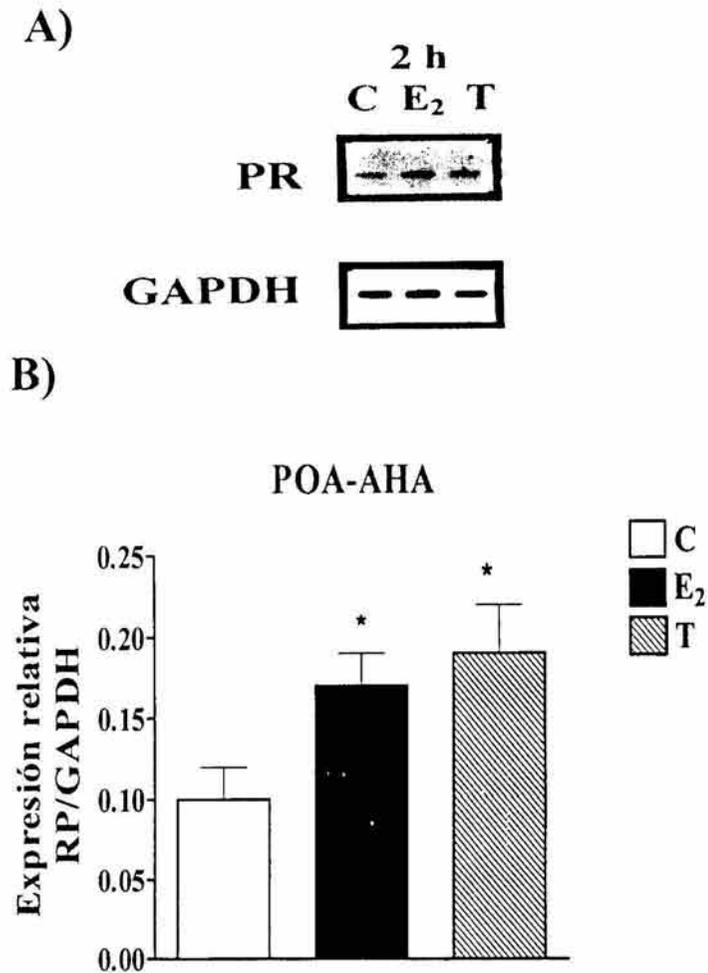


Figura 16. Expresión del gen de RP en el POA-AHA de ratas hembras de tres días de edad después del tratamiento con esteroides sexuales. A) Se muestra una imagen representativa de los productos de la RT-PCR obtenidos de RNA total del POA-AHA de ratas tratadas con vehículo (C), 17β-estradiol (E₂) o enantato de testosterona (T). Los animales fueron sacrificados a las 2 h después del tratamiento. B) Se muestra, el análisis densitométrico de la expresión del gen RP que fue corregido entre la expresión de GAPDH. Los resultados fueron expresados como la media ± e.e.m (n = 4). *p < 0.05 comparado con el grupo control.

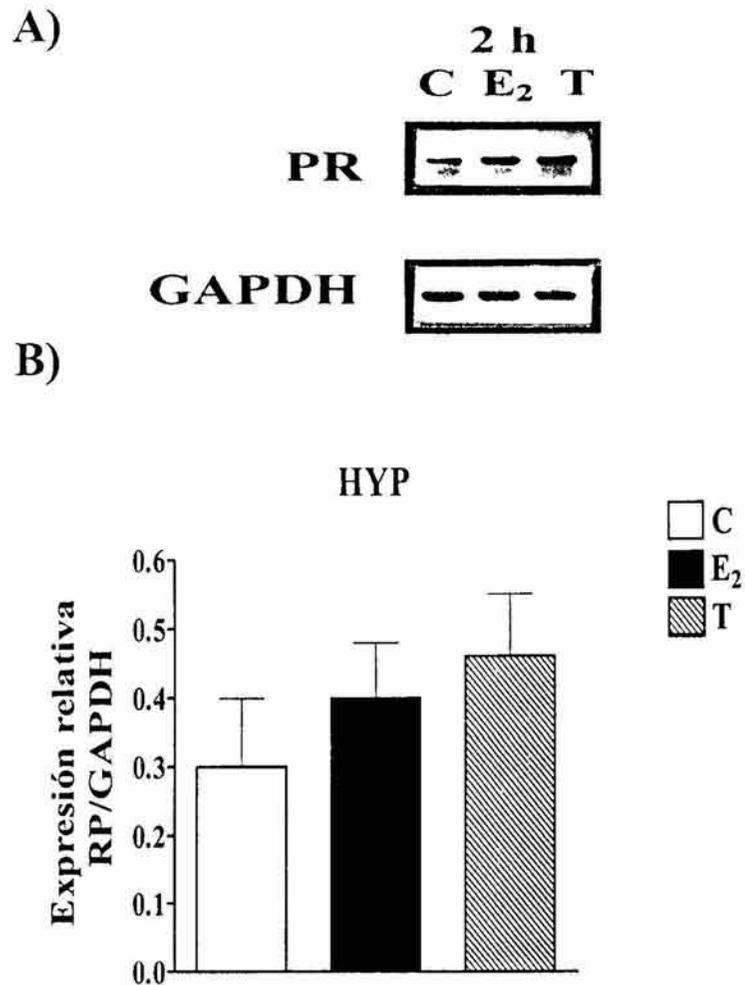


Figura 17. Expresión del gen de RP en el HYP de ratas hembras de tres días de edad después del tratamiento con esteroides sexuales. A) Se muestra una imagen representativa de los productos de la RT-PCR obtenidos de RNA total del POA-AHA de ratas tratadas con vehículo (C), 17 β -estradiol (E₂) o enantato de testosterona (T). Los animales fueron sacrificados a las 2 h después del tratamiento. B) Se muestra, el análisis densitométrico de la expresión del gen de RP que fue corregido entre la expresión de GAPDH. Los resultados fueron expresados como la media \pm e.e.m (n = 4).

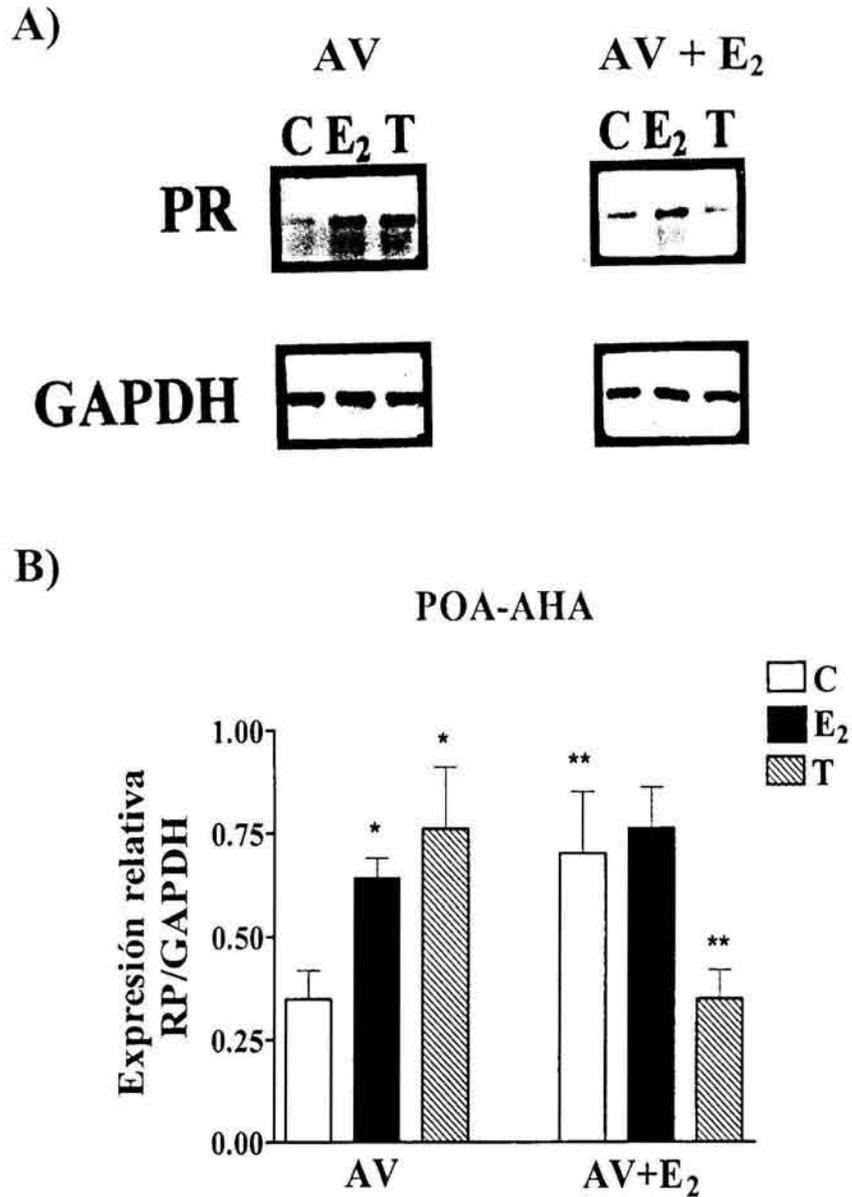


Figura 18. Expresión del gen de RP en el POA-AHA de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. A) Se muestra una imagen representativa de los productos de la RT-PCR obtenidos de RNA total del POA-AHA de ratas tratadas a los tres días de edad con vehículo (C), 17 β -estradiol (E₂) o enantato de testosterona (T), sacrificadas el día de la AV con o sin inyección i.p. de 17 β -estradiol (5 μ g), sacrificadas 3 horas después de la administración de esta hormona (AV + E₂). B) Se muestra, el análisis densitométrico de la expresión del gen de RP que fue corregido entre la expresión de GAPDH. Los resultados fueron expresados como la media \pm e.e.m (n = 4). *p < 0.05 comparado con el grupo CAV. **p < 0.05 comparado con el grupo CAV y TAV.

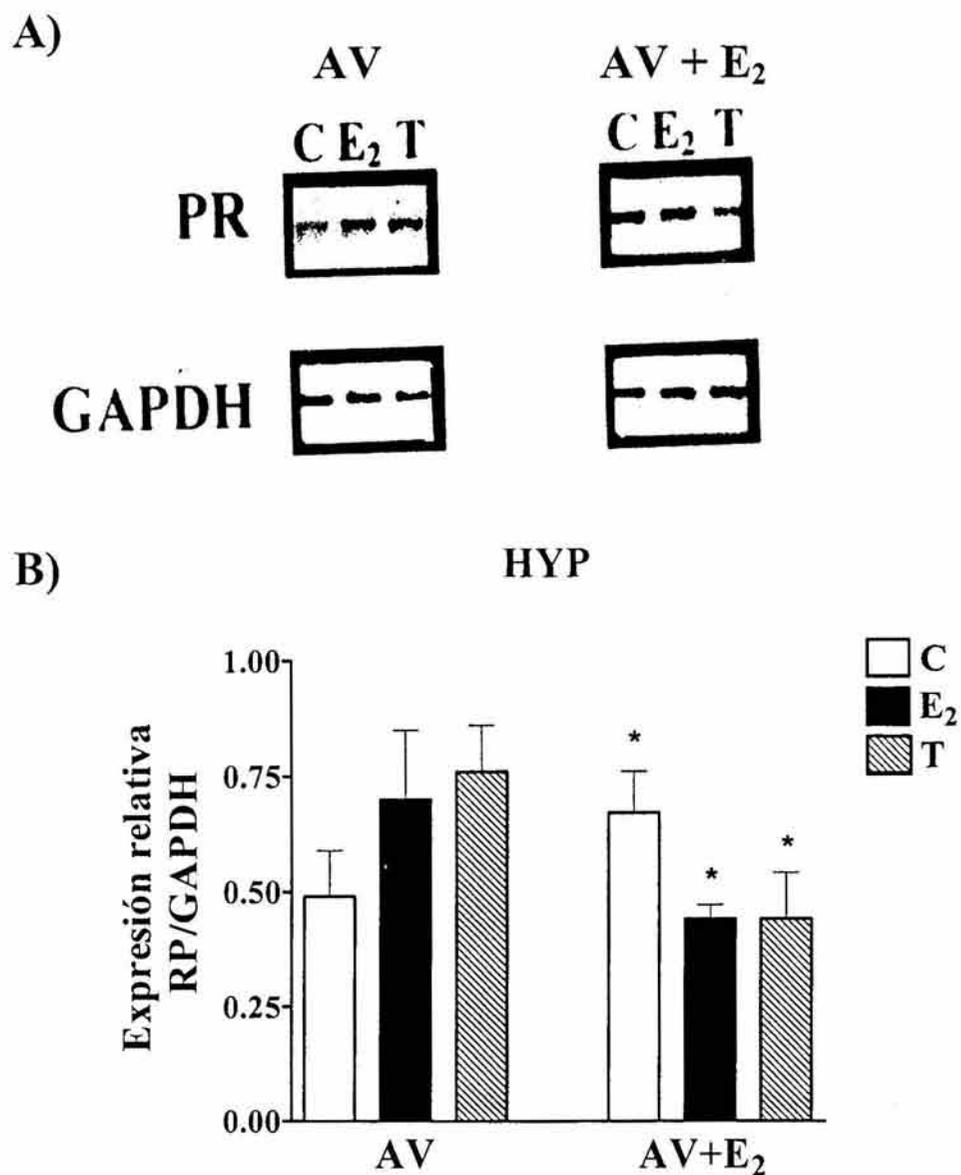


Figura 19. Expresión del gen de RP en el HYP de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. A) Se muestra una imagen representativa de los productos de la RT-PCR obtenidos de RNA total del HYP de ratas tratadas a los tres días de edad con vehículo (C), 17 β -estradiol (E₂) o enantato de testosterona (T), sacrificadas el día de la AV con o sin inyección i.p. de 17 β -estradiol (5 μ g), sacrificadas 3 horas después de la administración de esta hormona (AV + E₂). B) Se muestra, el análisis densitométrico de la expresión del gen de RP que fue corregido entre la expresión de GAPDH. Los resultados fueron expresados como la media \pm e.e.m (n = 4). *p < 0.05 comparado con su respectivo tratamiento en el día de la AV.

6.5 Expresión de la proteína del RP en ratas desfeminizadas

El tratamiento con E₂ o con T a los tres días de edad incrementó la inmunoreactividad del RP (ir-RP) en la región del POA-AHA (figuras 20 y 22) y en el HYP (figuras 21 y 22) en el día de la AV. La administración de E₂ en el día de la AV (AV + E₂) induce un incremento significativo en la ir-RP en el POA-AHA (figuras 20 y 22) y en el HYP (figuras 21 y 22) del grupo control. En los animales desfeminizados con E₂ o con T, la administración de E₂ en el día de la AV (AV + E₂), no induce la ir-RP además disminuye significativamente la expresión de la proteína del RP en el POA-AHA (figuras 20 y 22) y en el HYP (figuras 21 y 22).

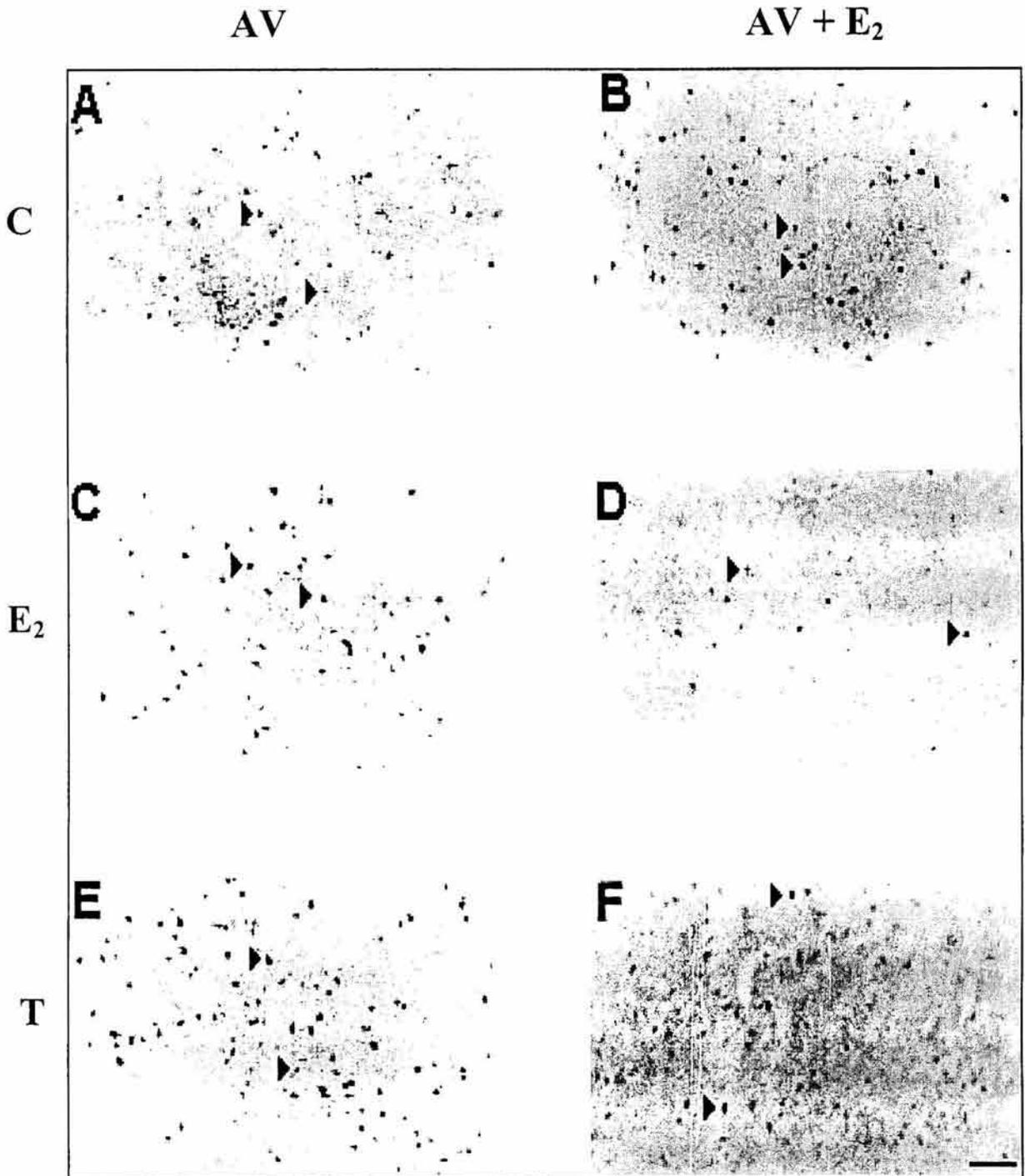


Figura 20. Expresión de la proteína del RP en el POA de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. Se muestran fotomicrografías (objetivo 20 X) representativas de la ir-RP en cortes de 50 μ m procesados por inmunohistoquímica (ver materiales y métodos). Las ratas hembras del grupo control (A) y los grupos que fueron tratados con estradiol (C) o testosterona (E) a los tres días de edad se sacrificaron en el día de la AV. Otro grupo de ratas tratadas a los tres días de edad con vehículo (B), estradiol (D) o testosterona (F) fueron sacrificadas 3 horas después de recibir una dosis de estradiol en el día de la AV (AV + E₂). La cabeza de las flechas indica la inmunolocalización nuclear del RP.

AV

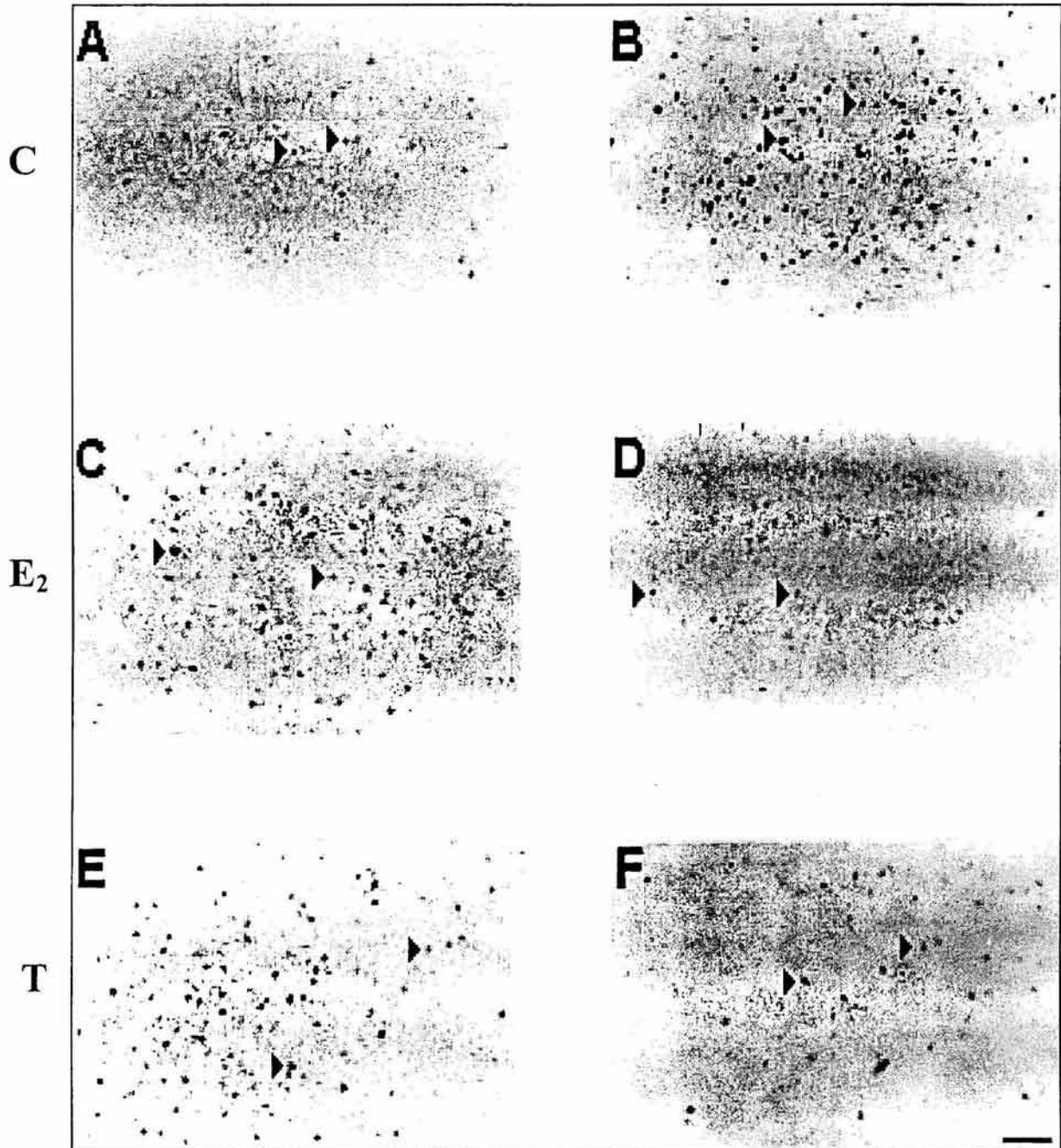
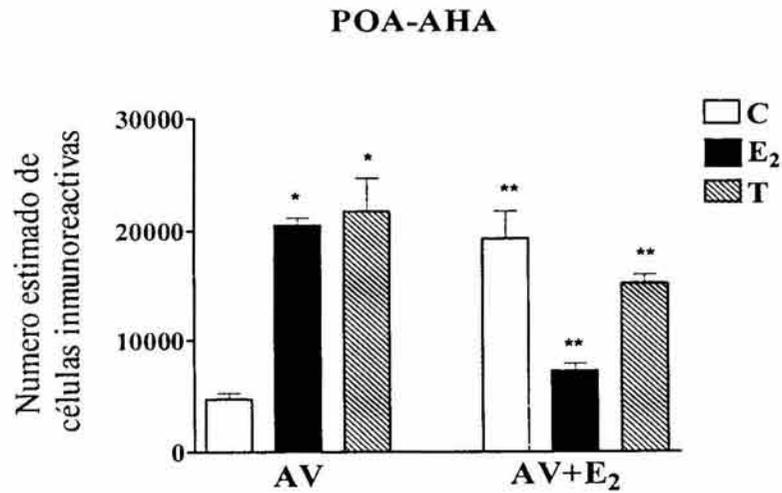
AV + E₂

Figura 21. Expresión de la proteína del RP en el HYP de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. Se muestran fotomicrografías (objetivo 20 X) representativas de la ir-RP en cortes de 50 μm procesados por inmunohistoquímica (ver materiales y métodos). Las ratas hembras del grupo control (A) y los grupos que fueron tratados con estradiol (C) o testosterona (E) a los tres días de edad se sacrificaron en el día de la AV. Otro grupo de ratas tratadas a los tres días de edad con vehículo (B), estradiol (D) o testosterona (F) fueron sacrificadas 3 horas después de recibir una dosis de estradiol en el día de la AV (AV + E₂). La cabeza de las flechas indica la inmunolocalización nuclear del RP.

A)



B)

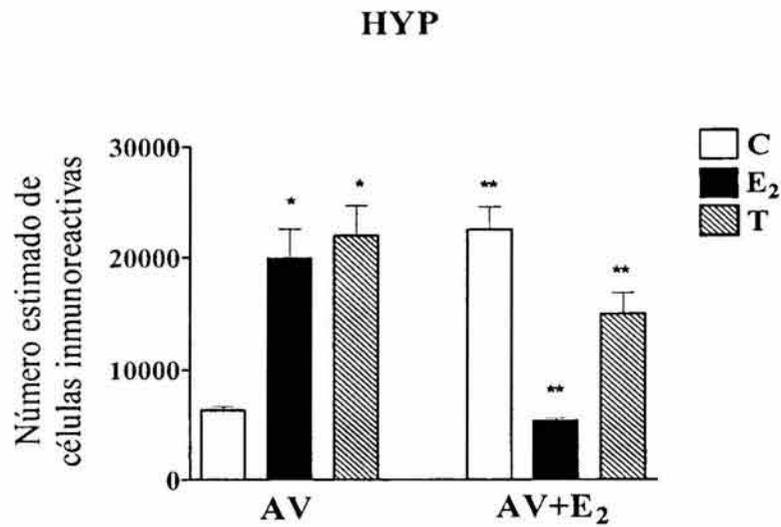


Figura 22. Cuantificación de células inmunoreactivas para el RP (ir-RP) en el POA-AHA y en el HYP de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. Las gráficas muestran el número estimado de ir-RP en el área total del POA-AHA (A) y en el HYP (B) en el día de la AV y después de la administración con estradiol en el día de la AV (AV + E₂). Los resultados son expresados como la media ± e.e.m (n = 4). *p < 0.05 comparado con CAV, **p < 0.001 comparado con su respectivo grupo de tratamiento en AV.

6.6 Concentraciones hormonales séricas en ratas desfeminizadas

En los animales desfeminizados con esteroides sexuales (E_2 o T) no se observaron diferencias significativas en las concentraciones séricas del E_2 con respecto al grupo control en el día de la AV. En el caso de la concentración sérica de la P_4 , se observó una disminución significativa (dos a tres veces más baja) de esta hormona en los animales tratados con esteroides sexuales en comparación con el grupo control en el día de la AV (tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de esteroides en suero de ratas hembras desfeminizadas.

| Tratamiento | Estradiol (pg/ml) | Progesterona (ng/ml) |
|-------------|-------------------|----------------------|
| CAV | 77.86 ± 6.2 | 5.053 ± 0.57 |
| EAV | 79.33 ± 4.0 | 1.608 ± 0.50* |
| TAV | 81.61 ± 3.4 | 2.542 ± 0.38* |

Los animales fueron tratados con vehículo (CAV), E_2 (EAV) y T (TAV) a los tres días de edad y sacrificados en el día de la AV. Las concentraciones de los esteroides fueron determinados por radioinmunoensayo. Los datos son expresados como la media ± e.e.m de 4 animales por grupo. * $p < 0.001$ comparado con CAV.

6.7 Expresión diferencial de RNAs mensajeros

A través del *Differential Display* se detectó la expresión de diversos transcritos (RNAs mensajeros) en el POA-AHA y en el HYP de ratas hembras tratadas a los tres días de edad con aceite de maíz, con E₂ o con T y sacrificadas a las 2 horas y en el día de la AV después de la administración hormonal. A las 2 horas después de los tratamientos hormonales se observó un mayor número de transcritos obtenidos en el grupo control y en el grupo con E₂ en comparación con el grupo con T en la región del POA-AHA/HYP. También se observó que existe un mayor número de transcritos expresados en los animales recién nacidos en comparación con los animales en la etapa adulta (figura 23).

En el día de la AV, se aislaron más de 100 diferentes transcritos en el POA-AHA y en el HYP, de éstos 45 fueron inducidos por E₂ y 57 inducidos por T en la región del POA-AHA y del HYP (figura 24). La administración de E₂ en el día de la AV (AV + E₂) en animales tratados a los tres días de edad con esteroides sexuales induce la expresión diferencial de transcritos en el POA-AHA y en el HYP (figura 24).

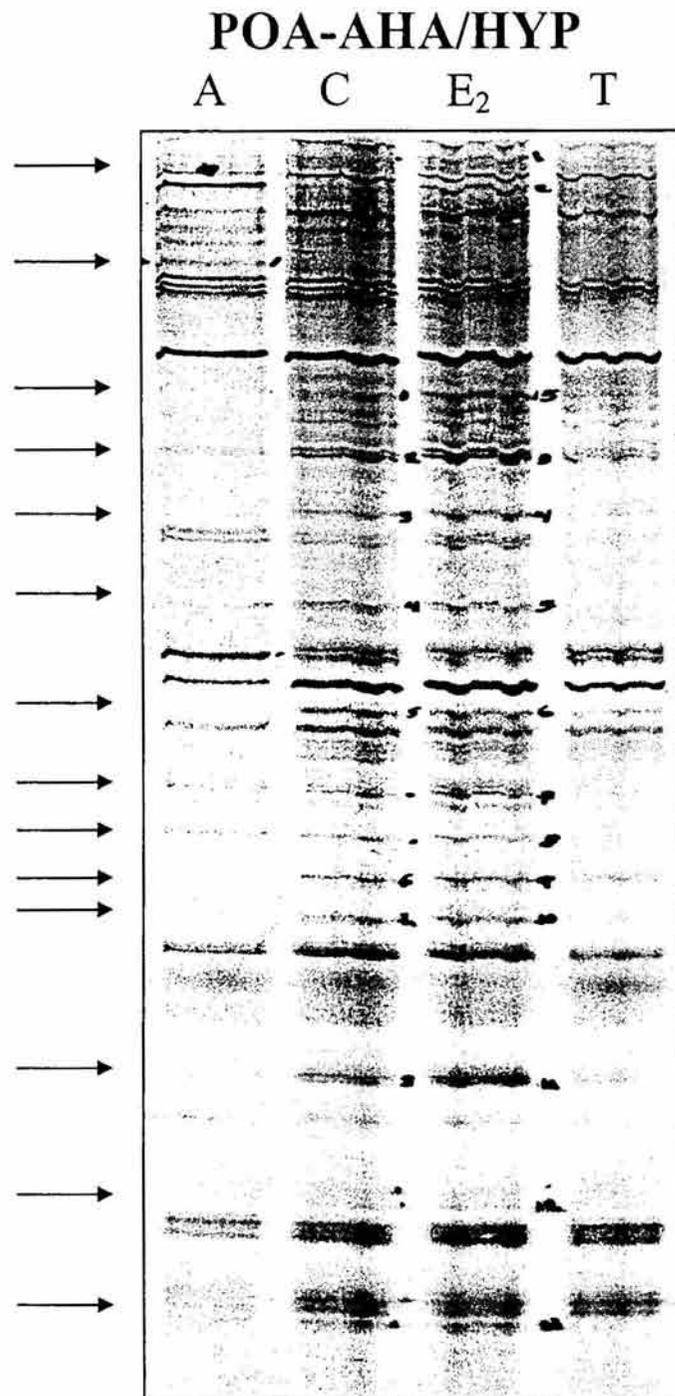


Figura 23. Expresión diferencial de RNA mensajeros en el POA-AHA/HYP de ratas hembras a los tres días de edad. Se muestra la imagen de una autorradiografía donde se observa la expresión diferencial de transcritos obtenidos a través de la técnica de *differential display* por RT-PCR (ver materiales y métodos). Los animales fueron tratados con vehículo (C), 17 β -estradiol (E₂) y testosterona (T) a los tres días de edad y sacrificados 2 horas después de los tratamientos; se hace una comparación con un animal intacto en el día de la AV (A). Las flechas indican algunas de las bandas expresadas diferencialmente entre los tratamientos y los números dentro de la figura las bandas que fueron cortadas y purificadas del gel para la re-amplificación de los productos por RT-PCR.

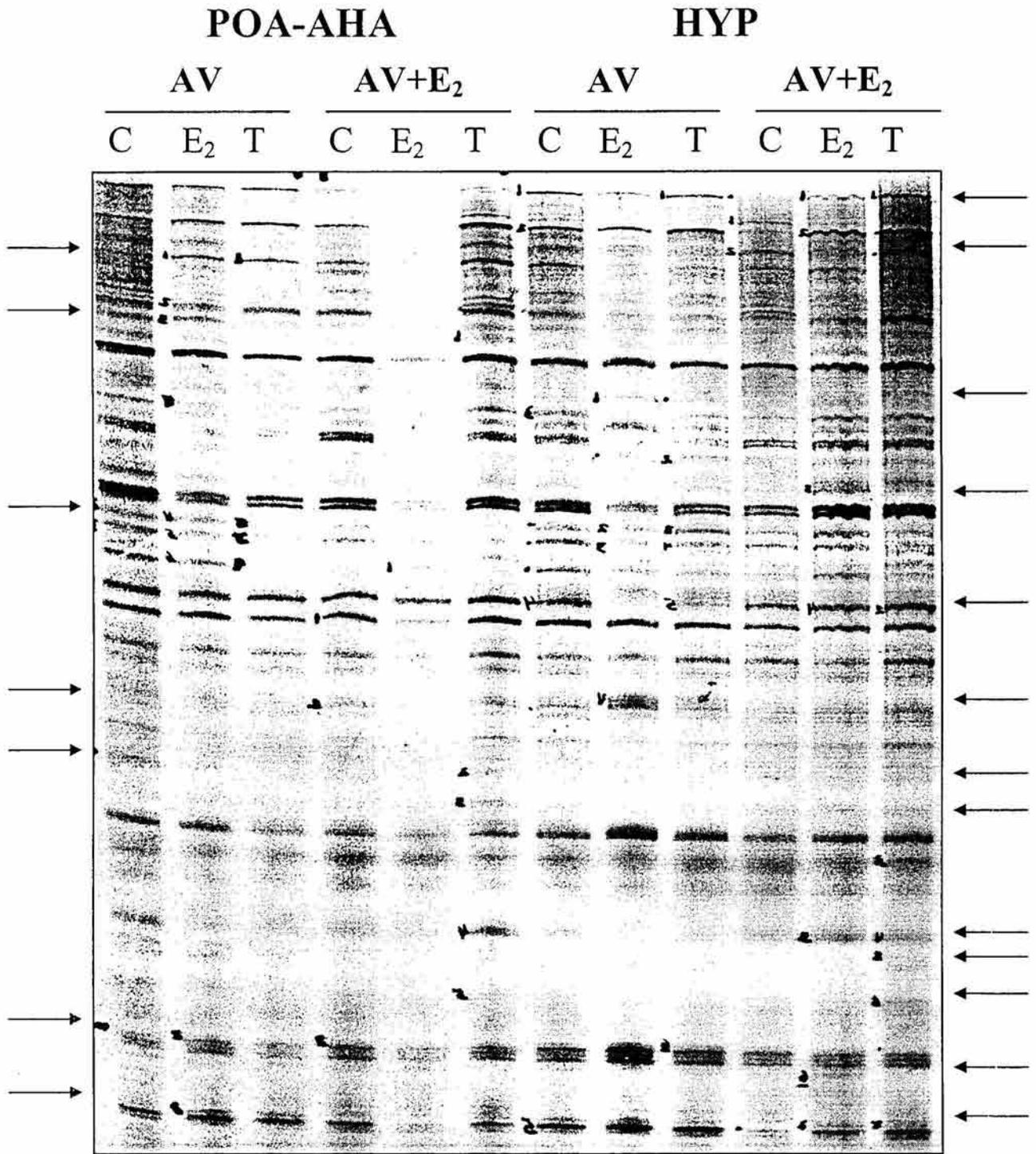


Figura 24. Expresión diferencial de RNA mensajeros en el POA-AHA y en el HYP de ratas hembras en el día de la apertura vaginal. Se muestra la imagen de una autorradiografía donde se observa la expresión diferencial de transcritos obtenidos a través de la técnica de *differential display* por RT-PCR (ver materiales y métodos). Los animales fueron tratados con vehículo (C), 17 β -estradiol (E₂) o testosterona (T) a los tres días de edad y sacrificados en el día de la AV después de los tratamientos; otro grupo de animales tratados como se describe anteriormente recibieron por vía i.p. una dosis de 17 β -estradiol y fueron sacrificados 3 horas después (AV + E₂). Las flechas indican algunas de las bandas expresadas diferencialmente entre los tratamientos y los números dentro de la figura las bandas que fueron cortadas y purificadas del gel para la re-amplificación de los productos por RT-PCR.

6.8 Identificación de nuevos genes expresados

De los transcritos obtenidos por la técnica de *Differential Display*, sólo se procesaron 10 para su clonación, de estos sólo 2 muestras se analizaron por secuenciación. Estas dos muestras corresponden a la región del POA-AHA de ratas hembras desfeminizadas con E₂ en el día de la AV (figura 24). El tamaño obtenido para cada producto es de 191 pb para la muestra no. 1 y de 165 pb para la muestra no. 2.

Muestra no. 1 (191 pb)

```
5'[GAAATCAAGGTCTAAAAGTATGATAATTTTATTGCCTTTTGAAAGAGAA  
CGTAAAAATGATTCGTGAAGAGCTTTCATTATGCCCAAGGCTGAGGACAGC  
CCATATTCCTGTACATGAGAGCTTAGATTCACACCTCCATTTAGTTCTCCCT  
TGGACTAGCTCAGCTTGTGGTATATGTTTCCAGTATTG]3'
```

Muestra no. 2 (165 pb)

```
5'[CGCTGTGCCCAATTACAATGTTATTGCCACTGTAGTGATGGACACCAGTT  
TTAGCCAACATGGCATAAGTATTCTATTTTCAGATTTCTCAAAGCTGGACAGT  
TGTTGGCGAGGATAACCAATTTTCGCTTTGCCTTGTCTGATCATCTTCAGAGT  
CTGTTTGTACC]3'
```

El análisis realizado de estas secuencias en un banco genómico gratuito del *National Center Biotechnology Information* (NCBI) mostró que la muestra no. 1 es idéntica con un RNA mensajero identificado como AW528658 en una biblioteca de expresión (*expressed sequence tag* o *EST*) obtenida de hipocampo de rata adulta (Bonaldo y cols., 2000) (figura 25). La muestra no. 2 es idéntica con el RNA mensajero de la proteína L30 ribosomal (número de acceso del *GeneBank* NM_022699) de la rata, del ratón y del humano.

```

1 50
AW528658 (1) TTTTTTTTTTTTTTCTCCAGAAATCAAGGTCTAAAAGTATGATAATTT
dd_1A (1) -----GAAATCAAGGTCTAAAAGTATGATAATTT
51 100
AW528658 (51) TATTGCCTTTTGAAAAGAGAACGTAAAAATGATTCGTGAAGAGCTTTCATT
dd_1A (30) TATTGCCTTTTGAAAAGAGAACGTAAAAATGATTCGTGAAGAGCTTTCATT
101 150
AW528658 (101) ATGCCCAAGGCTGAGGACAGCCCATATTCCTGTACATGAGAGCTTAGATT
dd_1A (80) ATGCCCAAGGCTGAGGACAGCCCATATTCCTGTACATGAGAGCTTAGATT
151 200
AW528658 (151) CACACCTCCATTTAGTTCTCCCTTGGACTAGCTCAGCTTGTTGGTATATG
dd_1A (130) CACACCTCCATTTAGTTCTCCCTTGGACTAGCTCAGCTTGTTGGTATATG
201 250
AW528658 (201) TTTCCAGTATTGCCAGCACAGGCCCTGCCTTGGGTGCTTCTAGGTTACC
dd_1A (180) TTTCCAGTATTG-----
251 300
AW528658 (251) TTCTTCAGCACCAGTTTCTGAATGAGTAAATAGTATAACTACATTTAGGC
dd_1A (192) -----
301 350
AW528658 (301) AGAGTCAGTGTCTCACAATCACAGACAGTACTGTCATTCACAGCTTGTA
dd_1A (192) -----
351 400
AW528658 (351) CTTAATATTTTTGACATTTTATGGCAGATAATCATATAACCACGTGAGGGC
dd_1A (192) -----
401 450
AW528658 (401) TGTCTACATGCTGTAGGTAACCTATTAGCATTGATGATTTCGTACCTGAC
dd_1A (192) -----
451 479
AW528658 (451) AGATGCCGGTAAAACTCTCCTCGTGCCGA
dd_1A (192) -----

```

Figura 25. Alineamiento de bases entre la secuencia AW528658 y la muestra no. 1 obtenida por *Differential Display*. El producto del gen AW528658 tiene un tamaño de 479 pb y el gen de la muestra 1 de 191 pb. El recuadro amarillo muestra el sitio de homología entre las dos secuencias.

6.9 Expresión del gen AW528658 en la rata adulta

Para estudiar la expresión del gen AW528658 en el hipotálamo y en el hígado de rata macho adulto, se utilizó dos pares de oligonucleótidos. Tanto con el primer par (89/329) como con el segundo par (87/246) de oligonucleótidos el gen AW528658 se expresó en ambos tejidos (figura 26), sin embargo se obtuvo más de un producto. Utilizando otras condiciones de estandarización de la PCR, se observó un sólo producto del peso esperado en el hipotálamo con un solo par de oligonucleótidos (89/329) (figura 27).

7. Discusión

7.1 Expresión de c-fos y del RP en el POA-AHA y en el HYP de ratas tratadas con esteroides sexuales durante el período neonatal

Este trabajo investigó la expresión del RNAm y la proteína de c-fos y del RP en la región del POA-AHA y del HYP en diferentes etapas del desarrollo postnatal de ratas hembras desfeminizadas por el tratamiento con E₂ o T a los tres días de edad. Los resultados indican que se incrementa la expresión del RNAm de c-fos y del RP a las 2 horas y en el día de la AV después del tratamiento tanto con E₂ como con T (figuras 7 – 10 y 16 – 19) en ambas regiones, lo que sugiere que las HES administradas en el período crítico postnatal de la diferenciación sexual del cerebro modifican la expresión normal de genes regulados por estrógenos (c-fos y RP) en el HYP. Diversos grupos de investigadores han demostrado que en ratas hembras adultas ovariectomizadas y tratadas con E₂ se induce la expresión de c-fos y del RP en tejidos sensibles a estrógenos, como es el caso del HYP o del útero (Hagihara y cols., 1992; Hoffman y cols., 1994; Auger y Blaustein, 1995; Cheung y cols., 1997; Mendoza-Rodríguez y cols., 1999; Greco y cols., 2001). Sin embargo, ningún estudio ha demostrado la participación de c-fos y del RP en el proceso de la diferenciación sexual del HYP. Además, los efectos del E₂ a largo plazo sobre la expresión de c-fos y del RP en el proceso de la diferenciación sexual del HYP no han sido previamente estudiados en algún modelo de desfeminización o de androgenización. Solamente se ha observado la inducción de la expresión de c-fos a largo plazo después de un estímulo físico o químico, como es el caso de ratas machos estresados en el período neonatal que al exponerlos a hembras receptoras en la etapa adulta muestran un aumento en la expresión de c-fos en el HYP; también, se ha demostrado la expresión de c-fos en el cerebro anterior de ratas adultas expuestas a drogas antipsicóticas 3 meses antes (Humm y cols., 1995; Sebens y cols., 1995).

Este trabajo aporta la observación relevante de que el tratamiento neonatal con esteroides sexuales incrementa la expresión del RNAm y de la proteína de c-

fos y del RP en el POA-AHA y en el HYP en el día de la AV (figuras 9 – 10, 15, 18 – 19 y 22). c-fos es un gen inducido por diversos estímulos físicos o farmacológicos (Kovács, 1998), entre los que destaca el E₂ y en el cerebro de la rata ésta inducción ocurre en períodos de tiempo muy breves (minutos u horas) después de la administración de la hormona. El incremento en la expresión de c-fos y del RP en los animales desfeminizados no se debe a una inducción por E₂ circulante en el día de la AV, ya que no se observaron cambios en la concentración sérica de E₂ entre los animales desfeminizados en comparación con el grupo control (tabla 3). En contraste, la concentración sérica de la P₄ disminuye significativamente en los animales desfeminizados (tabla 3), esto último podría explicar la regulación de la expresión del RP por su ligando, es decir, al disminuir la concentración sérica de la P₄ se incrementa la expresión del RP. Esta bien establecido que la administración de HES en la etapa neonatal modifica la fisiología y morfología normal del ovario, generando la pérdida de cuerpos lúteos, lo cual podría explicar las bajas concentraciones plasmáticas de la P₄ observada en el día de la AV (Handa y cols., 1985). Los cambios en la expresión génica observados en este trabajo sugieren que las HES administradas en el período crítico de la diferenciación sexual del cerebro generan modificaciones funcionales en las neuronas. Estas alteraciones se establecen tempranamente y son tan duraderas que se manifiestan a largo plazo, al menos en lo que respecta a la respuesta transcripcional a HES. Dichas alteraciones podrían deberse a las modificaciones en la programación de las redes neuronales durante el desarrollo, como es la alteración en la actividad celular de neuronas maduras para sintetizar y secretar neurotransmisores, neuropéptidos o moléculas importantes para el adecuado funcionamiento neuronal (Romano y cols., 1990; Dohler, 1991; Crowley y Kalra, 1994), y desde luego la respuesta transcripcional a HES. Sin embargo se requiere mas trabajo experimental para sustanciar esta explicación.

Para tratar de entender mejor como la expresión de c-fos y del RP es regulada por el E₂ en el POA-AHA y en el HYP, en el presente modelo de animales

desfeminizados se administró E₂ en el día de la AV (AV + E₂), demostrándose que no se induce la expresión normal del RNAm y de la proteína de c-fos y del RP (figuras 9-10, 15, 18-19 y 22). En este día el E₂ induce la expresión de c-fos y del RP en el grupo control; en claro contraste, en animales desfeminizados con E₂, la inyección del E₂ en el día de la AV falla en estimular la expresión de c-fos y del RP en el POA-AHA y disminuye la expresión del RP en el HYP. Estas observaciones dan apoyo a la hipótesis del trabajo sobre el establecimiento de cambios funcionales en las neuronas del POA-AHA y del HYP inducidos por estrógenos. En los roedores, el área preóptica medial y el hipotálamo ventro medial son especialmente sensibles a los efectos del E₂. Estas regiones son sexualmente dimórficas en su estructura y en su función neuroquímica (Arnold y Gosrki, 1984), y para el establecimiento de estas diferencias se requiere de los efectos de las HES en el HYP durante la etapa crítica postnatal en el cerebro de la rata (Parsons y cols., 1984).

En cambio, en los animales desfeminizados con T, la administración aguda de E₂ inhibe la expresión de c-fos y del RP en ambas regiones. Estos datos indican que no es lo mismo inducir la expresión de c-fos o del RP en el POA-AHA y en el HYP en animales desfeminizados con E₂ que con T (figura 28). Se ha tratado de determinar el mecanismo por el cual, los andrógenos, actúan sobre la expresión de genes regulados por estrógenos, pero hasta el momento esto no ha sido aclarado. Se ha observado que sólo la administración de T y no la del E₂ durante el período crítico del desarrollo es capaz de modificar las concentraciones de neurotransmisores, como la serotonina, en el sistema límbico o como la dopamina en el HYP (González y Leret, 1992). Datos recientes sugieren que la aromatización de la T a E₂ es crucial para la expresión del RP en el núcleo preóptico medial y en el núcleo periventricular anteroventral de la rata (Quadros y cols., 2002(a); 2002(b)). Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual genes regulados por estrógenos se inducen por andrógenos no ha sido completamente estudiado. El grupo de McCarthy y cols., ha demostrado que la administración de HES en el período

crítico de la diferenciación sexual del cerebro induce la expresión de algunas proteínas coactivadoras del RP y que esta inducción es distinta entre animales tratados con E₂ que con los tratados con T (Auger y cols., 2000; 2002), por lo que resulta interesante estudiar la actividad transcripcional de algunas proteínas involucradas en la inducción de c-fos o del RP en este proceso.

Por otro lado, otros grupos de investigadores han demostrado que las HES controlan la muerte neuronal durante el desarrollo del cerebro de hembras y machos. La T secretada por los testículos en el período prenatal y postnatal incrementa la muerte neuronal en algunas regiones cerebrales, mientras que la disminuye en otras regiones (Tobet y Hanna, 1997). Por ejemplo, la T o el E₂ incrementan la muerte celular en el núcleo anteroventral periventricular del HYP en la etapa prenatal, este núcleo es más grande en las hembras que en los machos en la etapa adulta, también se ha observado que tiene más neuronas dopaminérgicas en las hembras que en los machos (Sumida y cols., 1993; Arai y cols., 1996; Simerly, 1998). Estudios más recientes han demostrado la participación de proteínas anti-apoptóticas, como es el caso de Bcl2, para promover la supervivencia de neuronas en respuesta al efecto de los esteroides sexuales durante el desarrollo del HYP en la rata (Zup y cols., 2003). Los mecanismos involucrados en la regulación de la muerte neuronal en el HYP por las HES no ha sido completamente aclarado dentro del proceso de la diferenciación sexual del cerebro, por lo que se requieren más investigaciones en esta dirección.

En resumen, estos datos indican que tanto el E₂ como la T administrados en el período crítico postnatal modifican la funcionalidad neuronal lo que se traduce en cambios en la expresión normal de algunos genes regulados por estrógenos (c-fos y RP) en el proceso de la diferenciación sexual del HYP.

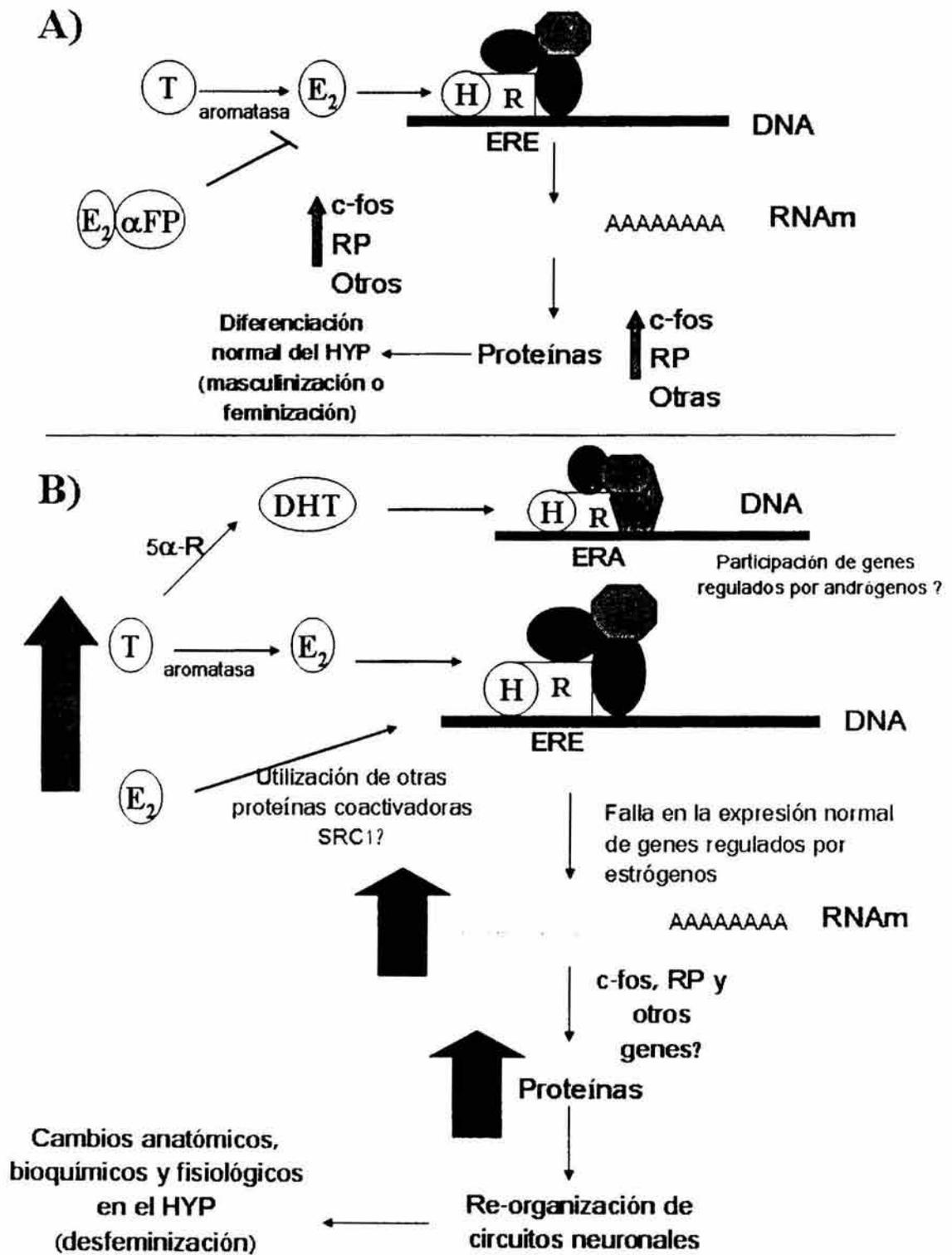


Figura 28. Efecto de las HES sobre la expresión de c-fos y del RP en la diferenciación sexual del HYP en la rata hembra. A) En los roedores, las concentraciones plasmáticas de estradiol (E_2) o de testosterona (T) se incrementan considerablemente en los últimos tres días del desarrollo prenatal hasta los primeros cinco días postnatales. En las hembras, el E_2 sérico se une a la alfa-fetoproteína (α FP) protegiendo a las neuronas del HYP de los efectos masculinizantes del E_2 ; en cambio, en los machos la T entra a las neuronas del hipotálamo (HYP) y ahí es aromatizada a E_2 para masculinizar las estructuras cerebrales permitiendo se desarrolle la conducta sexual normal en la etapa adulta (Auger y cols., 2001; Gabant P y cols., 2002; Gorski, 2002). La hormona (H) se une con su receptor nuclear (R) y el complejo hormona-receptor se une a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA para inducir la expresión de genes como c-fos y receptor a progesterona (RP) u otros genes que participen en la diferenciación normal del HYP. **B)** En esta tesis se propone que altas concentraciones de E_2 o de T administradas durante el período crítico de la diferenciación del cerebro genera modificaciones funcionales en las neuronas del HYP, estas alteraciones se establecen tempranamente y se mantienen a largo plazo y que la regulación a nivel transcripcional de c-fos y del RP es diferente dependiendo de la hormona administrada dependiendo de la maquinaria transcripcional activada como es el caso de proteínas coactivadoras (SRC1). No está claro hasta el momento cual es el papel regulador de los andrógenos en este modelo, se sabe que la testosterona se aromatiza a E_2 o se reduce a dihidrotestosterona (DHT) por efecto de la 5α -reductasa (5α -R). La DHT se une a su R para activar elementos de respuesta a andrógenos (ERA) que podrían estar involucrados en la diferenciación del HYP. Ver figura en la página anterior.

7.2 Identificación de nuevos genes en el POA-AHA y en el HYP de ratas tratadas durante el período neonatal con esteroides sexuales

En este estudio se utilizó la técnica del "*Differential Display*" (DD) para identificar otros genes inducidos por E₂ o T en la región del POA-AHA y del HYP en diferentes etapas del desarrollo postnatal de ratas hembras tratadas con esteroides sexuales a los tres días de edad. Los resultados muestran la expresión de diferentes transcritos (RNAs mensajeros) a las 2 horas y en el día de la AV después del tratamiento hormonal (figuras 23 y 24). En el día de la AV se aislaron más de 100 transcritos entre los animales desfeminizados con E₂ y con T en el POA-AHA y en el HYP. Se secuenciaron sólo dos transcritos inducidos por E₂ en el POA-AHA cuyo análisis muestra que son idénticos a 1) RNAm identificado como AW528658 de una biblioteca de expresión obtenida de hipocampo de la rata adulta, y 2) la proteína L30 ribosomal. Los presentes datos y los que se deriven del análisis del resto de los transcritos encontrados es importante y oportuna dado que se sabe muy poco acerca de los genes cuya ulterior expresión (durante la pubertad) en núcleos del HYP está afectada en animales tempranamente expuestos a HES.

Uno de los datos más relevantes en este trabajo fue la detección de un transcrito (AW528658) que ha sido reportado en un banco genómico de secuencias para cDNAs (EST). Este transcrito aparentemente es un fragmento de un RNAm cuyo producto génico (proteína) se desconoce. AW528658 (tabla 4) fue encontrado en una biblioteca genómica de RNA mensajeros expresados en el hipocampo de la rata hembra adulta (Bonaldo y cols., 1996). La expresión de éste transcrito fue inducida por E₂ y no existen informes previos al respecto, por lo que se trata de un nuevo gen regulado por E₂ que podría participar directamente en el proceso de la diferenciación sexual del HYP. Varias observaciones hacen pensar que AW528658 no es un producto espureo surgido de la creación de la biblioteca genómica. Primero, la biblioteca se creó a partir de cDNA sintetizado utilizando como iniciador (primer) oligo-dT, procedimiento que únicamente amplifica secuencias que contienen una región de poli-A, característica común de los RNAm. Además,

en la secuencia AW528658 puede identificarse la región poli-A (nucleótidos 1-15), ver figura 25. Por otro lado, en estudios independientes se observó que oligonucleótidos iniciadores (primers) elaborados tanto para la secuencia encontrada en este estudio como para el AW528658 amplifican un RNAm en HYP de ratas macho adultas. Sin embargo, su expresión no parece estar restringida al SNC pues también se le pudo encontrar en cDNA de hígado (figuras 26 y 27). Estudios de hibridación “*northern blot*” usando las sondas apropiadas (tanto la encontrada en este estudio como la correspondiente a AW528658) permitirán establecer el tamaño del transcrito completo. Por otra parte, estudios ulteriores de RT-PCR y análisis de hibridación (*Northern blot*) permitirán determinar en forma sistemática en que tejidos se expresa este RNAm.

Tabla 4. Datos generales del gen AW528658 obtenidos del *Gene Bank*.

| Gen AW528658 | Características |
|----------------------------|--|
| Registro (base de datos) | Biblioteca de expresión (Expressed sequence tag o EST) |
| No. de registro dbEST | 3947451 |
| No. de acceso al Gene Bank | AW528658 |
| Especie | <i>Rattus norvegicus</i> |
| Tejido | Hipocampo |
| Etapa del desarrollo | Adulta |
| Tamaño del producto | 479 pb |
| Región Poli-A | Nucleótido 1-15 |

La secuencia AW528658 se analizó usando herramientas para análisis de proteínas del *ExPASy Molecular Biology Server* (<http://us.expasy.org/>) y el *Open Reading Frame Finder* de la *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>), los resultados se muestran en la tabla 5. El análisis del producto de traducción más probable para el transcrito AW528658 (Figura 29, tabla 5) revela que tiene un gran

número de sitios para N-miristoilación, estos sitios son importantes para el anclaje de las proteínas, a través de ácidos grasos, a la membrana plasmática o a membranas de organelos celulares. Queda por determinar a mediano plazo si la proteína del AW528658 tiene o no localización membranal.

```

78 atgattcgtgaagagctttcattatgcccaaggctgaggacagcc
  M I R E E L S L C P R L R T A
123 catattcctgtacatgagagcttagattcacacctccatttagtt
  H I P V H E S L D S H L H L V
168 ctccttggactagctcagcttgggtatattgttccagtattg
  L P W T S S A C W Y M F P V L
213 ccagcacaggcccctgccttgggtgcttctaggttaccttctca
  P A Q A P A L G A S R L P S S
258 gcaccagtttctgaatga 275
  A P V S E *

```

Figura 29. Secuencia de aminoácidos obtenida para el gen AW528658. Región correspondiente al nucleótido 78 al 275. Se observa en rojo dos sitios de iniciación para la traducción representados por la secuencia atg que codifica para la metionina (M), en azul se muestra el codón de terminación.

Las tareas inmediatas más urgentes en la caracterización de la secuencia AW528658 son dos: 1) Confirmar por métodos independientes que este transcrito es regulado in vivo por E₂, y 2) encontrar la secuencia faltante del fragmento AW528658. Para el objetivo numero 1 se puede utilizar la tecnología tradicional de hibridación "Northern blot" o la más novedosa e informativa que es la RT-PCR cuantitativa (Q-RT-PCR o RT-PCR en Tiempo Real). No se descarta el uso de hibridación in situ que además permitiría determinar la distribución del mensaje en el SNC por ejemplo. En cuanto al objetivo numero 2, una estrategia adecuada y sencilla para obtener la secuencia del extremo 5' faltante es el RACE (*Rapid Amplification of cDNAs Ends*) o mejor la variante MLR-RACE (*RNA-Ligase-Mediated-RACE*). En su forma más básica este procedimiento consiste en reacciones de PCR

que facilitan la clonación del extremo 5' de transcritos incompletos, para lo que se requiere generar un cDNA al cual se le unirá un adaptador al extremo 3' del cDNA (que corresponde al extremo 5' del transcrito de interés) sintetizado amplificándolo por PCR con oligonucléotidos específicos del gen de interés (Schaefer, 1995).

Tabla 5. Análisis del producto de traducción más probable para el gen AW528658.

| | |
|--------------------------------------|---|
| Sitios probables de N-miristoilación | 1 - 6 GaaATC, 9 - 14 GgtcTA, 10 - 15 GtctAA, 18 - 23 GtatGA, 22 - 27 GataAT, 34 - 39 GCctTT, 41 - 46 GaaaGA, 45 - 50 GagaAC, 47 - 52 GaacGT, 51 - 56 GtaaAA, 59 - 64 GattCG, 64 - 69 GtgaAG, 66 - 71 GaagAG, 69 - 74 GagcTT, 71 - 76 GCttTC, 82 - 87 GcccAA, 88 - 93 GgctGA, 89 - 94 GCtgAG, 92 - 97 GaggAC, 94 - 99 GgacAG, 95 - 100 GAcaGC, 99 - 104 GcccAT, 111 - 116 GtacAT, 117 - 122 GagaGC, 119 - 124 GagcTT, 121 - 126 GcttAG, 126 - 131 GattCA, 144 - 149 GTtcTC, 154 - 159 GgacTA, 155 - 160 GactAG, 160 - 165 GctcAG, 165 - 170 GCttGT, 169 - 174 GTtgGT, 172 - 177 GgtaTA, 173 - 178 GtatAT, 179 - 184 GTttCC, 186 - 191 GTatTG |
| Región rica en alanina | 2 - 133 AaatcaaggctctaaaagatgataatatttattgccttttgaagagaaacgtaaaaatgattcgtgaagagcttcattatgccaaggctgaggacagcccatattcctgtacatgagagcttagattcacA |
| Región rica en cisteína | 72 - 166 CtttcattatgccaaggctgaggacagcccatattcctgtacatgagagcttagattcacacctccatttagttccttgactagctcagC |
| Región rica en glicina | 41 - 173 GaaagagaacgtaaaaatgattcgtgaagagctttcattatgccaaggctgaggacagcccatattcctgtacatgagagcttagattcacacctccatttagttccttgactagctcagcttggtG |
| Región rica en treonina | 11 - 199 TctaaaagtatgataatatttattgccttttgaagagaaacgtaaaaatgattcgtgaagagctttcattatgccaaggctgaggacagcccatattcctgtacatgagagcttagattcacacctccatttagttccttgactagctcagcttggtgatatgtttccagatT |
| Secuencia de aa | 78 - 275 M I R E E L S L C P R L R T A H I P V H E S L D S H L H L V L P W T S S A C W Y M F P V L P A Q A P A L G A S R L P S S A P V S E |

La identificación de la proteína L30 ribosomal en el POA-AHA de ratas desfeminizadas con E₂ en el día de la AV, resulta de gran interés ya que sugiere la participación de un gen crítico de la maquinaria de la síntesis de proteínas en el proceso de la diferenciación sexual del cerebro. Es necesario enfatizar que no existen precedentes en la literatura sobre la regulación de L30 por hormonas sexuales. Que L30 es una proteína de expresión regulable ha quedado bien establecido (Vilardell y cols., 2000a) y el presente trabajo agrega la noción de que uno de los reguladores podría ser el E₂. Se sabe bien, que las proteínas ribosomales se encuentran altamente conservadas en la escala evolutiva y tanto en células eucarióticas como en procarióticas son piezas fundamentales en la síntesis y en la producción de proteínas (Moore y Steitz, 2003). La proteína L30 ribosomal se ha detectado en diversas especies de mamíferos pero sólo se ha estudiado en forma detallada en levaduras, encontrándose que tiene un papel dual en la célula. No sólo es un componente indispensable del ribosoma, si no que también se une al transcrito de su propio gen para inhibir el procesamiento que conduce al RNA maduro (Vilardell y cols., 2000a). El RNAm de L30 es abundante y tiene una vida media relativamente corta estimada entre 5 y 7 minutos. Su función más importante es la de dar estabilidad al ribosoma para llevar a cabo eficientemente la traducción de su propia proteína la cual juega un papel importante en el crecimiento y la diferenciación celular (Vilardell y cols., 2000b).

Los RNA mensajeros de las proteínas ribosomales han sido ampliamente utilizados como genes de referencia debido a su supuesta expresión constitutiva. Estudios previos y el presente trabajo indican que L30 es una excepción, quizá no la única. En trabajos sobre la expresión de genes regulados por estrógenos se ha observado que los genes de proteínas ribosomales en general no se regulan transcripcionalmente en respuesta a los estrógenos (Perry y Meyuhas, 1990; Stebbins-Boaz y Richter, 1997).

Por otra parte, existen estudios previos en los que se ha estudiado la regulación de genes por estrógenos utilizando DD en células en cultivo. El

presente trabajo es uno de los pocos esfuerzos que se han hecho en esa dirección en un modelo *in vivo*. Otro estudio publicado se llevó a cabo en muestras de cáncer de mama humano dependiente de estrógenos, en el cual se detectó, por *differential display*, la expresión diferencial de diversos genes, que incluye a proteínas ribosomales, enzimas, factores de transcripción, proteínas reguladoras del ciclo celular, proteínas de adhesión y del citoesqueleto. Esta diferencia en el patrón de expresión de estos genes podrían explicar que algunos tumores de mama sean más sensibles o no al efecto de los estrógenos (Nagai y cols., 2003).

La identificación de genes regulados por estrógenos en el HYP de la rata, ha sido poco explorado. Algunos reportes han demostrado, a través de técnicas como la del *Differential Display*, la expresión de genes que no se habían detectado previamente en modelos de ratas adultas ovariectomizadas con E₂ o en animales recién nacidos tratados con E₂, identificando a genes como la proteína cinasa C, factores nucleares tiroideos, la evecina-1, etc (Choi y cols., 2001; Park y cols., 2001). No está claro cuál es la participación de estos genes en la diferenciación del HYP, así que se requieren ulteriores investigaciones dirigidas a la caracterización de esos genes regulados por estrógenos.

Por otra parte, en el HYP de ratas hembras tratadas con propionato de testosterona a los dos días de edad (animales androgenizados) y sacrificadas tres días después, a través de la generación de una biblioteca de cDNAs, se identificó al gen de la granulina/epitelina (Suzuki y cols., 1998). En este mismo estudio, en ratas machos no androgenizados de cinco días de edad se observó un incremento en la expresión del RNAm de la granulina en el NVM y en el ARC por hibridación *in situ*. La expresión del gen de la granulina en el HYP es similar en machos y hembras al nacimiento y se mantiene en el mismo nivel hasta los 10 días de edad en los machos mientras que en las hembras disminuye un 75 % en ese día, lo que indica un dimorfismo sexual en la expresión de la granulina (Suzuki y cols., 1998). Otro estudio demostró que la administración intraventricular de un oligonucleótido antisentido para bloquear la expresión del gen de la granulina en

el HYP de la rata macho de dos días de edad disminuyó significativamente los parámetros en la conducta sexual de estos animales en la etapa adulta, sugiriendo que la adecuada expresión de la granulina en el período crítico de la diferenciación sexual del HYP es importante para un adecuado establecimiento de los circuitos neuronales que controlan parte de la conducta sexual en los machos (Suzuki y Nishihara, 2002).

Recientemente, utilizando análisis de microarreglos (*microarrays*) en combinación con RT-PCR en tiempo real se ha investigado la expresión diferencial de genes en el HYP de la rata entre sexos o por la administración de E₂ en el período neonatal (Yonehara y cols., 2003). Los genes regulados por estrógenos identificados en ese estudio fueron: glutamato descarboxilasa 65, coronina 1b, colágena tipo 3 α 1 y la tioredoxina reductasa 2. Para el gen de la descarboxilasa ácido glutámico 65 y el gen de la coronina 1b se observó que se expresa más en el HYP de los machos que de las hembras en el día postnatal 5. En el caso del gen de la colágena tipo 3 α 1 y el gen de la tioredoxina reductasa 2 se observó una disminución y un aumento, respectivamente, por el tratamiento de E₂ a ratas hembras a los dos días de edad en el HYP. También se estudió la expresión de estos cuatro genes durante el desarrollo, encontrándose que desde el nacimiento hasta el noveno día de edad se observó un patrón de expresión sexualmente dimórfico en el HYP. En conjunto esos resultados sugieren que estos cuatro genes participan directamente en el proceso de la diferenciación sexual del cerebro de la rata (Yonehara y cols., 2003).

En el presente estudio sólo se analizó con más detalle a dos de los más de cien transcritos que respondieron al tratamiento con HES. Tanto AW528658 por su novedad como L30 por su importancia en la regulación de la maquinaria de síntesis de proteínas son genes que merecen mayor caracterización. Estudios *in vivo* similares a los discutidos en párrafos anteriores revelarán la manera en que estos genes están involucrados en la diferenciación sexual del cerebro en la rata. Queda también por explorar la riqueza de transcritos restantes entre los cuales

seguramente habrá algunos genes previamente identificados y probablemente muchos otros nuevos regulados por HES. Tan sólo la identificación de baterías de genes cuya expresión es regulada durante la diferenciación sexual del cerebro representa un avance significativo pues abre las puertas al mejor entendimiento de las bases moleculares de la diferenciación sexual del SNC.

8. Conclusiones

1. La expresión del RNA mensajero de c-fos y del RP se induce por E₂ o T en el POA-AHA y en el HYP a las 2 horas y en el día de la apertura vaginal después del tratamiento hormonal a los tres días de edad.
2. La expresión de la proteína de c-fos y del RP se induce por E₂ o T en el POA-AHA y en el HYP el día de la apertura vaginal después del tratamiento hormonal a los tres días de edad.
3. La expresión del RNA mensajero y de la proteína de c-fos y del RP se induce por la administración aguda de E₂ en el día de la AV en el POA-AHA y en el HYP de ratas hembras tratadas con vehículo a los tres días de edad.
4. No se induce la expresión del RNA mensajero y de la proteína de c-fos y del RP por la administración aguda de E₂ en el día de la AV en el POA-AHA y en el HYP de ratas hembras tratadas desfeminizadas con E₂ o con T.
5. Se induce la expresión del RNA mensajero AW528658 y la proteína L30 ribosomal en el día de la AV en el POA-AHA de ratas hembras desfeminizadas con E₂.

9. Perspectivas

Finalmente todos estos resultados indican que genes regulados por estrógenos en el POA-AHA y en el HYP están involucrados en los mecanismos moleculares de la diferenciación sexual del cerebro de la rata hembra. Por lo que resulta interesante tratar de dilucidar los eventos que están produciendo la expresión diferencial de c-fos y del RP en este modelo. Dentro de las líneas de investigación a continuar dentro de este proyecto se propone:

Estudiar algunas proteínas asociadas a la actividad transcripcional de los receptores a hormonas esteroides que inducen (coactivadores) o reprimen (corepresores) la expresión de genes regulados por estrógenos, como el coactivador SRC1 o el corepresor SMRT. En este estudio se observó que existe una sensibilidad diferencial para expresar c-fos y RP entre los animales tratados con E₂ y los tratados con T, esto ayudaría a entender estas diferencias ya que se ha descrito una gran variedad de coreguladores importantes para la actividad transcripcional de estos genes.

Se observó que existe una diferencia entre los niveles de expresión del RNAm y los niveles de expresión de la proteína de c-fos y del RP, tal vez ésto se deba a las modificaciones post-transcripcionales en estos genes por lo que resulta interesante estudiar que sucede con la degradación de estas proteínas, si esta aumentada, disminuída o no hay modificaciones a este nivel.

Otro dato interesante es si se induce muerte en las neuronas de las diferentes regiones del HYP que trate de explicar por qué no existe respuesta al estímulo por el E₂ en animales desfeminizados.

Una línea de investigación muy interesante es continuar con la caracterización de la expresión del RNA mensajero AW528658 en el HYP, ver si su expresión es tejido específico y si se regula o no por esteroides sexuales. Así como tratar de obtener la secuencia completa del gen AW528658, a través del RACE, para determinar que proteína codifica. Realizar estudios de northern blot e hibridación in situ que permitirá localizar el tamaño completo del transcrito

además de su localización específica en áreas del SNC. Continuar obteniendo el resto de las secuencias de los diferentes transcritos obtenidos por *Differential Display*, para identificar nuevos genes que participen en el proceso de la diferenciación sexual del HYP.

10. Referencias

Abercombie M. (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec.* 94:239-247.

Abraham GE. (1975) Radioimmunoassay of steroids in biological fluids. *J Steroid Biochem.* 6(3-4):261-270.

Advis JP, Andrews WW y Ojeda SR. (1979) Changes in ovarian steroidal and prostaglandin E responsiveness to gonadotropins during the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology.* 104(3):653-658.

Advis JP, Krause JE y McKelvy JF. (1982) Luteinizing hormone-releasing hormone peptidase activities in discrete hypothalamic regions and anterior pituitary of the rat: apparent regulation during the prepubertal period and first estrous cycle at puberty. *Endocrinology.* 110(4):1238-1245.

Alonso R y López-Coviella I. (1998) Gonadal steroids and neuronal function. *Neurochem Res.* 23(5):675-688.

Andrews WW y Ojeda SR. (1977) On the feedback actions of estrogen on gonadotropin and prolactin release in infantile female rats. *Endocrinology.* 101(5):1517-1523.

Andrews WW, Mizejewski GJ y Ojeda SR. (1981) Development of estradiol-positive feedback on luteinizing hormone release in the female rat: a quantitative study. *Endocrinology.* 109(5):1404-1413.

Angel P y Karin M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1072(2-3):129-157.

Arai Y y Gorski RA. (1968) Critical exposure time for androgenization of the rat hypothalamus determined by antiandrogen injection. *Proc Soc Exp Biol Med.* 127(2):590-593.

Arai Y, Sekine Y y Murakami S. (1996) Estrogen and apoptosis in the developing sexually dimorphic preoptic area in female rats. *Neurosci Res.* 25(4):403-407.

Arnold AP y Gorski RA. (1984) Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 7:413-442.

Auger AP y Blaustein JD. (1995) Progesterone enhances an estradiol-induced increase in Fos immunoreactivity in localized regions of female rat forebrain. *J Neurosci.* 15(3 Pt 2):2272-2279.

Auger AP, Tetel MJ y McCarthy MM. (2000) Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(13):7551-7555.

Auger AP, Perrot-Sinal TS y McCarthy MM. (2001) Excitatory versus inhibitory GABA as a divergence point in steroid-mediated sexual differentiation of the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(14):8059-8064.

Auger AP, Perrot-Sinal TS, Auger CJ, Ekas LA, Tetel MJ y McCarthy MM. (2002) Expression of the nuclear receptor coactivator, cAMP response element-binding protein, is sexually dimorphic and modulates sexual differentiation of neonatal rat brain. *Endocrinology.* 143(8):3009-3016.

Barracough CA. (1966) Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones. *Recent Prog Horm Res.* 22:503-539.

Barrett TJ y Spelsberg TC. (1998) Steroid receptors at the nexus of transcriptional regulation. *J Cell Biochem Suppl.* 30-31:185-193.

Berriman SJ, Wade GN y Blaustein JD. (1992) Expression of Fos-like proteins in gonadotropin-releasing hormone neurons of Syrian hamsters: effects of estrous cycles and metabolic fuels. *Endocrinology.* 131(5):2222-2228.

Berry M, Metzger D y Chambon P. (1990) Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 9(9):2811-2818.

Bishop JM. (1987) The molecular genetics of cancer. *Science.* 235 (4786):305-311.

Blaustein JD, Lehman MN, Turcotte JC y Greene G. (1992) Estrogen receptors in dendrites and axon terminals in the guinea pig hypothalamus. *Endocrinology.* 131(1):281-290.

Bleier R, Byne W y Siggelkow I. (1982) Cytoarchitectonic sexual dimorphisms of the medial preoptic and anterior hypothalamic areas in guinea pig, rat, hamster, and mouse. *J Comp Neurol.* 212(2):118-130.

- Bogic L, Gerlach JL y McEwen BS. (1998) The ontogeny of sex differences in estrogen-induced progesterone receptors in rat brain. *Endocrinology*. 122(6):2735-2741.
- Bonaldo MF, Lennon G y Soares MB. (1996) Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res*. 6(9):791-806.
- Brown-Grant K. (1974) Failure of ovulation after administration of steroid hormones and hormone antagonists to female rats during the neonatal period. *J Endocrinol*. 62(3):683-684.
- Calogero AE, Burrello N, Barone N, Palermo I, Grasso U y D'Agata R. (2000) Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action. *Hum Reprod*. 15 Suppl 1:28-45.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Perez-Palacios G y Cerbon MA. (1995) Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev Invest Clin*. 47(4):329-340.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Dominguez R, Mendoza-Rodriguez CA, Cruz ME y Cerbon MA. (1998) C-fos expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during proestrus. *Life Sci*. 62(13):1153-1159.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C y Cerbón MA. (1998) Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport*. 9(18):3993-3996.
- Cattaneo E y Maggi A. (1990) c-fos induction by estrogen in specific rat brain areas. *Eur J Pharmacol*. 188(2-3):153-159.
- Chappell PE, Lydon JP, Conneely OM, O'Malley BW y Levine JE. (1997) Endocrine defects in mice carrying a null mutation for the progesterone receptor gene. *Endocrinology*. 138(10):4147-4152.
- Cheung S, Will YM, Hentschel K, Moore KE y Lookingland KJ. (1997) Role of gonadal steroids in determining sexual differences in expression of Fos-related antigens in tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in subdivisions of the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocrinology*. 138(9):3804-3810.
- Choi EJ, Ha CM, Choi J, Kang SS, Choi WS, Park SK, Kim K y Lee BJ (2001) Low-density cDNA array-coupled to PCR differential display identifies new estrogen-responsive genes during the postnatal differentiation of the rat hypothalamus. *Mol Brain Res*. 97(2):115-128.

Chomczynski P y Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-159.

Christensen LW y Gorski RA. (1978) Independent masculinization of neuroendocrine systems by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat. *Brain Res.* 146(2):325-340.

Chung WC, Swaab DF y De Vries GJ. (2000) Apoptosis during sexual differentiation of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat brain. *J Neurobiol.* 43(3):234-243.

Cicatiello L, Ambrosino C, Coletta B, Scalona M, Sica V, Bresciani F y Weisz A. (1992) Transcriptional activation of jun and actin genes by estrogen during mitogenic stimulation of rat uterine cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 41(3-8):523-528.

Conneely OM, Mulac-Jericevic B, DeMayo F, Lydon JP y O'Malley BW. (2002) Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Prog Horm Res.* 57:339-355.

Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS y Breedlove SM. (1998) Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol.* 19(4):323-362.

Crowley WR y Kalra SP. (1994) Neonatal exposure to estradiol prevents the expression of ovarian hormone-induced luteinizing hormone and prolactin surges in adulthood but not antecedent changes in neuropeptide Y or adrenergic transmitter activity: implications for sexual differentiation of gonadotropin secretion. *Brain Res.* 663(2):257-265.

Curran T, Gordon MB, Rubino KL y Sambucetti LC. (1987) Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene.* 2(1):79-84.

Curran T y Franza BR. (1988) Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell.* 55(3):395-397.

Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF y Korach KS. (1996) Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(22):12626-12630.

Dalkin AC, Bourne GA, Pieper DR, Regiani S y Marshall JC. (1981) Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology*. 108(5):1658-1664.

Dang CV, McGuire M, Buckmire M y Lee WM. (1989) Involvement of the 'leucine zipper' region in the oligomerization and transforming activity of human c-myc protein. *Nature*. 337(6208):664-666.

Davis EC, Shryne JE y Gorski RA. (1996) Structural sexual dimorphisms in the anteroventral periventricular nucleus of the rat hypothalamus are sensitive to gonadal steroids perinatally, but develop peripubertally. *Neuroendocrinology*. 63(2):142-148.

Doan A y Urbanski HF. (1994) Diurnal expression of Fos in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of Syrian hamsters. *Biol Reprod*. 50(2):301-308.

Döhler KD, Coquelin A, Davis F, Hines M, Shryne JE y Gorski RA. (1984) Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Brain Res*. 302(2):291-295.

Dohler KD. (1991) The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int Rev Cytol*. 131:1-57.

Doler KD y Wuttke W. (1975) Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*. 97(4):898-907.

Dragunow M y Robertson HA. (1987) Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature*. 329(6138):441-442.

Dragunow M y Robertson HA. (1988) Brain injury induces c-fos protein(s) in nerve and glial-like cells in adult mammalian brain. *Brain Res*. 455(2):295-299.

Evans RM. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240(4854):889-895.

Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M y Wehling M. (2000) Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*. 52(4):513-556.

Fawell SE, Lees JA, White R y Parker MG. (1990) Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell*. 60(6):953-962.

Feder HH. (1981) Hormonal actions on the sexual differentiation of the genitalia and the gonadotropin regulating systems. En: *Neuroendocrinology of Reproduction. Physiology and Behavior*. Eds. Adler NT. Plenum Press, New York & London 86-126.

Fink G. (1986) The endocrine control of ovulation. *Sci Prog*. 70(279 Pt 3):403-423.

Fink KL, Wieben ED, Woloschak GE y Spelsberg TC. (1988) Rapid regulation of c-myc protooncogene expression by progesterone in the avian oviduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(6):1796-1800.

Forsthoefel A y Thompson EA. (1987) Glucocorticoid regulation of transcription of the c-myc cellular protooncogene in P1798 cells. *Mol Endocrinol*. 1(12):899-907.

Fort P, Marty L, Piechaczyk M, el Sabrouy S, Dani C, Jeanteur P y Blanchard JM. (1985) Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res*. 13(5):1431-1442.

Fuller PJ. (1991) The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *FASEB J*. 5(15):3092-3099.

Funkenstein B, Nimrod A y Lindner HR. (1980) The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal rat ovaries. *Endocrinology*. 106(1):98-106.

Gabant P, Forrester L, Nichols J, Van Reeth T, De Mees C, Pajack B, Watt A, Smitz J, Alexandre H, Szpirer C y Szpirer J. (2002) Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(20):12865-12870.

Giangrande P, Pollio G y McDonnell DP. (1997) Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem*. 272(52):32889-32900.

Giangrande P y McDonnell DP. (1999) The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res*. 54:291-313.

Giangrande P, Kimbrel EA, Edwards DP y McDonnell DP. (2000) The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol.* 20(9):3102-3115.

González MI y Leret ML. (1992) Extrahypothalamic serotonergic modification after masculinization induced by neonatal gonadal hormones. *Pharmacol Biochem Behav.* 41(2):329-332.

González GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs W 3rd, Vale WW y Montminy MR. (1989) A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature.* 337(6209):749-752.

Gore-Langton RE y Armstrong DT. (1988) Follicular steroidogenesis and its control. En: *Physiology of Reproduction.* Knobil E., et al., (Eds) Raven Press Ed. New York. Vol. 1:331-335.

Gorski RA. (1963) Modification of ovulatory mechanisms by postnatal administration of estrogen to the rat. *Am J Physiol.* 205(5):842-844.

Gorski RA, Gordon JH, Shryne JE y Southam AM. (1978) Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.* 148(2):333-346.

Gorski RA, Harlan RE, Jacobson CD, Shryne JE y Southam AM. (1980) Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J Comp Neurol.* 193(2):529-539.

Gorski RA. (2002) Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones. *Adv Exp Med Biol.* 511:57-70.

Graham JD y Clarke CL. (1997) Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev.* 18(4):502-519.

Greco B, Allegretto EA, Tetel MJ y Blaustein JD. (2001) Coexpression of ER beta with ER alpha and progestin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology.* 142(12):5172-5181.

Green S y Chambon P. (1991) The oestrogen receptor: from perception to mechanism. En: *Nuclear hormone receptors.* Parker MG. Academic Press. New York. pp. 15.

Gronemeyer H. (1992) Control of transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J.* 6:2524-2529.

Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Atger M, Perrot-Applanat M y Milgrom E. (1989) Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell.* 57(7):1147-1154.

Guerra-Araiza C y Camacho-Arroyo I. (2000) Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev Invest Clin.* 52(6):686-691.

Hager GL y Archer TK. (1991) The interaction of steroid receptors with chromatin. En: *Nuclear Hormone Receptors.* Ed. Parker MG. Academic Press. New York. pp 217.

Hager GL, Lim CS, Elbi C y Baumann CT. (2000) Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74(5):249-254.

Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M y Kato J. (1992) Distribution of cells containing progesterone receptor mRNA in the female rat di- and telencephalon: an in situ hybridization study. *Mol Brain Res.* 14(3):239-249.

Halazonetis TD, Georgopoulos K, Greenberg ME y Leder P. (1988) c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell.* 55(5):917-924.

Handa RJ, Nass TE y Gorski RA. (1985) Proestrous hormonal changes preceding the onset of ovulatory failure in lightly androgenized female rats. *Biol Reprod.* 32(2):232-240.

Harrison SC. (1991) A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature.* 353(6346):715-719.

Herrenkohl LR y Scott S. (1984) Prenatal stress and postnatal androgen: effects on reproduction in female rats. *Experientia.* 40(1):101-103.

Hoffman GE, Le WW, Abbud R, Lee WS y Smith MS. (1994) Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation. *Brain Res.* 654(2):207-215.

Hope IA y Struhl K. (1987) GCN4, a eukaryotic transcriptional activator protein, binds as a dimer to target DNA. *EMBO J.* 6(9):2781-2784.

Housley PR, Sanchez ER, Danielsen M Ringold GM y Pratt W. (1990) Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. *J Biol Chem.* 265(22):12778-12781.

Houtsmuller EJ, Brand T, de Jonge FH, Joosten RN, van de Poll NE y Slob AK. (1994) SDN-POA volume, sexual behavior, and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. *Physiol Behav.* 56(3):535-541.

Hovland AR, Powell RL, Takimoto GS, Tung L y Horwitz KB. (1998) An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *J Biol Chem.* 273(10):5455-5460.

Hsueh JS, Adashi EY, Jones PB y Welsh TH Jr. (1984) Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 5(1):76-127.

Huet-Hudson YM, Chakraborty C, De SK, Suzuki Y, Andrews GK y Dey SK. (1990) Estrogen regulates the synthesis of epidermal growth factor in mouse uterine epithelial cells. *Mol Endocrinol.* 4(3):510-523.

Humm JL, Lambert KG, Kinsley CH. (1995) Paucity of c-fos expression in the medial preoptic area of prenatally stressed male rats following exposure to sexually receptive females. *Brain Res Bull.* 37(4):363-368.

Hunt SP, Pini A y Evan G. (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature.* 328(6131):632-634.

Huse B, Verca SB, Matthey P y Rusconi S. (1998) Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol.* 12(9):1334-1342.

Hutchinson JS, Nelson PB y Zeleznik AJ. (1986) Effects of different gonadotropin pulse frequencies of corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology.* 119(5):1964-1971.

Hyder SM, Cram LF y Loose-Mitchell DS. (1991a) Sequence of a 1.4-kb region in the 3'-flanking region of the murine c-fos proto-oncogene which contains an estrogen-response element. *Gene.* 105(2):281-282.

Hyder SM, Stancel GM y Loose-Mitchell DS. (1991b) Presence of an estradiol response region in the mouse c-fos oncogene. *Steroids.* 56(10):498-504.

Insel TR. (1990) Regional induction of c-fos-like protein in rat brain after estradiol administration. *Endocrinology*. 126(4):1849-1853.

Jennes L, Jennes ME, Purvis C y Nees M. (1992) c-fos expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments. *Brain Res*. 586(1):171-175.

Jooss KU, Funk M y Muller R. (1994) An autonomous N-terminal transactivation domain in Fos protein plays a crucial role in transformation. *EMBO J*. 13(6):1467-1475.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H y Chambon P. (1990) Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J*. 9(5):1603-1614.

Kato J y Onouchi T. (1983) Progesterin receptors in female rat brain and hypophysis in the development from fetal to postnatal stages. *Endocrinology*. 113(1):29-36.

Kato J, Hirata S, Nozawa A y Yamada-Mouri N. (1994) Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm Behav*. 28(4):454-463.

Katzenellenbogen JA y Katzenellenbogen B. (1996) Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chemistry and Biology*. 3:529-536.

Kouzarides T y Ziff E. (1988) The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature*. 336(6200):646-651.

Kovács KJ. (1998) c-fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*. 33:287-297.

Kraus WL, Montano MM y Katzenellenbogen BS. (1993) Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol*. 7(12):1603-1616.

Landers JP y Spelsberg TC. (1992) New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit Rev Euk Gene Express*. 2(1):19-63.

Landschultz WH, Johnson PF y McKnight SL. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*. 240(4860):1759-1764.

- Lange CA, Shen T y Horwitz KB. (2000) Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(3):1032-1037.
- Lau CK, Subramaniam M, Rasmussen K y Spelsberg TC. (1990) Rapid inhibition of the c-jun proto-oncogene expression in avian oviduct by estrogen. *Endocrinology.* 127(5):2595-2597.
- Lee W, Smith MS y Hoffman GE. (1990) Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(13):5163-5167.
- Loose-Mitchell DS, Chiappetta C y Stancel GM. (1988) Estrogen regulation of c-fos messenger ribonucleic acid. *Mol Endocrinol.* 2(10):946-951.
- López-López M, Cervantes-Peredo A y Kofman-Alfaro S. (1996) Progress in the knowledge on the genetic process of sexual differentiation in humans. *Rev Invest Clin.* 48(2):129-137.
- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA Jr, Shyamala G, Conneely OM y O'Malley BW. (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9(18):2266-2278.
- Mader S, Kumar V, de Verneuil H y Chambon P. (1989) Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature.* 338(6212):271-274.
- Maggi A y Pérez J. (1985) Role of female gonadal hormones in the CNS: clinical and experimental aspects. *Life Sci.* 37(10):893-906.
- Mani SK, Blaustein JD, Allen JM, Law SW, O'Malley BW y Clark JH. (1994) Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology.* 135(4):1409-1414.
- Martin KJ y Pardee AB. (1999) Principles of differential display. *Methods in enzymology.* 303:234-258.
- McCann SM, Negro-Vilar A, Ojeda SR, Advis JP, Lumpkin M, Samson WK y Vijayan E. (1981) Steroid effects on hypothalamic-gonadotropin interactions. *Exp Brain Res. Suppl* 3:142-150.

- McDonald PG y Doughty C. (1972) Inhibition of androgen-sterilization in the female rat by administration of an antioestrogen. *J Endocrinol.* 55(2):455-456.
- McDonald PG y Doughty C. (1974) 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.
- McDonnell D y Goldman ME. (1994) RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 269(16):11945-11949.
- McEwen BS. (1983) Gonadal steroid influences on brain development and sexual differentiation. *Int. Rev. Physiol.* 27:99-145.
- McEwen BS y Alves SE. (1999) Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev.* 20(3):279-307.
- McKenna NJ, Lanz RB y O'Malley BW. (1999) Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 20(3):321-344.
- McKenna NJ y O'Malley BW. (2000) From ligand to response: generating diversity in nuclear receptor coregulator function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74(5):351-6.
- Meisel RL y Sachs BD. (1994) The physiology of male sexual behavior. En: Knobil E, Neills JD, eds. *The physiology of reproduction.* 2nd ed. New York: Raven Press, 3-106.
- Mendoza-Rodríguez CA, Camacho-Arroyo I, Garcia GA y Cerbon MA. (1999) Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception.* 59(5):339-343.
- Mistry AM, Helferich W y Romsos DR. (1994) Elevated neuronal c-Fos-like immunoreactivity and messenger ribonucleic acid (mRNA) in genetically obese (ob/ob) mice. *Brain Res.* 666(1):53-60.
- Mizuno A, Mizobuchi T, Ishibashi Y y Matsuda M. (1989) c-Fos mRNA induction under vitamin B6 antagonist-induced seizure. *Neurosci Lett.* 98(3):272-275.
- Moore PB y Steitz TA. (2003) The structural basis of large ribosomal subunit function. *Annu Rev Biochem.* 72:813-850.

- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL y Curran T. (1987) Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*. 237(4811):192-197.
- Morgan JI y Curran T. (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*. 14:421-451.
- Murphy LJ, Murphy LC y Friesen HG. (1987) Estrogen induction of N-myc and c-myc proto-oncogene expression in the rat uterus. *Endocrinology*. 120(5):1882-1888.
- Nagai MA, Ros N, Bessa SA, Mourao Neto M, Miracca EC y Brentani MM. (2003) Differentially expressed genes and estrogen receptor status in breast cancer. *Int J Oncol*. 23(5):1425-1430.
- Nephew KP, Polek TC, Akcali KC y Khan SA. (1993) The antiestrogen tamoxifen induces c-fos and jun-B, but not c-jun or jun-D, protooncogenes in the rat uterus. *Endocrinology*. 133(1):419-422.
- Nephew KP, Peters GA y Khan SA. (1995) Cellular localization of estradiol-induced c-fos messenger ribonucleic acid in the rat uterus: c-fos expression and uterine cell proliferation do not correlate strictly. *Endocrinology*. 136(7):3007-3015.
- Norvitch ME, Harvey S, Smith S, Hagstrom JE y Wieben ED. (1989) Androgens affect the processing of secretory protein precursors in the guinea pig seminal vesicle. I. Evidence for androgen-regulated proteolytic processing. *Mol Endocrinol*. 3(11):1788-1796.
- Numan M. (1994) Maternal behavior. En: Knobil E, Neills JD, eds. *The physiology of reproduction*. 2nd ed. New York: Raven Press, 221-302.
- Ojeda SR, Urbanski HF, Katz KH y Costa ME. (1985) 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):1175-1178.
- Ojeda SR y Urbanski HF. (1994) Puberty in the rat. En: *The Physiology of reproduction*. 2a. ed. Knobil E y Neill JD (eds). 363-409.
- O'Shea EK, Rutkowski R y Kim PS. (1989) Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science*. 243(4890):538-542.

- Papa M, Mezzogiorno V, Bresciani F y Weisz A. (1991) Estrogen induces c-fos expression specifically in the luminal and glandular epithelia of adult rat uterus. *Biochem Biophys Res Commun.* 175(2):480-485.
- Park S, Seong JY, Son GH, Kang SS, Lee S, Kim SR y Kim K. (2001) Analysis of steroid-induced genes in the rat preoptic area-anterior hypothalamus using a differential-display reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Neuroendocrinol.* 13(6):531-539.
- Park-Sarge OK y Mayo KE. (1994) Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 134(2):709-718.
- Parsons B, Rainbow TC y McEwen BS. (1984) Organizational effects of testosterone via aromatization on feminine reproductive behavior and neural progesterin receptors in rat brain. *Endocrinology.* 115(4):1412-1417.
- Paxinos G, Ashwell KWS y Tork I. (1994) Atlas of the Developing Rat Nervous System, Academic Press, San Diego, CA. Esquemas: 16-36.
- Paxinos G y Watson C. (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, New York. Esquemas: 18-35.
- Perry RP y Meyuhas O. (1990) Translational control of ribosomal protein production in mammalian cells. *Enzyme.* 44(1-4):83-92.
- Picard D y Yamamoto KR. (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6(11):3333-3340.
- Picard D, Kumar V, Chambon P y Yamamoto KR. (1990) Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. *Cell Regul.* 1(3):291-299.
- Pinilla L, Trimino E, Garnelo P, Bellido C, Aguilar R, Gaytan F y Aguilar E. (1993) 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.
- Pfaus JG, Kleopoulos SP, Mobbs CV, Gibbs RB y Pfaff DW. (1993) Sexual stimulation activates c-fos within estrogen-concentrating regions of the female rat forebrain. *Brain Res.* 624(1-2):253-267.

Pomata PE, Colman-Lerner AA, Baranao JL y Fiszman ML. (2000) In vivo evidences of early neurosteroid synthesis in the developing rat central nervous system and placenta. *Dev Brain Res.* 120(1):83-86.

Power RF, Conneely OM y O'Malley BW. (1992) New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *Trends Pharmacol Sci.* 3(8):318-323.

Quadros PS, Goldstein AY, De Vries GJ y Wagner CK. (2002a) Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats. *J Neuroendocrinol.* 14(10):761-767.

Quadros PS, Lopez V, De Vries GJ, Chung WC y Wagner CK. (2002b) Progesterone receptors and the sexual differentiation of the medial preoptic nucleus. *J Neurobiol.* 51(1):24-32.

Ransone LJ y Verma IM. (1990) Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol.* 6:539-557.

Ransone LJ, Visvader J, Wamsley P y Verma IM. (1990) Trans-dominant negative mutants of Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(10):3806-3810.

Rhees RW, Shryne JE y Gorski RA. (1990a) Onset of the hormone-sensitive perinatal period for sexual differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in female rats. *J Neurobiol.* 21(5):781-786.

Rhees RW, Shryne JE, Gorski RA. (1990b) Termination of the hormone-sensitive period for differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. *Dev Brain Res.* 52(1-2):17-23.

Rhodes D. (1997) Chromatin structure. The nucleosome core all wrapped up. *Nature.* 389(6648):231-233.

Romano GJ, Mobbs CV, Lauber A, Howells RD y Pfaff DW. (1990) Differential regulation of proenkephalin gene expression by estrogen in the ventromedial hypothalamus of male and female rats: implications for the molecular basis of a sexually differentiated behavior. *Brain Res.* 536(1-2):63-68.

Saffen DW, Cole AJ, Worley PF, Christy BA, Ryder K y Baraban JM. (1988) Convulsant-induced increase in transcription factor messenger RNAs in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(20):7795-7799.

Sagar SM, Sharp FR y Curran T. (1988) Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* 240(4857):1328-1331.

Sassone-Corsi P, Lamph WW, Kamps M y Verma IM. (1988) fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1. *Cell*. 54(4):553-560.

Schaefer BC. (1995) Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem*. 227(2):255-273.

Schuchard M, Landers JP, Sandhu NP y Spelsberg TC. (1993) Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocr Rev*. 14(6):659-669.

Schumacher M, Coirini H, Robert F, Guennoun R y El-Etr M. (1999) Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav Brain Res*. 105(1):37-52.

Schoonen WG, Dijkema R, de Ries RJ, Wagenaars JL, Joosten JW, de Gooyer ME, Deckers GH y Kloosterboer HJ. (1998) Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells. II. Comparison of binding, transactivation and ED50 values of several synthetic (anti)progestagens in vitro in CHO and MCF-7 cells and in vivo in rabbits and rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 64(3-4):157-170.

Sebens JB, Koch T, Ter Horst GJ, Korf J. (1995) Differential Fos-protein induction in rat forebrain regions after acute and long-term haloperidol and clozapine treatment. *Eur J Pharmacol*. 273(1-2):175-182.

Sheng M y Greenberg ME. (1990) The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 4(4):477-485.

Shoham Z y Schachter M. (1996) Estrogen biosynthesis regulation, action, remote effects and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. *Fertil Steril*. 65(4):687-701.

Shughrue PJ, Stumpf WE, Elger W, Schulze PE y Sar M. (1991) Progestin receptor cells in the 8-day-old male and female mouse cerebral cortex: autoradiographic evidence for a sexual dimorphism in target cell number. *Endocrinology*. 128(1):87-95.

Simerly RB, Swanson LW y Gorski RA. (1985) The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of gonadotropin release: immunohistochemical evidence for a dopaminergic sexual dimorphism. *Brain Res*. 330(1):55-64.

Simerly RB. (1998) Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav Brain Res*. 92(2):195-203.

Simpson ER. (2002) Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. *Fertil Steril.* 77 suppl 4:6-10.

Stebbins-Boaz B y Richter JD. (1997) Translational control during early development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* (1-2):73-94.

Sumida H, Nishizuka M, Kano Y y Arai Y. (1993) Sex differences in the anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area and in the related effects of androgen in prenatal rats. *Neurosci Lett.* 151(1):41-44.

Sutherland JA Cook A, Bannister AJ y Kouzarides T. (1992) Conserved motifs in Fos and Jun define a new class of activation domain. *Genes Dev.* (9):1810-1819.

Suzuki M, Yoshida S, Nishihara M y Takahashi M. (1998) Identification of a sex steroid-inducible gene in the neonatal rat hypothalamus. *Neurosci Lett.* 242(3):127-130.

Suzuki M y Nishihara M. (2002) Granulin precursor gene: a sex steroid-inducible gene involved in sexual differentiation of the rat brain. *Mol Genet Metab.* 75(1):31-37.

Svenningsson P, Strom A, Johansson B y Fredholm BB. (1995) Increased expression of c-jun, junB, AP-1, and preproenkephalin mRNA in rat striatum following a single injection of caffeine. *J Neurosci.* 15(5 Pt 1):3583-3593.

Takimoto GS, Hovland AR, Tasset DM, Melville MY, Tung L y Horwitz KB. (1996) Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem.* 271(23):13308-13316.

Temple JL, Fugger HN, Li X, Shetty SJ, Gustafsson J y Rissman EF. (2001) Estrogen receptor beta regulates sexually dimorphic neural responses to estradiol. *Endocrinology.* 142(1):510-513.

Tischkau SA y Ramírez VD. (1993) A specific membrane binding protein for progesterone in rat brain: sex differences and induction by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(4):1285-1289.

Tobet SA y Hanna IK. (1997) Ontogeny of sex differences in the mammalian hypothalamus and preoptic area. *Cell Mol Neurobiol.* 17(6):565-601.

Truss M y Beato M. (1993) Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev.* 14(4):459-479.

- Tsai MJ y O'Malley BW. (1994) Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann Rev Biochem.* 63:451-486.
- Van Beveren C, Van Straaten F, Curran T, Müller R y Verma I. (1983) Analysis of FBJ-MuSV provirus and c-fos (mouse) gene reveals that viral and cellular fos gene products have different carboxy termini. *Cell.* 32(4):1241-1255.
- Van der Schoot P y Zeilmaker GH. (1973) Regulation of luteal activity in neonatally castrated male rats bearing ovarian cysts. *Endocrinology.* 92(3):674-678.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW y McDonnell DP. (1993) Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol.* 7(10):1244-1255.
- Vilardell J, Chartrand P, Singer RH y Warner JR. (2000a) The odyssey of a regulated transcript. *RNA.* 6(12):1773-1780.
- Vilardell J, Yu SJ y Warner JR. (2000) Multiple functions of an evolutionarily conserved RNA binding domain. *Mol Cell.* 5(4):761-766.
- Voet D y Voet J. (1995) Lipid metabolism. En: *Biochemistry.* John Wiley & Sons, Inc. Second edition. 663-726.
- Wagner JW, Erwin W y Critchlow V. (1966) Androgen sterilization produced by intracerebral implants of testosterone in neonatal female rats. *Endocrinology.* 79(6):1135-1142.
- Wagner CK, Pfau JL, De Vries GJ y Merchenthaler IJ. (2001) Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression. *J Neurobiol.* 47(3):176-182.
- Wang WW y Howells RD. (1994) Sequence of the 5'-flanking region of the rat c-fos proto-oncogene. *Gene.* 143(2):261-264.
- Watson MA y Milbrandt J. (1989) The NGFI-B gene, a transcriptionally inducible member of the steroid receptor gene superfamily: genomic structure and expression in rat brain after seizure induction. *Mol Cell Biol.* 9(10):4213-4219.
- Webb DK, Moulton BC y Khan SA. (1993) Estrogen induces expression of c-jun and jun-B protooncogenes in specific rat uterine cells. *Endocrinology.* 133(1):20-28.

Webster NJ, Green S, Jin JR y Chambon P. (1988) The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell*. 54(2):199-207.

Weisz A y Bresciani F. (1988) Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol Endocrinol*. 2(9):816-824.

Weisz A, Cicatiello L, Persico E, Scalona M y Bresciani F. (1990) Estrogen stimulates transcription of c-jun protooncogene. *Mol Endocrinol*. 4(7):1041-1050.

Weisz A y Rosales R. (1990) Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res*. 18(17):5097-5106.

Weisz J y Ward I. (1980) Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses and neonatal offspring. *Endocrinology*. 117(1):155-160.

White JD y Gall CM. (1987) Differential regulation of neuropeptide and protooncogene mRNA content in the hippocampus following recurrent seizures. *Brain Res*. 427(1):21-29.

Williams CL y Blaustein JD. (1988) Steroids induce hypothalamic progestin receptors and facilitate female sexual behavior in neonatal rats. *Brain Res*. 449(1-2):403-407.

Wolffe AP y Pruss D. (1996) Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell*. 84(6):817-819.

Yang K, Mu XS, Xue JJ, Whitson J, Salminen A, Dixon CE, Liu PK y Hayes RL. (1994) Increased expression of c-fos mRNA and AP-1 transcription factors after cortical impact injury in rats. *Brain Res*. 664(1-2):141-147.

Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K y Nishihara M. (2003) Expression analyses of sex steroid-regulated genes in neonatal rat hypothalamus. *J Reprod Dev*. 49(6):547-552.

Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement JP 4th, Prendergast P, Yip TT, Hutchens TW, Edwards DP y Weigel NL. (1997) Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol*. 11(6):823-832.

Zup SL, Carrier H, Waters EM, Tabor A, Bengston L, Rosen GJ, Simerly RB y Forger NG. (2003) Overexpression of bcl-2 reduces sex differences in neuron number in the brain and spinal cord. *J Neurosci.* 23(6):2357-2362.

11. Apéndice

Artículo no. 1

C-FOS GENE EXPRESSION PATTERN IN THE HYPOTHALAMUS AND THE PREOPTIC AREA OF DEFEMINIZED RATS

Arrieta I, Camacho-Arroyo I, Mendoza-Rodríguez CA y Cerbón MA

Brain Research (2000) 867(1-2):100-106

Research report

c-Fos gene expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of defeminized rats

Isabel Arrieta, Ignacio Camacho-Arroyo, C. Adriana Mendoza-Rodríguez,
Marco A. Cerbón*

Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. México

Accepted 8 March 2000

Abstract

The object of the present study was to determine the c-fos gene expression pattern in the hypothalamus (HYP) and the preoptic area (POA) after estradiol and testosterone priming during the critical period of sexual differentiation of the rat brain. Three-day-old female rats were injected s.c. with a single dose of 17 β -estradiol (200 μ g), testosterone enantate (200 μ g) or vehicle (corn oil). HYP and POA were dissected 2 h, 24 h and 14 days after treatments and on the day of vaginal opening (VO). Other animals, previously treated as above, were acutely injected with 17 β -estradiol (5 μ g) on the day of VO; HYP and POA were obtained 3 h later. Total RNA was extracted and processed for semiquantitative RT-PCR. We observed that c-fos gene expression was markedly increased in POA of the animals treated with estradiol or testosterone 2 h after treatments, while a non-significant increase in c-fos gene expression was observed in the HYP of these animals. We found a significant increase in c-fos expression in HYP and POA on the day of VO in both estradiol and testosterone defeminized rats. Interestingly, the acute estradiol administration on the day of VO did not induce c-fos gene expression in either HYP or POA of defeminized animals, instead a diminution in its expression was observed in animals treated with testosterone in POA. The overall results suggest that estradiol and testosterone imprinting during critical postnatal period of sexual differentiation of the brain permanently modifies the regulation of c-fos gene expression. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Themes: Endocrine and autonomic regulation

Topics: Neuroendocrine regulation; other

Keywords: Sexual differentiation; Defeminization; c-Fos gene expression; Testosterone; Estradiol

1. Introduction

Sex steroid hormones play a key role in the differentiation, development and function of the mammalian brain [1,24,26]. Estrogens induce the formation of neural pathways during fetal and neonatal life that modulate the activity of neural connections in adults [22]. The exposure of rodents to high levels of estradiol or testosterone during the postnatal critical period of sexual differentiation of the brain produces changes in the reproductive physiology of adult animals and induces defeminization in female rats [2,20,23].

Steroid hormones, through the interaction with their

specific intracellular receptors, modulate the expression of various genes such as c-fos which is involved in differentiation, growth and function of neurons [13,14,33]. Various reports have shown that c-fos gene expression is induced by estradiol in ovariectomized rats in a short period of time (minutes and hours) in brainstem, hypothalamus (HYP), preoptic area (POA), amygdala, and hippocampus [6,17]. It has also been demonstrated that c-fos expression is regulated by estradiol during the estrous cycle in several forebrain areas in the rat [5,18]. This regulation is mediated by estrogen responsive elements located in the promoter region of c-fos gene [25,35].

Although c-fos is an early-regulated gene, some studies have demonstrated a long-term increase in Fos-protein in several areas of the nervous system after antipsychotics treatment or following nerve injury [19,32]. The molecular

*Corresponding author. Tel.: +52-5-622-3098; fax: +52-5-616-2010.

E-mail address: macer@servidor.unam.mx (M.A. Cerbón)

mechanisms involved in the long-term physiological effects of sex steroid hormones administered during critical period are unknown. *c-Fos* gene expression may represent a transcription factor that mediates both short and long-term changes in neural function. In this work we studied the effects of estradiol and testosterone postnatal imprinting upon *c-fos* gene expression in HYP and POA of defeminized rats at both short- and long-term periods.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All chemical reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA). Taq polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Branchburg, NJ, USA). *c-Fos* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) probes used in this study were obtained by PCR as previously described [4,5].

2.2. Animals

Female Wistar rat pups housed with their mothers until weaning under a 14:10 h light–dark cycle, lights on from 06:00 to 20:00, with food and water available ad libitum were used. Three groups of 3-day-old rats randomly distributed were injected s.c. as follows: a single dose of 200 µg of 17β-estradiol, firstly dissolved in absolute ethanol and then in 0.1 ml of corn oil (10% ethanol, final concentration), a single dose of testosterone enantate (200 µg dissolved in 0.1 ml of corn oil) or vehicle (0.1 ml corn oil containing 10% absolute ethanol); and were killed 2 h, 24 h, and 14 days after the treatments and on the day of vaginal opening (VO) since it represents the beginning of sexual maturity in the female rat [27]. The animals treated with estradiol or testosterone are described in this manuscript as defeminized rats. Other groups of rats, previously treated as mentioned above, were injected i.p. with 17β-estradiol (5 µg/100 g body weight dissolved in 0.15 ml of 0.9% saline containing 10% absolute ethanol) on the day of VO and killed 3 h after the acute estradiol administration.

Rat brains were rapidly removed after decapitation and chilled in cold 0.9% saline. HYP and POA were immediately excised according to the atlas of the developing and the adult brain of Paxinos and colleagues [29,30]. Briefly, POA was dissected by making one razor cut just rostral to the optic chiasm to the anterior commissure whose anteroventral limit was the nucleus of the diagonal band of Broca. The HYP was dissected by one razor cut just behind the optic chiasm to the caudal portion of the mammillary bodies that laterally limit with hypothalamic commissures [34]. In all cases tissues from four animals were pooled. All tissues were immediately processed for total RNA extraction. All experiments were performed in

triplicate. Thus, each value in the figures was derived from 12 rats. The experiments were performed under the guidelines of the Mexican Law of Animal Protection.

2.3. Total RNA extraction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated from each region using a single-step method based on guanidine isothiocyanate–phenol–chloroform extraction and TRIzol reagent (Gibco-BRL) [8]. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.2% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. A 2-µg amount of total RNA was reverse-transcribed to synthesize single strand cDNA. Subsequently, 10 µl of the RT reaction were subjected to PCR in order to co-amplify a fragment of *c-fos* and GAPDH genes which was used as an internal control [21]. The sequences of the oligonucleotide primers used for cDNA amplification were: (a) for *c-fos* 5'-[CCC CTG TCA ACA CAC AGG AC]-3' (sense) and 5'-[CCG ATG CTC TGC GCT CTG C]-3' (antisense) [10]; and for GAPDH, 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' (sense) and 5'-[CAA TGC CAG CCC CAG CA]-3' (antisense) [11]. The 50-µl PCR reaction included: 10 µl of previously synthesized cDNA, 20 mM Tris–HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, the PCR reaction was performed for 25 cycles. The cycle profile for *c-fos* and GAPDH genes amplification was: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min and 72°C, 1 min. A final extension was performed at 72°C for 5 min. The number of cycles performed was within the exponential phase of the amplification process. After PCR, the amplification products (25 µl) were resolved on 2% agarose gel stained with ethidium bromide which was photographed under a UV transilluminator. The image was captured with a type 665 negative film (Polaroid, Cambridge, MA, USA). The intensity of *c-fos* and GAPDH bands was quantified by densitometry with a Scan jet 3C apparatus (Hewlett-Packard, Greeley, CO, USA). *c-Fos* gene expression was normalized to GAPDH values. The data were analyzed by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's *t*-test. The PRISM 2.01 program (GraphPad, CA, USA) was used to calculate probability values.

3. Results

We assessed *c-fos* gene expression in HYP and POA of rats treated with estradiol and testosterone during the critical period of postnatal sexual differentiation of the brain. In all samples a single product of 247 bp, corre-

sponding to the expected amplification fragment of *c-fos*, and another of 453 bp corresponding to GAPDH were obtained. The identification of each band was previously verified by sequencing and Southern blot analysis. We observed that *c-fos* gene expression was significantly induced 2 h after estradiol or testosterone administration in POA (Fig. 1). A non-significant increase in *c-fos* expression was detected in HYP after steroid treatments (Fig. 2). *c-Fos* gene expression was not significantly modified 24 h and 14 days after estradiol and testosterone treatments in either region. *c-Fos* levels found in control animals at these periods of time were similar to those found in 3-day-old control animals (data not shown).

In animals treated with testosterone, VO occurred earlier (30 ± 3 days, $X \pm S.D.$, after hormone administration) compared to those treated with vehicle (38 ± 2 days) or estradiol (37 ± 2 days). Both control and treated rats were studied on estrus day since, under our experimental

conditions, VO occurred in the early morning of the estrus phase. This was confirmed by a vaginal cytology analysis which showed a predominance of cornified epithelial cells. *c-Fos* expression in POA and HYP of defeminized animals was significantly higher than that observed in control animals on the day of VO (Figs. 3 and 4). The administration of estradiol or testosterone produced similar *c-fos* gene induction in HYP, whereas in POA animals treated with testosterone presented the highest *c-fos* gene expression (Figs. 3 and 4).

The acute administration of estradiol on the day of VO produced a significant increase in *c-fos* gene expression in the control group in both HYP and POA. Interestingly, *c-fos* gene expression was not induced by the acute administration of estradiol in defeminized animals (Figs. 3 and 4). The group defeminized with testosterone exhibited a marked diminution in *c-fos* expression in POA after the acute administration of estradiol (Fig. 3).

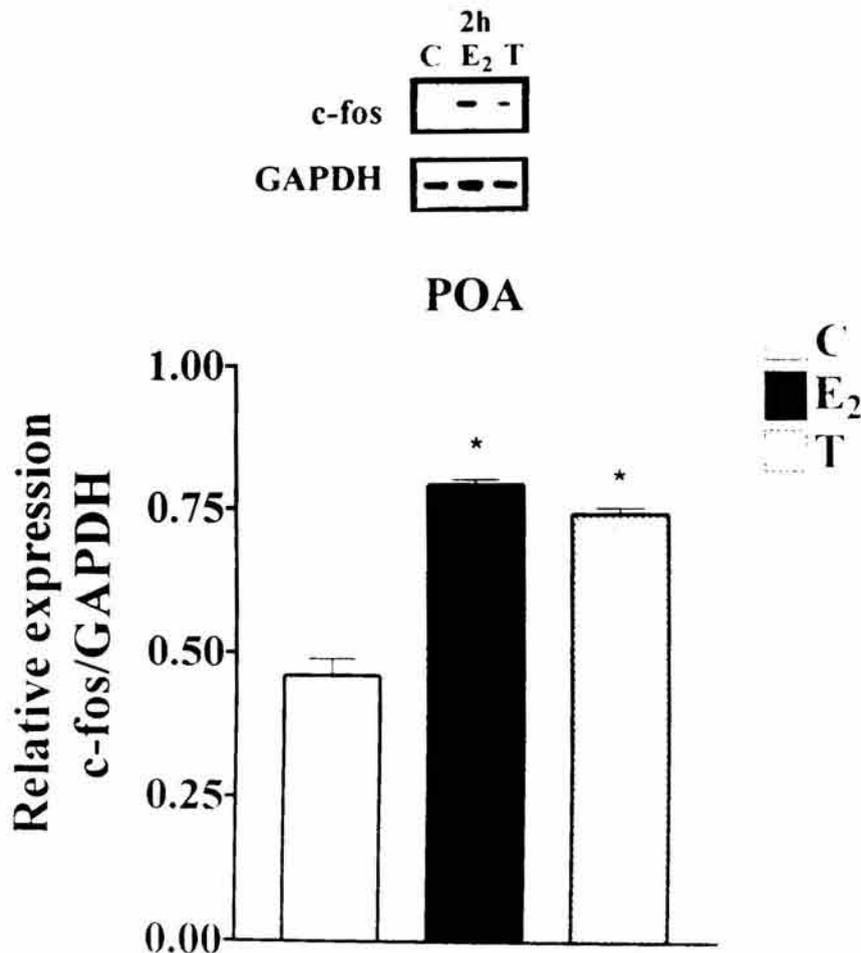


Fig. 1. *c-Fos* gene expression in POA of 3-day-old female rats after steroid treatments. A representative blot of RT-PCR products is shown in the top panel. RT-PCR was performed using total RNA isolated from POA of rats treated with vehicle (C), 200 μ g of 17 β -estradiol (E₂) and 200 μ g of testosterone enantate (T). Animals were killed 2 h after treatment. The densitometric analysis of *c-fos* gene expression is depicted in the bottom panel. *c-Fos* gene expression was corrected for that of GAPDH. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n=3$). * $P<0.05$ compared with C.

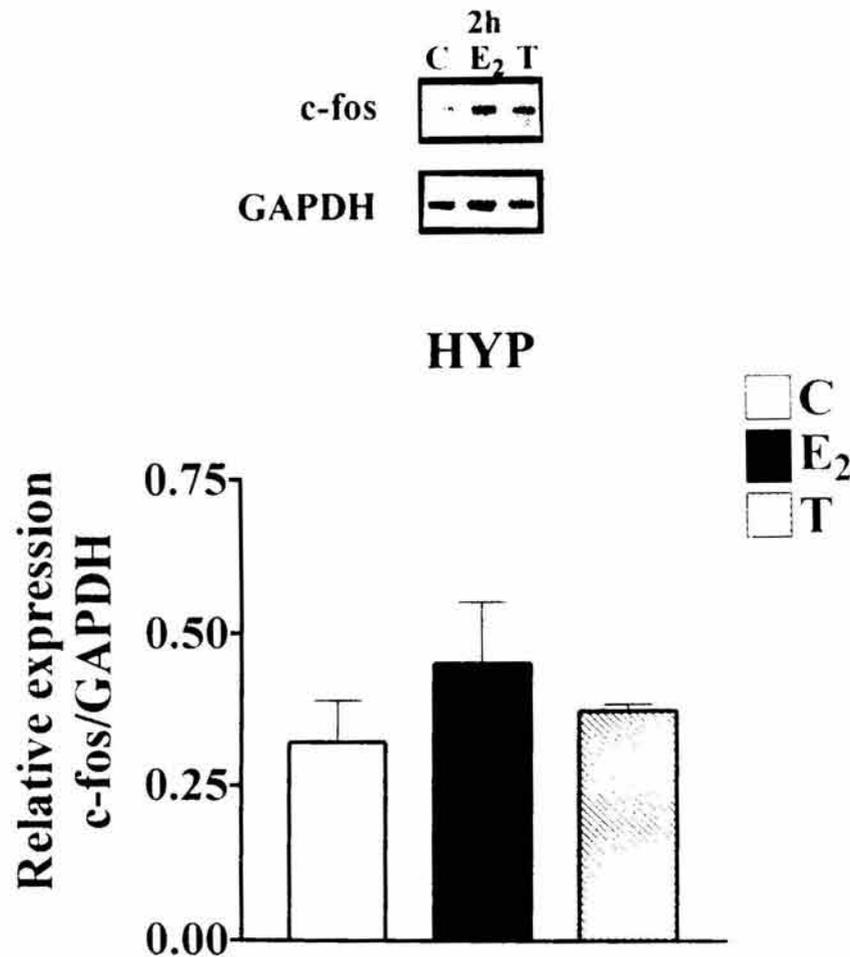


Fig. 2. *c-Fos* gene expression in the HYP of 3-day-old female rats after steroid treatments. A representative blot of RT-PCR products is shown in the top panel. RT-PCR was performed using total RNA isolated from HYP of rats treated with E₂, T and C. Animals were killed 2 h after treatment. The densitometric analysis of *c-fos* gene expression is depicted in the bottom panel. *c-Fos* gene expression was corrected for that of GAPDH. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n=3$).

4. Discussion

Our results indicate that the early administration of estradiol or testosterone during the critical postnatal period of sexual differentiation of the brain induces marked changes in the expression of *c-fos*, an estrogen-sensitive gene, in the HYP and POA of the rat. A diminished response to estradiol was found on the day of VO in defeminized rats.

The observation that estradiol administration early-induces (2 h after treatment) *c-fos* gene expression confirms and extends previous data about estrogen regulation of this gene in female rat forebrain [3,7,15]. The long-term effects of estradiol administration during the critical postnatal period of sexual differentiation of the brain upon *c-fos* gene expression had not been explored previously. Interestingly, we observed that the imprinting with estradiol or testosterone during postnatal period modifies *c-fos* gene

expression in HYP and POA on the day of VO (Figs. 3 and 4), suggesting a marked change in the estradiol-sensitivity of this gene in the studied regions.

To study the estradiol-sensitivity of *c-fos* gene in defeminized animals, we performed a series of experiments on the day of VO using an acute estradiol administration. We found that estradiol did not significantly modify *c-fos* gene expression in HYP and POA of defeminized rats suggesting that both estradiol and testosterone administered during the critical period modify the normal expression of genes involved in sexual differentiation of HYP and POA. This new evidence about the long-term molecular effects of steroid hormone treatment during the critical period suggest that the expression of other estrogen-sensitive genes that participate in the sexual differentiation of the brain should be also modified in defeminized animals.

Although in this study both control and treated rats

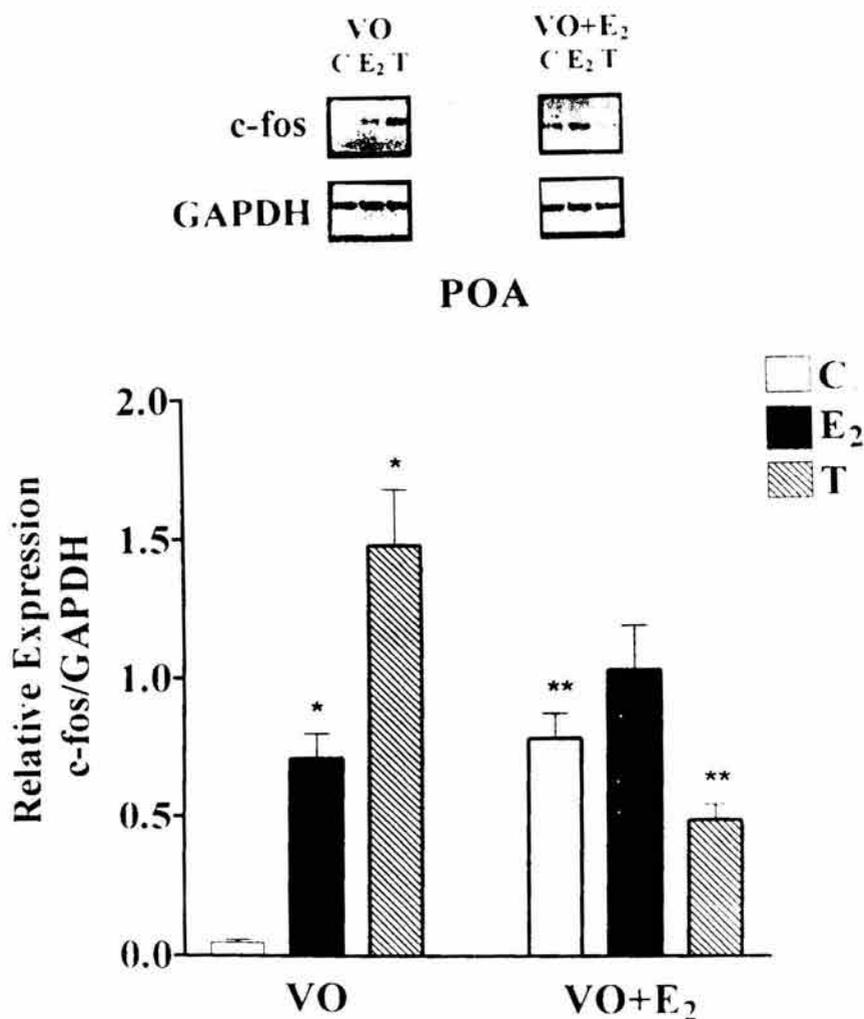


Fig. 3. *c-Fos* gene expression in POA of defeminized rats on the day of vaginal opening (VO). A representative blot of RT-PCR products is shown in the top panel. RT-PCR was performed using total RNA isolated from POA (see Materials and methods) of animals treated with E₂, T and C and killed on the day of VO. Other groups of vehicle-treated and defeminized rats, previously treated as mentioned above, were injected i.p. with 17 β -estradiol (5 μ g) the day of VO and killed 3 h after this acute administration (VO+E₂). The densitometric analysis of *c-fos* gene expression is depicted in the bottom panel. *c-Fos* gene expression was corrected for that of GAPDH. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n=3$). * $P<0.05$ compared with C. ** $P<0.05$ compared with C and T on the day of VO.

presented VO on estrus day, several reports have shown changes in the secretion of gonadotrophins and sex steroids in defeminized animals [31], suggesting that the endogenous circulation values of estradiol on VO should be different between control and defeminized rats. These changes could contribute to the differential expression in *c-fos* gene between defeminized and control rats. In order to assess *c-fos* expression in both control and defeminized rats with the same concentration of steroid hormones it should be important to ovariectomize the animals and treat them with exogenous steroids.

Although RT-PCR used in our study is a very sensitive method we cannot observe regional differences between HYP and POA nuclei. Thus, an immunohistochemical and

an in situ hybridization studies will be necessary in order to assess inter-nuclei differences in *c-fos* gene expression in defeminized animals.

It is well known that the *c-fos* gene is induced by estradiol, however no previous studies had reported the long-term effects of estradiol on the expression of this gene. Long-term changes in *c-fos* expression have been reported in POA of prenatally stressed male rats exposed to receptive females and in the forebrain of long-term haloperidol and clozapine treated rats [16,32]. The long-term changes in neural function induced by steroid hormones could be considered to modify developmental programs, such as the formation of differential neural phenotypes and the alteration in the cellular activity of the

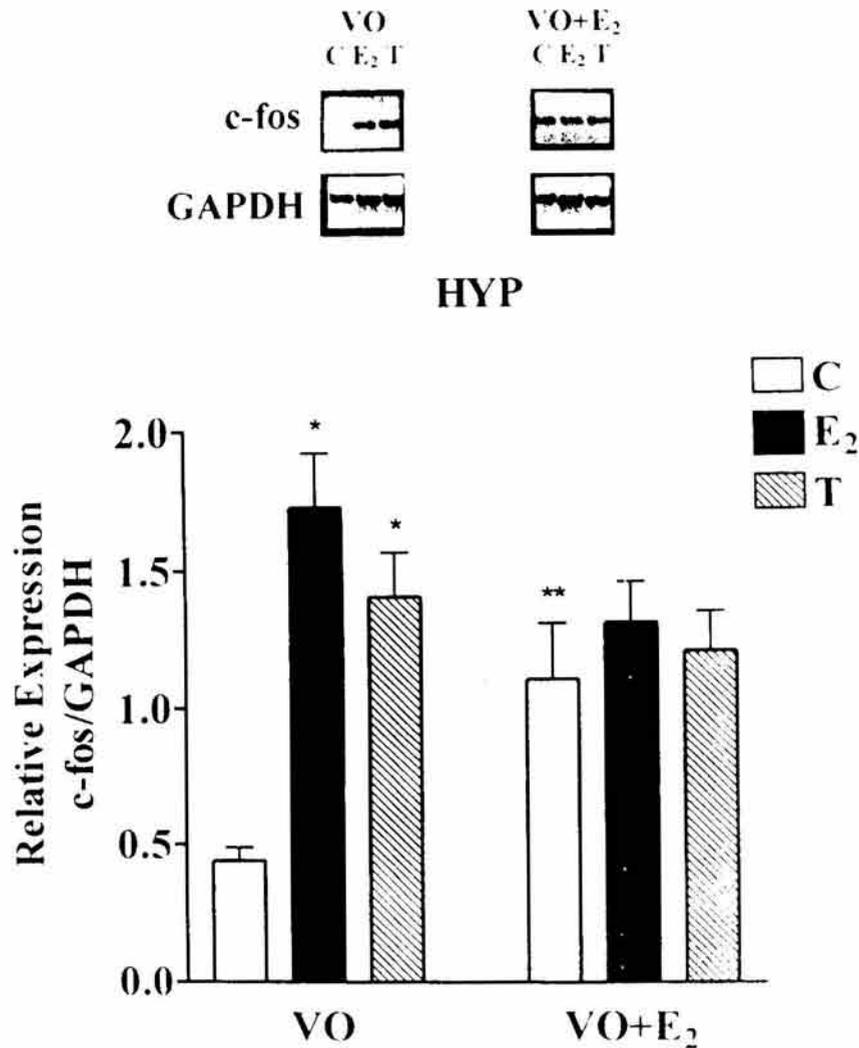


Fig. 4. c-Fos gene expression in HYP of defeminized rats on the day of VO. A representative blot of RT-PCR products is shown in the top panel. RT-PCR was performed using total RNA isolated from HYP (see Materials and methods) of animals treated with E₂, T and C and killed on the day of VO. Other groups of rats, previously treated as mentioned above, were injected i.p. with E₂ (5 µg) the day of VO and killed 3 h after this acute administration (VO+E₂). The densitometric analysis of c-fos expression is depicted in the bottom panel. c-Fos gene expression was corrected for that of GAPDH. Results are expressed as the mean ± S.E.M. (*n* = 3). **P* < 0.05 compared with C. ***P* < 0.05 compared with C on the day of VO.

mature neuron. Mechanisms involved in long-term changes in estradiol-sensitivity of c-fos require further investigation.

We found a differential expression of the c-fos gene in the animals that received testosterone imprinting as compared to those that received estradiol. This observation may indicate that in addition to the effects of aromatized estradiol from testosterone, the latter steroid also participates in the regulation of sexual differentiation of the female rat brain [28]. This is in agreement with a previous report which indicates that only the administration of testosterone but not that of estradiol during the critical period was capable of modifying serotonin levels in the limbic system as well as those of dopamine in HYP [12].

Our results contribute to the understanding of the

marked effects observed in rodents after the hormonal manipulation of the critical postnatal period of sexual differentiation of the brain. The presence of sex steroid hormones during the postnatal critical period permanently alters the developing nervous system of female animals which display typical male behavior in adulthood [9]. Besides, neonatal administration of sex steroids induces permanent anovulation in female rats. This alteration is also observed in the secretion of gonadotrophins as well as in morphological changes in several hypothalamic nuclei with a consequent dysfunction in fertility in adult animals [2,31].

The overall results suggest that the imprinting with exogenous steroid hormones during the postnatal critical period permanently modifies the normal expression of

genes involved in sexual differentiation in the rat brain. Moreover, the differential expression of c-fos in the HYP and POA after testosterone defeminization suggests that this steroid hormone, in addition to its estrogenic effects due to aromatization, activates other androgen-dependent genes, which in turn modify the sexual differentiation of the brain.

Acknowledgements

This work was supported by PAIP, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We thank Flora García-Formentí from CELE, UNAM for the revision of the English manuscript.

References

- [1] R. Alonso, I. López-Coviella, Gonadal steroids and neural function, *Neurochem. Res.* 23 (1998) 675–688.
- [2] A.P. Arnold, R.A. Gorski, Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system, *Ann. Rev. Neurosci.* 7 (1984) 413–442.
- [3] A.P. Auger, J.D. Blaustein, Progesterone enhances an estradiol-induced increase in fos immunoreactivity in localized regions of female rat forebrain, *J. Neurosci.* 15 (1995) 2272–2279.
- [4] I. Camacho-Arroyo, A.M. Pasapera, M.A. Cerbón, Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit, *Neurosci. Lett.* 214 (1996) 25–28.
- [5] I. Camacho-Arroyo, C. Guerra-Araiza, R. Domínguez, C.A. Mendoza-Rodríguez, M.E. Cruz, M.A. Cerbón, c-Fos expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during proestrus, *Life Sci.* 62 (1998) 1153–1159.
- [6] E. Cattaneo, A. Maggi, c-Fos induction by estrogen in specific rat brain areas, *Eur. J. Pharmacol.* 188 (1990) 153–159.
- [7] S. Cheung, Y.M. Will, K. Hentschel, K.E. Moore, K.J. Lookingland, Role of gonadal steroids in determining sexual differences in expression of Fos-related antigens in tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in subdivisions of the hypothalamic arcuate nucleus, *Endocrinology* 138 (1997) 3804–3810.
- [8] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156–159.
- [9] B. Cooke, C.D. Hegstrom, L.S. Villeneuve, S.M. Breedlove, Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms, *Front. Neuroendocrinol.* 19 (1998) 323–362.
- [10] T. Curran, M.B. Gordon, K.L. Rubino, L.C. Sambucetti, Isolation and characterization of the c-fos (rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro, *Oncogene* 2 (1987) 79–84.
- [11] P. Fort, I. Marty, M. Piechaczyk, D.C. el Sabroustys, P. Jeanteur, J.M. Blanchard, Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigenic family, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 1431–1442.
- [12] M.I. González, M.L. Leret, Extrahypothalamic serotonergic modification after masculinization induced by neonatal gonadal hormones, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41 (1992) 329–332.
- [13] R.M. Gubits, J.L. Hazelton, R. Simantov, Variations in c-fos gene expression during rat brain development, *Mol. Brain Res.* 3 (1988) 197–202.
- [14] M.R. Hanley, Proto-oncogenes in the nervous system, *Neuron* 1 (1988) 175–182.
- [15] G.E. Hoffman, W.W. Le, R. Abbud, W.S. Lee, M.S. Smith, Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neural activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation, *Brain Res.* 654 (1994) 207–215.
- [16] J.L. Humm, K.G. Lambert, C.H. Kinsley, Paucity of c-fos expression in the medial preoptic area of prenatally stressed male rats following exposure to sexually receptive females, *Brain Res. Bull.* 37 (1995) 363–368.
- [17] T.R. Insel, Regional induction of c-fos-like protein in rat brain after estradiol administration, *Endocrinology* 126 (1990) 1849–1853.
- [18] L. Jennes, M.E. Jennes, Ch. Purvis, M. Nees, c-Fos expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments, *Brain Res.* 586 (1992) 171–175.
- [19] K.C. Kajander, A.M. Madsen, M.J. Iadarola, G. Draisci, S. Wakisaka, Fos-like immunoreactivity increases in the lumbar spinal cord following a chronic constriction injury to the sciatic nerve of rat, *Neurosci. Lett.* 206 (1996) 9–12.
- [20] S. Kühnemann, T.J. Brown, R.B. Hochberg, N.J. MacLusky, Sexual differentiation of estrogen receptor concentrations in the rat brain: effects of neonatal testosterone exposure, *Brain Res.* 691 (1995) 229–234.
- [21] K.M. Lau, I. Leav, S.M. Ho, Rat estrogen receptor- α and - β , and progesterone receptor mRNA expression in various prostatic lobes and microdissected normal and dysplastic epithelial tissues of the noble rats, *Endocrinology* 139 (1998) 424–427.
- [22] A. Maggi, J. Perez, Role of female gonadal hormones in the CNS, clinical and experimental aspects, *Life Sci.* 37 (1985) 893–906.
- [23] B.S. McEwen, Gonadal steroid influences on brain development and sexual differentiation, *Int. Rev. Physiol.* 27 (1983) 99–145.
- [24] B.S. McEwen, S.E. Alves, Estrogen actions in the central nervous system, *Endocrinol. Rev.* 20 (1999) 279–307.
- [25] R. Müller, Cellular and viral fos genes: structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products, *Biochim. Biophys. Acta* 823 (1986) 207–225.
- [26] F. Nafolin, N.J. MacLusky, C.Z. Ieranth, H.S. Sakamoto, I.M. García-Segura, The cellular effects of estrogens on neuroendocrine tissues, *J. Steroid Biochem.* 30 (1988) 195–207.
- [27] S.R. Ojeda, H.F. Urbanski, Puberty in the rat, in: E. Knobil, J.D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, Vol. II, Raven Press, New York, 1994, pp. 363–409.
- [28] B. Parsons, T.C. Rainbow, B.S. McEwen, Organizational effects of testosterone via aromatization on feminine reproductive behavior and neural progesterone receptors in rat brain, *Endocrinology* 115 (1984) 1412–1417.
- [29] G. Paxinos, K.W.S. Ashwell, I. Törk, *Atlas of the Developing Rat Nervous System*, Academic Press, San Diego, CA, 1994.
- [30] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, (1998).
- [31] L. Pinilla, E. Trimiño, P. Gamelo, C. Bellido, R. Aguilar, F. Gaytán, E. Aguilar, Changes in pituitary secretion during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats, *J. Reprod. Fert.* 97 (1993) 13–20.
- [32] J.B. Sebens, T. Koch, G.J. Ter Host, J. Korf, Differential Fos-protein induction in rat forebrain regions after acute and long-term haloperidol and clozapine treatment, *Eur. J. Pharmacol.* 273 (1995) 175–182.
- [33] M. Sheng, M.E. Greenberg, The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system, *Neuron* 4 (1990) 477–485.
- [34] R.B. Simerly, Anatomical substrates of hypothalamic integration, in: G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, Academic Press, 1995, pp. 353–376.
- [35] A. Weisz, R. Rosales, Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 5097–5106.

Artículo no. 2

PROGESTERONE RECEPTOR GENE AND PROTEIN EXPRESSION
IN THE ANTERIOR PREOPTIC AREA AND HYPOTHALAMUS OF
DEFEMINIZED RATS

Arrieta I, Díaz-Ibáñez LB, Morales T, Mendoza-Garcés L, Morimoto S, Moreno-
Mendoza N, Cerbón MA

Journal of Neurobiology (2003) 56(4):338-346

Progesterone Receptor Gene and Protein Expression in the Anterior Preoptic Area and Hypothalamus of Defeminized Rats

Isabel Arrieta,¹ Leticia Berenice Díaz-Ibáñez,¹ Teresa Morales,²
Luciano Mendoza-Garcés,¹ Sumiko Morimoto,³ Norma Moreno-Mendoza,⁴
Marco A. Cerbón¹

¹ Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

² Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-UAQ, 76230 Juriquilla, Gro., México

³ Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, 14000 México D.F., México

⁴ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D.F., México

Received 22 November 2002; accepted 3 March 2003

ABSTRACT: Progesterone receptor (PR) plays an important role during sexual differentiation of the rat brain. The objective of the present study was to determine PR protein and gene expression pattern in preoptic-anterior hypothalamic area (POA-AHA) and hypothalamus (HYP), after estradiol or testosterone treatment during the postnatal critical period of sexual differentiation of the rat brain (defeminized animals). Three-day-old female rats were subcutaneously (s.c.) injected with a single dose of 17β -estradiol (200 μ g), or testosterone enanthate (200 μ g), or vehicle (corn oil). POA-AHA and HYP were dissected 3 h, 24 h, and 14 days, as well as on the day of vaginal opening (VO) after treatments. Other animals, previously treated as above, were acutely injected with 17β -estradiol (5 μ g) on the day of VO; POA-AHA and HYP were obtained 3 h later. Total RNA was extracted and processed for semiquantitative RT-PCR and tissue slices were prepared for protein detection by immunohistochemistry. We observed that PR mRNA expression was increased in

POA-AHA and HYP of the animals treated with estradiol or testosterone 3 hours after treatments, compared with the vehicle-treated control group. We also found a significant increase in PR mRNA and protein expression in POA-AHA and HYP on the day of VO in both estradiol and testosterone defeminized rats. Interestingly, the acute administration of estradiol on the day of VO (VO + E₂) did not increase PR mRNA or protein expression in POA-AHA and HYP of either estradiol or testosterone defeminized animals, as opposed to the marked induction observed in the intact animals of the control group. The overall results suggest that estradiol and testosterone treatment during the postnatal critical period of sexual differentiation of the brain modifies the regulation of the PR mRNA and protein expression during early onset of maturity. © 2003 Wiley Periodicals, Inc.

J Neurobiol 56: 338–346, 2003

Keywords: sexual differentiation; defeminization; progesterone receptor; brain differentiation; estradiol

Correspondence to: M. Cerbón (mcerbon85@hotmail.com or macer@servidor.unam.mx).

Contract grant sponsor: CONACyT; contract grant number: 34861-N.

Contract grant sponsor: PAIP, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

© 2003 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 12 June 2003 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/neu.10241

INTRODUCTION

Sex steroid hormones play a key role in the differentiation, development, and function of the mammalian brain (Naftolin et al., 1988; Alonso and López-Coviella, 1998; McEwen and Alves, 1999). During fetal and neonatal life estrogens induce the formation of neural pathways that modulate the activity of neural connections in adults (Maggi and Pérez, 1985; McEwen, 2001). A variety of behaviors in mammals are sexually dimorphic, mainly due to differences in hormone sensitive regions of the brain between sexes (Breedlove, 1992).

The exposure of rodents to high concentrations of estradiol or testosterone during the postnatal critical period of sexual differentiation of the brain produces changes in the reproductive physiology of adult animals and induces defeminization in female rats (González-Mariscal et al., 1982; McEwen, 1983; Arnold and Gorski, 1984). Thus, the administration of sex steroids during this period permanently alters the developing nervous system of female animals, which will then display typical male behaviors in adulthood (Cooke et al., 1998). In addition, neonatal administration of sex hormones to female rats induces permanent anovulation with a subsequent alteration in the secretion of gonadotrophins and in the morphology of several hypothalamic nuclei. This leads, in turn, to a fertility dysfunction in the adult animals (Arnold and Gorski, 1984; Pinilla et al., 1993).

Steroid hormones modulate the expression of various genes, such as the progesterone receptor (PR) gene, through interaction with their specific intracellular receptors. PR protein is involved in different neuronal functions (Schumacher et al., 1999), and it has been demonstrated that its expression is increased in various brain areas after estrogen treatment (Shughrue et al., 1997). In fact, PR plays a key role in sexual differentiation of the hypothalamus in the rat (Laubier et al., 1991; Quadros et al., 2002).

PR content changes in various brain regions in response to specific hormonal conditions, such as those that occur during the estrous cycle or after sexual maturity (Guerra-Araiza et al., 2000; Scott et al., 2002). Furthermore, the expression and regulation of PR in the brain of rodent fetuses and adults is sexually dimorphic (Laubier et al., 1991; Wagner et al., 1998). It is well established that PR expression in the Medial Preoptic Nucleus (MPN) during embryonic development and in newborn rats, is higher in males than in females (Wagner et al., 1998). Conversely, in adult animals PR is more highly expressed in the hypothalamus of females than in that of males (Guerra-Araiza et al., 2002).

In the present work, we performed two series of experiments. The first series was designed to assess both the short-term (hours) and long-term (during postnatal development and at puberty) effect of the administration of sex steroid hormones to newborn rats on PR mRNA expression in POA-AHA and HYP. A second series of experiments evaluated the effect of steroids administered to newborn rats, on both basal- and acutely estradiol-stimulated expression of PR mRNA and protein in POA-AHA and HYP at puberty time.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

All chemicals were purchased from Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO) or Gibco-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD). Taq Polymerase was obtained from Perkin-Elmer (Branchburg, NJ). PR and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) probes were generated by PCR as previously described (Guerra-Araiza et al., 2000). An antiprogestosterone receptor antibody (sc-538), recognizing both PR-A and PR-B isoforms was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA).

Animals

Female Wistar rat pups were housed with their mothers until weaning under a 14:10-h light:dark cycle, lights on from 06:00 to 20:00; food and water were available *ad libitum* were used. The experiments were performed in full compliance with the guidelines of the "Mexican Law for Animal Protection."

Experiment 1: Effect of Estradiol or Testosterone Neonatal Administration on PR mRNA Expression

Three groups of 3-day-old rat pups (four animals by group) randomly distributed were s.c. injected as follows: a single dose of 200 μg of 17β -estradiol in 0.1 mL corn oil containing 10% ethanol, or a single dose of testosterone enanthate (200 μg dissolved in 0.1 mL of corn oil), or vehicle (0.1 mL corn oil containing 10% ethanol); and were killed 3 h, 24 h, and 14 days after the treatments and on the day of VO (35 ± 3 days), which represents the onset of sexual maturity in the female rat (Ojeda and Urbanski, 1994). In this study, animals treated with either estradiol or testosterone are considered defeminized. The esterified androgen and estradiol used in our treatments have been previously described in similar animal models (MacLusky et al., 1997).

Tissue Preparation for Total RNA Extraction and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Brains were rapidly removed after decapitation of the rats and chilled in cold 0.9% saline solution. HYP and POA-AHA were immediately excised according to the atlas of the developing and the adult brain (Paxinos et al., 1994; Paxinos and Watson, 1998). Briefly, POA-AHA was dissected by making one razor cut just rostral from the optic chiasm to the anterior commissure whose anteroventral limit was the nucleus of the diagonal band of Broca. HYP was dissected by one razor cut just behind from the optic chiasm to the caudal portion of the mammillary bodies that laterally limit with hypothalamic commissures (Simerly, 1995). In all cases tissues from all four animals were pooled, and immediately processed for total RNA extraction. All experiments were performed in quadruplicate. Therefore each value in the figures was derived from 12 rats.

Total RNA was isolated from each brain region by the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent (Gibco-BRL, Inc) (Chomczynski and Sacchi, 1987). RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.2% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Two micrograms of total RNA were reverse-transcribed to synthesize single-strand cDNA. Subsequently, 10 μ L of RT reaction were subjected to PCR to amplify a fragment of PR; GAPDH gene was coamplified in these reactions as an internal control (Lau et al., 1998). The sequences of the oligonucleotide primers used for cDNA amplification were: (a) for PR amplification: 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT GGT G]-3' (sense) and 5'-[CAC CAT CCC TGC CAG GAT CTT G]-3' (antisense), which amplifies the hormone binding domain (Park-Sarge and Mayo, 1994); and (b) for GAPDH: 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' (sense) and 5'-[CAA TGC CAG CCC CAG CA]-3' (antisense) (Fort et al., 1985). The 50 μ L PCR reaction included: 10 μ L of cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μ M of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with nonretrotranscribed RNA were included in all the experiments. After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, the 25 cycles of PCR were performed. The amplification cycle profile for both PR and GAPDH genes was: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; and 72°C, 1 min with a final extension step at 72°C for 5 min. The number of PCR of cycles was within the exponential phase of the amplification process. After PCR, the amplification products (25 μ L) were resolved on 2% agarose gels stained with ethidium bromide, the gels were then photographed under a UV transilluminator using a type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA). The intensity of PR and GAPDH bands was quantified by densitometry using software of Scion Image Beta 3b for Windows of NIH (Scion Co., MD). PR mRNA expression was normalized to GAPDH values. The data were analyzed by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's *t*

test and all measurements are expressed as mean \pm SEM. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used to calculate probability values.

Experiment 2: Effect of Acute Estradiol Administration on PR mRNA and Protein Expression in Pubertal Rats

Three groups of rats (eight animals per group), neonatally treated as described in experiment 1, were intraperitoneally injected with 17 β -estradiol (5 μ g/100 g body weight dissolved in 0.15 mL of 0.9% saline solution containing 10% ethanol) on the day of VO and killed 3 h after the acute treatment. The tissues from four animals per treatment were analyzed as described in Experiment 1, and the rest of them were processed for the immunohistochemical analysis as it is indicated below.

Perfusion and Tissue Processing

For immunohistochemistry analysis, the animals were perfused under pentobarbital anesthesia (1 mg/100 g body weight) via the ascending aorta with saline solution, followed by 250 mL of ice-cold 4% paraformaldehyde at pH 7.6. The brains were postfixed in the perfusion solution for 2–3 h and then stored overnight in potassium PBS with 10% sucrose at 4°C. Serial 50 μ m coronal sections were cut on a cryostat throughout the POA-AHA and HYP brain regions. Serial sections for each region were collected into 1-in-6 series, placed in tissue-cultured wells containing cryoprotectant solution (ethylene glycol) and maintained at –20°C until immunohistochemistry was performed.

Immunohistochemistry

Progesterone receptor immunoreactivity (PR-ir) was detected using a conventional avidin–biotin immunoperoxidase protocol (Sawchenko et al., 1990). Briefly, free-floating sections were first pretreated with hydrogen peroxide for 10 min to quench endogenous peroxidase activity, followed by two rinses in PBS, and then incubated in 1.0% sodium borohydride to reduce free aldehydes. The tissue sections were then incubated with the primary antibody raised in rabbit at a dilution 1:50 at 4°C for 72 h. Overnight incubation with secondary antibody was performed using a 1:100 dilution (4 μ g/mL) at 4°C. The primary antibody was detected with the avidin–DH-biotinylated horseradish peroxidase–H-complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA); the diaminobenzidine reaction product was developed using a nickel-enhanced glucose oxidase method.

As negative control, two different procedures were used. In the first one, the primary antibody was omitted, while in the second, the primary antibody was preabsorbed with the specific synthetic peptide (sc-539P, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA) used to raise the antibody.

The number of PR-ir nuclei in POA-AHA and HYP was

determined by counting positive nuclei using the KS300 Imaging System (Karl Zeiss, Germany). PR-ir cells were counted bilaterally in all sections corresponding to one of the collected series through the POA-AHA and HYP brain areas from each animal. Abercrombie's method (Abercrombie, 1946) was used to correct for double-counting errors. Data were analyzed by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's *t* test and all measurements are expressed as mean \pm S.E.M. The Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used to calculate probability values.

Experiment 3: Steroids Radioimmunoassay

Specific radioimmunoassay was performed in serum samples from control and defeminized rats on the day VO. A total of four animals per treatment was used. All samples were stored at -70°C . Estradiol and progesterone determinations were carried out as previously described (Abraham, 1975). The sensitivity of the assays was 5.4 pg/mL for estradiol and 8.3 ng/mL for progesterone. The intra- and interassay coefficients of variation were $5.3 \pm 8\%$ and $6.5 \pm 10\%$, respectively.

RESULTS

Experiment 1: Effect of Estradiol or Testosterone Neonatal Administration on PR mRNA Expression

In all samples a single PCR product of 247 bp, corresponding to the expected amplification fragment of the PR, and another one of 453 bp corresponding to GAPDH were obtained. The identity of each band was verified by sequencing analysis. We observed a significant induction of PR mRNA expression at 3 h after estradiol or testosterone administration in POA-AHA [Fig. 1(A)]. A small, nonsignificant increase in PR expression was detected in HYP 3 h after steroid treatment [Fig. 1(B)]. PR mRNA expression was not significantly modified in either region at 24 h or 14 days in either estradiol or testosterone defeminized animals, compared with the control group (data not shown).

In animals treated with testosterone VO occurred earlier (30 ± 3 days, mean \pm S.D., after hormone administration) in comparison to those treated with vehicle (38 ± 2 days) or estradiol (37 ± 2 days). Both control and treated rats were studied on the estrous day, because in our experimental conditions VO occurred in the early morning of the estrous phase. This was confirmed by a vaginal cytology analysis, which showed a predominance of cornified epithelial cells, indicating that the animals were in estrus (data not shown).

PR mRNA expression in POA-AHA either in estro-

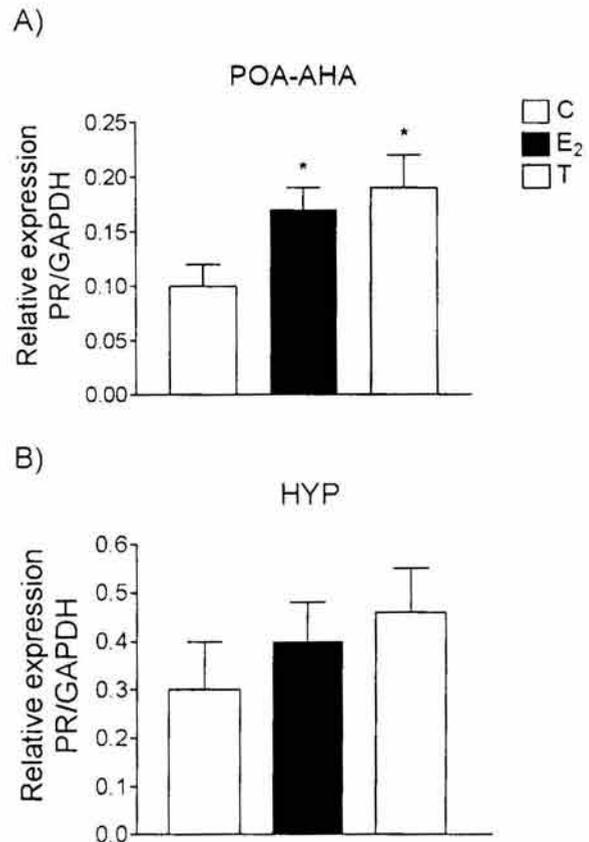


Figure 1 PR mRNA expression in POA-AHA and HYP of 3-day-old female rats at 3 h after steroid treatment. RT-PCR was performed using total RNA isolated from POA-AHA and HYP of rats treated with vehicle (C), 200 μg of 17β -estradiol (E_2) and 200 μg of testosterone enanthate (T). Animals were killed 3 h after treatment. The densitometric analysis of PR mRNA expression of POA-AHA (A), and HYP (B), is depicted in this figure. PR mRNA expression was corrected for that of GAPDH. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 4$). * $p < 0.05$ compared with C.

diol or testosterone defeminized animals was significantly higher than that observed in control animals on the day of VO [Fig. 2(A)]. PR mRNA expression in HYP from defeminized rats showed the same tendency, although the change was not significant [Fig. 2(B)].

Experiment 2: Effect of Acute Estradiol Administration on PR mRNA and Protein Expression in Pubertal Defeminized Rats

The acute administration of estradiol on the day of VO (VO + E_2) produced a significant increase in PR mRNA expression in the control group in POA-AHA and HYP [Fig. 2(A) and (B)]. Interestingly, the same

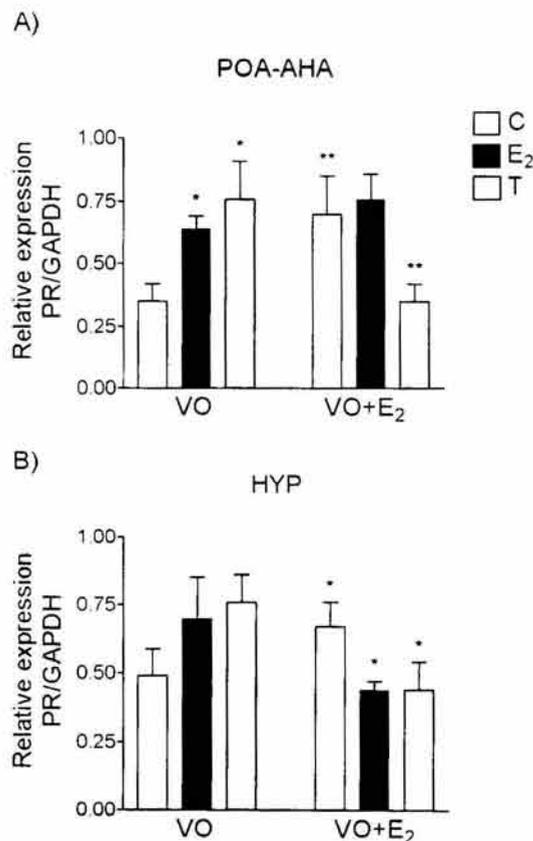


Figure 2 Changes in PR mRNA expression in POA-AHA and HYP of defeminized rats on the day of vaginal opening (VO) in defeminized rats. RT-PCR was performed using total RNA isolated from POA-AHA and HYP of animals treated with E_2 , T, and vehicle (control group) killed on the day of VO. Other groups of vehicle-treated and defeminized rats, treated neonatally as described above, were injected intraperitoneally with 17β -estradiol ($5 \mu\text{g}$) the day of VO and killed 3 h after this acute administration ($VO + E_2$). The densitometric analysis of PR mRNA expression of POA-AHA (A), and HYP (B), is depicted in this figure. PR mRNA expression was corrected for that of GAPDH. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 4$). In (A), $*p < 0.05$ compared with C; $**p < 0.05$ compared with C and T on the day of VO. In (B), $*p < 0.05$ treatments C and T of the $VO + E_2$ were compared with C and T groups on the day of VO.

treatment in estradiol defeminized rats failed to induce a change in PR mRNA in POA-AHA. By contrast, PR gene expression decreased in HYP. On the other hand, testosterone defeminized rats showed a significant decrease in PR mRNA expression both in POA-AHA and HYP [Fig. 2(A) and (B)].

Postnatal exposure to estradiol or testosterone significantly increased PR-immunoreactive (PR-ir) cells in both Medial Preoptic Area (MPA) and Vento-

Medial Hypothalamic nucleus (VMH) of rats at the time of VO in comparison with control group. The data of PR-ir in VMH is depicted in Figure 3. The acute administration of estradiol in the control group on the day of VO ($VO + E_2$) induces a significant increase in PR-ir in VMH. Interestingly, the same acute treatment in estradiol or testosterone defeminized rats showed a significant decrease in PR-ir in this nucleus (Fig. 3). Similar results were observed in MPA (data not shown).

The estimated number of PR-ir cells was assessed in POA-AHA and HYP either in estradiol or testosterone defeminized animals at the time of VO. PR-ir cells were significantly higher in defeminized animals in comparison with control animals [Fig. 4(A) and (B)]. Importantly, when parallel groups of animals were treated with an acute estradiol dose, we observed a significant increase of PR-ir cells in the control group but not in defeminized animals. On the contrary, both estradiol or testosterone defeminized animals presented a diminution in total PR-ir cells (Fig. 4).

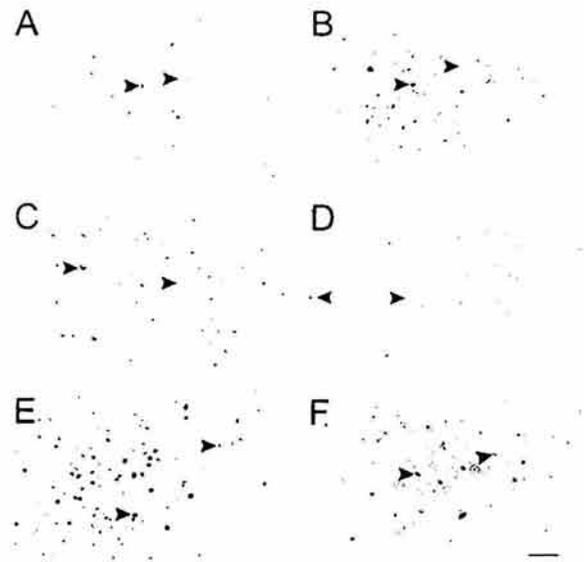


Figure 3 Changes of PR immunoreactive cells (PR-ir) in VMH of defeminized rats on the day of VO. Representative photomicrographs of PR-ir nuclei in VMH. Slides of $50 \mu\text{m}$ were incubated with specific anti-PR antibody and processed for immunohistochemistry (see Materials and Methods). Control animals (A), estradiol (C) or testosterone (E) defeminized animals sacrificed at VO. Other groups of control rats treated with vehicle (B), or defeminized with estradiol (D) or testosterone (F), were treated with acute administration of estradiol on the day of VO and killed 3 h later. Nuclear staining was assessed as previously described (see Materials and Methods).

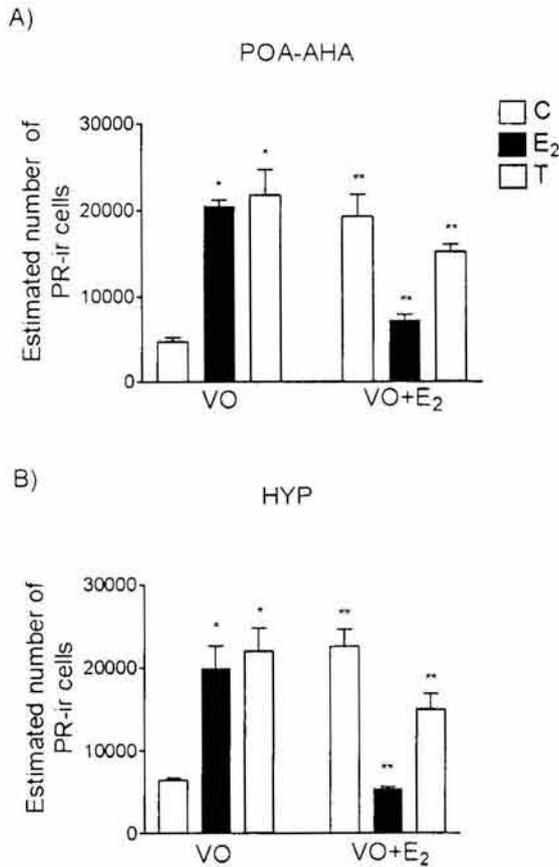


Figure 4 Quantification of PR immunoreactive cells (PR-ir) in POA-AHA and HYP in defeminized rats on the day of vaginal opening (VO). The estimated number of PR-ir cells in the total areas of POA-AHA (A) and in the HYP (B) of defeminized rats on the VO and after acute estradiol administration (VO + E₂). The estimation of PR-ir cells was performed according to previously described in methods (Abercrombie, 1946). Results are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 4$). * $p < 0.05$ versus C, ** $p < 0.001$ versus its respective value in VO.

Experiment 3: Steroids Radioimmunoassay

Serum estradiol and progesterone levels in control and defeminized animals are shown in Table 1. No significant differences in estradiol content were found between control and defeminized animals at the time of VO. However, a marked decrease in serum progesterone levels was observed in both estradiol and testosterone defeminized animals as compared with the control group.

DISCUSSION

It is well established that two regions of the hypothalamus, the MPA and the VMH, are especially sensitive

to the effects of testosterone and its metabolite estradiol during development. These areas are sexually dimorphic in their structure, neurochemistry, and function (Arnold and Gorsky, 1984). Recent data suggest that aromatization of testosterone into estradiol is crucial for the sex differences in PR expression in the MPN and the anteroventral periventricular nucleus in POA of the rat (Quadros et al., 2002).

Our results indicate that the administration of estradiol or testosterone during the postnatal critical period of sexual differentiation of the brain induces an increase in the expression of PR, an estrogen-regulated gene, in POA-AHA and HYP of the rat, both at short and long times after steroid administration. In addition, a decreased response to estradiol was found on the day of VO in defeminized rats.

The observation that early estradiol administration increases (3 h after treatment) PR gene expression confirms and extends previous studies of estrogen regulation of PR in female rat tissues (Hagihara et al., 1992; Mendoza-Rodriguez et al., 1999; Greco et al., 2001). To our knowledge, the long-term effects of estradiol administration during the postnatal critical period of sexual differentiation of the brain upon PR gene expression have not been previously studied. We observed that the imprinting with estradiol or testosterone during the postnatal period increased PR mRNA expression in POA-AHA and HYP on the day of VO (Fig. 2), suggesting a marked change in the estradiol sensitivity of this gene in the studied regions because similar endogenous circulating values of estradiol on VO have been found in control and defeminized rats. This can be inferred from the decreased responsiveness to the acute administration of estradiol on the day of VO. Another possibility to explain these results is a decrease in the downregulation of PR produced by the low levels of progesterone found in defeminized animals (Table 1).

Interestingly, we observed no effects of hormonal steroids 24 h and 14 days after administration. This could be due to the low estradiol levels found after

Table 1. Steroid Serum Levels in the Defeminized Rat at the Time of Vaginal Opening

| Treatment | Estradiol (pg/mL) | Progesterone (ng/mL) |
|--------------|-------------------|---------------------------------|
| Control | 77.86 \pm 6.202 | 5.053 \pm 0.5753 ^a |
| Estradiol | 79.33 \pm 4.079 | 1.608 \pm 0.5069 |
| Testosterone | 81.61 \pm 3.461 | 2.542 \pm 0.3845 |

Steroid serum levels were determined by radioimmunoassay. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of four animals/group.

^a $p < 0.001$ compared with estradiol and testosterone defeminized rats in VO (see Materials and Methods).

24 h of treatment and during prepubertal development. However, this deserves further investigation.

It is well known that neonatal steroid administration modifies the normal ovarian physiology and morphology producing more estradiol but lack of corpora lutea, which could explain the low levels of progesterone in serum observed in these animals (Handa et al., 1985).

To study the estradiol sensitivity of PR gene in defeminized animals, we performed a series of experiments on the day of VO after an acute estradiol administration. We found that estradiol induced a significant increase in PR expression in both POA-AHA and HYP of control animals. In contrast, in estradiol defeminized rats, the acute injection of estradiol failed to stimulate PR gene expression in POA-AHA and decreased it in HYP of estradiol defeminized rats. In testosterone defeminized animals, the administration of acute estradiol inhibited PR gene expression, both in POA-AHA and HYP (Fig. 2). This observation suggests that both estradiol and testosterone administration during the postnatal critical period modifies the normal expression of estrogen-regulated genes involved in sexual differentiation of POA and HYP (Arrieta et al., 2000; Giannakopoulou et al., 2001).

A recent report indicates that the induction of PR via ER α is necessary for the sexually dimorphic induction of PR in several regions of the developing brain including the preoptic area (Wagner et al., 2001). It has been reported that the estradiol and testosterone neonatal treatment reduces the uterine responsiveness to estradiol and reduces the concentration of estrogen receptor before puberty, and that both effects precede the onset of Persistent Estrus Syndrome (Gellert et al., 1977). Whether the estrogen receptor is modified in POA-AHA and HYP of defeminized rats and influences the altered estrogen response observed in our study deserves to be investigated.

A differential effect of estradiol on PR was found at mRNA and protein levels in POA-AHA because PR mRNA level did not change in estradiol defeminized rats after acute treatment with estradiol, whereas PR protein content diminished in the same animals [Figs. 2(A) and 4(A)]. This difference may be due to the fact that PR mRNA expression was assessed in all neuronal tissue obtained from homogenization of the POA-AHA, whereas PR protein assessment was conducted in specific hypothalamic nuclei. Another possibility may be due to the different PR regulation observed at transcriptional and at post-transcriptional levels (Camacho-Arroyo et al., 1996, 2002).

It is well known that the PR mRNA is induced by estradiol; however, no previous studies have reported long-term effects of estradiol on the expression of this gene. The long-term changes in neural function induced by steroid hormones could be considered to modify developmental programs, such as the formation of differential neural phenotypes and the alteration in the cellular activity of the mature neuron.

It has been established that testosterone and its metabolite estradiol are responsible for generating many of the morphological and functional sex differences in the brain. However, the molecular mechanisms activated by testosterone and estradiol exposure during development remains poorly understood (Quadros et al., 2002). We found a differential expression of PR mRNA in the animals that received testosterone imprinting compared to those that received estradiol. This observation suggests that in addition to the effects of estradiol product of aromatization from testosterone, the latter steroid also participates in a different pathway in the regulation of sexual differentiation in the female rat brain (Parsons et al., 1984). This is in agreement with a previous report that indicates that only the administration of testosterone, but not that of estradiol, during the critical period is capable of modifying neurotransmitters levels in the limbic system (González and Leret, 1992).

Our results contribute to the understanding of the effects observed in rodents after hormonal manipulation conducted during the postnatal critical period of sexual differentiation of the brain. Overall results suggest that imprinting with exogenous steroid hormones during the postnatal critical period modifies PR normal expression in the rat brain. Moreover, the differential expression of PR in POA-AHA and HYP after testosterone defeminization suggests that testosterone activates other androgen-dependent genes, which should participate in the sexual differentiation of the brain.

We thank José Guadalupe Baltazar, Federico Jandete, Adriana Mendoza-Rodríguez, Ismael Ramírez, and Mauricio Rodríguez-Dorantes for their technical assistance. Thanks are due to Ignacio Camacho-Arroyo and Roger Gutiérrez-Juárez for the critical review of the manuscript.

REFERENCES

- Abercrombie M. 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94:239–247.
- Abraham GE. 1975. Reliability criteria for steroid radioimmunoassay. *Pathol Biol* 23:885–888.

- Alonso R, López-Coviella I. 1998. Gonadal steroids and neural function. *Neurochem Res* 23:675–688.
- Arnold AP, Gorski RA. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 7:413–442.
- Arrieta I, Camacho-Arroyo I, Mendoza-Rodríguez A, Cerbón MA. 2000. c-Fos gene expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of defeminized rats. *Brain Res* 867:100–106.
- Breedlove SM. 1992. Sexual dimorphism in the vertebrate nervous system. *Neuroscience* 12:4133–4142.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Cerbón MA. 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett* 214:25–28.
- Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Guerra-Araiza C. 2002. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology* 76:267–271.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS, Breedlove SM. 1998. Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19:323–362.
- Fort P, Marty L, Piechaczyk M, el Sabroustys DC, Jeanteur P, Blanchard JM. 1985. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res* 13:1431–1442.
- Gellert RD, Lewis J, Petra PH. 1977. Neonatal treatment with sex steroids: relationship between the uterotrophic response and estrogen receptor in prepubertal rats. *Endocrinology* 100:520–528.
- Giannakopoulou M, Bozas E, Philippidis H, Stylianopoulou F. 2001. Protooncogene c-fos involvement in the molecular mechanism of rat brain sexual differentiation. *Neuroendocrinology* 73:387–396.
- González MI, Leret ML. 1992. Extrahypothalamic serotonergic modification after masculinization induced by neonatal gonadal hormones. *Pharmacol Biochem Behav* 41:329–332.
- González-Mariscal G, Fernández-Guasti A, Beyer C. 1982. Anesthetic pregnancies counteract androgen-induced defeminization. *Neuroendocrinology* 34:357–362.
- Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. 2000. Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci* 66:1743–1752.
- Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, Camacho-Arroyo I. 2002. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 59:105–109.
- Greco B, Allegretto EA, Tetel MJ, Blaustein JD. 2001. Coexpression of ER β with ER α and progesterone receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. *Endocrinology* 142:5172–5181.
- Hagihara K, Hirata S, Osada T, Hirai M, Kato J. 1992. Distribution of cells containing progesterone receptor messenger RNA in the female rat diencephalon and telencephalon: an in situ hybridization study. *Mol Brain Res* 14:239–249.
- Handa RJ, Nass TE, Gorski RA. 1985. Proestrous hormonal changes preceding the onset of ovulatory failure in lightly androgenized female rats. *Biol Reprod* 32:232–240.
- Lau KM, Leav I, Ho SM. 1998. Rat estrogen receptor- α and - β , and progesterone receptor mRNA expression in various prostatic lobes and microdissected normal and dysplastic epithelial tissues of the noble rats. *Endocrinology* 139:424–427.
- Laubier AH, Romano GJ, Pfaff DW. 1991. Gene expression for estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat brain and possible relations to sexually dimorphic functions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:53–62.
- MacLusky NJ, Bowlby DA, Brown TJ, Peterson RE, Hochberg RB. 1997. Sex and the developing brain: suppression of neuronal estrogen sensitivity by developmental androgen exposure. *Neurochem Res* 22:1395–1414.
- Maggi A, Pérez J. 1985. Role of female gonadal hormones in the CNS, clinical and experimental aspects. *Life Sci* 37:893–906.
- McEwen BS. 1983. Gonadal steroid influences on brain development and sexual differentiation. *Int Rev Physiol* 27:99–145.
- McEwen BS. 2001. Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol* 91:2785–2801.
- McEwen BS, Alves SE. 1999. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 20:279–307.
- Mendoza-Rodríguez CA, Camacho-Arroyo I, Garcia GA, Cerbón MA. 1999. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception* 59:339–443.
- Naftolin F, MacLusky NJ, Leranath CZ, Sakamoto HS, García-Segura LM. 1988. The cellular effects of estrogens on neuroendocrine tissues. *J Steroid Biochem* 30:195–207.
- Ojeda SR, Urbanski HF. 1994. Puberty in the rat. In: Knobil E, Neill JD, editor. *The physiology of reproduction*, vol II. New York: Raven Press, p 363–409.
- Park-Sarge OK, Mayo KE. 1994. Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134:709–718.
- Parsons B, Rainbow TC, McEwen BS. 1984. Organizational effects of testosterone via aromatization on feminine reproductive behavior and neural progesterone receptors in rat brain. *Endocrinology* 115:1412–1417.
- Paxinos G, Ashwell KWS, Törk I. 1994. *Atlas of the developing rat nervous system*. San Diego, CA: Academic Press.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Pinilla L, Trimiño E, Garnelo P, Bellido C, Aguilar R, Gaytán F, Aguilar E. 1993. Changes in pituitary secretion

- during the early postnatal period and anovulatory syndrome induced by neonatal oestrogen or androgen in rats. *J Reprod Fertil* 97:13–20.
- Quadros PS, López V, De Vries GJ, Chung WCJ, Wagner CK. 2002. Progesterone receptors and the sexual differentiation of the medial preoptic nucleus. *J Neurobiol* 51:24–32.
- Quadros PS, Pfau JL, Goldstein AYN, De Vries GJ, Wagner CK. 2002. Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology* 143:3727–3739.
- Sawchenko PE, Arias C, Bittencourt JC. 1990. Inhibin beta, somatostatin, and enkephalin immunoreactivities coexist in caudal medullary neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 291:269–280.
- Schumacher M, Coirini H, Robert F, Guennoun R, El-Etr M. 1999. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behaviour. *Brain Res* 105:37–52.
- Scott RE, Wu-Peng XS, Pfaff DW. 2002. Regulation and expression of progesterone receptor mRNA isoforms A and B in the male and female rat hypothalamus and pituitary following oestrogen treatment. *J Neuroendocrinol* 14:175–183.
- Shughrue PJ, Malcolm VL, Merchenthaler I. 1997. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the rat medial preoptic nucleus by estrogenic and antiestrogenic compounds: an in situ hybridization study. *Endocrinology* 138:5476–5484.
- Simerly RB. 1995. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. New York: Academic Press, p 353–376.
- Wagner CK, Jennifer LP, De Vries GJ, Merchenthaler IJ. 2001. Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor α expression. *J Neurobiol* 47:176–182.
- Wagner CK, Nakayama AY, De Vries GJ. 1998. Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology* 139:3658–3661.