



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

00551
UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

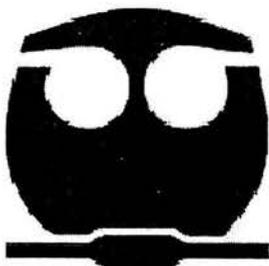
PARTICIPACIÓN DEL PROTEOSOMA 26S EN LA
REGULACIÓN DEL
RECEPTOR A PROGESTERONA EN
EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

BIÓL. OLGA VILLAMAR CRUZ



Tutor: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

MÉXICO, D. F.

2005

m345026



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ENTIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE QUÍMICA E
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Of. No. PMDCB/88/2005

BIÓL. OLGA VILLAMAR CRUZ
Alumna de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

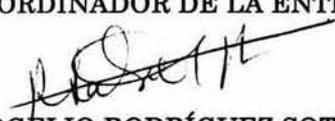
Los miembros del Subcomité Académico en reunión del día 14 de enero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Papel del proteosoma 26S en la degradación del receptor a progesterona en sistema nervioso central durante el ciclo estral de la rata", dirigida por el Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Julio Morán Andrade
VOCAL	Dr. Mario Rocha Sosa
SECRETARIO	Dr. Iván Velasco Velázquez
SUPLENTE	Dra. Lourdes Massieu Trigo
SUPLENTE	Dr. Marta Menjívar Iraheta

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 28 de enero de 2005.
EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA


DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo excepcional.
NOMBRE: Olga Villamar Cruz
FECHA: 01-Junio-05
FIRMA: Olga Villamar Cruz

C.c.p. Archivo

PARTICIPACIÓN DEL PROTEOSOMA 26S EN LA REGULACIÓN DEL RECEPTOR A PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Dr. Mario Rocha Sosa	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Raúl Alvarado, del Departamento de Investigaciones Cerebrales del Instituto de Neurología y neurocirugía "Manuel Velasco", en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de microinyecciones intracerebrales.

Se reconoce la asesoría técnica del Dr. Joaquín Manjarrez Marmolejo en los experimentos de microinyecciones intracerebrales.

Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Julio Morán Andrade
Vocal	Dr. Mario Rocha Sosa
Secretario	Dr. Iván Velasco Velázquez
Suplente	Dra. Lourdes Massieu Trigo
Suplente	Dra. Marta Menjivar Hiraeta

Agradecimientos especiales

Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por permitirme trabajar en este proyecto, por mostrarme el gusto por hacer verdadera ciencia y sobre todo por sus enseñanzas y su amistad.

Al comité tutorial, que evaluó atinadamente este proyecto: Dra. Martha Robles F, Dr. Mario Rocha S., quiero agradecer el tiempo, sugerencias y comentarios que ayudaron a progresar y mejorar este proyecto.

Al Dr. Julio Morán Andrade, al Dr. Iván Velasco Velázquez, al Dr. Mario Rocha Sosa, a la Dra. Lourdes Massieu Trigo y a la Dra. Marta Menjivar Hiraheta por la atinada revisión a este trabajo.

A la UNAM, por ser la mejor institución del país, y donde yo he podido realizar mis estudios profesionales y de posgrado, por darme tanto. GOYA!!!

A CONACYT y a la DGEP por los apoyos recibidos durante mis estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

- a mi FER, mi pequeña, mi vida, mi razón de ser y hacer en la vida; todo el trabajo y esfuerzo de mi vida es por ti, es para ti corazoncito, TE AMO-ATO.
- A mi familia, a todos les agradezco su apoyo para que pudiera realizar este sueño.
- A mi mamá, por haberme dado la vida, de su vida, por ser el ejemplo de fuerza, resistencia, paciencia y amor (todo en un paquete) que ha motivado mi vida. MAMI, TE AMO, GRACIAS.
- A mi papá, por apoyarme a tu manera, por ese otro cromosoma X, por los genes Villamar. GRACIAS.
- A mis abuelos Nacho y Micaela, por el simple hecho de ser quienes son, el pilar de la familia, por enseñarnos y demostrarnos que UNIDOS VENCEREMOS!
- A todos mis hermanos: Nacho, Vicky, Gabriel (Lorena), Claudia (Arturo) y Edgard (Xochitl), por ser parte de la tripulación de este viaje sin principio ni fin, por mantener su identidad y luchar cada día por sus ideales. Va por la banda!
- A mi tía Angy, por apoyarnos incondicionalmente y con tanto amor. GRACIAS.
- Especialmente a mi abuelita Maqui, por enseñarme lo que significa la bondad, por que sin ti he aprendido a sentir la ausencia de un ser amado, por que el ejemplo de tu vida ha sido determinante en la mia, Abue, te extraño.
- A la familia Arias-Romero, por abrirme las puertas de su casa tan amablemente, Sr. Luis, Sra. Evelia, Raül, Juve. Gracias.
- A mis sobrinos (por orden de aparición): Pao (Anafide), Carlos (Mada) y Emiliano (Regulis), y el que sigue (Juandi). A los cuatro, por ser la luz y la alegría de la casa, aún cuando parece que el cielo se nubla.
- A Luis Enrique, que durante todos estos años has estado conmigo, por cuidarme, apoyarme (en todo), consolarme, apapacharme, regañarme y sobre todo por amarme como yo te amo. Te agradezco compartir tu espacio, tu tiempo y tu corazón conmigo. Te amo todos los todos.
- A mis amigas del alma y comadres simbólicas: Brenda, Bere y Maricarmen, ya que han sido muchos años de compartir esta historia. Las quiero de veras!

- A mis cuates de la Fac. de Ciencias, a todos los buenos CAMARADAS, a TODOS. Y especialmente a Piki, (me ayudaste a valorarme y me impulsaste a seguir en esto, gracias) por compartir mas que buenos momentos, espero que la distancia no sea el olvido.
- A mis compañeros del laboratorio 202, especialmente a Aliesha (madame) y a Christian (el viejo capataz), con quienes compartí, no sólo trabajo y convivencia, sino una buena amistad.
- Al resto de los cuates del labo: Tere, Edith, Gaby, Iván (darling), al Chynus, a Luciano, Adriana y especialmente a José S, que es un buen amigo y por apoyar indiscriminadamente a cualquiera en el labo; y los hoy asusentes: Andrea R, Andrea N, Emmanuel.
- Al Dr. Joaquín Manjarrez, por su amable colaboración y sobre todo por la amistad que me ha brindado. Gracias.
- Y por supuesto a Mago y a la Sra. Genoveva, sin su apoyo y colaboración el laboratorio no podría funcionar. Mil gracias.
- Por último quiero dedicar este trabajo especialmente a:
 - * Al pueblo de México que gracias a sus impuestos pude obtener una beca.
 - * Los perseguidos políticos, a los caídos luchando contra el fascismo yanqui y de cualquier lugar del mundo, a los que han muerto y sufrido por guerras y violencia absurdas.
 - * Por supuesto al EZLN.

*"Soy en verdad un viajero solitario -
expresó Einstein e una ocasión-, y los
ideales que han iluminado mi camino y han
proporcionado una y otra vez nuevo valor
para afrontar la vida han sido: la
belleza, la bondad y la verdad."*

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
III.	ANTECEDENTES	4
	3.1. Estructura y función de las hormonas esteroideas.....	4
	3.1.1. Generalidades.....	4
	3.1.2. La progesterona (P4).....	5
	3.1.3 Acciones generales de la P4.....	8
	3.1.3.1. Acciones de la P4 en el Sistema Nervioso Central.....	9
	3.1.4. Mecanismos de acción de la P4.....	13
	3.2. El Receptor a P4 (RP).....	18
	3.2.1. Características del RP.....	18
	3.2.2 Isoformas del RP.....	23
	3.2.3 Regulación de la expresión del RP.....	27
	3.3. El sistema ubiquitina-proteosoma	30
	3.3.1 Ubiquitinación, estructura del proteosoma y mecanismo de acción.....	30
	3.3.2. Inhibidores del proteosoma.....	39
	3.3.3 El proteosoma y la degradación de receptores nucleares.....	42
	3.3.3.1. Regulación del RP por el proteosoma 26S.....	44
	3.4. El ciclo estral de la rata.....	47
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	50
V.	HIPÓTESIS	51
VI	OBJETIVOS	51
	OBJETIVO GENERAL.....	51
	OBJETIVOS PARTICULARES.....	51
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	52
	7.1. Animales de experimentación.....	52
	7.2. Determinación de la etapa del ciclo estral.....	52
	7.3. Microinyecciones intracerebroventriculares del inhibidor del proteosoma.....	52

7.3.1. Implantación de cánulas de microinyección por estereotaxia...	52
7.3.2. Administración del inhibidor del proteosoma 26S:MG132.....	54
7.4. Obtención de las diferentes regiones cerebrales.....	55
7.5. Análisis de las proteínas del RP, Receptores a estrógenos y cofactores SRC-1 y SMRT.....	55
7.5.1 Extracción y electroforesis de proteínas totales.....	55
7.5.2. Western blot.....	56
7.6. Análisis de resultados.....	57
VIII. RESULTADOS.....	59
IX. DISCUSIÓN.....	66
X. CONCLUSIONES.....	74
XI. REFERENCIAS.....	75

Lista de abreviaturas

DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Estradiol
E1	Enzima 1 activadora de ubiquitina
E2	Enzima 2 acarreadora de ubiquitina o conjugadora de ubiquitina
E3	Enzima 3 ligasa de ubiquitina
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
ERH	Elemento de respuesta a la hormona
ERP	Elemento de respuesta a progesterona
FSH	Hormona folículo estimulante
GF	Factor de crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GRIP	Proteína de interacción con el receptor a glucocorticoides-1
HAT	Histona acetiltransferasa
HDAC	Histona desacetiltransferasa
hRP	Receptor a progesterona humano
HSP	Proteína de choque térmico
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MBT	Maquinaria basal de transcripción
MG132	Inhibidor del proteosoma
NcoR	Correpresor de receptores nucleares
NLS	Secuencia de localización nuclear
PGPH	Peptidilglutamil hidrolasa
P4	progesterona
Proteosoma	Sistema de degradación
26S	

RE	Receptor a estrógenos
RE- α	Isoforma α del receptor a estrógenos
RE- β	Isoforma β del receptor a estrógenos
RP	Receptor a progesterona
RP-A	Isoforma A del receptor a progesterona
RP-B	Isoforma B del receptor a progesterona
SMRT	Silenciador mediador para el receptor a ácido retinoico y a hormonas tiroideas
SNC	Sistema Nervioso Central
SRC	Coactivador de Receptores a hormonas esteroides
SRC-1	Coactivador de Receptores a hormonas esteroides-1
SRC-2	Coactivador de Receptores a hormonas esteroides-2
SRC-3	Coactivador de Receptores a hormonas esteroides-3
Ub	Ubiquitina

I. RESUMEN

En este trabajo se determinó la regulación del contenido del receptor a progesterona (RP) por el proteosoma 26S en el Sistema Nervioso Central (SNC) de ratas hembras intactas durante la etapa de proestro del ciclo estral, cuando el contenido de progesterona es más elevado, administrando microinyecciones intracerebroventriculares de un inhibidor del proteosoma (MG132). Se evaluó también el contenido de proteínas involucradas en la regulación y en las acciones del RP: 1) el receptor a estrógenos α (RE- α); 2) el receptor a estrógenos β (RE- β), 3) el coactivador SRC-1 y 4) el correpresor SMRT. Las proteínas se aislaron del hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo, y se procesaron para su análisis por Western blot. El contenido del RP (RP-A y RP-B) y RE- β aumentó significativamente después de la administración del MG132 en las tres regiones cerebrales estudiadas en comparación con el vehículo (DMSO); el contenido del RE- α aumentó significativamente sólo en el área preóptica. El coactivador SRC-1 presentó un incremento significativo en las tres regiones cerebrales estudiadas mientras que el correpresor SMRT sólo aumentó su contenido en el hipotálamo y en el área preóptica. Los resultados obtenidos sugieren que el RP, el RE, el coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT son degradados por el proteosoma 26S de manera región específica en el cerebro de la rata en condiciones fisiológicas.

II. INTRODUCCIÓN

La progesterona (P4) participa en la regulación de un amplio rango de funciones en el Sistema Nervioso Central (SNC). Esta hormona lleva a cabo la mayoría de sus efectos a través de la interacción con su receptor intracelular (RP) el cual pertenece a la superfamilia de receptores a hormonas esteroides que son factores de transcripción regulados por la unión a su ligando.

La regulación del RP es fundamental para las acciones de la P4 en el SNC. Se sabe que en ratas ovariectomizadas, el contenido de las isoformas del RP en algunas regiones cerebrales es regulado por el proteosoma 26S, sin embargo se desconoce el papel de este sistema de degradación en la regulación del RP en condiciones fisiológicas.

El receptor a estrógenos (RE) también pertenece a la superfamilia de receptores a hormonas esteroides y tiene un papel fundamental en la regulación a la alta del RP. En sistemas in vitro se ha demostrado que el RE es blanco de la degradación por el proteosoma 26S, sin embargo, también se desconoce el papel de este sistema de degradación en la regulación del RE en el SNC en condiciones fisiológicas.

Las acciones biológicas de las hormonas esteroides a través de sus receptores requieren además de la maquinaria basal de transcripción de otras proteínas llamadas cofactores, dichas proteínas pueden activar (coactivadores) o reprimir (correpresores) la actividad transcripcional. Existe evidencia de que los cofactores intervienen en la unión de los receptores a hormonas esteroides con la

maquinaria basal de transcripción y modifican la estructura de la cromatina regulando así el proceso de transcripción mediada por dichos receptores.

Recientemente se han caracterizado varios cofactores relacionados con la regulación de receptores a hormonas esteroides, entre los que se encuentran el coactivador de receptores a hormonas esteroides-1 (SRC-1) y el silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico (SMRT). Aunque existe evidencia de que dichos cofactores son regulados diferencialmente durante el ciclo estral de la rata, se desconoce el papel del proteosoma en la regulación del coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT en el SNC en condiciones fisiológicas.

En el presente trabajo se estudió el papel del proteosoma 26S en la regulación del contenido del RP, RE, SRC-1 y SMRT en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo de la rata hembra en condiciones fisiológicas.

III. ANTECEDENTES

3.1. Estructura y función de las hormonas esteroideas.

3.1.1. Generalidades.

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

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

Estas hormonas modifican la actividad celular al interactuar con receptores específicos que tienen una alta afinidad para cada hormona esteroide. Los receptores a hormonas esteroideas son proteínas que en su mayoría se localizan en el núcleo de la célula y son parte de la familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos, positiva o negativamente, a través de

la interacción con distintas secuencias en el DNA denominadas elementos de respuesta hormonal (Zhang et al., 1996).

3.1.2 La progesterona.

La progesterona (P4) (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides. Su nombre se deriva del latín: pr=a favor y gestare=llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción (Pérez-Palacios et al., 1985).

La estructura química de la P4 y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21; Fig. 1). La P4 se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo del ovario, durante el ciclo menstrual (Hsueh et al., 1984; Hutchison et al., 1986); otros órganos donde también se ha demostrado su síntesis son la corteza adrenal, la placenta (Goroscope y Freeman, 1985; Perrot-Appianat et al., 1982), el testículo, (Weisz y Ward, 1980; Dalkin et al., 1992) y el cerebro (Zwain y Yen, 1999b; Ukena et al., 1999).

Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y la adrenalina (Graham y Ckarke., 1997). La síntesis de P4 se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a P4 (Fig. 2), por medio de distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

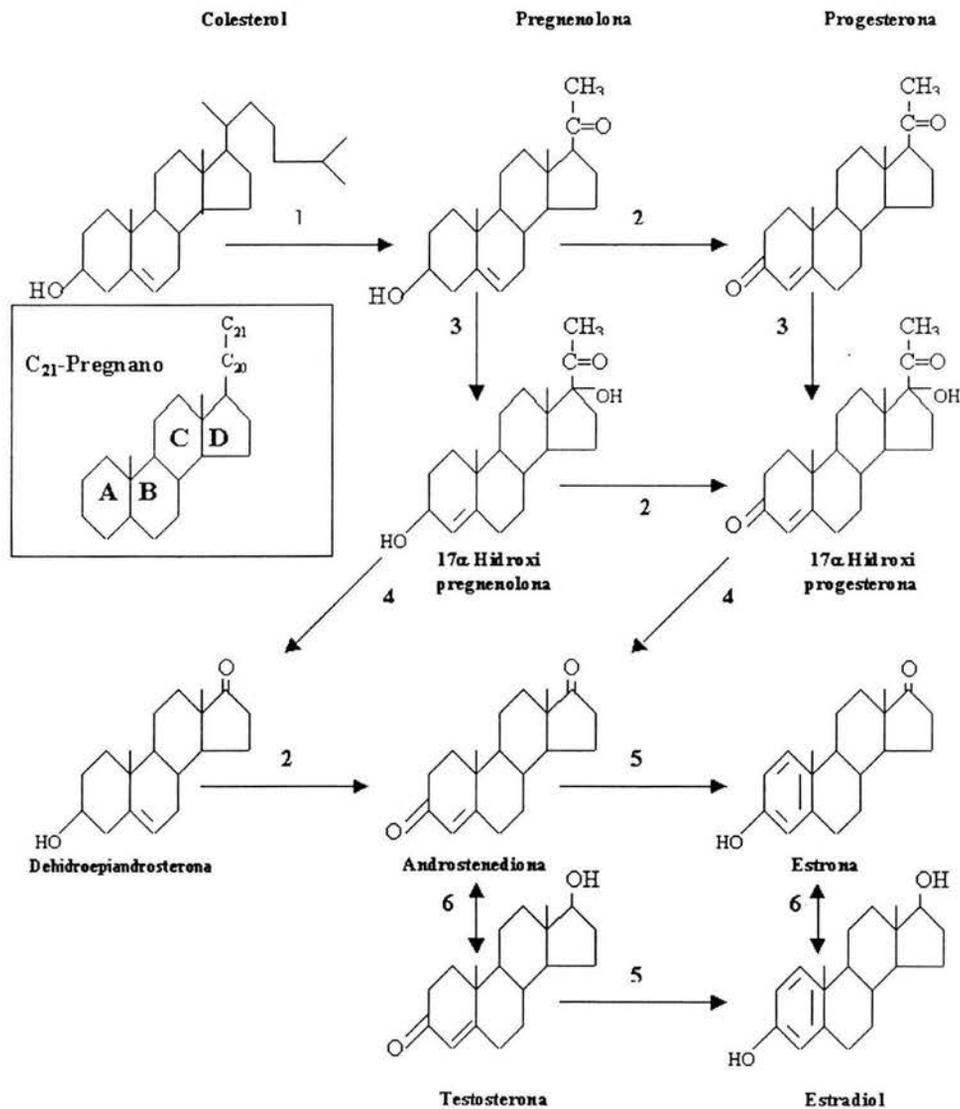


Figura 1. Síntesis de los principales esteroides. 1) 20,22 desmolasa; 2) 3β-OH-esteroido deshidrogenasa, 3) 17α-hidroxilasa; 4) 17, 20-esteroido liasa; 5) aromatasa; 6) 17β-OH-esteroido deshidrogenasa. En el recuadro se encuentra la estructura del pregnano al igual que las letras con las que se denominan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

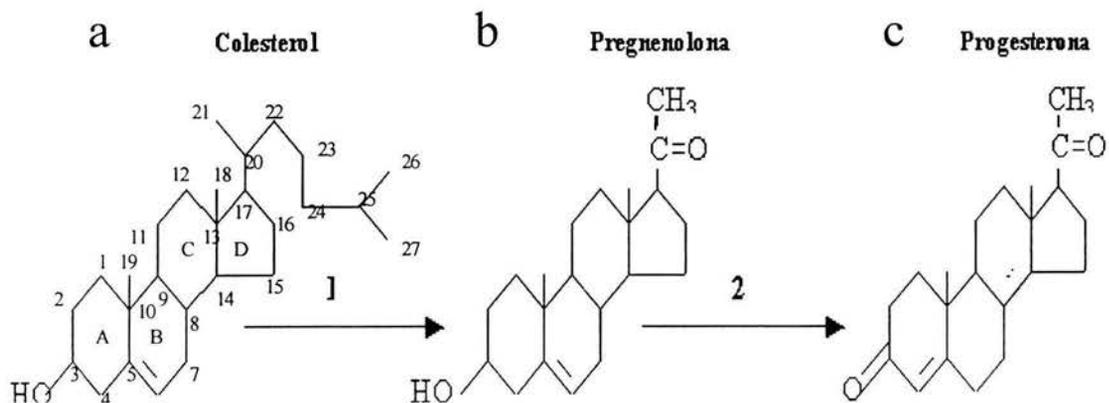


Figura 2. Biosíntesis de la P4. La biotransformación de colesterol a P4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17 por medio de la enzima 20,22 esteroide liasa (1), b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3 por medio de la enzima 3 β -OH-esteroide deshidrogenasa (2) y c) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A. (Gore-Langton, 1988).

Una vez que la P4 y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

La reducción en el carbono 20 lo que da lugar a la formación de 20 α y 20 β dihidroprogesterona (con actividad biológica, que puede ser similar o diferente a la de P4); posteriormente se reduce el anillo A en los carbonos 3 y 5 dando lugar a la formación de ocho pregnandioles o pregnantrioles.

La reducción de los pregnandioles forma glucurónidos, lo que incrementa la polaridad de la molécula formándose así compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción por la orina (Fig. 3).

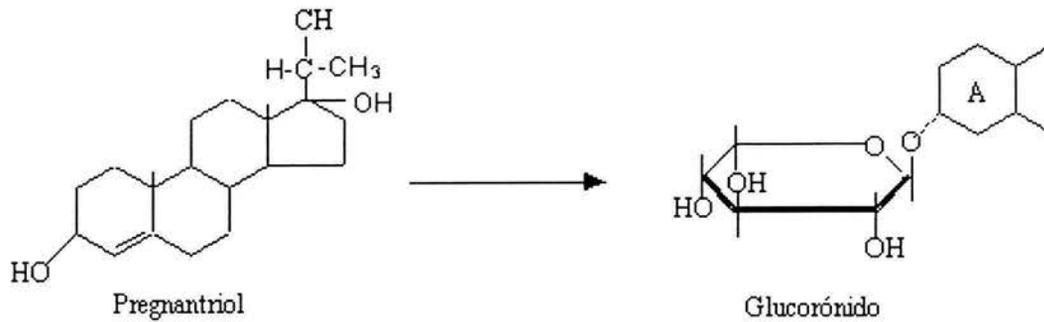


Figura 3. Principales catabolitos de la P4 (Renwick 1970).

3.1.3. Acciones generales de la P4.

La P4 participa en muchas de las actividades biológicas de diferentes tejidos (Tabla 1). Desde hace varias décadas se ha demostrado que la P4 tiene como tejidos blanco el útero y el ovario donde participa en procesos como la liberación del ovocito, el mantenimiento del embarazo, entre otros. Entre 1980 y 1990 se demostró que la P4 participa en el desarrollo alveolar y la síntesis de leche en la glándula mamaria respectivamente. De manera muy interesante se ha descrito que el cerebro también es un órgano blanco de la P4. Así, se ha descrito que dicha hormona participa en la regulación de procesos como la respuesta sexual, la excitabilidad neuronal, el sueño, la neuroprotección, la memoria y el aprendizaje. La P4 participa en la involución del timo y la regulación de la masa ósea (Tabla 1).

TABLA 1. Acciones fisiológicas de la P₄.

Tejido	Función
Útero/Ovario	Liberación del ovocito (1) Facilitación de la implantación (2) Mantenimiento del embarazo (3) Estimulación de la regeneración del estroma (4)
Glándula mamaria	Aumento del desarrollo alveolar (5) Regulación de la síntesis de leche durante el embarazo (6)
Cerebro	Regulación de la respuesta sexual (7) Reducción de la excitabilidad neuronal y aumento de sueño (8) Neuroprotección (9, 10) Memoria y aprendizaje (11, 12)
Timo	Involución del timo (13)
Hueso	Prevención de la pérdida de la masa ósea (14)

(1) Susuki et al., 1994, (2) Graham y Clarke, 1997, (3) Rotchild, 1983, (4) Clarke, 1993, (5) Topper y Freeman, 1980, (6) Savouret et al., 1990, (7) Camacho-Arroyo et al., 1995, (8) Camacho-Arroyo et al., 1999, (9) González-Vidal, et al., 1998, (10) Vongher y Frye, 1999, (11) Vallee et al., 2001, (12) Baulieu, 1997, (13) Shinoyima et al., 1991, (14) Wei et al., 1993.

3.1.3.1. Acciones de la P₄ en el SNC.

Existe una gran variedad de acciones reguladas por P₄ en diferentes regiones del cerebro de mamíferos, incluyendo la médula espinal, el tallo cerebral, el cerebelo, el hipotálamo, el hipocampo, la amígdala, la corteza y el bulbo olfatorio (Camacho-Arroyo, 1995; Chabbert-Buffet et al., 2000, Schumacher et al.,

1999; Stein, 2001). La P4 participa en la regulación de la ovulación, de la conducta sexual, en la diferenciación sexual en el cerebro, en la excitabilidad neuronal y en procesos como el dolor, la respiración, el sueño, el ciclo sueño-vigilia, la memoria y el aprendizaje, la neuroprotección y el desarrollo de tumores cerebrales (Schumacher et al., 1999, Grunberg et al., 1991).

En relación al control de la reproducción se ha reportado ampliamente que la P4 promueve la ovulación a través de su acción en neuronas hipotalámicas. De manera interesante, la P4 promueve la facilitación de la conducta sexual femenina de lordosis en roedores, sin embargo, con dosis subsecuentes de esta hormona se inhibe el despliegue de la conducta sexual, en un proceso conocido como inhibición secuencial (González-Mariscal et al., 1993).

El incremento en la temperatura basal corporal durante el ciclo menstrual y el embarazo es modulado también por P4 a través de sus acciones en neuronas termosensibles del hipotálamo y el área preóptica (Nakayama et al., 1975; Charkoudian y Johnson, 2000). Se ha observado que la P4 tiene un papel muy importante en el embarazo y en el despliegue de la conducta maternal en roedores y conejos (González-Mariscal, 2001; Francis et al., 2002), mientras que en ratas macho se ha observado que la P4 induce un comportamiento agresivo de los adultos hacia las crías (Schneider et al., 2003).

Recientemente se ha reportado que la expresión del RP en el hipotálamo y el área preóptica presenta cambios utilizando un modelo de ratas desfeminizadas con estradiol (E) durante el período crítico de diferenciación del cerebro (primeros 5 días del desarrollo postnatal) (Arrieta et al., 2003).

Las diferencias sexualmente dimórficas en el volumen de estructuras como el núcleo preóptico medial cambian con la administración del antagonista del RP (RU486) durante el desarrollo postnatal temprano (Quadros et al., 2002). Esto sugiere que el RP podría estar involucrado en la diferenciación sexual del cerebro.

En relación a la excitabilidad neuronal, se ha reportado que la P4 modula la actividad de varios neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico (GABA), glutamato, acetilcolina, dopamina, norepinefrina y serotonina (Rupprecht, 2003; Melcangi et al., 2001; Bethea et al., 2002). En general, se ha observado que la P4 disminuye la excitabilidad neuronal por el incremento de la actividad de GABA o por la modulación del glutamato (Melcangi et al., 2001; Engel y Grant, 2001).

Se ha reportado que la P4 tiene efectos anestésicos en varias especies y tiene propiedades anticonvulsivas en varios modelos animales y en humanos (Backstrom et al., 1984; Beyenburg et al., 2001). De manera interesante, se ha observado que muchos de los efectos de la P4 en la excitabilidad neuronal son mediados a través de sus metabolitos reducidos como 3α , 5α tetrahidroprogesterona, que también tiene actividad biológica y en algunos casos su actividad es mayor que la misma P4 (Frye et al., 2000; Herzog y Frye, 2003).

En la vida postnatal temprana las neuronas de Purkinje en el cerebelo sintetizan P4, y esto promueve el crecimiento de dendritas y la sinaptogénesis en estas células, contribuyendo a la formación de circuitos neuronales en esta estructura durante la vida neonatal (Sakamoto et al., 2001 y 2002).

La P4 participa en la regulación del sueño durante el embarazo y su administración en machos adultos muestra efectos hipnogénicos (Friess et al.,

1997). Se ha reportado que las microinyecciones de P4 en la formación reticular pontina de ratas macho intactos y hembras ovariectomizadas, produce una marcada disminución en la latencia a la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (Camacho-Arroyo et al., 1999).

La aparición de síntomas del síndrome premenstrual en las mujeres, así como la ansiedad observada al final de la fase lútea ha sido correlacionada con la disminución en los niveles de P4. De acuerdo con esta evidencia, se ha encontrado que la P4 y sus metabolitos poseen propiedades ansiolíticas (Backstrom et al., 2003; Freeman, 2002; Gómez et al., 2002; Picazo y Fernández-Guasti, 1995).

La P4 también participa en la modulación de la plasticidad sináptica y se sabe que la memoria espacial varía durante el embarazo en ratas, y la retención de la memoria es aumentada por el tratamiento de E y P4 (Galea et al., 2000; Sandstrom y Williams, 2001). Se ha reportado que un tratamiento agudo con P4 (5 h) aumenta la formación de espinas dendríticas en el hipocampo de la rata (Gould et al., 1990). También se ha observado que el aumento en la densidad de espinas dendríticas por E y P4 podría estar regulado por un incremento en el contenido de la proteína MAP-2 en el hipocampo (Reyna-Neyra et al., 2002).

Uno de los aspectos más interesantes y de aplicación de las acciones de la P4 en el cerebro es la capacidad tanto de prevenir la degeneración como promover la neuroprotección y la neuroregeneración. En varios modelos animales de daño cerebral se ha observado que la P4 muestra un papel neuroprotector contra varios agentes y procesos traumáticos (Stein, 2001, Callier et al., 2001; Cervantes et al., 2002; Nilsen y Brinton, 2002). El conocimiento sobre los

mecanismos involucrados en estos procesos podría ser de gran importancia, con el propósito de utilizar a la P4 en humanos no sólo después de un trauma cerebral, sino en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer y la de Parkinson.

3.1.4. Mecanismos de acción de la P4.

Los mecanismos celulares mediante los cuales la P4 puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: genómico y no genómico (Bramley, 2003). El primero involucra la interacción de la P4 con sus receptores nucleares específicos (RP) (Evans, 1988), mientras que el segundo requiere la interacción de la P4 con receptores membranales o sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores como el GABA_A, canales iónicos, receptores de tipo cinasa de tirosina y receptores de siete dominios transmembranales (Fig. 4) (Camacho-Arroyo, 2003).

Mediante el mecanismo no genómico se modifican la conductancia iónica, la formación de segundos mensajeros y la activación de cascadas de fosforilación (Bramley, 2003). De esta manera la P4 puede regular diferentes funciones en el pulmón a corto (milisegundos), mediano (minutos) y largo plazo (horas y días).

Por medio del mecanismo genómico se generan cambios en la transcripción de genes específicos después de la interacción de la P4 con el RP (Fig. 4).

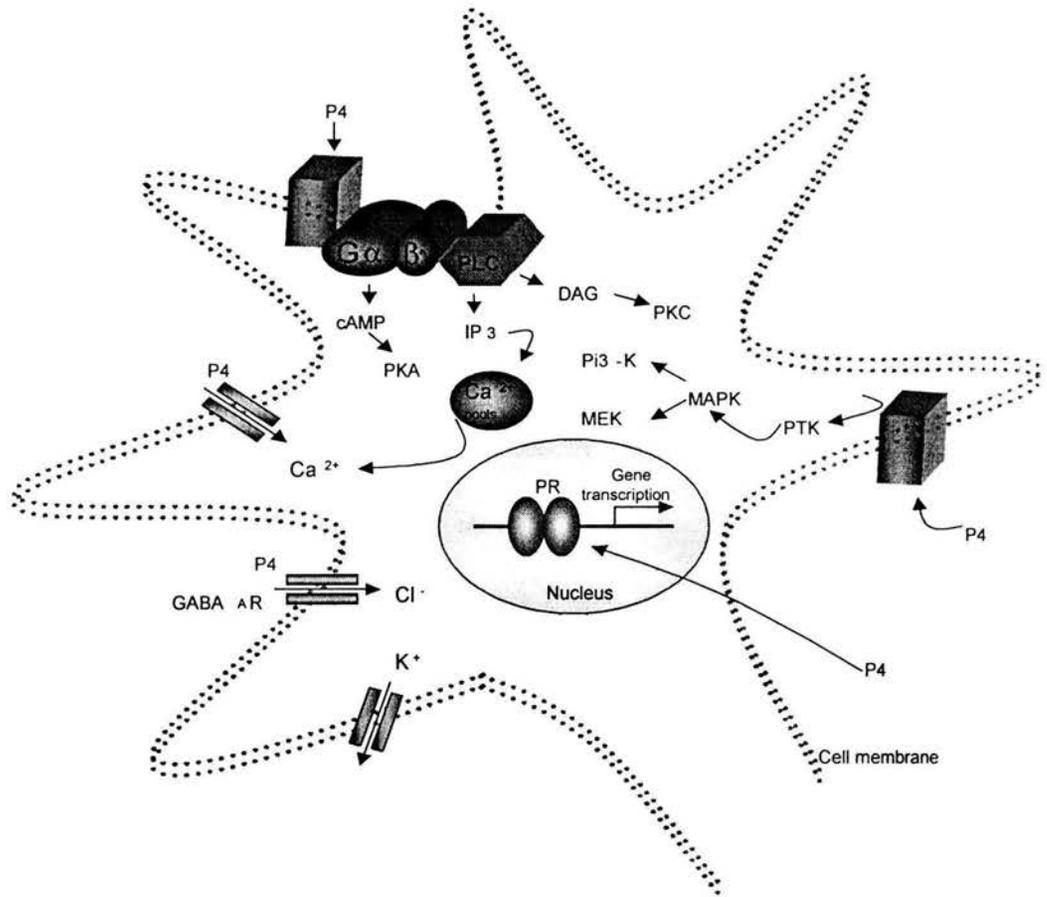


Figura 4. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de la P4. Los efectos de la P4 ocurren por 2 diferentes mecanismos celulares: 1) en la membrana, incluyen receptores membranales y canales, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares; 2) en el núcleo donde receptores a P4 (PR), que son moduladores directos de la expresión génica, mediante la interacción del complejo hormona-receptor con elementos de respuesta a hormonas, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA. G: Proteína G, αβγ: Subunidades de la proteína G, PKA: Proteína Cinasa A, RGABA_A: Receptor a GABA tipo A, RP: Receptor a P4, PLC: Fosfolipasa C, IP₃: Inositol Trifosfato, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PTK: Proteína de Tirosina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, MEK: Cinasa de MAPK, Cl⁻: Cloro, Ca²⁺: Calcio, K⁺: Potasio (Camacho-Arroyo, 2003).

En general, el mecanismo de acción genómico de la P4 sobre su receptor se lleva a cabo de la siguiente manera (Fig. 5) (Giangrande et al., 1997):

a) Unión de la P4 al RP, el cual se encuentra transcripcionalmente inactivo formando complejos oligoméricos con proteínas de choque térmico (HSP) como las HSP 70, 90, 59 (Beato, 1987; Chambraud et al., 1990; Schowalter et al., 1991).

b) Cambio conformacional inducido por la unión del ligando, separación del las HSP, fosforilación y activación del RP.

c) Dimerización del RP y aumento en su afinidad por secuencias reguladoras en el DNA, denominadas elementos de respuesta a P4 (ERP).

d) Unión del RP activado a su elemento de respuesta, el reclutamiento de cofactores de transcripción hacia la región promotora, que junto con la maquinaria basal de transcripción inician y regulan la síntesis del mRNA (Mahesh et al., 1996; Rowan et al., 2000).

e) Una vez que se ha llevado a cabo la transcripción del gen, el RP y la maquinaria transcripcional se desensamblan del gen blanco y el receptor regresa a la fase de inactivación.

Como se mencionó anteriormente, existen proteínas cofactoras que son capaces de modular la expresión y actividad del RP, por lo tanto se pueden considerar como reguladores fundamentales del RP. Funcionalmente los coactivadores sirven como puentes moleculares que unen al receptor con la maquinaria basal de transcripción (McKenna et al., 1999). Se ha observado que algunos coactivadores tienen actividades enzimáticas que contribuyen a potenciar la transcripción de genes. Los coactivadores de receptores a esteroides (SRC-1,

SRC-2, SRC-3), y el factor asociado a p300/CBP (p300/CBP y PCAF) tienen actividad de histona acetiltransferasa (HAT), mientras que miembros del complejo SWI/SNF presentan actividad de ATPasa (Lemon y Tjian, 2000). La actividad HAT modifica la estructura de la cromatina, neutralizando la carga positiva de las histonas, interrumpiendo las interacciones iónicas entre las histonas cargadas positivamente y cargando negativamente el esqueleto del DNA.

La actividad HAT es la primera función enzimática implicada en la transcripción que depende de receptores hormonales (Spencer et al., 1997). Físicamente los coactivadores que contienen actividad ATPasa son capaces de abrir la estructura local de la cromatina permitiendo un fácil acceso de otras proteínas auxiliares de la transcripción (Jenster et al., 1997).

Así como los coactivadores interactúan con el RP de manera específica para potenciar su efecto en la transcripción de genes, existen proteínas llamadas correpresores que ejercen el efecto contrario, ya que al asociarse con los receptores nucleares son capaces de reprimir la transcripción de un gen. El silenciador mediador para el receptor a ácido retinoico y a hormonas tiroideas (SMRT) y el correpresor de receptores nucleares (NcoR) son dos de los correpresores que comúnmente se unen a los receptores nucleares para inhibir la transcripción. Estas proteínas correpresoras median el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDAC) como HDCA1, HDCA2, mSin3A y mSin3B (Heinzel et al; 1997), lo que trae por consecuencia la represión génica (Heinzel et al., 1997, Jackson et al., 1997).

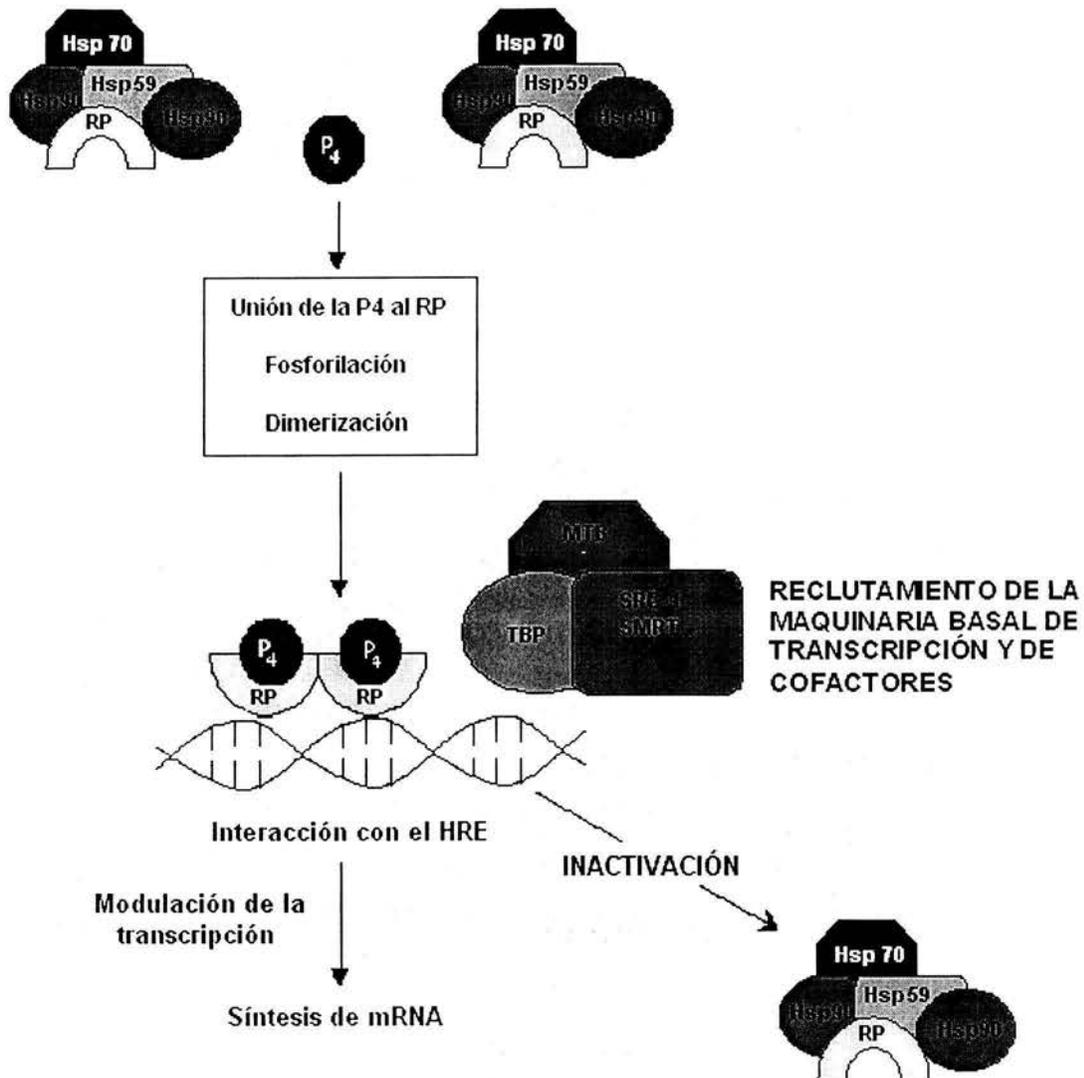


Figura 5. Mecanismo de acción genómica de la P4. El RP está presente en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico (HSP); cuando la P4 se une al RP, las HSP se disocian y el RP sufre cambios conformacionales que le permiten unirse a un elemento de respuesta hormonal (HRE), reclutar a cofactores y a la maquinaria basal de transcripción (MBT), lo cual modifica la transcripción del gen blanco. El complejo formado puede reclutar otros cofactores al promotor como el SRC-1 que pueden: 1) abrir la estructura de la cromatina a través de su actividad de histona acetil transferasa en el caso de los coactivadores; si se reclutan correpresores como SMRT, se presenta una

estructura más compacta de la cromatina por la actividad de histona desacetiltransferasa, y 2) contribuir a la estabilización del complejo de pre-iniciación (Giangrande et al., 1997).

3.2 El Receptor a P4 (RP).

3.2.1. Características del RP.

El RP pertenece a la familia de receptores a hormonas esteroideas, cuyos miembros regulan la expresión de genes en respuesta a la unión con su ligando (Kastner et al., 1990). El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de genes a través de la interacción con los elementos de respuesta a P4 (ERP), localizados principalmente en la región promotora de los genes regulados por P4. El RP presenta dos isoformas: una larga denominada B (108-120 KDa) y una corta denominada A (80-94 KDa) (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Ambas isoformas se generan a partir del mismo gen pero son reguladas por distintas regiones promotoras; las características de estas isoformas se describirán más adelante.

En los mamíferos y específicamente en el humano el gen del RP está localizado en el cromosoma 11p22-23, el tamaño de éste es de aproximadamente 90 kb y comprende 8 exones y 7 intrones (Fig. 6) (Misrahi et al., 1993). La homología entre los genes del RP de humano y el de rata es de un 85% y la identidad entre las proteínas es de un 96% (Park-Sarge y Mayo, 1994). Estructuralmente, las isoformas del RP están compuestas por cuatro dominios que llevan a cabo las siguientes funciones:

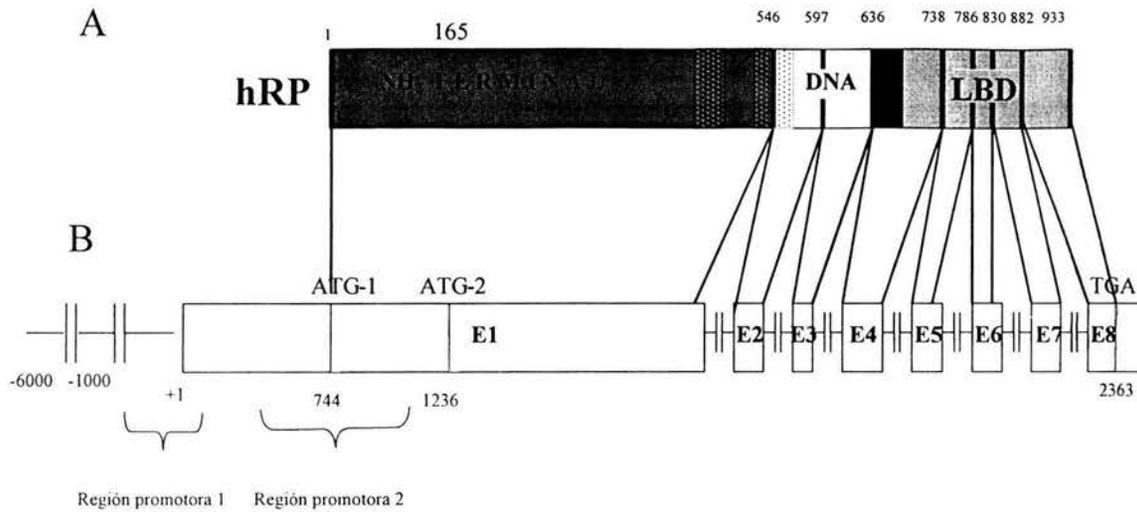


Figura 6. Estructura del gen del RP humano. A) Se esquematiza el RP del humano (hRP). La secuencia de aminoácidos del hRP está dividida en 4 dominios: el dominio amino terminal señalado en color gris oscuro, el dominio de unión al DNA señalado en color blanco, el dominio bisagra señalado en color negro y el dominio de unión al ligando (LBD) señalado en color gris claro. Las funciones de cada uno de estos dominios se describe en el texto. Las dos regiones altamente conservadas entre el RP del humano, el pollo y la rata están señaladas con puntos. Los límites de los exones están indicados con líneas verticales gruesas de color negro que corresponden a las posiciones de los aminoácidos, los cuales están señalados con números en la parte superior. B) Se esquematiza el gen del hRP que contiene dos regiones promotoras, 8 exones y 7 intrones, en donde los exones del 1 al 8 están señalados con la letra E mayúscula y el número correspondiente a cada exón. El tamaño de cada exón está indicado en el texto. Los intrones están señalados como líneas interrumpidas entre cada exón. La región promotora 1 se encuentra ubicada de la posición -711 a $+31$ y la 2 en la posición $+464$ a $+1105$. Se señalan las dos posiciones de inicio de la traducción (ATG) y la de término (TGA) (Misrahi et al., 1993).

Dominio NH₂ terminal (A/B): Se codifica a partir del exón 1 (2380 pb). Participa en la regulación de la transcripción de genes blanco ya que contiene funciones de transactivación.

Dominio de unión al DNA (C): Se codifica a partir de los exones 2 (152 pb) y 3 (117 pb). Participa en la dimerización con otro receptor y en la unión al DNA a través de la presencia de dedos de zinc.

Dominio bisagra (D): Se codifica a partir del exón 4 (306 pb). Participa en procesos de estabilización del receptor por unión a proteínas de choque térmico como Hsp90 y en la localización nuclear, ya que contiene el péptido señal de localización nuclear (NLS).

Dominio de unión al ligando (E): Se codifica a partir de los exones 5 (145), 6 (131), 7 (158) y 8 (153 pb). Participa en la interacción con el ligando y en la regulación de la transcripción, ya que contiene una función de transactivación.

El RP es una fosfoproteína cuya actividad puede ser regulada por fosforilación (Sheridan et al., 1989; Zhang et al., 1997). Existe evidencia de que la regulación de distintas vías de señalización celular alteran la actividad y la fosforilación del RP (Beck et al., 1992; Takimoto et al., 1996), así como de otros receptores a hormonas esteroideas (Ignar-Trowbirdge et al., 1992; Rogatsky et al., 1999). Algunos de estos cambios se deben a alteraciones directas en la fosforilación del RP, mientras que otros parecen afectar a proteínas asociadas (Rowan et al., 2000).

La fosforilación es un evento muy importante para que se lleve a cabo la transactivación de genes mediada por P4. El hRP contiene 14 sitios de fosforilación (Fig. 7), de los cuales 10 han sido identificados mediante ensayos de

fosforilación *in vitro* e *in vivo* (Ser²⁰, Ser⁸¹, Ser¹⁰², Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰, Ser²¹³, Ser²⁹⁴, Ser³⁴⁶, Ser⁴⁰⁰, Ser⁶⁷⁶) y cuatro únicamente por fosforilación *in vitro* (Ser²⁵, Ser¹³⁰, Thr⁴³⁰, Ser⁵⁵⁴) (Zhang et al., 1994 y 1995, Lange et al., 2000, Knotts et al., 2001). Hasta ahora se sabe que la P4 induce la fosforilación del RP en tres residuos que son la Ser¹⁰², Ser²⁹⁴ y Ser³⁴⁵ y que los residuos Ser⁸¹, Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰ y Ser⁴⁰⁰ son sitios basales que incrementan su fosforilación después del tratamiento con la hormona (Zhang et al., 1994 y 1995). Hasta el momento se conoce que los residuos Ser¹⁶² y Ser²⁹⁴ son fosforilados por las proteínas cinasas activadas por mitógenos 44 y 42 (MAPK-44 y MAPK-42) (Lange et al., 2000).

La fosforilación de sitios específicos del RP está acoplada a múltiples funciones del mismo, incluyendo localización nuclear en respuesta a la activación de MAPK, sinergismo transcripcional en presencia de P4 y regulación a la baja por acción del complejo ubiquitina-proteosoma 26S (Kazmi et al., 1993; Lange, 2004).

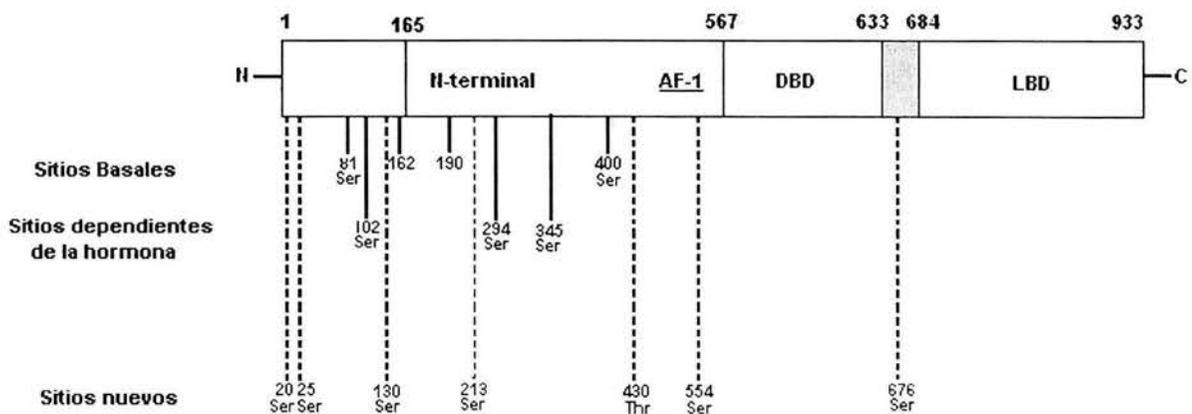


Figura 7. Sitios de fosforilación en el RP humano (hRP). Residuos de fosforilación en el hRP identificados hasta la fecha. Tomado de Knotts et al., 2001.

En estudios recientes se reportó que la CDK2 regula la actividad del RP en ausencia de progestinas a través de la fosforilación de la Ser⁴⁰⁰ (Pierson-Mullany y Lange, 2004).

El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por los ERP (Mahesh et al., 1996; Beato et al., 1989), y como se mencionó antes, la P4 induce la fosforilación del receptor para que éste pueda ser funcional y pueda llevar a cabo su efecto genómico. Sin embargo, la misma P4 induce la fosforilación en serinas como la 294, al fosforilarse este residuo se activa una vía de degradación del receptor, mediante la vía ubiquitina-proteosoma 26S. El proteosoma 26S es un complejo multiproteínico que degrada proteínas poliubiquitinadas, y cuya estructura y funcionamiento se detallarán más adelante (Lange, 2000; Lange et al., 2004).

Se ha detectado la presencia del RP en diferentes tejidos del aparato reproductivo de distintos grupos de vertebrados; en las células de la granulosa del ovario (Milgrom y Baulieu, 1970) en las trompas de Falopio, en la vagina, en el testículo (Turner, 1977); en las células de músculo de arterias uterinas (Perrot-Applanat et al., 1988); así como en el oviducto y bolsa de Fabricio de pollo (Ylikomi et al., 1985; González-Morán y Camacho-Arroyo., 1998). También se ha localizado el RP tanto en tejido normal como neoplásico de glándula mamaria (Pollow et al., 1977; Horwitz y McGuire., 1975) así como en distintas áreas del cerebro tales como el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza cerebral (Camacho-Arroyo et al., 1998b). También se encuentra en el timo (Pearce et al., 1983), islotes pancreáticos (Green et al., 1978); en células osteoblásticas (Gunn et al., 1999) y en el pulmón (Camacho-Arroyo et al., 1994).

3.2.2. Isoformas del RP.

Como ya se mencionó, se han identificado dos isoformas del RP, las cuales se han denominado A (80-94 kDa) y B (108-120 kDa) (Fig. 8). La isoforma A es la forma truncada de la isoforma B, ya que no contiene 164 aminoácidos en la región amino terminal que si contiene RP-B. Ambas isoformas se han identificado en diversas especies de roedores, primates y aves (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000), con excepción del conejo, en el cual sólo se ha detectado la isoforma B (Loosfelt et al., 1986).

En el ser humano y en la rata, ambas isoformas del RP son codificadas por el mismo gen, pero se transcriben a partir de dos secuencias promotoras distintas, una distal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-B) y otra proximal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-A), que dan lugar a diferentes mRNA (Kastner et al., 1990, Kraus et al., 1993) (Fig. 8).

Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad tanto por la P4 como por el ERP (Christensen et al., 1991). El RP tiene la capacidad de unirse al DNA como tres especies diméricas: AA, AB, BB. Se ha demostrado que la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman homodímeros o heterodímeros e interactúan con agonistas y antagonistas (Leonhardt et al., 1998).

Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo de célula, del gen blanco y del promotor (Tung et al., 1993). En muchos sistemas celulares la isoforma RP-B actúa como un activador transcripcional, mientras que el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad

transcripcional mediada tanto por RP-B como por otros receptores a hormonas esteroides (Vegeto et al., 1993; Tung et al., 1993; Sartorius et al., 1994; Clemm et al., 1995). En el útero del ratón se demostró que RP-A regula a los genes de la calcitonina y anfiregulina, mientras que RP-B a los de histidina descarboxilasa y lactoferrina (Mulac-Jericevic et al., 2000). En células T47D, derivadas de cáncer de mama, se observó que de 94 genes regulados por P4, 65 se regulan por medio del RP-B, 4 por el RP-A y 25 por ambas isoformas (Richer et al., 2002).

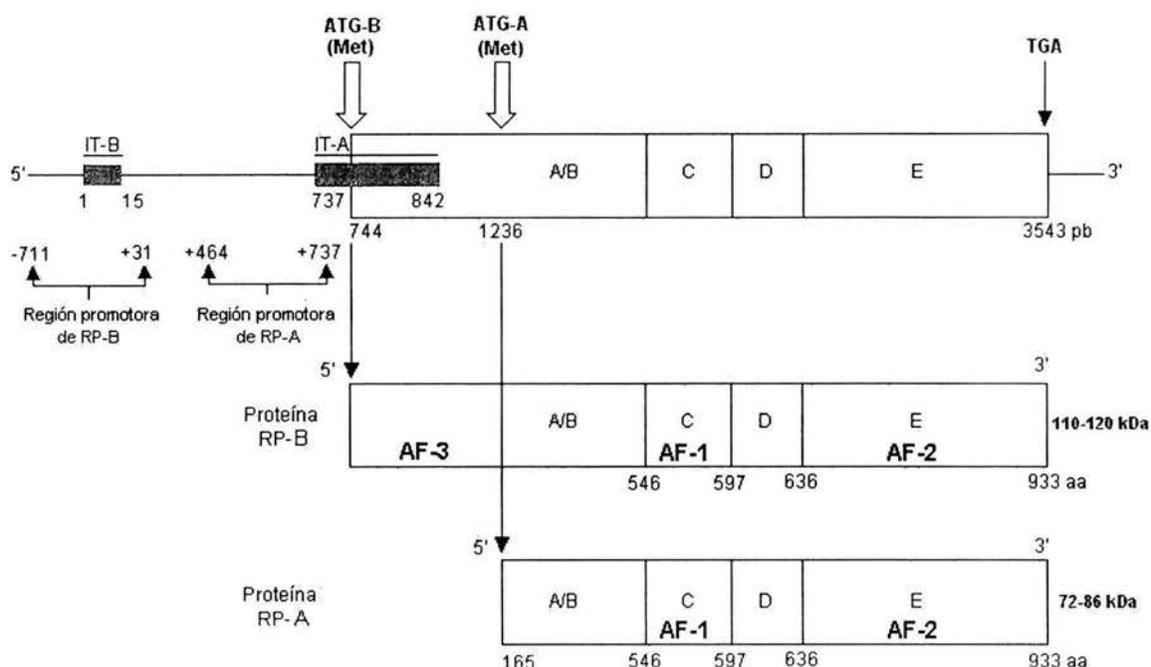


Figura 8. Organización de las isoformas del RP. Los números indican la posición de las bases y de los aminoácidos en el gen y en las proteínas de las isoformas de RP respectivamente. IT-B e IT-A: sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; A-E: dominios funcionales del RP; ATG-B y ATG-A: Inicio de la traducción de RP-B y RP-A respectivamente; Met: Metionina; TGA: Codón de término de la traducción. AF: Función de activación. Están indicados los pesos moleculares para las isoformas del RP de rata y humano, RP-A: 72-86 kDa y RP-B: 110-120 kDa (Kastner et al., 1990; Fujimoto et al., 1997, Park-Sarge y Mayo 1994; Kraus et al., 1993).

Se han detectado seis sitios de fosforilación que son exclusivos para la isoforma B del RP de humano (hRP) en los residuos Ser²⁰, Ser²⁵, Ser⁸¹, Ser¹⁰², Ser¹³⁰ y Ser¹⁶² y ocho sitios de fosforilación que son comunes para ambas isoformas en los residuos Ser¹⁹⁰, Ser²¹³, Ser²⁹⁴, Ser³⁴⁵, Ser⁴⁰⁰, Thr⁴³⁰, Ser⁵⁵⁴ y Ser⁶⁷⁶ (Knotts et al., 2001).

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

1.- La isoforma A carece de los primeros 164 aminoácidos presentes en la isoforma B (Graham et al., 1995).

2.- La existencia de tres regiones con funciones de activación (AF1, AF2 y AF3). Las dos primeras están presentes en ambas isoformas, mientras que AF3 solamente se encuentra en el RP-B (Giangrande et al., 1999) (Fig. 8).

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

4. Los homodímeros son más estables que los heterodímeros. En cuanto a la actividad, los homodímeros B:B son mejores activadores de la transcripción que los heterodímeros B:A, mientras que los homodímeros A:A son los que presentan la menor actividad transcripcional (Leonhardt et al., 1998).

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

ambas isoformas (Knotts et al., 2001). La diferente distribución y regulación de estos sitios de fosforilación en las isoformas del RP puede conferirles diferentes estados conformacionales, que los pueden hacer más o menos afines por las secuencias blanco y regular la transcripción de un gen.

6.- RP-A presenta mayor afinidad por el correpresor SMRT mientras que RP-B tiene mayor afinidad por el coactivador SRC-1. Por otro lado, RP-A es incapaz de reclutar eficientemente a los coactivadores transcripcionales como la proteína que interactúa con el receptor a glucocorticoides-1 (GRIP-1) y SRC-1 (Giangrande et al., 1999).

Estas observaciones llevan a sugerir que una alteración en la expresión o en la actividad de las isoformas del RP puede tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la P4.

La tasa de expresión de las dos isoformas varía en diferentes órganos y tejidos blanco (Ing et al., 1993, Graham y Clarke, 1997; Camacho-Arroyo, 2003), lo que sugiere que la expresión diferencial puede ser crítica para la respuesta celular a la P4 (Camacho-Arroyo et al., 1998).

El RP-A es predominante en el útero de roedores (Ilenchuck y Walters, 1987) así como en el sistema reproductivo de monos y humanos (Duffy et al., 1997, Mote et al., 1999), mientras que RP-B es más abundante en el área preóptica de la rata (Guerra-Araiza et al., 2003).

3.2.3. Regulación de la expresión del RP.

El mRNA del RP es regulado de manera positiva por estrógenos y de manera negativa por P4 en muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo (Graham et al., 1997, Camacho-Arroyo et al., 1994 y 1996, Mendoza-Rodríguez et al., 1999).

La regulación positiva del RP por estrógenos se debe a que en el promotor del gen de este receptor se han determinado elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Por ejemplo en la rata se ha determinado que en la región del promotor para RP-A existen 2 ERE, uno completo que contiene una secuencia palíndrome que varía en dos nucleótidos de la secuencia consenso, ubicado en la posición +615/637 del gen del RP y otro sitio más que únicamente contiene la mitad del ERE en la posición +462/+466 (Kraus et al., 1993a). En la región del promotor para RP-B no se han detectado ERE consenso, sin embargo se han determinado sitios de unión al factor de transcripción conocido como proteína específica 1 (Sp1) en la posición -49/-41 (Kraus et al., 1993), que puede actuar junto con el RE (Salvatori et al., 2003, Khan et al., 2003) para promover la transcripción del RP.

En la rata, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación negativa de la transcripción del gen del RP por P4 son hasta el momento desconocidos. Es posible que en tal regulación participen otras proteínas, dada la carencia de elementos de respuesta a P4 (ERP) en el gen del RP (Kraus et al., 1993a, Savouret et al., 1991).

La tasa de expresión de las isoformas del RP varía en función del tipo de tejido, en respuesta a los estímulos hormonales y de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se encuentre el organismo. En ratas recién nacidas se ha reportado una expresión diferencial de las isoformas del RP en la corteza cerebral, en el área preóptica y en el hipotálamo, ya que la isoforma predominante es la RP-B, pero esta expresión se modifica alrededor del día 12 después del nacimiento, cuando la isoforma predominante es la RP-A (Kato et al., 1993). En el cerebro del pollo, el contenido de ambas isoformas del RP aumenta durante los días 8 y 13 del desarrollo embrionario y en recién nacidos (Camacho-Arroyo et al., 2003). La expresión de RP-A en el hipotálamo es mayor en las ratas macho adultas intactas que la observada en los animales prepúberes, mientras que en el área preóptica, el cerebelo, la corteza frontal, el hipocampo y el bulbo olfatorio ambas isoformas se expresaron de manera similar (Guerra-Araiza et al., 2001).

En el útero de roedores y primates la tasa de expresión de RP-A varía durante los ciclos reproductivos (Ilenchuk y Walters, 1987; Mangal et al., 1997 y Duffy et al., 1997, Mote et al., 1999). Para el caso de la mujer se sabe que la expresión de ambas isoformas alcanza su máximo durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual cuando las concentraciones de E son elevadas y las de P4 bajas; sin embargo, la tasa de expresión RP-A:RP-B es de 10:1 durante la primera semana del ciclo (niveles de E y P4 bajos); en los días 9 a 13 es aproximadamente de 5:1 (niveles de E altos y P4 bajos); en los días 14-16 es 2:1 (niveles altos de P4 y E) y hacia el final del ciclo RP-B es prácticamente indetectable (niveles bajos de E y P4) (Mangal et al., 1997).

En la hipófisis de la rata se han reportado cambios en la expresión de las isoformas del RP durante el ciclo estral, siendo notorio el aumento de la expresión de ambas isoformas en la mañana del proestro (Szabo et al., 2000).

Se han observado claras diferencias en la regulación de la expresión del mRNA de las isoformas del RP (Camacho-Arroyo et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2000). En el hipotálamo de ratas ovariectomizadas, la expresión del mRNA de ambas isoformas del RP fue inducida por estrógenos y reducida por la P4, y en el área preóptica estos cambios sólo se presentaron en RP-B, mientras que en el hipocampo la isoforma que presentó inducción con estrógenos fue RP-A sin que la P4 tuviera efectos en la expresión de ambas isoformas (Camacho-Arroyo et al., 1998b). Las proteínas de ambas isoformas se regularon positivamente por E en el hipotálamo y en el área preóptica, mientras que la P4 reguló negativamente a ambas isoformas en el hipotálamo más no en el área preóptica. En el hipocampo sólo el contenido de RP-A se incrementó por E y disminuyó por P4 (Guerra-Araiza et al., 2003). En el ciclo estral de la rata el mRNA del RP-B fue predominante en el hipotálamo en el día del proestro, mientras que el contenido más bajo de la proteína de ambas isoformas se detectó durante el diestro. En el hipocampo no se detectó una diferencia importante entre la expresión del mRNA y de las proteínas de las isoformas del RP (Guerra-Araiza et al., 2000 y 2003). En varios sistemas celulares in vitro, se ha reportado que la P4 regula negativamente a su receptor a nivel de su degradación por el proteosoma 26S (Lange, 2000; Turgeon y Waring, 2000; Shen et al., 2001; Lange et al., 2004).

3.3. El sistema ubiquitina-proteosoma.

3.3.1. Ubiquitinación, estructura del proteosoma y mecanismo de acción.

La vía del proteosoma-ubiquitina degrada diversas proteínas celulares con gran especificidad. Para que esta vía sea eficiente, una maquinaria de ubiquitinación altamente compleja y elaborada es empleada para reconocer selectivamente sustratos específicos. La ubiquitina está constituida por 76 aminoácidos y su secuencia primaria está altamente conservada desde levaduras hasta mamíferos, lo que resulta en una estructura terciaria idéntica (Vijay-Kumar et al., 1987).

La ubiquitina se une a una proteína blanco por un enlace isopeptídico formado entre el grupo amino de la lisina y un residuo de glicina del extremo C-terminal de la ubiquitina por una serie de enzimas conjugadas a la ubiquitina, E1, E2 y E3.

En el primer paso de la cascada de conjugación de ubiquitinas, el grupo carboxilo de la Gly 76 de la ubiquitina es activado por la enzima activadora de ubiquitina (E1). Este paso involucra la hidrólisis de ATP a Ppi para generar el intermediario adenilato de ubiquitinil unido a la enzima E1. Subsecuentemente un residuo de Cys en el sitio activo de E1 se une covalentemente a la ubiquitina a través de un enlace tioester de alta energía con la consecuente liberación de AMP. Después de la activación, la ubiquitina activada es transferida por transacilación al grupo tiol de un residuo de cisteína en el sitio activo de proteína acarreadora de ubiquitina o enzima conjugadora de ubiquitina (E2). El último paso ocurre por la

transferencia de la ubiquitina de E2 a E3, la cual acepta a la ubiquitina a través de un enlace tiol y después la transfiere a la proteína sustrato. El ciclo se repite hasta que la proteína está marcada con una cadena de moléculas de ubiquitina. Esta cadena se une al proteosoma, lo cual permite que las enzimas cercanas abran el proteosoma para poder introducir la proteína marcada a la cámara proteolítica, donde otras enzimas la fragmentarán (Fig. 9). En algunos casos, sin embargo, parece que la E2 transporta la ubiquitina directamente a una proteína sustrato para formar un enlace amido-isopéptido entre el grupo carboxilo de la Gly 76 de la ubiquitina y el grupo ϵ -amino de un residuo interno de Lys en la proteína sustrato (Myung et al., 2001).

Diversos estudios han demostrado la importancia de las proteínas que participan en la ubiquitinación para la viabilidad celular; por ejemplo la levadura presenta una sola E1 llamada UBA1 y la inactivación de este gene es letal (Hatfield y Vierstra, 1992).

Es importante saber que la selectividad y especificidad de este sistema están determinadas por dos distintos grupos de proteínas: 1) E3 y 2) proteínas auxiliares. Primero, dentro del sistema de ubiquitina, los sustratos pueden ser específicamente reconocidos por una E3 apropiada como un prerrequisito para su ubiquitinación. En muchos casos, los sustratos no son reconocidos directamente por una E3. Sin embargo la E3 puede ser activada por una modificación post-traducciona que permite una forma activa que reconoce al sustrato (Hershko y Ciechanover, 1998; Fig. 9).

Además de las E3, enzimas (como las cinasas), proteínas auxiliares o secuencias de DNA las cuales se unen al sustrato, también tienen un papel importante en el proceso de reconocimiento.

El proteosoma es un complejo macromolecular de ~2.5 MDa, constituido al menos por 32 diferentes subunidades que se encuentran conservadas en los eucariontes. La estructura general puede ser dividida en dos subcomplejos mayores: la subunidad 20S que es el núcleo del proteosoma y posee la actividad proteolítica (Heinemeyer y Wolf, 2000) y las subunidades reguladoras 19S (Coux, 1996).

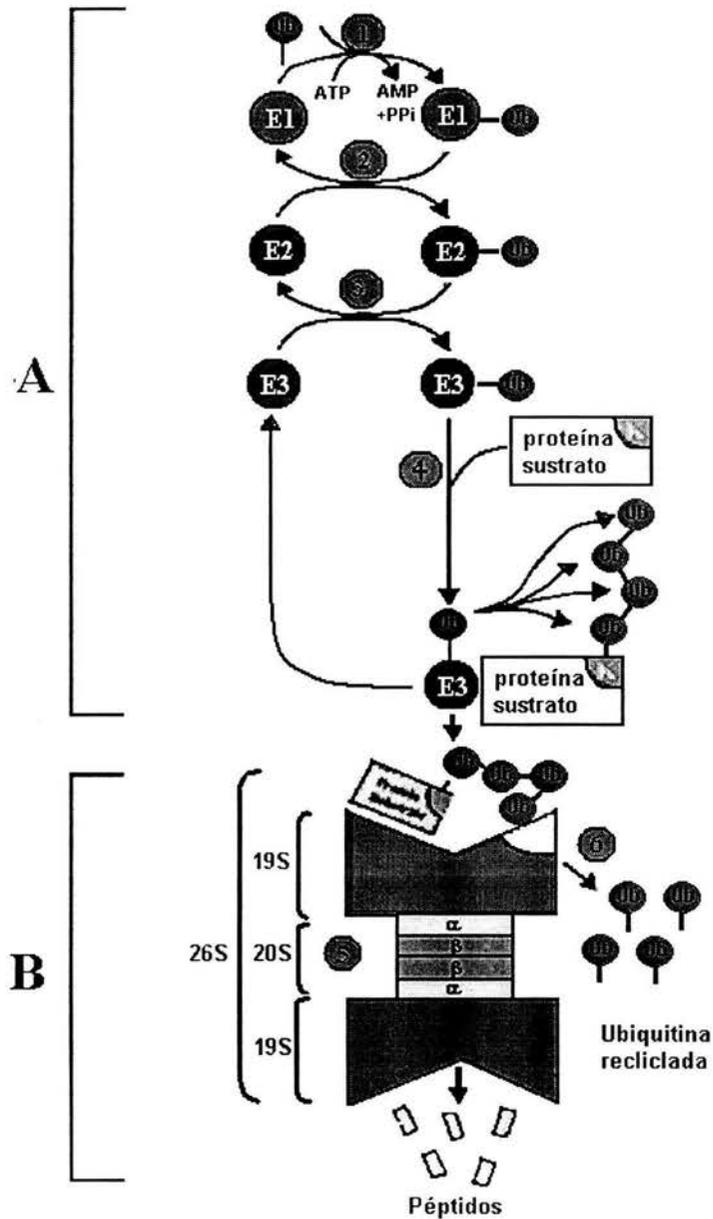


Figura 9. La vía ubiquitina-proteosoma. A) Conjugación o unión de ubiquitina a una proteína blanco de manera que la proteína marcada sea reconocida específica y eficientemente, para ser degradada por el proteosoma 26S. B) Degradación de la proteína marcada por el proteosoma 26S. 1)Activación de la ubiquitina por E1. 2)Transferencia de la ubiquitina activada de E1 a un miembro de la familia E2. 3)Transferencia de la ubiquitina activada de E2 a una E3 específica. 4)Formación de un complejo E3-sustrato y biosíntesis de una cadena de poliubiquitina. 5)Unión del sustrato poliubiquitinado a la subunidad 19S del complejo del proteosoma y la degradación del sustrato a péptidos pequeños por el proteosoma 20S. 6)Reciclaje de las moléculas de ubiquitina por la acción de otras enzimas (Ciechanover, 1998).

El proteosoma 26S degrada proteínas poliubiquitinadas a péptidos pequeños. La partícula central 20S es una estructura en forma de barril compuesta por cuatro anillos, dos anillos α externos y dos anillos β internos (Coux et al., 1996, Hershko y Ciechanover, 1992) (Fig. 10). En eucariontes, los anillos α y β están constituidos por siete distintas subunidades, dando como resultado el complejo 20S con una estructura general $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$.

Los sitios catalíticos están localizados en algunas subunidades β ; cada extremo de la estructura cilíndrica 20S está cubierto por una partícula reguladora 19S. Una función importante de la estructura 19S es reconocer proteínas ubiquitinadas y otros sustratos potenciales de degradación por el proteosoma. Una segunda función de la subunidad 19S es abrir un orificio en el anillo α que permitirá la entrada del sustrato en la estructura proteolítica. Debido a que las proteínas plegadas no pueden ser capaces de entrar al proteosoma 20S, se asume que la subunidad 19S es la responsable de desdoblarlas e introducirlas a la partícula catalítica 20S. Tanto la apertura del canal como el desdoblamiento de las proteínas sustrato requiere de un gasto de energía, la cual es aportada por la partícula reguladora 19S que contiene seis diferentes ATPasas (Braun et al., 1999, Horwich et al., 1999). Después de la degradación del sustrato, se generan péptidos pequeños y las moléculas de ubiquitina se liberan como moléculas reutilizables.

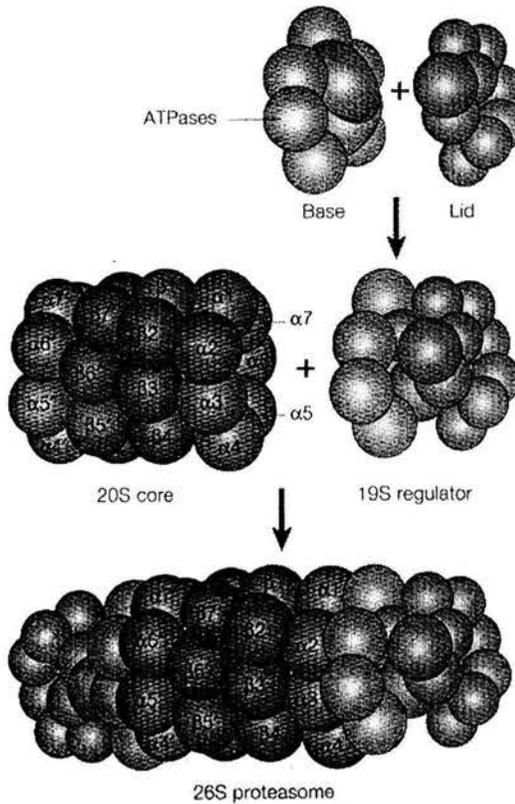


Figura 10. Estructura general del proteosoma. El proteosoma es un complejo multicatalítico formado por núcleo catalítico 20S y por las subunidades reguladoras 19S.

La proteólisis de una gran variedad de proteínas celulares mediada por la vía ubiquitina-proteosoma juega un papel importante en muchos procesos celulares básicos, como la regulación del ciclo celular, la división celular, diferenciación y desarrollo involucrados en la respuesta celular al estrés y a efectores extracelulares, morfogénesis de redes neuronales, modulación de receptores de superficie celular, canales iónicos y la vía secretora, reparación del DNA, regulación transcripcional, silenciamiento transcripcional, memoria a largo plazo, ritmos circadianos, regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, y la biogénesis de organelos (Ciechanover, 1998; Glickmann y Ciechanover, 2002).

La lista de proteínas celulares que son blanco de ubiquitinación va en aumento; dentro de éstas se encuentran las ciclinas, inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas, proteínas involucradas en la separación de cromátidas hermanas, proteínas supresoras de tumores, así como activadoras transcripcionales y sus inhibidoras. Los receptores de superficie celular y proteínas de retículo endoplásmico también son blanco de este sistema. Particularmente las proteínas mutadas, desnaturalizadas y/o mal plegadas son reconocidas y removidas eficientemente por este sistema (Goldberg, 2003). Finalmente, se ha visto que los receptores nucleares a hormonas esteroides también son blanco del proteosoma (Dennis et al., 2001). Este sistema es clave en el control de calidad de proteínas, en los mecanismos de defensa y en la homeostasis celular.

El mecanismo proteolítico del proteosoma ha sido relativamente difícil de entender, en gran medida porque sus subunidades no muestran homología en sus secuencias con otras proteasas comunes.

Estructuralmente, la subunidad 20S está formada por cuatro anillos, cada uno de siete subunidades. Los dos anillos β internos tienen la actividad proteolítica de tripsina, quimiotripsina y de peptidilglutamil hidrolasa (PGPH) (Cardozo, 1993; Orłowski y Wilk, 2000), mientras que los dos anillos α son el sitio de unión para la subunidad reguladora 19S (Glickman y Ciechanover, 2002). Estudios estructurales y de mutagénesis han revelado que las treoninas presentes en el extremo amino-terminal de las subunidades β tienen una función catalítica nucleofílica. Esto en contraste con otras proteasas, como las proteasas de cisteína y serina, que utilizan un aminoácido interno como nucleófilo (Myung et al., 2001). En estudios

realizados para mapear los sitios activos de las subunidades catalíticas del proteosoma 20S han revelado que la subunidad $\beta 1$ es responsable de la actividad de PGPH o caspasa (Hilt et al., 1993, Enenkel et al., 1994), $\beta 5$ provee la actividad de quimiotripsina y $\beta 2$ es necesaria para la actividad de tripsina (Dick et al., 1998, Heinemeyer et al., 1993, Salzman et al., 1999) (Fig. 11).

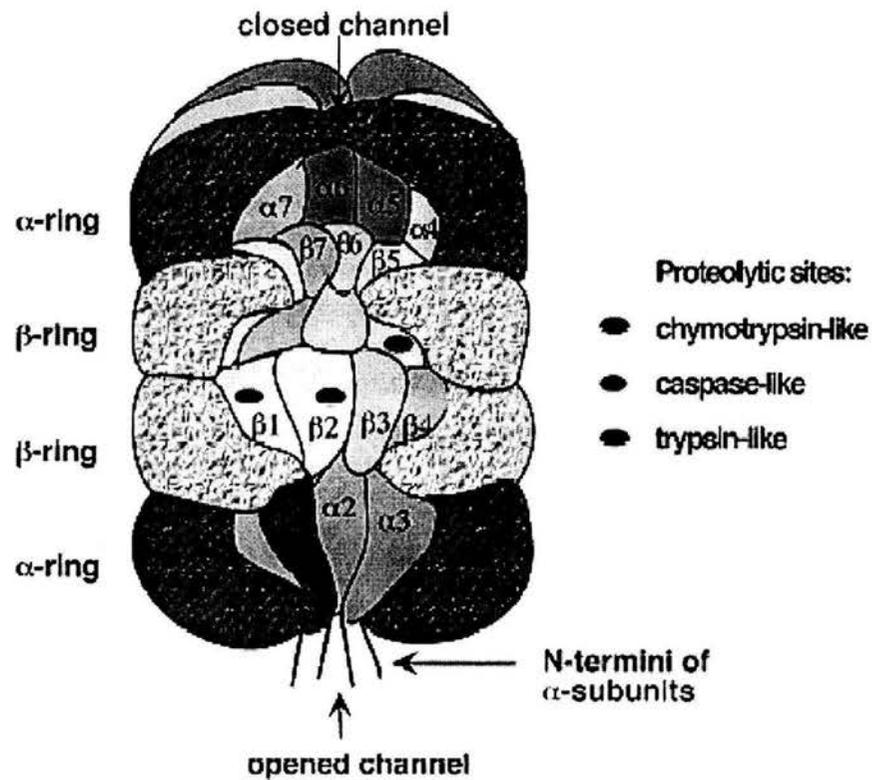


Figura 11. Subunidades catalíticas del proteosoma 20S. Los anillos heptaméricos β se encuentran en el interior de la cámara del proteosoma 20S, estas subunidades son las que poseen la actividad catalítica de quimiotripsina, tripsina o PGPH o caspasa, las subunidades de los anillos α participan en el ensamblaje del complejo 26S (Kisselev y Goldberg, 2001).

Basado en la alta homología en secuencias las subunidades catalíticas entre los proteosomas de levaduras y de mamíferos, la subunidad X (la contraparte de mamífero a la subunidad $\beta 5$ de levadura) tiene la actividad de quimiotripsina, Y (la contraparte de mamífero a la subunidad $\beta 1$ de levadura) tiene la actividad de PGPH, y Z (la contraparte de mamífero a la subunidad $\beta 2$ de levadura) para la actividad de tripsina (Orlowski y Wilk; 2000). En general, estas asignaciones concuerdan con extensos estudios utilizando inhibidores de este sistema de degradación. Cada uno de los sitios activos contenidos en las subunidades β preferencialmente corta después de un aminoácido diferente: $\beta 1$ corta después de un aminoácido ácido o un hidrofóbico pequeño, $\beta 2$ corta después de residuos básicos o hidrofóbicos pequeños, mientras que $\beta 5$ corta el enlace peptídico después de residuos hidrofóbicos (Dick et al., 1998).

Se ha demostrado que el sitio activo nucleofílico es el grupo hidroxilo de la treonina terminal de la subunidad β del extremo N-terminal. Existen evidencias que apoyan este mecanismo en células de eucariontes a partir de experimentos con lactacistina y lactonas que son inhibidores del proteosoma en mamíferos. Estos inhibidores se unen a la treonina terminal en la subunidad β por medio de un ataque nucleofílico.

Se ha incrementado la evidencia de que el proteosoma es una estructura dinámica que forma múltiples interacciones con subunidades asociadas transitoriamente y con factores celulares necesarios para distintas funciones, como la localización celular, presentación de sustratos, interacciones sustrato específicas o generación de distintos productos.

Tomando en cuenta que es numerosa la cantidad de proteínas blanco para el sistema del proteosoma-ubiquitina, no es sorprendente que las aberraciones o los errores que se pueden presentar en esta vía estén implicados en muchas patologías humanas. Recientemente se ha demostrado que el sistema del proteosoma está involucrado en padecimientos como las enfermedades de Parkinson, Alzheimer, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (Ciechanover y Brundin, 2003). En algunos casos la relación entre el sistema proteolítico y la patología resultante es directa, mientras que en otras es menos evidente.

3.3.2. Inhibidores del proteosoma.

Desde que se purificó y caracterizó bioquímicamente el proteosoma, ha sido necesario el desarrollo y el uso de inhibidores de origen natural y sintéticos capaces de bloquear la actividad proteolítica de este sistema y así determinar cual es su mecanismo de acción, así como de poder dar un significado fisiológico de este sistema en la célula (Tabla 2).

El inhibidor del proteosoma natural más conocido y utilizado es la lactacistina, es un metabolito de *Streptomyces lactacystinaeus*, que ha sido utilizado para inhibir la progresión del ciclo celular (Fenteany et al., 1994); posteriormente se demostró que es capaz de inhibir el proteosoma específicamente por una modificación irreversible en la treonina amino-terminal de las subunidades β (Fenteany et al., 1995).

La epoxomicina es un miembro de la familia de los péptidos α',β' -epoxicetonas. Este compuesto también es capaz de inhibir al proteosoma de

manera específica (Sin et al., 1999; Meng., 1999). Aunque la lactacistina y la epoxomicina son los inhibidores naturales del proteosoma mejor conocidos por su potencia y especificidad, existen otros compuestos como la gliotoxina que también bloquea la actividad de quimiotripsina del proteosoma (Kroll et al., 1999).

Existen distintos tipos de inhibidores del proteosoma sintéticos, entre éstos se encuentran las benzamidas, las α -cetoamidas, los péptidos aldehídos, los péptidos α -cetoaldehídos, las vinil sulfonas y los ácidos borónicos. Dentro de los inhibidores sintéticos más ampliamente utilizados se encuentran los péptidos aldehídos que tienen la capacidad de inhibir la actividad de proteasas de serina y cisteína. Debido a que el grupo funcional aldehído es susceptible a ser atacado nucleofílicamente por los grupos hidroxilo o tiol y a que el proteosoma emplea el grupo hidroxilo de la serina que se encuentra en su extremo amino-terminal como un nucleófilo.

Después de la unión al sitio activo del proteosoma 20S, los péptidos aldehídos forman un enlace covalente hemiacetal que es reversible bajo condiciones fisiológicas; ya que los péptidos aldehídos pueden ser fácilmente preparados y utilizados, los investigadores han diseñado múltiples inhibidores con alta potencia, así como con alta selectividad para bloquear la actividad de quimiotripsina del proteosoma 20S. Algunos ejemplos son el MG115, el MG132 (Rock et al., 1994), y el PSI (Wilk y Figueiredo-Pereira, 1993) que son potentes inhibidores, permeables y selectivos de quimiotripsina, y que han sido ampliamente usados en el estudio de la función del proteosoma en diversos procesos celulares (Vinitzky et al., 1994).

TABLA 2. INHIBIDORES DEL PROTEOSOMA

TIPO DE INHIBIDOR NATURALES	NOMBRE	ACTIVIDAD	CARACTERÍSTICAS		REFERENCIAS
			POTENCIA	SELECTIVIDAD	
Lactacistina y derivados	Lactacistina,	irreversible	alta	quimiotripsina	1-4
	<i>clasto-lactacistina</i> <i>β-lactona</i>				1, 3, 4
epoxiketonas	Epoxomicina	irreversible	alta	quimiotripsina	1, 3, 4
	Dihidroeponeomicina YU101				
gliotoxina	Gliotoxina	reversible	alta	quimiotripsina	1, 3, 4
SINTÉTICOS					
péptidos aldehídos	PSI	reversible	Muy alta	quimiotripsina	1-4
	ALLN MG132 MG115				
vinil sulfonas	NLVS	irreversible	alta	tripsina Proteasas de cisteína	1-4
	YLVS				
ácidos borónicos	PS341	reversible	media	Proteasas de Serina	1-4
	PS273				
	DFLB				

(1) Rivett y Gardner, 2000.

(2) Lee y Goldberg, 1998

(3) Kisselev y Goldberg, 2001

(4) Bogoy y Wang, 2002.

3.3.3 El proteosoma 26S y la degradación de receptores nucleares.

Recientemente se ha demostrado que varios miembros de la familia de los receptores nucleares son degradados por el sistema del ubiquitina-proteosoma de manera dependiente de ligando. La señal para que una proteína sea degradada no está bien determinada, aunque la fosforilación en residuos de aminoácidos específicos o la unión de proteínas cofactoras a los receptores puede conducir a la degradación por el proteosoma 26S. La activación y la degradación son mecanismos cíclicos, los cuales participan en un control estricto en diversos procesos celulares (Dennis et al., 2001).

El proceso de degradación involucra la pérdida de proteínas y requiere de gasto de ATP celular. Se ha visto que una de las funciones importantes en la que participa el proteosoma 26S es la eficiente y apropiada regulación de la transcripción. Una de las posibles razones de la degradación de los receptores nucleares es prevenir la sobreestimulación hormonal o de otras señales. El recambio de los receptores nucleares también puede regular el reinicio del aparato transcripcional y la preparación para una subsecuente respuesta a otros estímulos o necesidades de la célula.

Se ha visto que la vía de degradación del sistema ubiquitina-proteosoma altera la actividad transcripcional de algunos de los receptores nucleares como el receptor a Vitamina D, el receptor a hormonas tiroideas, el receptor a ácido retinoico, el RE y el RP (Nawaz et al., 1999; Lange y Shen, 2000; Masuyama y MacDonald, 1998; Zhu et al., 1999). Existe evidencia de que la degradación de los receptores nucleares a hormonas esteroideas hace posible el reciclaje de los

componentes del complejo receptor-cofactor y de la maquinaria basal de transcripción (McKenna et al., 1998).

Se ha demostrado que no sólo los receptores nucleares son ubiquitinados y degradados por el proteosoma, también se ha visto que correpresores como N-CoR y SMRT (Perrissi et al., 2004), y miembros de la familia de coactivadores a hormonas esteroides (SRC), CBP y E6-AP son ubiquitinados (Zhang et al., 1998; Lonard et al., 2000; Yan et al., 2003).

En publicaciones recientes se ha reportado que la ubiquitinación está acoplada a la actividad de otros factores de transcripción (Kim y Maniatis, 1996, Chen et al., 1996, Tang et al., 1997; Li et al., 1997). Esta evidencia sugiere que la vía del proteosoma es crítica para la transcripción mediada por receptores a hormonas esteroides (Dennis et al., 2001).

Es posible entonces que la degradación de receptores nucleares y cofactores a través de la vía del proteosoma 26S pueda ser la forma en la que se desensamble y reensamble el complejo de activación del inicio de la transcripción, además la hipótesis de degradación del complejo receptor-coactivador sugiere que el recambio de sus componentes debe ser continuo y dinámico. Cada nuevo complejo formado requerirá concentraciones suficientes de ligando para interaccionar con su receptor, una cantidad suficiente de receptor y una adecuada concentración de coactivadores para mantener la expresión de los genes regulados por los receptores nucleares en respuesta a los niveles hormonales apropiados o estímulos recibidos por la célula (Dennis et al., 2001).

3.3.3.1. Regulación del RP por el proteosoma 26S.

Se sabe que la fosforilación de receptores a hormonas esteroides modifica su actividad transcripcional. Los eventos de fosforilación y desfosforilación pueden servir para regular al receptor, integrando señales de otras vías por la alteración de la localización subcelular, interacciones proteína-proteína o la propia degradación del receptor (Knotts et al., 2001; Rao et al., 1987; Takimoto y Horwitz, 1993; Zhang et al., 1994; Weigel, 1996).

En células de cáncer de mama, se ha visto que la actividad de MAPKs aumenta; particularmente la activación de p42 y p44 hace que aumente la actividad transcripcional del RP en presencia de progestinas, sin embargo este estímulo también es capaz de disparar su rápida degradación por el sistema ubiquitina-proteosoma (Pierson-Mullany et al., 2003).

Se ha caracterizado el papel de la fosforilación del RP en el residuo Ser²⁹⁴ por MAPK en la degradación del receptor por el sistema ubiquitina-proteosoma (Lange et al., 2000), en el RP este sitio se encuentra dentro de una "caja de destrucción" de 9 aminoácidos, posteriormente se une covalentemente una (o varias) moléculas de ubiquitina a residuos de lisina del RP. La especificidad de la fosforilación como una señal para la ubiquitinación y degradación del RP por el proteosoma 26S ha sido confirmada a través de ensayos de mutación de los residuos de Ser 294, 344 y 345 por Ala, en células T47D tratadas con progestinas (R5020) observando que sólo la mutación en el sitio 294 es capaz de bloquear completamente la degradación del RP mediada por su ligando, mientras que las mutaciones en las Ser 344 y Ser 345 no tuvieron efecto (Shen et al., 2001). En

ensayos de coimmunoprecipitación se observó que el RP con la mutación S294A no es capaz de ubiquitinarse y por lo tanto de ser degradado por el proteosoma (Lange et al., 2000).

De manera interesante, se ha observado que después de la unión con su ligando, la subsecuente fosforilación del residuo de Ser 294 por MAPK se promueve la exportación del receptor desde el núcleo hacia el citoplasma para ser degradado por el proteosoma (Qiu et al., 2003) (Fig. 12).

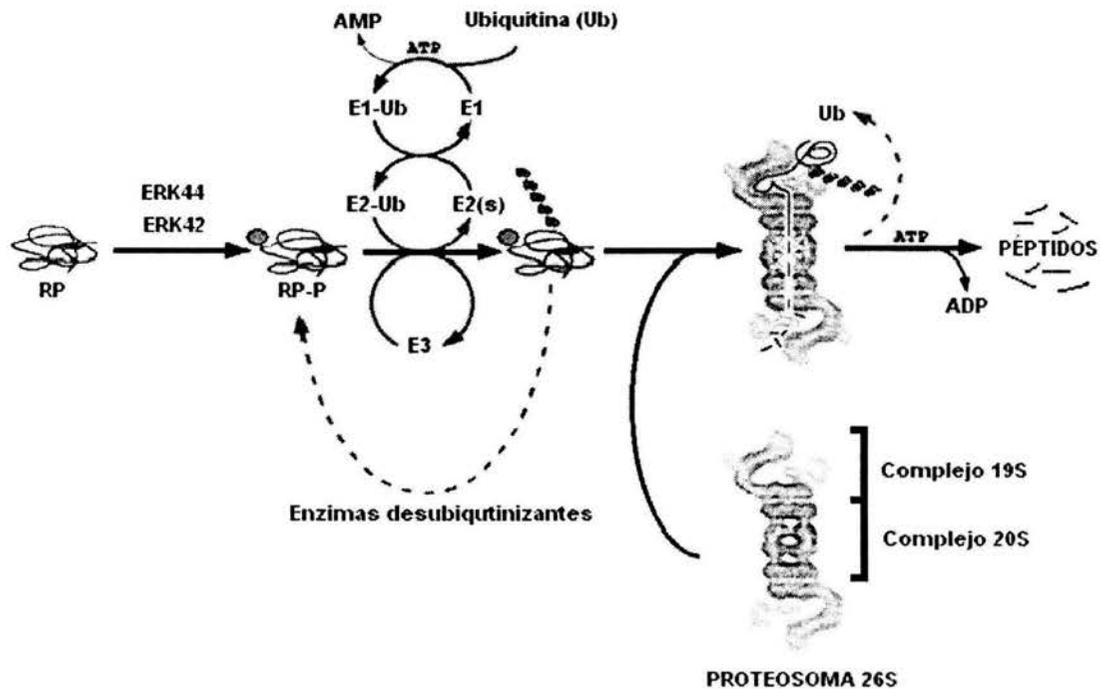


Figura 12. Degradación del RP por el proteosoma 26S. El RP es fosforilado por las MAPK's ERK42 y REK44, esto sirve como señal para su ubiquitinación, de esta manera el RP ubiquitinado es reconocido para su degradación por el proteosoma 26S.

Se ha demostrado que el RP se localiza preferencialmente en el núcleo en presencia de factores de crecimiento (GF), lo cual promueve la permanencia del RP, previene la degradación del receptor e induce la actividad transcripcional; se ha visto que los GF por si mismos son capaces de activar al RP de manera independiente del ligando (Shen et al., 2001, Richer et al., 1998), de modo que la localización nuclear del RP en respuesta a GF puede funcionar más eficientemente en presencia de P4, antes de su degradación citoplásmica.

Sin embargo, existen diversos mecanismos por medio de los cuales los receptores a hormonas esteroides pueden entrar y salir del núcleo (Guiochon-Mantel et al., 1989, Guiochon-Mantel et al., 1991, Guiochon-Mantel et al., 1994, Tyagi et al., 1998) de modo que la activación y degradación del receptor en respuesta a estímulos hormonales está finamente controlada (Qiu y Lange, 2003).

Por otro lado, se ha visto que en células de la hipófisis, el RP es inducido por E2 y regulado negativamente por P4, dicha regulación negativa está mediada por el sistema de del proteosoma 26S ya que ésta fue bloqueada al administrar el inhibidor, MG132 en una concentración de 1 μ M (Turgeon y Waring, 2000).

Recientemente se reportó la participación del proteosoma 26 en la regulación del RP en el cerebro de la rata, observando que al administrar el inhibidor del proteosoma, PSI (300 μ g/100g de peso, ip.) aumentó significativamente el contenido del receptor en el área preóptica y en el hipocampo. El incremento en el contenido de RP-A y RP-B después de la administración de PSI fue, en el área preóptica de ~90% y en el hipocampo de 50%. De manera interesante, el PSI no modificó el contenido del RP en la corteza

cerebral de la rata, lo cual sugiere que el proteosoma está participando en el recambio del RP in vivo de manera específica en diferentes regiones del cerebro de la rata (Camacho-Arroyo et al., 2002).

La degradación del RP por el proteosoma 26S tiene consecuencias muy importantes en la regulación de la conducta sexual de la rata hembra. Recientemente nuestro grupo reportó que la administración sistémica de dos inhibidores del proteosoma 26S: el PSI, que es un inhibidor reversible de proteasas con actividad de quimiotripsina; y el TLCK, un inhibidor irreversible de proteasas de serina, bloqueó la inhibición secuencial de la conducta sexual de la rata hembra ovariectomizada. Este efecto se correlacionó con un incremento en el contenido de ambas isoformas del RP en el hipotálamo y el área preóptica, sugiriendo que la carencia de efectos conductuales de la P4 durante la inhibición secuencial es debida a una degradación del RP por el proteosoma 26S inducida por su ligando natural (González-Flores et al., 2004).

3.4. El ciclo estral de la rata.

Los ciclos reproductivos de los mamíferos están definidos generalmente por el tipo de ovulación que presentan: la ovulación refleja y la ovulación cíclica. Los mamíferos con ovulación refleja, requieren de la cópula para ovular y la presentan el conejo y el gato, entre otros (Ramírez y Beyer, 1985). La ovulación cíclica puede clasificarse dependiendo de la respuesta del epitelio uterino a la estimulación hormonal en los ciclos menstrual y estral.

El ciclo estral es el ciclo reproductivo de la rata y está constituido por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro, en los cuales varían las concentraciones de E2 y P4 (Fig.13). Durante el ciclo menstrual las capas superficiales del endometrio se desprenden acompañadas de una hemorragia (menstruación), mientras que en el ciclo estral, el desprendimiento de las células endometriales no provoca esta hemorragia. El ciclo estral se presenta en distintas especies de roedores y se divide en varias etapas (Freeman, 1988).

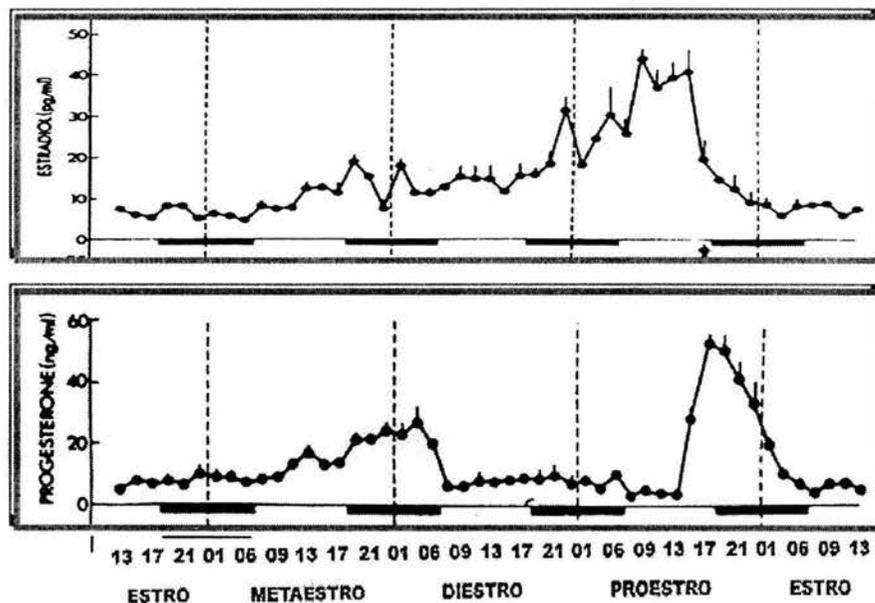


Figura 13. Niveles plasmáticos de E2 y P4 durante el ciclo estral de la rata (Freeman, 1988).

El ciclo estral de la rata se divide en cuatro etapas (proestro, estro, metaestro y diestro) que se caracterizan de acuerdo a la concentración de E2, P4, FSH y LH y por la abundancia de diferentes tipos celulares que se encuentran en un frotis vaginal. La duración media del ciclo estral se ha considerado entre 4.4-

4.8 días (Freeman, 1988). Durante el estro y el metaestro la concentración de E2 en sangre es basal (~20 pg/ml), mientras que en la noche del diestro se presenta un incremento (~40 pg/ml) hasta alcanzar su concentración máxima (>50 pg/ml) al medio día del proestro (Freeman, 1988) (Fig. 13). Este incremento activa la liberación de la GnRH por el hipotálamo que a su vez desencadena la secreción de la LH por la hipófisis. Durante la tarde del proestro la concentración de E2 disminuye rápidamente hasta alcanzar valores basales en las primeras horas de la mañana del estro (Freeman, 1988).

El aumento significativo en la concentración de LH es seguido por un incremento en la secreción de P4. Unas horas después de este aumento se presenta la ovulación y el comportamiento sexual característico de lordosis y posteriormente ocurre la cópula en la madrugada del estro. Durante el ciclo estral, la concentración de P4 se incrementa significativamente dos veces. Primero se presenta un incremento de origen folicular durante la tarde del proestro (>50 ng/ml) y otro de origen luteal que ocurre alrededor del mediodía del metaestro (~25 ng/ml), el cual se prolonga hasta la mañana del diestro y regresa a concentraciones basales en la tarde de ese mismo día (Freeman, 1988) (Fig. 13).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la P4 ejerce múltiples acciones fisiológicas en distintos tejidos. En el cerebro participa en la regulación de la respuesta sexual, la excitabilidad neuronal, la ovulación y la neuroprotección.

La vía de acción genómica de la P4 está directamente relacionada con la interacción con su receptor nuclear. En algunas regiones del cerebro de la rata como el hipotálamo y el área preóptica la expresión del RP se regula positivamente por el E2 a nivel del mRNA, y negativamente por P4 a nivel de la proteína.

Se ha demostrado en estudios in vitro que el RP es blanco del sistema de degradación ubiquitina-proteosoma, en células T-47D y en células de la pituitaria la ubiquitinación y degradación del RP por el proteosoma es inducida por su ligando.

Existe evidencia in vivo de que el proteosoma 26S está involucrado en la degradación del RP en ratas ovariectomizadas y tratadas con E2 y P4. Se ha demostrado que factores importantes en la regulación del RP como el RE, el coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT son ubiquitinados y degradados por el proteosoma 26S in vitro.

Para tener un acercamiento fisiológico sobre la regulación de estas proteínas se determinó su contenido en diferentes regiones cerebrales de ratas que fueron tratadas con el inhibidor del proteosoma MG132 durante la noche del proestro, cuando se encuentran elevados los niveles de P4.

V. HIPÓTESIS

Si la degradación del RP está mediada por el proteosoma 26S en condiciones fisiológicas, entonces al administrar un inhibidor del mismo durante el proestro cuando los niveles de P4 son más altos, no se reducirá el contenido del RP por acción de la P4.

Además, factores involucrados en la regulación del RP, como el RE y cofactores como SRC-1 y SMRT, que se sabe son degradados por el proteosoma in vitro se mantendrán estables al inhibir al proteosoma 26S en condiciones fisiológicas.

VI. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

- Determinar el papel del proteosoma 26S en la regulación del contenido del RP, RE y proteínas correguladoras en diferentes regiones del SNC durante el ciclo estral de la rata.

6.2 PARTICULARES

- Determinar si el contenido del RP en el hipotálamo, área preóptica e hipocampo del cerebro de la rata se modifica al administrar un inhibidor del proteosoma 26S en la etapa del proestro del ciclo estral.
- Determinar si el contenido de las isoformas del RP, RE, del coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT se modifica al inhibir el proteosoma 26S en diferentes regiones del SNC.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Animales de experimentación.

A lo largo de este estudio se utilizaron ratas adultas hembras de la cepa Sprague Dawley de 250 g de peso, que se mantuvieron con agua y comida *ad libitum*, en un ciclo luz oscuridad de 14:10 h (luz de 6:00-20:00 h).

7.2. Determinación del ciclo estral.

Se determinó la etapa del ciclo estral en la cual se encontraban las ratas intactas por medio del análisis citológico de frotis vaginales. El día del proestro se distinguió por la presencia de células epiteliales nucleadas, el día del estro por células epiteliales cornificadas, el día del metaestro por células epiteliales cornificadas y leucocitos, y finalmente el día del diestro por pocas células epiteliales cornificadas y leucocitos en abundancia. Las ratas que presentaron 3 ciclos consecutivos fueron usadas para realizar los experimentos.

7.3. Microinyecciones intracerebroventriculares del inhibidor del proteosoma.

7.3.1. Implantación de cánulas de microinyección por estereotaxia.

Previo a los experimentos se estandarizó la técnica de microinyección para determinar las coordenadas y el sitio de la administración del inhibidor del proteosoma, inyectando azul de Pontamina (SIGMA, 1.2 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$), y confirmar que

el fármaco administrado llegara a las regiones cerebrales de interés (hipotálamo, área preóptica e hipocampo) en donde la P4 ejerce diversas acciones.

Los animales fueron sacrificados a los 15, 30 minutos y 1 hora después de la microinyección, se extrajeron los cerebros y se realizaron cortes confirmando que el colorante se distribuyera en el hipotálamo, el área preóptica y en el hipocampo.

Los animales con ciclos regulares fueron anestesiados con ketamina-xilazina (100 y 12 mg/kg i.p.). Las ratas se colocaron en el aparato estereotáxico (David Kopf; Tujunga, CA.) y con técnicas de asepsia se rasuró la cabeza y se realizó una incisión en la parte medial para descubrir el cráneo. Se retiró el tejido conjuntivo para dejar sólo el hueso y de esta forma tener a la vista el punto de intersección entre las suturas sagital y frontoparietal (punto Bregma). Con el uso de la torre estereotáxica, se marcó el sitio sobre el cráneo donde se realizó un trépano, se introdujo unilateralmente la cánula guía de acero inoxidable (calibre 25) dirigida al ventrículo lateral izquierdo. Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para la implantación de la cánula guía fueron: 1.4 lateral izquierdo, 0.0 antero-posterior y -3.9 vertical desde la superficie del cráneo (Paxinos y Watson, 1986) con la barra de incisivos colocada a 3.5 mm debajo del cero interaural. En la entrada de la cánula guía se colocó un estilete para prevenir que se bloqueara la entrada; por último se colocaron dos tornillos de acero inoxidable (Small Parts; Miami Lakes, FL.) en el cráneo y el dispositivo se fijó con acrílico dental. Al final de la cirugía se aplicó antibiótico tópicamente (gentamicina, 300 µl) y se suturó la herida. Los animales se dejaron en recuperación en cajas individuales de acrílico durante siete días, durante los cuales se continuaron tomando frotis vaginales

para confirmar que la cirugía y la manipulación del animal no afectara el ciclo estral. Durante los primeros tres días postcirugía se les administró antibiótico en el agua de beber (Baytril, Bayer, México).

7.3.2. Administración del inhibidor del proteosoma 26S:MG132

Durante la fase experimental los animales que se encontraban en la etapa de proestro se colocaron individualmente en cajas de observación de acrílico transparente de 30x30x30 cm para posteriormente inyectarlos unilateralmente a las 19:00 h (cuando los niveles de P4 son más altos) con 100 μ M del inhibidor del proteosoma (MG132) o con vehículo (DMSO) en las coordenadas anteriormente mencionadas. Cabe mencionar que los animales fueron tratados sin anestesia, de modo que se pudiera observar y registrar si la capacidad motora y la conducta de los animales era alterada por los fármacos administrados.

Todas las microinyecciones se aplicaron en un volumen total de 1 μ l durante 5 minutos, utilizando una cánula de inyección de acero inoxidable calibre 32, conectada a una microjeringa Hamilton de 10 μ l por un tubo de polietileno; los animales fueron observados durante una hora a partir de la microinyección para evaluar que no hubiera alteraciones en la conducta y capacidad motora.

7.4. Obtención de las diferentes regiones cerebrales

Los animales fueron sacrificados 24 h después (noche del estro) del tratamiento con el inhibidor del proteosoma o con el vehículo y se disecaron las siguientes regiones cerebrales: hipotálamo, área preóptica e hipocampo según el atlas Paxinos del cerebro de la rata (Paxinos y Watson, 1998).

7.5. Análisis de las proteínas del RP, RE, SRC-1 y SMRT

7.5.1. Extracción y electroforesis de proteínas totales

Se homogenizaron los tejidos en buffer de lisis TDG con un coctel de inhibidores de proteinasas (Tris-HCl 10 mM, ditioneitol 1mM, glicerol al 30%, tritón al 1%, azida de sodio 15 mM, EDTA 1mM, leupeptina 4 µg/ml, aprotinina 22 µg/ml, PMSF 1mM, ortovanadato de sodio 1mM), en una relación de 1 ml de buffer/ g de tejido a 4°C.

Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 15,000 rpm, durante 15 min, a 4°C y se separó el sobrenadante. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Las proteínas obtenidas de los tejidos (80 µg) se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7.5% a 75 volts durante 2 horas. Cada muestra se preparó con Buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercapto-etanol 5%) en un volumen 1:1 y se hirvieron durante 5 min para depositarse en los geles antes mencionados.

7.5.2. Western Blot.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 20 volts, durante 1 hora en una cámara semihúmeda. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% y albúmina al 0.5% en TBS 1X.

Las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos, dependiendo de la proteína que se fuera a detectar: anticuerpo primario monoclonal de rata anti RP (Santa Cruz sc-810) anticuerpo monoclonal de ratón anti RE- α (Santa Cruz sc- 8002) en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ y anticuerpo policlonal de cabra anti RE- β (Santa Cruz sc- 6821) en una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$; anticuerpos policlonales anti SRC-1 (Santa Cruz sc- 6097) o anti SMRT (Santa Cruz sc- 1612) en una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween (TBS (pH=7.4) +Tween al 0.1%) 3 veces por 5 minutos. Para detectar al RP y al RE- α las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz sc- 2005). Para detectar al RE- β , SRC-1 y SMRT, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-cabra (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24 $\mu\text{g/ml}$ (Santa Cruz sc-2033). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las proteínas estudiadas. Con este sistema, el peróxido

de luminol y un potenciador son sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario que cuando reacciona se genera una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína cargada, las membranas en las cuales se detectaron las proteínas de interés (RP-B, RP-A, RE- α , RE- β , SRC-1 y SMRT) se lavaron con glicina ácida (glicina 0.1M, SDS 0.5%, pH 2.5) toda la noche a 4 °C y 30 min. a 37°C para posteriormente incubarlas con un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti- α -tubulina en una concentración de 0.5-1 μ g/ml (Sigma-Aldrich, T9026) durante 2 horas a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos; después se incubaron 1 hora con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa en una concentración de 0.24 μ g/ml (Santa Cruz sc-2033) y posteriormente se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

7.6. Análisis de resultados.

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico utilizando un aparato Scan Primax 600p (Colorado) y el programa KODAK 1D Image Análisis Software para cuantificar la expresión de las isoformas del RP, RE- α , RE- β , SRC-1, SMRT y α -tubulina, de acuerdo a la intensidad de cada banda. Para cada experimento los datos obtenidos de las proteínas de interés se normalizaron con los de α -tubulina.

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

VIII. RESULTADOS

Para determinar el papel del proteosoma 26S en la regulación del RP en condiciones fisiológicas, se evaluó el contenido de la proteína en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo de la rata, se administró el inhibidor del proteosoma MG132 intrecerebroventricularmente, en la noche del proestro (cuando los niveles de progesterona son más altos). Se realizaron ensayos de Western blot y utilizando anticuerpos que reconocen al RP, y a otros factores que sabe están involucrados en la regulación de dicho receptor, como las isoformas del RE, el coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT.

En la figura 14 se muestra la detección por Western blot de las isoformas A y B del RP de 80 y 110 kDa respectivamente, de las isoformas α y β del RE de 66 y 55 kDa respectivamente, el coactivador SRC-1 de 160 kDa y el correpresor SMRT de 165 kDa en el hipotálamo. Se muestra también la detección de α -tubulina de 50 kDa, que se utilizó como control de carga. En esta figura se muestran experimentos de 4 animales tratados con vehículo y 4 con MG132.

En la figura 15 se muestra el análisis densitométrico de los datos presentados en la figura 14. En esta figura se observa que en el hipotálamo hubo un incremento en ambas isoformas del RP después de administrar el inhibidor del proteosoma comparado con los tratamientos con vehículo (Fig.15a), el aumento fue de 26.6% para RP-A y 18.1% para RP-B. Para el caso del RE, la isoforma α no presentó cambios significativos en su contenido mientras que la isoforma β si aumentó (29.3%) al administrar el MG132 (Fig. 15b). Tanto el coactivador SRC-1

como el correpresor SMRT presentaron un incremento significativo cuando se administró el inhibidor MG132, de 40.2% y 20% respectivamente (Fig.15c).

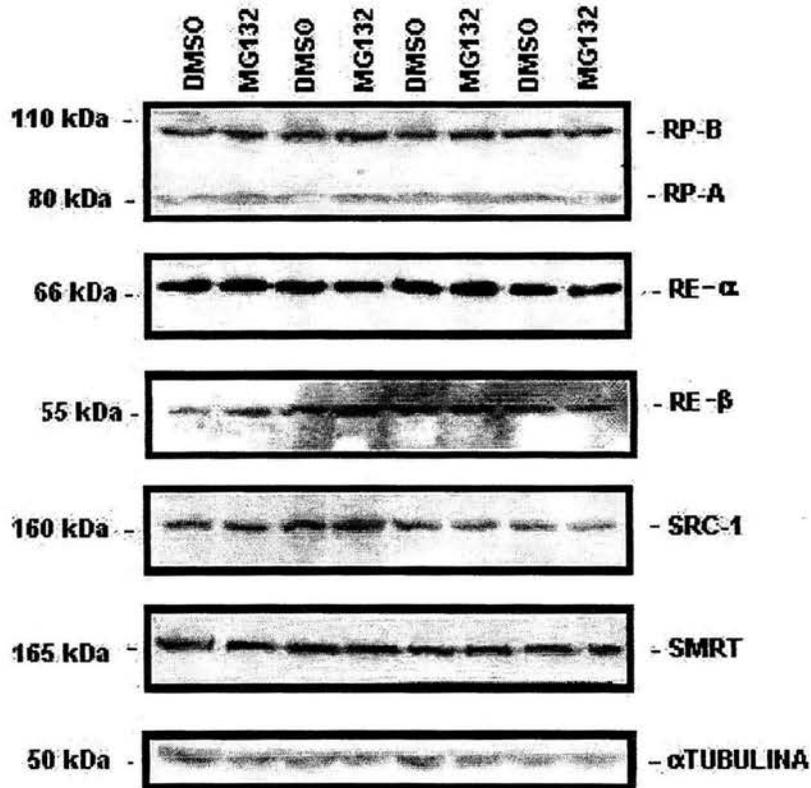


Figura 14. Ensayo de Western Blot de las isoformas del RP, del RE, el coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT en el hipotálamo de la rata. Se realizaron 4 experimentos independientes, las ratas fueron inyectadas intracerebroventricularmente con el inhibidor del proteosoma 26S (MG132, 100 μ M) o con vehículo (DMSO) a las 19:00 horas de la etapa del proestro. Las ratas fueron sacrificadas 24 h después de las microinyecciones (19:00 h. de la etapa del estro). Se homogeneizó el tejido de cada hipotálamo de cada animal por separado, se extrajeron y cuantificaron las proteínas totales, se separaron en geles de poliacrilamida SDS 7.5% y en cada carril se cargaron 80 μ g de proteína. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para ser incubadas con anticuerpos que reconocen al RP, a las isoformas del RE, al coactivador SRC-1 y al correpresor SMRT. Se revelaron por quimioluminiscencia (ECL). Como control de carga se incubó cada membrana con un anticuerpo que reconoce a α -tubulina.

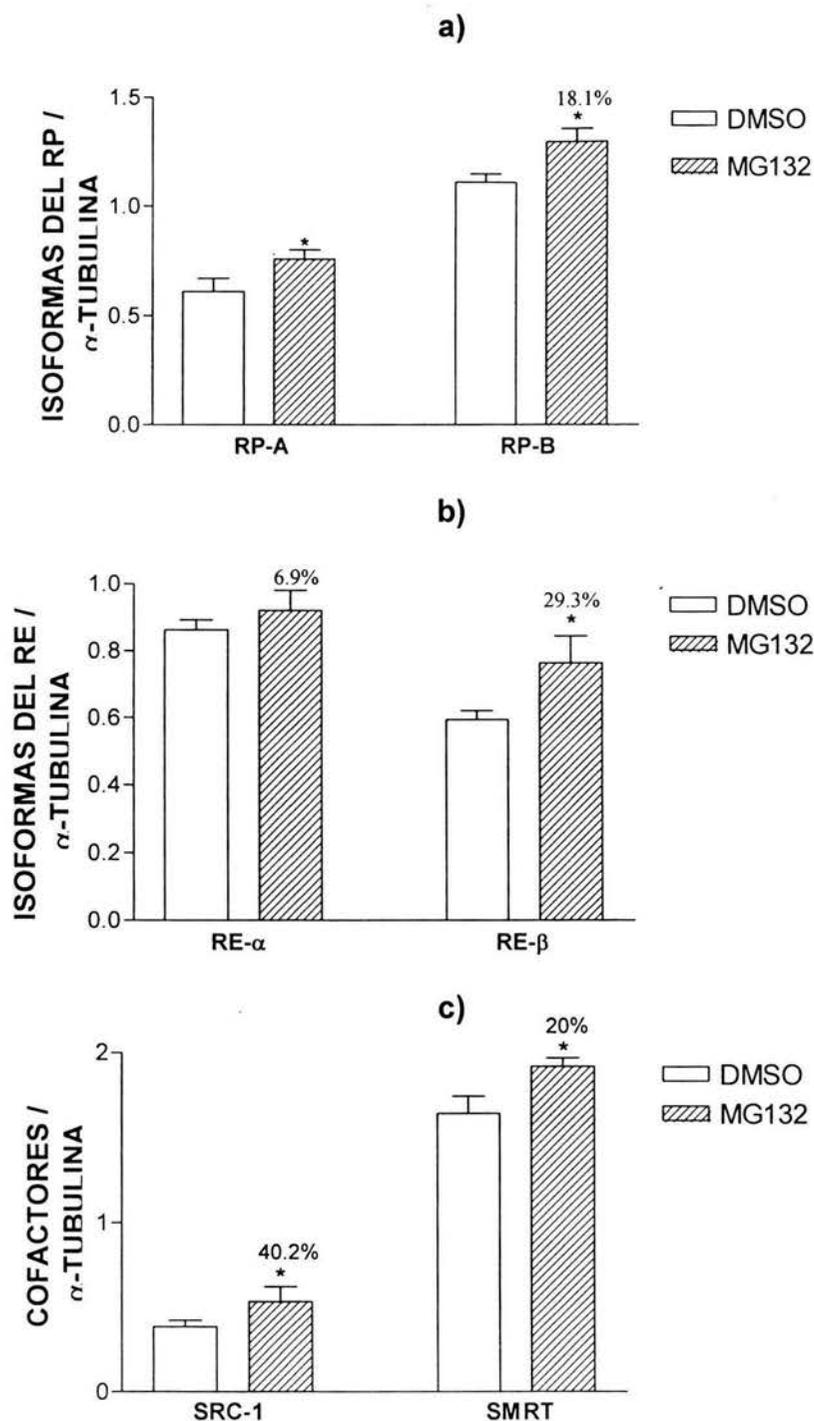


Figura 15. Contenido de las isoformas del RP, RE y cofactores en el hipotálamo de la rata a las 19:00 h del estro, después de administrar el inhibidor del proteosoma MG132 a las 19:00 h del proestro. Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de una análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la α -tubulina. a) RP, b) RE y c) SRC-1 y SMRT, * $p < 0.05$ vs DMSO.

En la figura 16 se muestra la detección de las isoformas A y B del RP de 80 y 110 kDa respectivamente, en el área preóptica, también se pueden observar las isoformas α y β de los pesos moleculares correspondientes, la detección del coactivador SRC-1 y del correpresor SMRT de 160 kDa de 165 kDa respectivamente. Se muestra también la detección de α -tubulina de 50 kDa, que se utilizó como control de carga. En esta figura se muestran experimentos de 4 animales tratados con vehículo y 4 con MG132.

Se puede observar que en el área preóptica las isoformas del RP (RP-A 27.18% y RP-B 42.6%), del RE (RE- α 45.7% y RE- β 35.4%) y los cofactores estudiados (SRC-1 27.1% y SMRT 33.5%) incrementaron significativamente su contenido al administrar el inhibidor del proteosoma comparado con los tratamientos con vehículo (Fig. 17 a, b y c).

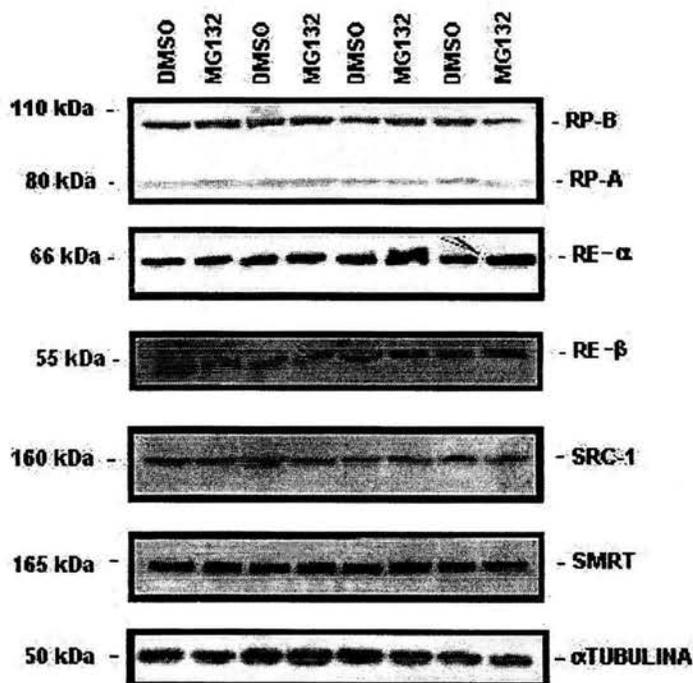


Figura 16. Ensayo de Western Blot de las isoformas del RP, las isoformas del RE, del coactivador SRC-1 y del correpresor SMRT en el área preóptica de la rata. Se realizaron 4 experimentos independientes como se señaló en la figura 15.

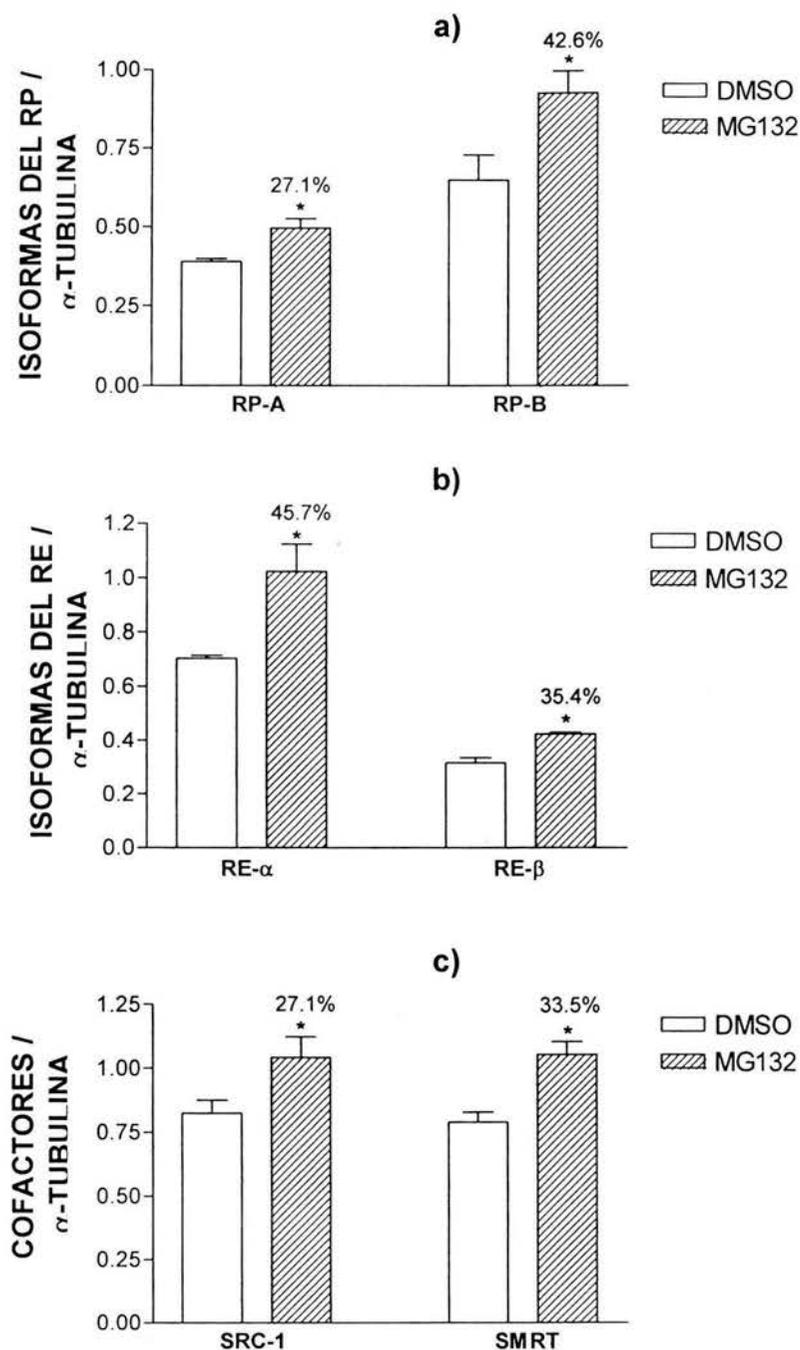


Figura 17. Contenido de las isoformas del RP, RE y cofactores en el área preóptica de la rata a las 19:00 h del estro, después de administrar el inhibidor del proteosoma MG132 a las 19:00 h del proestro. Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de una análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la α -tubulina. a) RP, b) RE y c) SRC-1 y SMRT, * $p < 0.05$ vs DMSO.

En la figura 18 se muestra la detección de las isoformas del RP, del RE, de SRC-1 y SMRT en el hipocampo de la rata. El análisis densitométrico se muestra en la figura 19 en la que se puede observar que el contenido de las isoformas del RP (Fig. 19a) y del RE- β aumentó significativamente después del tratamiento con el inhibidor del proteosoma (Fig. 19b). De manera interesante se puede observar en la figura 19c que el coactivador SRC-1 aumentó su contenido con el tratamiento con MG132 mientras que el correpresor SMRT no presentó cambios significativos.

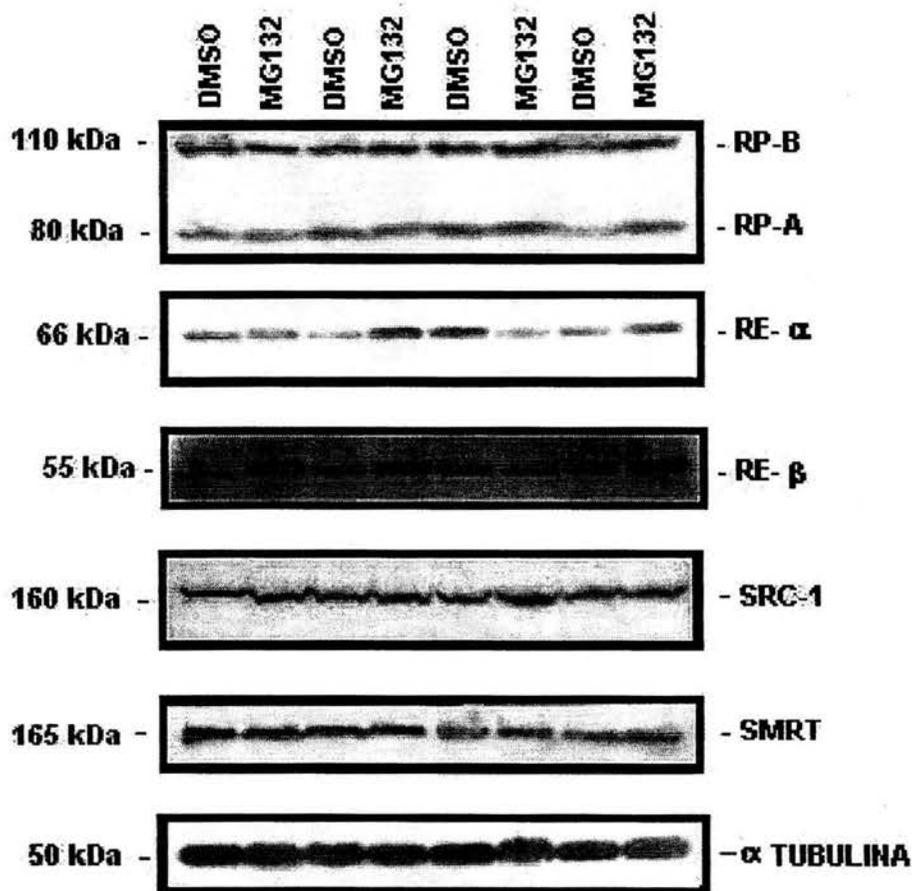


Figura 18. Ensayo de Western Blot de las isoformas del RP, las isoformas del RE, del coactivador SRC-1 y del correpresor SMRT en el hipocampo de la rata. Se realizaron 4 experimentos independientes, como se señaló en la figura 15.

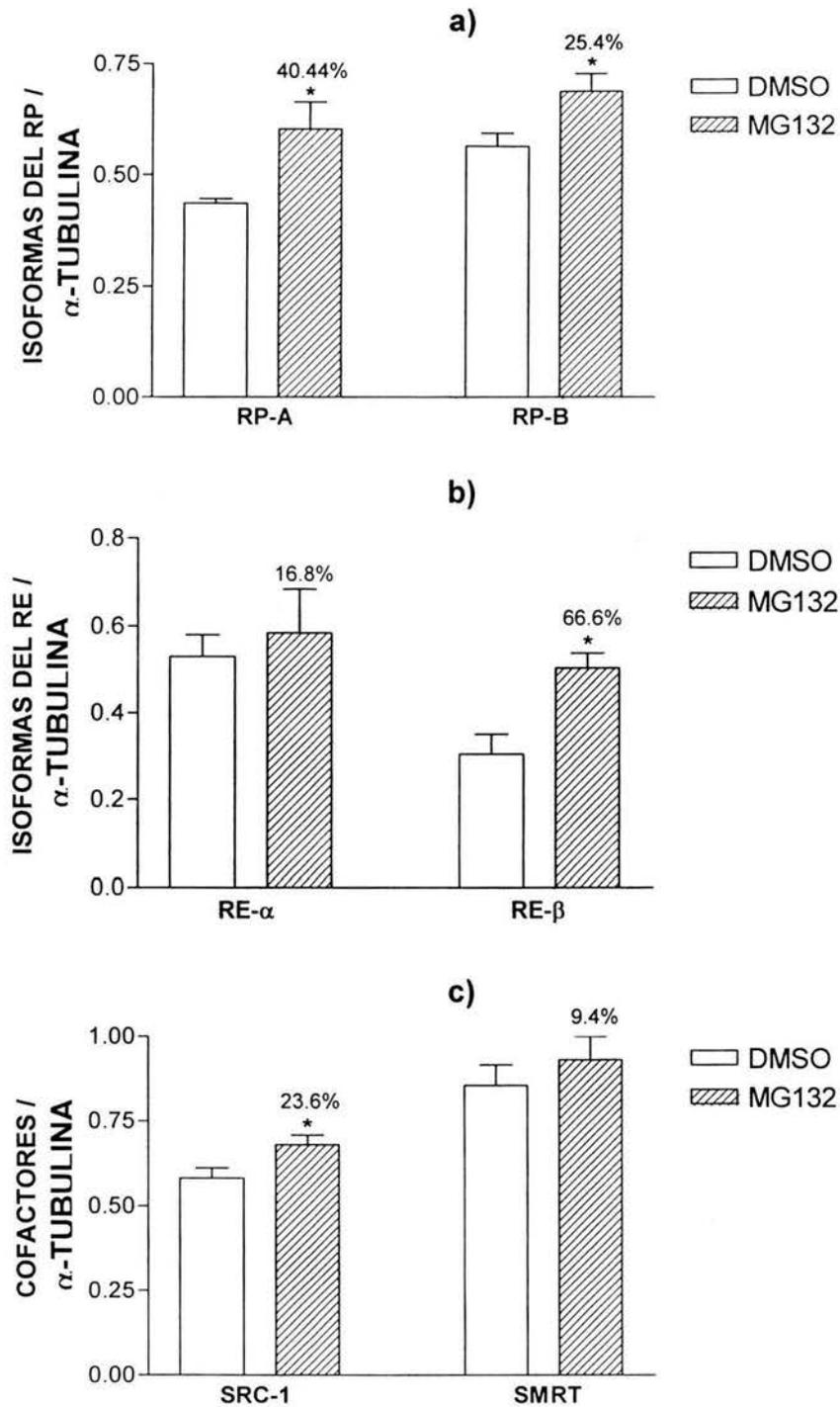


Figura 19. Contenido de las isoformas del RP, RE y cofactores en el hipocampo de la rata a las 19:00 h del estro, después de administrar el inhibidor del proteosoma MG132 a las 19:00 h del proestro. Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de una análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los obtenidos para la α -tubulina. a) RP, b) RE y c) SRC-1 y SMRT, * $p < 0.05$ vs DMSO.

IX. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó la regulación del contenido del RP por el sistema ubiquitina-proteosoma en el SNC de la rata en condiciones fisiológicas; mediante la inhibición de dicho sistema en la noche del proestro del ciclo estral de la rata, que es cuando los niveles de P4 se encuentran más elevados. También se analizaron las proteínas de las isoformas α y β del RE, del coactivador SRC-1 y del correpresor SMRT, que son factores determinantes en la regulación de la síntesis y actividad del RP. Los resultados obtenidos muestran que, de manera general, el RP, el RE y los cofactores SRC-1 y SMRT son degradados por el proteosoma 26S en condiciones fisiológicas.

Cabe mencionar que en este tipo de modelos de estudio donde se utiliza un animal completo, en condiciones fisiológicas, el proceso estudiado no está aislado y existe relación con diversos factores y sistemas que no están contemplados y controlados, por lo que es común que las diferencias obtenidas no superen el 30%. Las diferencias en los resultados de este trabajo están consideradas dentro de este rango.

En el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo, el contenido de las dos isoformas del RP (RP-A y RP-B) presentó un incremento significativo 24 horas después de haberse administrado el inhibidor del proteosoma, MG132 (etapa del estro), lo cual concuerda y apoya los datos reportados por nuestro laboratorio que demuestran que el contenido del RP aumenta en el área preóptica y el hipocampo después de bloquear la actividad del proteosoma con otro inhibidor (PSI) en un

modelo de ratas ovariectomizadas y tratadas con E y P4 (Camacho-Arroyo et al., 2002).

Se ha demostrado que la degradación de varios receptores nucleares, entre los que se encuentran, el RP y el RE es inducida por su ligando (Dennis y O'Malley, 2005); sin embargo la mayoría de estos estudios se ha realizado in vitro, y el efecto biológico de la degradación de dichos receptores está aún por entenderse. En ratas ovariectomizadas, el incremento en el contenido del RP por inhibición del proteosoma 26S en el área preóptica y en el hipotálamo está relacionado con el despliegue de la conducta de lordosis (González-Flores et al., 2004).

Aunque hasta la fecha no se ha determinado si existe una variación temporal (horas) del RP durante todas las etapas del ciclo estral de la rata, este trabajo pretende un primer acercamiento para entender si el recambio del RP es regulado por el proteosoma 26S en condiciones fisiológicas. Nuestros resultados sugieren que el proteosoma 26S puede estar involucrado en el recambio del RP en dichas condiciones y que puede participar en funciones reproductivas reguladas por la P4 en el hipotálamo y en el área preóptica, tales como la ovulación y el despliegue de conducta sexual de las ratas hembras.

Se sabe que en el hipocampo tanto la P4 como el E regulan diversas funciones que involucran modificaciones en la estructura celular. El proteosoma 26S al regular el contenido del RP y del RE puede mediar el recambio de proteínas que participan en la regulación de la memoria, el aprendizaje y en general en procesos cognoscitivos.

Al ser el RP un factor de transcripción su tasa de recambio es muy importante y determinante en la expresión de los genes que regula. Sin embargo, es preciso realizar estudios que permitan un mejor entendimiento del papel del proteosoma en la regulación del RP y las consecuencias en la regulación de procesos biológicos, en los que éste está involucrado.

Dentro de los estudios que podrían realizarse para determinar ampliamente si el proteosoma participa en la regulación del RP en condiciones fisiológicas, está la evaluación del contenido del RP en todo el ciclo estral y la inhibición del proteosoma 26S en cada etapa. Por otro lado, sería interesante determinar el estado funcional del RP durante las 4 etapas del ciclo estral, evaluando el nivel de fosforilación del receptor en dichas condiciones. Otro aspecto importante, es el de la regulación del RP durante el ciclo estral por sus coactivadores y/o correpresores cuando éste se encuentra unido a su secuencia blanco en el DNA, esto podría evaluarse por medio de ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) que nos permitirían determinar el estado transcripcional del RP.

Ya que la P4 regula diferencialmente procesos biológicos a través de su receptor, la regulación diferencial de éste en condiciones fisiológicas, podría tener implicaciones importantes en eventos regulados por la P4 en el SNC, como el despliegue de conducta sexual, sueño, memoria y aprendizaje; entonces estos procesos pudieran ser alterados al inhibir el proteosoma 26S en las diferentes etapas del ciclo estral.

El RE es importante en la regulación del RP. Existen diversos trabajos, que demuestran que en líneas celulares de cáncer de mama como la MCF-7 y T47D y en la línea Ishikawa de cáncer de endometrio (Horwitz y McGuire, 1978); en el

útero, el pulmón (González-Arenas et al., 2003) y el cerebro de la rata, el RP es regulado positivamente por E2 (Guerra-Araiza et al., 2003). Esta regulación positiva del RP se debe a la presencia de elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en la región promotora del gen del RP. Por ejemplo, en la rata se ha determinado que la región del promotor para RP-A existen dos ERE, mientras que en la región del promotor para RP-B no se han detectado ERE, sin embargo se han determinado sitios de unión al factor de transcripción conocido como proteína específica 1 (Sp1) en la posición -49/-41 (Kraus et al., 1993) que puede permitir la interacción con el RE (Salvatori et al., 2003; Khan et al., 2003) para regular la transcripción del RP (Kraus et al., 1993).

En el área preóptica ambas isoformas del RE (α y β) fueron blanco de degradación por el proteosoma 26S, ya que el contenido de estas proteínas aumentó significativamente después de inhibir la actividad catalítica del proteosoma. Se observó que en el hipotálamo y en el hipocampo sólo RE- β aumentó significativamente después de haber bloqueado la actividad catalítica del proteosoma 26S, lo cual sugiere que en condiciones fisiológicas, el proteosoma degrada selectivamente a las isoformas del RE, ya que ER- α no presentó cambios significativos en su contenido en estas dos regiones cerebrales.

Estos resultados concuerdan con los datos reportados sobre el papel del proteosoma en la degradación del RE en estudios in vitro (Alarid et al., 1999; Preisler-Mashek et al., 2002; Tateishi et al., 2004) y en el útero de la rata (Nirmala y Thampan, 1995). Cabe mencionar que en la etapa del proestro, se presenta la mayor concentración plasmática de E y se ha demostrado que la degradación del

RE mediada por el proteosoma también es dependiente de ligando (Lonard et al., 2000). El E puede interactuar con el RE, inducir su fosforilación y ubiquitinación para posteriormente ser degradado por el proteosoma, de manera que al inhibir este sistema de degradación se observó un incremento en RE.

De manera interesante, se observó que dicho incremento fue diferencial entre las isoformas del RE y además fue región-específico.

Actualmente no se sabe cual es el mecanismo por el cual el proteosoma 26S regula al RE, sin embargo, es posible que la presencia de otras proteínas pueda determinar el efecto región-específico de la regulación de este receptor por el proteosoma en el SNC.

En este trabajo se utilizó el inhibidor MG132, del cual han sido caracterizadas y demostradas una alta potencia y selectividad por la actividad de quimiotripsina en estudios *in vitro*. En la rata no se ha reportado ningún estudio hasta la fecha, utilizando este inhibidor, sin embargo las dosis utilizadas *in vitro* van de 1 a 100 μM , no habiendo diferencias en el efecto en la inhibición del proteosoma de la dosis de 10 a 100 μM , por lo cual nosotros decidimos utilizar la dosis máxima registrada (100 μM) ; sin embargo, no se sabe si habría mayor efecto en el bloqueo de la actividad catalítica del proteosoma al incrementar la concentración en la dosis del inhibidor y si permanecería el efecto diferencial observado en este estudio sobre el contenido de las isoformas del RE.

Los cofactores son proteínas capaces de modular la transactivación de los receptores nucleares, hay evidencia *in vitro* de que el coactivador SRC-1 y el correpresor SMRT regulan la actividad del RP. *In vitro*, los cofactores pueden ser

fosforilados y degradados por el proteosoma 26S (Rowan et al., 2000; Lonard et al., 2000; Yan et al., 2003), sin embargo se desconoce el mecanismo de degradación de dichos cofactores en condiciones fisiológicas. Nuestros datos sugieren que existen diferencias en el contenido y tasa de recambio de estos cofactores en el cerebro de la rata, ya que esta regulación se presentó de manera diferencial en distintas regiones del SNC.

En cultivos celulares (células HeLa, MCF-7 y ts85), los coactivadores de la familia SRC y CBP presentan un aumento en la actividad transcripcional y en el contenido de su proteína en presencia del inhibidor del proteosoma MG132, lo cual sugiere que dichos coactivadores son blanco del proteosoma *in vitro* provocando una concentración intracelular elevada y a su vez esto incrementa su potencial transcripcional (Lonard et al, 2000). También ha surgido evidencia de que los correpresores SMRT y NcoR son degradados por el sistema del proteosoma 26S, ya que la respuesta al tratamiento con MG132 *in vitro* es el aumento en el contenido de la proteína y la represión en la transcripción (Dennis y O'Malley, 2005).

Los cofactores están presentes en el SNC de la rata (Meijer, 2000) y son regulados diferencialmente por hormonas esteroides y durante el ciclo estral en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo de la rata (Camacho-Arroyo et al., 2005).

En este trabajo encontramos que en el hipotálamo y en el área preóptica, tanto SRC-1 como SMRT aumentaron su contenido significativamente después de administrar el inhibidor del proteosoma en la etapa del proestro del ciclo estral de la rata. En el hipocampo se presentó una regulación diferencial de estos

cofactores, ya que el coactivador SRC-1 aumentó su contenido después de administrar el MG132, mientras que el correpresor SMRT no cambió su contenido después de inhibir al proteosoma.

Las diferencias en el contenido tanto del RE como de los cofactores estudiados pueden deberse a que existe una tasa de recambio diferencial en condiciones fisiológicas y ésta puede estar determinada por una parte por el estímulo hormonal (de acuerdo a la etapa del ciclo estral); por otra, a la presencia de otras proteínas involucradas tanto en su propia regulación como en la del RP (como el cofactor SRC-3, el correpresor NcoR y otras proteínas reguladoras que forman parte del sistema de degradación ubiquitina-proteosoma 26S, como las ligasas de ubiquitina); a los patrones de fosforilación y desfosforilación que determinan la activación y la degradación del receptor; de modo que sea posible el recambio del RP, el RE y sus cofactores de acuerdo a las necesidades de la célula.

Todo lo anterior, sugiere que la expresión y la regulación de los cofactores por el proteosoma 26S se presenta de manera región-específica en el cerebro de la rata en condiciones fisiológicas y que las hormonas esteroideas participan en la regulación de la expresión de los cofactores SRC-1 y SMRT en diferentes tejidos durante los ciclos reproductivos.

En este trabajo se observó que la degradación del RP es mediada por el proteosoma 26S en condiciones fisiológicas y se presenta diferencialmente en las áreas del cerebro de la rata estudiadas, además, factores importantes involucrados en la regulación del propio RP como el RE, el coactivador SRC-1 y el

correpresor SMRT también son degradados por el proteosoma 26S en las mismas condiciones.

Sin embargo, sería interesante evaluar los efectos biológicos que implica la inhibición del proteosoma en cada etapa del ciclo estral, además de poder estudiar la distribución y expresión tanto del RP, RE y los cofactores de interés durante el mismo, y evaluar su colocalización en diferentes regiones del cerebro de la rata de modo que se pueda determinar la interacción entre ellas en condiciones fisiológicas.

X. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos indican que el proteosoma 26S está involucrado en el recambio del RP, RE, SRC-1 y SMRT, que son proteínas fundamentales que participan en el mecanismo de acción genómico de la P4 en el sistema nervioso central de la rata en condiciones fisiológicas.
- La regulación de las isoformas del RE se presentó de manera diferencial y en las regiones del SNC estudiadas. El RE- β incrementó su contenido en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo, mientras que RE- α solo aumentó significativamente en el área preóptica en las mismas condiciones.
- El contenido de las proteínas de los cofactores presentó una regulación diferencial, ya que el coactivador SRC-1 aumentó significativamente después de inhibir la actividad del proteosoma en la etapa de proestro en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo, mientras que el contenido del correpresor SMRT aumentó significativamente en el hipotálamo y en el área preóptica.

▪ **XI. REFERENCIAS**

- Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N. 1999. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol.* 13:1522-34.
- Arrieta I, Diaz-Ibañez LB, Morales T, Mendoza-Garcés L, Morimoto S, Moreno-Mendoza N, Cerbon MA. 2003. Progesterone receptor gene and protein expression in the anterior preoptic area and hypothalamus of defeminized rats. *J Neurobiol.* 56:338-46.
- Backstrom T, Andreen L, Birzniece V, Bjorn I, Johansson IM, Nordenstam-Haghjo M, Nyberg S, Sundstrom-Poromaa I, Wahlstrom G, Wang M, Zhu D. 2003. The role of hormones and hormonal treatments in premenstrual syndrome. *CNS Drugs.* 17:325-42
- Backstrom T, Zetterlund B, Blom S, Romano M. 1984. Effects of intravenous progesterone infusions on the epileptic discharge frequency in women with partial epilepsy. *Acta Neurol Scand.* 69:240-8.
- Baulieu EE. 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res.*52:1-32
- Beato M. 1987. Induction of transcription by steroid hormones. *Biochem Biophys Acta* 910:95-102.
- Beato M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56:335-44.
- Beck CA, Weigel NL, Edwards DP. 1992. Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol. Endocrinol.* 6:607-620.
- Bethea CL, Lu NZ, Gundlach C, Streicher JM. 2002. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Front. Neuroendocrinol.* 23:41-100.
- Beyenburg S, Stoffel-Wagner B, Bauer J, Watzka M, Blumcke I, Bidlingmaier F, Elger CE. 2001. Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Res.* 44:141-53.
- Bogyo y Wang. 2002. Proteasome inhibitors: Complex tools for a complex enzyme. In: The proteasome.ubiquitin protein degradation pathway. Zwickl P y Baumeister W (eds). Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp 185-208.
- Bramley T. 2003. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 125:3-15.

- Braun BC, Glickman Mh, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finely D, Schmidt M. 1999. The base of the proteasomeregulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nature Cell Biol.* 1:221-226.
- Callier S, Morissette M, Grandbois M, Pelaprat D, Di Paolo T. 2001. Neuroprotective properties of 17beta-estradiol, progesterone, and raloxifene in MPTP C57Bl/6 mice. *Synapse.* 41:131-8.
- Camacho-Arroyo I. 2003. Progesterone receptor isoforms and progesterone actions in the brain. In *Recent Research Developments in Life Sciences*, edn 1, Gayathri A (ed). Research Signpost, Kerala, India, pp. 221-242.
- Camacho-Arroyo I, González-Arenas A, González-Aguero G, Guerra-Araiza C, González-Moran G. 2003. Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 136:447-52.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA, 1998b. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9:3993-3996.
- Camacho-Arroyo I, Hernández Gollas R, Manjarrez J, Alvarado R. 1999. Progesterone microinjections into the pontine reticular formation modify sleep in male and female rats. *Neurosci. Lett* 269:9-12.
- Camacho-Arroyo I, Mendez-Cruz ST, Guerra-Araiza C, Cerbon MA. 1998. Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J. Endocrinol.* 157:71-74.
- Camacho-Arroyo I, Neri-Gómez T, González-Arenas A, Guerra-Araiza C. 2005. Changes in the content of steroid coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors in the rat brain during estrous cycle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* in press.
- 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.* 214:25-8.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev. Inv. Clin.* 47:329-340.

- Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. 1994. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J. Endocrinol.* 142:311-316.
- Camacho-Arroyo I, 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.* 76:267-71.
- Cardozo C. 1993. Catalytic components of the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Protein.* 47:296-305.
- Cervantes M, Gonzalez-Vidal MD, Ruelas R, Escobar A, Morali G. 2002. Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res.* 33:6-14.
- Chabbert-Buffet N, Skinner DC, Caraty A, Bouchard P. 2000. Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids.* 65:613-620.
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE, 1990. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of heat shock protein-90 complex. *J Biol Chem* 265:20686-20691.
- Charkoudian N, Johnson JM. 2000. Female reproductive hormones and thermoregulatory control of skin blood flow. *Exerc Sport Sci Rev.* 28:108-12.
- Chen ZJ, Parent L, Maniatis. T. 1996. Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell.* 84:853-62.
- Christensen K, Estes PA, Onate SA, Beck CA, DeMarzo A, Altman M, Liberman BA, St John J, Nordeen SK, Edwards DP, 1991. Characterisation and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol Endocrinol* 5:1755-1770.
- Ciechanover A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17:7151-60.
- Ciechanover A, Brundin P. 2003. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron.* 40:427-46.
- Clarke PB. 1993. Ovarian steroid hormone receptors and their mechanism of action: In: Molecular aspects of placental and fetal Autacoids. Rice GE, Brennecke SP (eds). CRP Press, Inc., Boca Raton, FL, pp 27-54.

- Clemm DL, Macy BL, Santiso-Mere D, McDonnell DP, 1995. The critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol* 53:487-495.
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 65:801-847.
- Dalkin AC, Paul SJ, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Yasin M, Marshall JC. 1992. Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. *J Endocrinol* 132:39-45.
- Dennis AP, Haq RU, Nawaz Z. 2001. Importance of the regulation of nuclear receptor degradation. *Front Biosci.* 6:954-9.
- Dennis AP, O'Malley B W. 2005. Rush hour at the promoter: How the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 93:139-51.
- Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, Schirle M, Keilholz W, Stefanovic S, Wolf DH, Huber R, Ramenese HG, Schild H. 1998. Contributions of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptid substrates analyzed with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* 273:25637-25646.
- Duffy MD, Wells TR, Haluska JG, Stouffer RL, 1997. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod* 57:693-699.
- Enenkel C, Lehmann H, Kipper J, Guckel R, Hilt W, Wolf DH. 1994. PRE3, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked LMP2 (RING12) gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for the peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity. *FEBS Lett.* 341:193-196.
- Engel SR, Grant KA. 2001. Neurosteroids and behavior. *Int Rev Neurobiol.* 46:321-48
- Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240:889-95
- Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science.* 268:726-31.
- Fenteany G, Standaert RF, Reichard GA, Corey EJ, Schreiber SL. 1994. A beta-lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line

- and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:3358-62.
- Francis K, Meddle SL, Bishop VR, Russell JA. 2002. Progesterone receptor expression in the pregnant and parturient rat hypothalamus and brainstem. *Brain Res*. 927:18-26.
 - Freeman EW. 2002. Current update of hormonal and psychotropic drug treatment of premenstrual dysphoric disorder. *Curr Psychiatry Rep*. 4:435-40.
 - Freeman ME, 1988. In: The ovarian cycle of the rat. The Physiology of Reproduction.
 - Friess E, Tagaya H, Trachsel L, Holsboer F, Rupprecht R. 1997. Progesterone-induced changes in sleep in male subjects. *Am. J. Physiol*. 272:E885-91.
 - Frye CA, Manjarrez J, Camacho-Arroyo I. 2000. Infusion of 3alpha, 5alpha-THP to the pontine reticular formation attenuates PTZ-induced seizures. *Brain Res*. 881:98-102.
 - Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. 1997. Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol*. 62:449-54.
 - Galea LA, Ormerod BK, Sampath S, Kostaras X, Wilkie DM, Phelps MT. 2000. Spatial working memory and hippocampal size across pregnancy in rats. *Horm. Behav*. 37:86-95.
 - Giangrande PH, McDonnell DP, 1999. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* 54:291-313.
 - Giangrande PH, Pollio G, McDonnell, 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 272: 32889-32900.
 - Glickman MH y Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev*. 82:373-428.
 - Goldberg AL. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*. 426:895-899.
 - Gómez C, Saldivar-Gonzalez A, Delgado G, Rodriguez R. 2002. Rapid anxiolytic activity of progesterone and pregnanolone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 72:543-50.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- González-Arenas A, Neri-Gómez T, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. 2004. Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors in the lung of adult rats. *Steroids*. 69:351-6.
- González-Arenas A, Villamar-Cruz O, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. 2003. Regulation of progesterone receptor isoforms expression by sex steroids in the rat lung. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85:25-31.
- González-Arenas A, Reyna-Neyra A, Gómez MJ, Méndez I, Larrieta-Carrasco ME, Haces ML, Jiménez B, Camacho-Arroyo I. 2001. Los mensajeros químicos del sistema neuroendocrino. *Educ. Quím.* 3:158-162.
- González-Flores O, Guerra-Araiza C, Cerbón M, Camacho-Arroyo I, Etgen AM. The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats. *Endocrinology*. 2004. 145:2328-36.
- González-Mariscal G, Melo AI, Beyer C. 1993. Progesterone, but not LHRH or prostaglandin E2, induces sequential inhibition of lordosis to various lordogenic agents. *Neuroendocrinology*. 57:940-5.
- González-Mariscal G. 2001. Neuroendocrinology of maternal behavior in the rabbit. *Horm Behav.* 40:125-32.
- González-Morán G, Camacho-Arroyo I, 1998. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat Histol Embryol* 27:277-282.
- González-Vidal M.D. Cervera-Gaviria, M. Ruelas, R. Escobar, A. Morali, G. Cervantes, M. 1998. Progesterone: Protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res.* 29:117-124.
- Gore-Langton, R. E., Armstrong, D. T. Follicular steroidogenesis and its control. In: Physiology of Reproduction. In Knobil, E. y Neill, J. The physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 1988. Pp. 331-335.
- Goroscope WC, Freeman ME. 1985. Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion *in vitro*. *Biol. Reprod.* 32:279-83.
- Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.* 10:1286-91.

- Graham JD, Clarke CL. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18:502-519.
- Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL, 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res* 55:5063-5068.
- Green IC, Howell SL, El Seifi S, Perrin D, 1978. Binding of 3h-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetol* 15:349-355.
- Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Russell CA, Lucci L, Stevenson LL. 1991. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestone agent mifepristone. *J. Neurosurg.* 74:861-6.
- Guerra-Araiza C y Camacho-Arroyo I. 2000 Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev. Inv. Clin.* 52:686-691.
- Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. 2000. Progesterone receptor isoforms expresión pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci.* 73:1743-1752.
- Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Salazar AM, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. 2001. Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. *Brain Res. Bull.* 54:13-17.
- Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I. 2003. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after estradiol and progesterone treatments. *J. Neuroendocrinol.* 15:1-7.
- Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Milgrom E. 1994. Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91:7179-83.
- Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Applanat M, Milgrom E. 1991. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* 10:3851-9.
- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Atger M, Perrot-Applanat M, Milgrom E. 1989. Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell.* 57:1147-54.
- Gunnet JW, Granger K, Cryan E, Demarest KT, 1999. Characterization of the progestin receptors in the human TE85 and murine MC3T3-E1 osteoblast-like cell lines. *J Endocrinol* 163:139-47.

- Hatfield PM y Vierstra RD. 1992. Multiple forms of ubiquitin-activating enzyme E1 from wheat. Identification of an essential cysteine by in vitro mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 267:14799-14803.
- Heinemeyer W y Wolf DH. 2000. Active sites and assembly of the 20S proteasome. In: *Proteasomes: The world of Regulatory Proteolysis*, edited by Wolf DH and Hilt W. Georgetown. Tx: *Landes Bioscience*, p.48-70.
- Heinemeyer W, Gruhler A, Mohrle V, Mahe Y, Wolf DH. 1993. PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* 268: 5115-5120.
- Heinzl T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie Jr, Seto E, Einsenman RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. 1997. A complex containing NcoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature.* 387:43-48.
- Hershko A y Ciechanover A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61:761-807.
- Hershko A y Ciechanover A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 67:245-479.
- Herzog AG, Frye CA. 2003. Seizure exacerbation associated with inhibition of progesterone metabolism. *Ann. Neurol.* 53:390-1.
- Hilt W, Enenkel C, Gruhler A, Singer T, Wolf DH. 1993. The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J. Biol. Chem.* 268:3479-3486.
- Horwich AL, Weber-Ban EU, Finley D. 1999. Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96:11033-40.
- Horwitz KB, McGuire WL. 1975. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids.* 25:497-505.
- Horwitz KB, McGuire WL. 1978. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 253:2223-8.
- Hsue AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr, 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 5:76-127.

- Huse B, Verca SB, Matthey P, Rusconi S. 1998. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 12:1334-1342.
- Hutchison JS, Nelson PB, Zeleznik AJ. 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on corpus luteum function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. *Endocrinology.* 119:1964-1971.
- Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS. 1992. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:4658-4662.
- Ilenchuk T, Walters M. 1987. Rat uterine Progesterone receptor analyzed by [³H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology.* 120:1449-1456.
- Ing NH, Beekman JM, Kessler DJ, Murphy M, Jayaraman K, Zengdegui JG, Hogan ME, O'Malley BW, Tsai MJ. 1993. In vivo transcription of a progesterone responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic Acids Res.* 21:2789-9276.
- Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L, Horwitz KB. 1997. The partial agonist activity of antagonist occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain binding coactivator L7/SPA and the corepressors NcoR or SMRT. *Mol. Endocrinol.* 11:693-705.
- Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1997. Steroid receptor induction of gene transcription: a two-step model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:7879-84.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9:1603-1614.
- Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N. 1993. The ontogeny of gene expression of progestine receptors in the female rat brain. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 47:173-182.
- Kazmi SM, Visconti V, Plante RK, Ishaque A, Lau C. 1993. Differential regulation of human progesterone receptor A and B form-mediated trans-activation by phosphorylation. *Endocrinology.* 133:1230-8.

- Khan S, Abdelrahim M, Samudio I, Safe S. 2003. Estrogen receptor/Sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells. *Endocrinology*. 144:2325-2335.
- Khissiiin EI, Leclercq G. 1999. Implication of proteasome in estrogen receptor degradation. *FEBS Lett*. 448:160-6.
- Kim TK, Maniatis T. 1996. Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway. *Science*. 273:1717-9.
- Kisselev AF, Goldberg AL. 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem. Biol*. 8:739-58.
- In Knobil, E. y Neill, J. The physiology of Reproduction. Raven Press. New York. 1988. Pp. 331-335.
- Knobil E. 1988. The neuroendocrine control of ovulation. *Hum. Reprod*. 3:469-72.
- Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, Weigel NL. 2001. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J. Biol. Chem*. 276: 8475-83.
- Kraus WL, Katzenellenbogen BS. 1993a. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone end sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology*. 132:2371-2396.
- Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. 1993. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol. Endocrinol*. 7:1603-1616.
- Kroll M, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F, Thomas D, Friguet B, Conconi M. 1999. The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chem. Biol*. 6:689-98.
- Lange CA. 2004. Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol. Endocrinol*. 18: 269-78.
- Lange CA, Shen T, 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*. 97:1032-7.
- Lee DH, Goldberg AL. 1998. Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*. 8:397-403.

- Lemon B, Tjian R. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Develop.* 14:2551-2569.
- Leonhardt SA, Altmann M, Edwards DP. 1998. Agonist and antagonists induce homodimerization and mixed ligand heterodimerization of human progesterone receptors in vivo by a mammalian two-hybrid assay. *Mol. Endocrinol.* 12:1914-1930.
- Li S, Li Y, Carthew RW, Lai ZC. 1997. Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor. *Tramtrack.Cell.* 90:469-78.
- Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW. 2000. The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol. Cell.* 5:939-48.
- Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E. 1986. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:9045-9049.
- Mahesh V, Brann D, Hendry L. 1996. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 56:209-219.
- Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, Weigel LN. 1997. Differential expression of uterine progesterone receptors forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem. Molec. Biol.* 63:195-202.
- Masuyama H, MacDonald PN. 1998. Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J. Cell Biochem.* 71:429-40.
- Meijer OC, Steenbergen PJ, De Kloet ER. 2000. Differential expression and regional distribution of steroid receptor coactivators SRC-1 and SRC-2 in brain and pituitary. *Endocrinology.* 141:2192-9.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20:321-344.
- McKenna NJ, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1998. Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:11697-702.
- Melcangi RC, Magnaghi V, Galbiati M, Martini L. 2001. Formation and effects of neuroactive steroids in the central and peripheral nervous system. *Int. Rev. Neurobiol.* 46:145-76

- Mendoza-Rodríguez CA, Camacho-Arroyo I, García GA, Cerbón MA. 1999. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception*. 59:339-343.
- Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM. 1999. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:10403-8.
- Milgrom E, Baulieu EE. 1970. Progesterone in uterus and the plasma. II. The role of hormone availability and metabolism on selective binding to uterus protein. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 40:723-730.
- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-Verber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E. 1993. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochem. Biophys. Acta*. 1216:289-292.
- Molenda HA, Griffin AL, Auger AP, McCarthy MM, Tetel MJ. 2002. Nuclear receptor coactivators modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats. *Endocrinology*. 143:436-44.
- Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL. 1999. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 84:2963-2971.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*. 289:1751-1754.
- Myung J, Kim KB, Crews CM. 2001. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Medicinal Research Reviews*. 21:245-273.
- Nakayama T, Suzuki M, Ishizuka N. 1975. Action of progesterone on preoptic thermosensitive neurones. *Nature*. 258:80.
- Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL, O'Malley BW. 1999. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:1858-62.
- Nilsen J, Brinton RD. 2002. Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology*. 143:205-12.

- Nirmala PB, Thampan RV. 1995. Ubiquitination of the rat uterine estrogen receptor: dependence on estradiol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3:24-31.
- Orłowski M, Wilk S. 2000. Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 383: 1-16.
- 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.
- Paxinos, G. Watson. C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Sydney; Academic Press. 1986.
- Pearce PT, Khalid BAK, Funder JW. 1983. Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology.* 113:1287-1291.
- Pérez-Palacios. 1985. Mecanismos de acción de hormonas esteroides en bioquímica e inmunología. Vol 2. Cap VI, Ed. Hicks, J y Díaz-Agaya J.C. UNAM. México. 346-370.
- Perissi V, Aggarwal A, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. 2004. A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell.* 116:511-26.
- Perrot-Appianat M, David-Ferreira JF. 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. *Cell Tissue Res.* 223:1511-1519.
- Perrot-Appianat M, Groyer-Picard MT, Garcia E, Lorenzo F, Milgrom E. 1988. Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology.* 123:1511-9.
- Picazo O, Fernández-Guasti A. 1995. Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. *Brain Res.* 680:135-41.
- Pierson-Mullany LK, Lange CA. 2004. Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol. Cell Biol.* 24:10542-57.
- Pierson-Mullany LK, Skildum A, Faivre E, Lange CA. 2003. Cross-talk between growth factor and progesterone receptor signaling pathways: implications for breast cancer cell growth. *Breast Dis.* 18:21-31.

- Pollow K, Boquoi E, Baumann J, Schmidt-Gollwitzer M, Pollow B. 1977. Comparison of the in vitro conversion of estradiol-17 beta to estrone of normal and neoplastic human breast tissue. *Mol. Cell Endocrinol.* 6:333-348.
- Preisler-Mashek MT, Solodin N, Stark BL, Tyrivier MK, Alarid ET. 2002. Ligand-specific regulation of proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor-alpha. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282:891-8.
- Qiu M, Lange CA. 2003. MAP kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: degradation, transcriptional synergy, and nuclear association. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 85:147-57.
- Qiu M, Olsen A, Faivre E, Horwitz KB, Lange CA. 2003. Mitogen-activated protein kinase regulates nuclear association of human progesterone receptors. *Mol. Endocrinol.* 17:628-42.
- Quadros PS, Lopez V, De Vries GJ, Chung WC, Wagner CK. 2002. Progesterone receptors and the sexual differentiation of the medial preoptic nucleus. *J. Neurobiol.* 51:24-32.
- Ramírez VD y Beyer C. 1988. The ovarian cycle of the rabbit: its neuroendocrine control. In Knobil E y Neil J. The physiology of Reproduction. Raven Press. New York. Pp585-611.
- Rao KV, Peralta WD, Greene GL, Fox CF. 1987. Cellular progesterone receptor phosphorylation in response to ligands activating protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146:1357-65.
- Renwick AG. 1970. Metabolism and function of ovarian and testicular hormones. *J. Reprod. Fertil Suppl.* 12:55-64.
- Reyna-Neyra A, Camacho-Arroyo I, Ferrera P, Arias C. 2002. Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein 2 content in the rat hippocampus. *Brain Res. Bull.* 58:607-12.
- Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 277:5209-5218.
- Richer JK, Lange CA, Manning NG, Owen G, Powell R, Horwitz KB. 1998. Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J. Biol. Chem.* 273:31317-26.

- Rivett AJ, Gardner RC. 2000. Proteasome inhibitors: from in vitro uses to clinical trials. *J. Pept. Sci.* 6:478-88
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 78:761-771.
- Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. 1999. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J. Biol. Chem.* 274:22296-22302.
- Rotchild I, 1983. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin CW, Milgromm E, Mauvais-Jarvis P (eds) Progesterone and progestins. Raven Press, New York, pp 219-229.
- Rowan B, Garrison N, Weigel NL, O'Malley BW. 2000. 8-bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol. Cell Biol.* 20:8720-8730.
- Rupprecht R. 2003. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology.* 28:139-68.
- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. 2001. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J. Neurosci.* 21:6221-32.
- Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. 2002. Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats. *Neurosci. Lett.* 322:111-5.
- Salvatori L, Pallante P, Ravenna L, Chinzari P, Frati L, Russo MA, Petrangeli E. 2003. Oestrogens and selective oestrogen receptor (ER) modulators regulate EGF receptor gene expression through human ER alpha and beta subtypes via an Sp1 site. *Oncogene* 22:4875-4881.
- Salzmann U, Kral S, Braun B, Standera S, Schmidt M, Kloetzel PM, Sijts A. 1999. Mutational analysis of subunit i beta2 (MECL-1) demonstrates conservation of cleavage specificity between yeast and mammalian proteasomes. *FEBS Lett.* 454:11-15.

- Sandstrom NJ, Williams CL. 2001. Memory retention is modulated by acute estradiol and progesterone replacement. *Behav. Neurosci.* 115:384-93.
- Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB. 1994. A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Mol.Endocrinol.* 8:1347-1360.
- Savouret JF, Baily A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A, Milgrom E, 1991. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J.* 10:1875-1883.
- Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E. 1990. Molecular action of progesterone. *Int. J. Biochem.* 22:579-594.
- Schneider JS, Stone MK, Wynne-Edwards KE, Horton TH, Lydon J, O'Malley B, Levine JE. 2003. Progesterone receptors mediate male aggression toward infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:2951-6.
- Schowalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson ADW, Soneely, O'Malley BW, Toft DO. 1991. Characterization of progesterone receptor binding to the 90 and 70-kDA heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266:21165-21173.
- Schumacher M, Coirini H, Robert F, Guennoun R, El-Etr M. 1999. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav. Brain. Res.* 105:37-52.
- Shen T, Horwitz KB, Lange CA. 2001. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol. Cell Biol.* 21:6122-31.
- Sheridan PL, Evans RM, Horwitz KB. 1989. Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J. Biol. Chem.* 264:6520-6528.
- Shinoyima N, Tsuru S, Tsugita M, Katsura Y, Takemura T, Rokutanda M, Nomoto K. 1991. Thymic depletion in pregnancy: kinetics of thymocytes and immunologic capacities of the hosts. *J. Clin. Lab. Immunol.* 34:11-22.
- Sin N, Kim KB, Elofsson M, Meng L, Auth H, Kwok BH, Crews CM. 1999. Total synthesis of the potent proteasome inhibitor epoxomicin: a useful tool for understanding proteasome biology. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2283-8.
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature.* 389:194-198.

- Stein DG. 2001. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci.* 24:386-91.
- Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum. Reprod.* 9:1589-1595.
- Szabo M, Kilen SM, Nho SJ, Schwartz NB, 2000. Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. *Biol. Reprod.* 62:95-102.
- Takimoto G, Horwitz K. 1993. Progesterone receptor phosphorylation-complexities in defining a functional role. *Trends Endocrinol. Metabol.* 4:1-17.
- Takimoto GS, Hovland AR, Tasset DM, Melville MY, Tung L, Horwitz KB, 1996. Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J. Biol. Chem.* 271:13308-13316.
- Tang AH, Neufeld TP, Kwan E, Rubin GM. 1997. PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell.* 90:459-67.
- Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J. 2004. Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J.* 23:4813-23.
- Turner C, 1977. Progesterone and progestins in the male reproductive system. *Ann. NY Acad. Sci.* 286:313-320.
- Topper YJ, Freeman CS. 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* 60:1049-1106.
- Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horowitz KB. 1993. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol. Endocrinol.* 7:1256-1265.
- Turgeon JL, Waring DW. 2000. Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology.* 141:3422-9.
- Tyagi RK, Amazit L, Lescop P, Milgrom E, Guiochon-Mantel A. 1998. Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and ran guanosine triphosphate. *Mol. Endocrinol.* 12:1684-95.

- Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K. 1999. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology*. 140:805-813.
- Vallee M, Mayo W, Koob GF, Le Moal M. 2001. Neurosteroids in learning and memory processes. *Int. Rev. Neurobiol.* 46:273-320.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP, 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7:1244-1255.
- Vijay-Kumar S, Bugg CE, Wilkinson KD, Vierstra RD, Hatfield PM, Cook WJ. 1987. Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin. 262:6396-6399.
- Vinitzky A, Cardozo C, Sepp-Lorenzino L, Michaud C, Orlowski M, 1994. Inhibition of the proteolytic activity of the multicatalytic proteinase complex (proteasome) by substrate-related peptidyl aldehydes. *J. Biol. Chem.* 269:29860-29866.
- Vongher JM, Frye CA, 1999. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 64:777-785.
- Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM, 1993. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195:525-532.
- Weigel NL. 1996. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.* 319:657-67.
- Weisz J, Ward IL. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology*. 106:306-316.
- Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:8356-8364.
- Wilk S. y Figueiredo-Pereira ME. 1993 Synthetic inhibitors of the multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzime Protein.* 47:306-313.
- Yan F, Gao X, Lonard DM, Nawaz Z. 2003. Specific ubiquitin-conjugating enzymes promote degradation of specific nuclear receptor coactivators. *Mol. Endocrinol.* 17:1315-31.

- Ylikomi T, Gasc JM, Isola J, Baulieu EE, Tuohimäki P, 1985. Progesterone receptor in the chick bursa of fabricius: characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology* 117:155-160.
- Zhang J, Guenther MG, Carthew RW, Lazar MA. 1998. Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev.* 12:1775-80.
- Zhang X, Jeyakumar M, Bagchi MK. 1996. Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptors. Evidence for common transcriptional coactivator(s). *J. Biol. Chem.* 271:14825-33.
- Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement JP 4th, Prendergast P, Yip TT, Hutchens TW, Edwards DP, Weigel NL, 1997. Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol. Endocrinol.* 11:823-832.
- Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL, 1994. Identification of phosphorylation sites unique to the B form of human progesterone receptor. In vitro phosphorylation by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 269:31034-1040.
- Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL, 1995. Identification of a group of Ser-Pro motif hormone-inducible phosphorylation sites in the human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 9:1029-1040.
- Zhu J, Gianni M, Kopf E, Honore N, Chelbi-Alix M, Koken M, Quignon F, Rochette-Egly C. 1999. The H. Retinoic acid induces proteasome-dependent degradation of retinoic acid receptor alpha (RARalpha) and oncogenic RAR alpha fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:14807-12.
- Zwain IH, Yen SS. 1999a. Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology.* 140:880-7
- Zwain IH, Yen SS, 1999b. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* 140:3843-3852.