

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN Y LA REGULACIÓN  
DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR A  
PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO  
CENTRAL DE LA RATA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**P R E S E N T A:**

**QFB Andrea Almaraz Nieves**

**DIRECTOR:**

**DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO**



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.

# INDICE

<b>I.</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>III.</b>	<b>GENERALIDADES SOBRE EL HIPOTÁLAMO.....</b>	<b>5</b>
<b>IV.</b>	<b>GENERALIDADES SOBRE LA PROGESTERONA .....</b>	<b>7</b>
	IV.1. Estructura y función de la progesterona.....	7
	IV.2. Papel de la progesterona en el sistema nervioso central .....	10
	IV.3. Mecanismos de acción de la progesterona.....	12
	IV.4. Características del receptor a progesterona.....	15
	IV.5. Regulación de las isoformas del receptor a progesterona en el sistema nervioso central.....	23
<b>V.</b>	<b>RELACIÓN ENTRE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR A PROGESTERONA Y LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....</b>	<b>25</b>
	V.1. Regulación del RP en el SNC durante la ovulación .....	25
	V.2. Participación del RP en la conducta sexual .....	26
	V.3. Expresión del RP durante el embarazo .....	26
	V.4. Participación del RP en la conducta maternal y paternal .....	27
	V.5. Relación entre la expresión del RP y la excitabilidad neuronal .....	28
	V.6. Participación del RP en la neuroprotección, memoria y aprendizaje..	29
<b>VI.</b>	<b>TRABAJO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>30</b>
	VI.1. Justificación .....	30
	VI.2. Planteamiento del problema .....	30
	VI.3. Hipótesis .....	30
	VI.4. Objetivos .....	31
	VI.5. Metodología.....	31
	VI.5.1. Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica.....	31
	VI.5.2. Análisis de la especificidad de los anticuerpos.....	34
	VI.5.3. Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia.....	35
<b>VII.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>VIII.</b>	<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>44</b>
<b>IX.</b>	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>45</b>

## **I. RESUMEN**

En el presente escrito se abordará la relación entre la respuesta fisiológica a la progesterona (P4) y el patrón de expresión de las isoformas del receptor a progesterona (RP) en varios tejidos del sistema nervioso central (SNC). Se hará hincapié en los efectos de la P4 en el hipotálamo y otros tejidos involucrados de manera importante en la reproducción y la conducta. Finalmente se mostrará el trabajo experimental realizado sobre la estandarización de una técnica de inmunofluorescencia, que permitiría colocalizar las isoformas del RP en el hipotálamo de la rata; sin embargo la carencia de un anticuerpo específico para reconocer la isoforma RP-A no permitió establecer las condiciones experimentales para dicha técnica, y así conocer la expresión y la distribución de ambas isoformas del RP en los tejidos estudiados.

## II. INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroideas sexuales actúan como mensajeros químicos regulando una gran variedad de actividades fisiológicas en los mamíferos, incluido el ser humano. La coordinación del sistema neuroendocrino con otros sistemas que conforman a los organismos pluricelulares, entre los que destacan el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmunológico, permite la supervivencia y la adaptación de las especies a los diferentes ecosistemas (González-Arenas et al., 2003).

La progesterona (P4) una hormona esteroide, participa en distintas funciones del SNC, entre las que destacan las conductas asociadas a la reproducción (Delville y Blaustein, 1989), la excitabilidad neuronal y tiene acción neuroprotectora ante diversas condiciones patológicas (Reyna-Neyra et al., 2002). Los efectos fisiológicos de la P4 dependen del tipo celular y de la vía por la cual actúe sobre las células blanco. La P4 puede ejercer acción en neuronas y células gliales a través de 1) receptores intracelulares específicos (RP); 2) sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores y 3) canales iónicos (Camacho-Arroyo et al., 2003).

Los efectos genómicos de la P4 están mediados por el RP, del cual se han caracterizado dos isoformas: RP-A y RP-B con distinta función y regulación (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). El nivel de expresión del RP así como la relación estequiométrica entre ambas isoformas en distintos tejidos varía como consecuencia del desarrollo y estado hormonal (Conneely y Ludon, 2000).

Por lo tanto, para entender los efectos fisiológicos tejido-específicos, es importante conocer el patrón de expresión de las isoformas del RP a través de una técnica que permita colocalizar dichas isoformas en la misma célula intacta y no en homogenados del tejido como hasta hoy día se ha caracterizado.

### **III. GENERALIDADES SOBRE EL HIPOTÁLAMO**

Una región del cerebro se distingue de otra por los tipos neuronales y los patrones de interconexión. Tanto si se trata de una respuesta refleja simple como de un acto mental complejo, la conducta es el resultado de un patrón de transmisión de señales entre células interconectadas adecuadamente. (Blaustein, 2003).

El hipotálamo está situado en la base del tercer ventrículo, por debajo del tálamo y por encima de la hipófisis o pituitaria. El hipotálamo desempeña un papel muy importante en la regulación del sistema nervioso autónomo (compuesto por las neuronas aferentes y eferentes que inervan las glándulas, vísceras y tejido muscular liso) y cumple una función integradora al regular las siguientes funciones (Conn y Freeman, 2000):

- Control de la presión arterial y la composición electrolítica mediante un conjunto de mecanismos reguladores que van desde el control de la ingesta de líquidos y el apetito por la sal hasta el mantenimiento de la osmolalidad sanguínea y el tono vasomotor.
- Regulación de la temperatura corporal por medio de actividades que abarcan el control de la termogénesis metabólica hasta comportamientos como buscar un ambiente más cálido o más frío.
- Control del metabolismo energético regulando la ingesta de alimentos, la digestión y el metabolismo.
- Regulación de la reproducción a través del control hormonal del apareamiento, el embarazo y la lactancia.
- Control de la respuesta de emergencia al estrés, incluidas las respuestas físicas e inmunológicas al estrés regulando el flujo sanguíneo al músculo y a otros tejidos, así como la secreción de adrenalina.

El hipotálamo se puede dividir anatómicamente en las siguientes regiones: área preóptica (POA), hipotálamo anterior, hipotálamo medial, e hipotálamo posterior. Cada área puede subdividirse en media y lateral y comprender varios núcleos que se distinguen por su funcionalidad (Tabla 1).

### Núcleos del Hipotálamo

Área Preóptica (POA)	Núcleo preóptico medial
	Núcleo preóptico periventricular
Hipotálamo Anterior	Núcleo Periventricular
	Núcleo supraquiasmático
	Núcleo hipotalámico anterior
	Núcleo supraóptico
	Núcleo paraventricular (PVH)
Hipotálamo Medial	Área quiasmática medial
	Núcleo arcuato
	Núcleo ventromedial (VMH)
	Núcleo dorsomedial
	Núcleo perifornical
Hipotálamo Posterior	Eminencia Media
	Núcleo arcuato posterior
	Núcleo tuberomamilar
	Núcleo premamilar ventral
	Núcleo premamilar dorsal
	Núcleo hipotalámico posterior
	Núcleo supramamilar

**Tabla 1.** Divisiones topográficas del hipotálamo

El hipotálamo tiene conexiones vasculares con el lóbulo anterior de la hipófisis. Estos capilares sanguíneos se conocen como *el sistema porta hipotálamo-hipófisis*, lo que permite que las hormonas liberadoras que se sintetizan en el hipotálamo lleven el mensaje a la hipófisis anterior o adenohipófisis donde se sintetizarán hormonas que tienen acciones en

diferentes órganos blanco. Así mismo, algunos núcleos del hipotálamo están conectados directamente con la médula espinal donde las neuronas aferentes de órganos reciben un estímulo externo relacionado a la función fisiológica en curso (Purves et al., 2001).

La parte más anterior del hipotálamo es el POA, que regula los ciclos de actividad, la temperatura corporal y en muchos mamíferos sintetiza la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

Los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo sintetizan oxitocina y vasopresina (llamada también hormona antidiurética). Estas dos hormonas descienden por los axones hasta el lóbulo posterior de la hipófisis dentro de gránulos secretores.

Cuando se recibe un estímulo nervioso, estos gránulos descargan su contenido en la hipófisis posterior y las hormonas hipofisarias alcanzan el torrente sanguíneo. Además de sus efectos como hormonas, la vasopresina y la oxitocina, también pueden actuar como neurotransmisores entre el hipotálamo y la médula espinal. La oxitocina induce la contracción del músculo liso, favoreciendo la producción de leche en la mama y la contracción uterina durante el parto.

Los núcleos ventromedial (VMH) y dorsomedial se proyectan en todo el interior del hipotálamo y hacia el sistema límbico para regular funciones complejas de integración como el control del crecimiento, la alimentación, la maduración y junto con el POA las conductas asociadas a la reproducción.

## **IV. GENERALIDADES SOBRE LA PROGESTERONA**

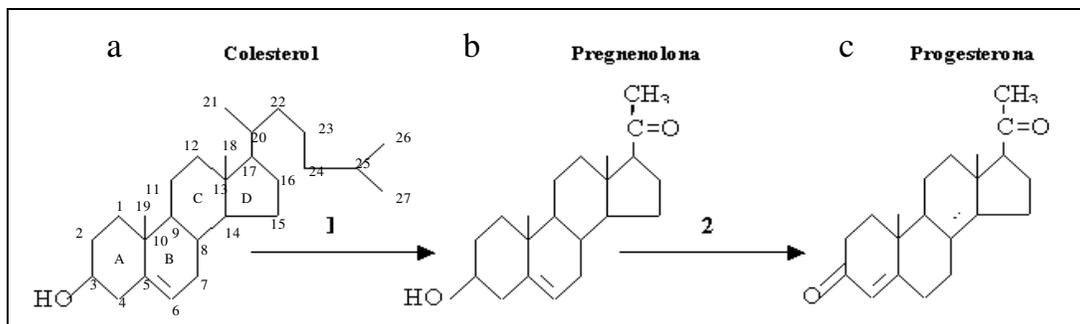
### **IV.1. Estructura y función de la progesterona**

La P4 (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides, su nombre se deriva del latín: *pro* (a favor) y *gestare* (llevar), lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción (Pérez-Palacios, 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. 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 (Perrot-Applanat y David-Ferreira, 1982), el testículo, (Weisz y Ward, 1980; Dalkin et al., 1992) y el cerebro (Zwain y Yen, 1999; Ukena et al., 1999).

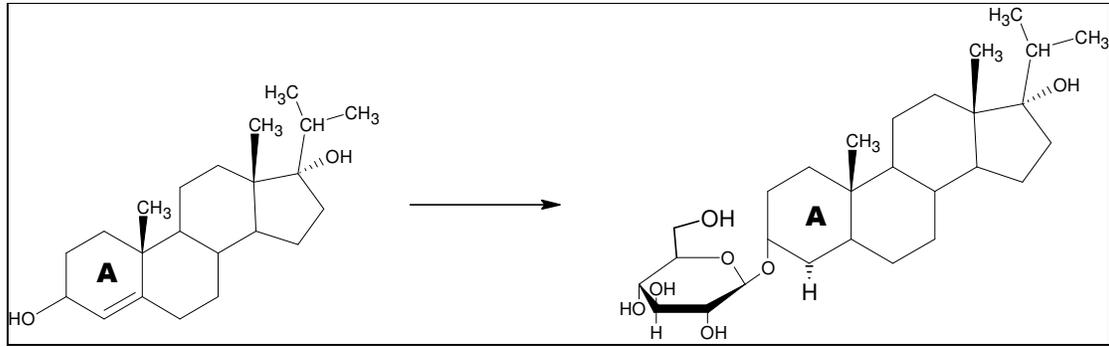
La síntesis de la P4 es regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y la adrenalina, llamada también epinefrina (Graham y Clark, 1997); y se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a P4 (Fig. 1), por medio de distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.



**Figura 1. 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 y c) la migración del doble enlace del anillo B al anillo A por medio de la enzima 3 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa (2) (Gore-Langton , 1988).

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

1. La reducción en el carbono 20 que da lugar a la formación de 20 $\alpha$  y 20 $\beta$  dihidroprogesterona (con actividad biológica, que puede ser similar o diferente a la de progesterona); posteriormente, se reduce el anillo A en los carbonos 3 y 5 dando lugar a la formación de diferentes compuestos (pregnandioles y pregnantrioles).
2. La eliminación de los pregnandioles ocurre cuando, por condensación con la glucopiranososa, forma glucósidos; esto incrementa la polaridad de la molécula y se forman compuestos hidrofílicos que son excretados por orina (Fig. 2).



**Figura 2.** Formación de un glucósido a partir de pregnandiol.

La P4 participa en muchas de las actividades biológicas de diferentes tejidos (Tabla 2). Sus efectos pueden ser estimuladores: como en el caso de la liberación de la GnRH (Ke y Ramírez, 1987), de la dopamina (Dluzen y Ramírez, 1991), en la inducción de la lordosis (Schaeffer et al., 1990), que es una conducta de receptividad sexual durante la cual la hembra flexiona su espina dorsal en forma de arco al ser montada por un macho para darle acceso a la cavidad vaginal; en la síntesis de uteroglobina, en la reacción acrosomal y en el flujo de  $Ca^{2+}$  en el espermatozoide (Meizel y Turner, 1991; Tesarik et al., 1992). Los efectos de la P4 también pueden ser inhibidores, como en la contractilidad uterina (Csapo y Resch, 1979) y en la síntesis de noradrenalina inducida por AMPc en el hipotálamo (Petitti y Etgen, 1992).

Tejido	Función	Referencia
Útero/Ovario	Liberación del ovocito	Susuki et al., 1994
	Facilitación de la implantación	Graham y Clarke, 1997
	Mantenimiento del embarazo	Rotchild, 1983
	Estimulación de la regeneración del estroma	Clarke, 1993
Glándula mamaria	Aumento del desarrollo alveolar	Topper y Freeman, 1980
	Regulación de la síntesis de leche	Savouret et al., 1990
Cerebro	Regulación de la respuesta sexual	Camacho-Arroyo et al., 1995
	Reducción de la excitabilidad neuronal y aumento de sueño	Camacho-Arroyo et al., 1999
	Neuroprotección	González-Morán y Camacho-Arroyo, 1998 Vongher y Frye, 1999

	Memoria y Aprendizaje	Reyna-Neyra et al., 2002
Timo	Involución del timo	Shinoyima et al., 1991
Hueso	Prevención de la pérdida de la masa ósea	Wei et al., 1993
Pulmón	Maduración, desarrollo y ventilación	Beyer et al., 2003 González-Arenas et al., 2003

**TABLA 2.** Acciones fisiológicas de la P4.

Otro de los efectos estudiados de la P4 es su participación en el ciclo celular y, para ello se han utilizado como modelo las células T47-D provenientes de cáncer de mama (las cuales expresan el RP). Cuando se tratan estas células con P4 se observa progresión del ciclo celular, lo que está relacionado con la inducción de genes asociados a este proceso, como las ciclinas CD-1 (Musgrove et al., 1991, 1993), los factores de crecimiento EGT, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  (Murphy et al., 1986; Musgrove et al., 1993) y protooncogenes asociados con la actividad proliferativa (Wong y Murphy, 1991; Musgrove et al., 1991).

#### **IV.2. Papel de la progesterona en el SNC**

La P4 ejerce diversas acciones en el SNC de mamíferos de forma tejido-específica, incluyendo médula espinal, tallo cerebral, cerebelo, hipotálamo, hipocampo, amígdala, corteza y bulbo olfatorio (Schumacher et al., 1999). La P4 participa en los procesos de regulación de la ovulación, la conducta sexual (Conneely y Ludon, 2000), la diferenciación sexual del cerebro, la excitabilidad neuronal, el ciclo sueño-vigilia, el estado de ánimo, aprendizaje y memoria, neuroprotección y en el crecimiento de tumores cerebrales (Beyer et al., 1997).

En relación con el control de la reproducción, se ha reportado que la P4 participa en el proceso de ovulación al incrementar la liberación de GnRH en neuronas hipotalámicas; participa en el desarrollo de la conducta sexual de las hembras al inducir la síntesis de varios péptidos y proteínas, tales como la oxitocina y su receptor o por la reducción de la actividad del receptor a  $\mu$ -opioides (MOR) (Skinner et al., 1998). Después de la liberación de la hormona luteinizante (LH), la P4 reduce la frecuencia de los pulsos de liberación de la GnRH; además se ha observado que después de la inducción del comportamiento de lordosis por parte de la P4, dosis subsecuentes de la hormona no inducen la conducta

sexual, por lo que se evidencia el proceso conocido como inhibición secuencial (Beyer et al., 1997).

El incremento de la temperatura basal corporal, que se observa durante el ciclo menstrual y el embarazo, es también modulado por la P4 a través de las neuronas termosensibles que se encuentran en el POA (Nayakama et al., 1975). La P4 provoca el desarrollo del comportamiento maternal en hembras de roedores y conejos mientras que en los machos adultos induce la agresión contra las crías (Schneider et al., 2003).

Respecto a la excitabilidad neuronal, se ha reportado que la P4 modula la actividad de varios neurotransmisores como el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), glutamato, acetilcolina, dopamina, norepinefrina y serotonina. Algunos de los metabolitos reducidos de la P4, como la  $3\alpha,5\alpha$ - tetrahidroprogesterona pueden tener la misma o mayor actividad que su precursor (Frye et. al, 2000). Se ha observado que la P4 disminuye la excitabilidad neuronal, que puede resultar en un efecto anestésico, incluso en varones, al incrementar la actividad de GABA o por la regulación del glutamato (Oettel, et. al, 2004). De hecho la P4 ejerce sus efectos anestésicos en varias especies y posee propiedades anticonvulsivas tanto en animales de experimentación como en humanos (Camacho-Arroyo, 2003).

La P4 se relaciona con el incremento de la analgesia que se observa durante el embarazo (Caba et al., 1994), ya que provoca el incremento del contenido de dinorfina en la médula espinal de la rata a nivel lumbar (Medina et al., 1993).

La aparición de los síntomas del síndrome premenstrual en mujeres, como la ansiedad que se observa al final de la fase lutea, ha sido correlacionada con una disminución en los niveles de P4; se ha reportado que algunos metabolitos de la P4 poseen propiedades ansiolíticas (Backstrom et al., 2003).

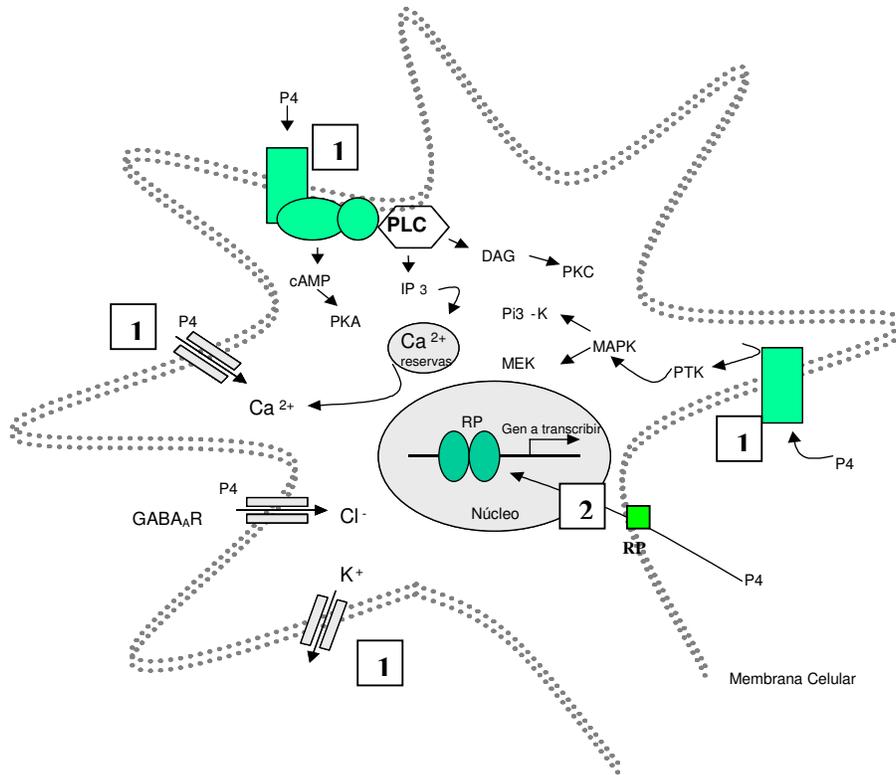
El tratamiento agudo con P4 favorece la formación de espinas dendríticas inducidas por E2 en el hipocampo, demostrando que la P4 participa también en la modulación de la plasticidad sináptica; este efecto coincide con un incremento en el contenido de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) en el hipocampo (Reyna-Neyra et al., 2002). Se ha reportado en otros experimentos que la memoria espacial de las ratas varía durante el embarazo, observando que la memoria de retención es favorecida por la P4 (Gould et al., 1990).

La regeneración neuronal posterior a la administración de P4 en el SNC de ratas después de un daño, se ha asociado con el aumento de la síntesis de componentes mielínicos por parte de las células de Schwann y los oligodendrocitos (Schumacher et al., 2004).

Por otro lado, durante la etapa temprana postnatal, las células de Purkinje del cerebelo sintetizan P4 y ésta promueve tanto el crecimiento dendrítico como la sinaptogénesis de dichas células, contribuyendo a la formación de circuitos neuronales en el cerebelo (Reyna-Neyra et al., 2004).

### **IV.3. Mecanismos de acción de la progesterona.**

Los mecanismos celulares mediante los cuales la P4 puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: genómicos y no genómicos (Bramley, 2003). Los primeros involucran la interacción de la P4 con sus receptores nucleares específicos (RP) (Evans, 1988), mientras que los segundos requieren la interacción de la P4 con receptores membranales o sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores como el GABA, canales iónicos, receptores de tipo tirosina cinasa y receptores de siete dominios transmembranales (Fig. 3); (Camacho-Arroyo, 2003).



**Figura 3. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de la P4.** Los efectos de la P4 ocurren por dos mecanismos celulares: **1)** en la membrana incluyen la participación de receptores membranales y canales iónicos, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares. **PKA:** Proteína Cinasa A, **GABA<sub>A</sub>R:** Receptor a GABA tipo A, **RP:** Receptor a P4, **PLC:** Fosfolipasa C, **IP<sub>3</sub>:** Inositol Trifosfato, **DAG:** Diacil glicerol, **PKC:** Proteína Cinasa C, **PI<sub>3</sub>-K:** Cinasa de Inositol Trifosfato, **PTK:** Proteína de Tirosina Cinasa, **MAPK:** Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, **MEK:** Cinasa de MAPK, **Cl<sup>-</sup>:** Cloro, **Ca<sup>2+</sup>:** Calcio, **K<sup>+</sup>:** Potasio (Camacho-Arroyo, 2003). **2)** en el núcleo donde receptores a P4 (RP) 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.

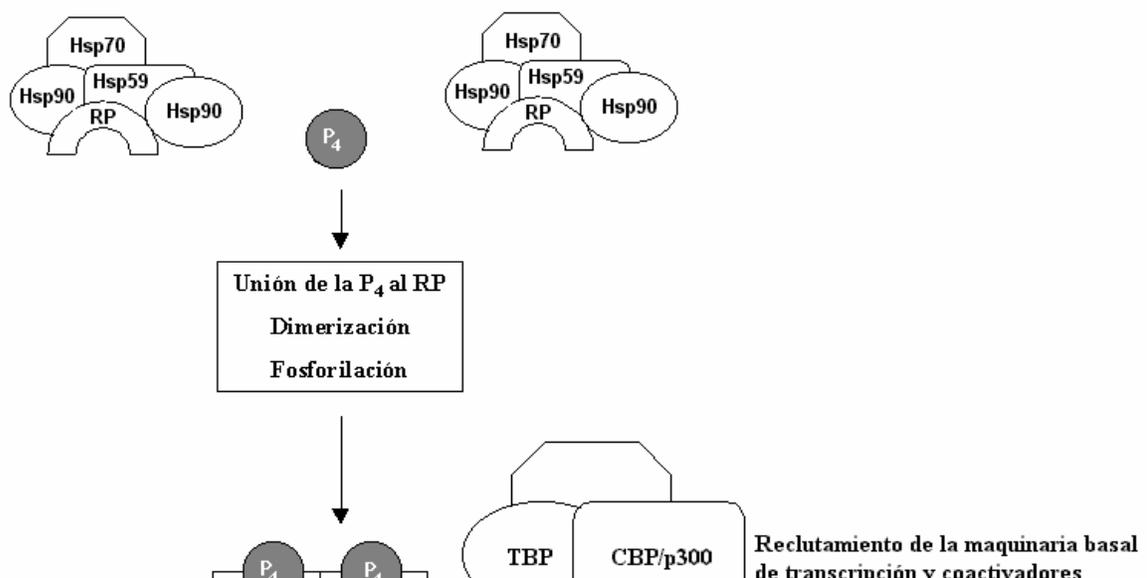
Mediante el mecanismo no genómico se modifican la conductancia iónica, la formación de segundos mensajeros y la activación de cascadas de fosforilación (Bramley, 2003). De esta manera la P4 puede regular diferentes funciones en el cerebro a corto (milisegundos), mediano (minutos) y largo plazo (horas 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. En general, el mecanismo de acción del RP se lleva a cabo de la siguiente manera (Fig. 4) (Giangrande et al., 1997):

- 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, 1989; Chambraud et al., 1990; Schowalter et al., 1991).
- Dimerización del RP y aumento en su afinidad por secuencias reguladoras en el DNA, denominadas elementos de respuesta hormonal (HRE), en este caso es un elemento de respuesta a P4. Activación del RP por fosforilación.
- Unión del RP activado a su elemento de respuesta, el reclutamiento de cofactores de la 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).
- 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 es removido para su posterior degradación por el proteosoma.
- La fosforilación del RP inducida por la P4 y mediada por proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) es señal para la ubiquitinación del RP y su degradación por el proteosoma 26S.

Los coactivadores de receptores nucleares como el RP son una clase de proteínas coreguladoras que interactúan con estos receptores de manera ligando específica, para potenciar su efecto en la transcripción de genes blanco.

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.



**Figura 4. Mecanismo general de activación del RP por su ligando.** 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 HRE, reclutar a coactivadores y a la maquinaria basal de transcripción, lo cual modifica la transcripción del gen blanco. El complejo formado puede reclutar otros cofactores al promotor como el CBP/p300 que pueden 1) abrir la estructura de la cromatina a través de su actividad de histona acetil transferasa (HAT) y 2) contribuir a la estabilización del complejo de pre-iniciación (Giangrande et al., 1997).

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. La unión del RP con SMRT y/o NcoR se da cuando el receptor está unido a antagonistas o incluso agonistas (Heinzel et al., 1997, Jackson et al., 1997). La existencia de coactivadores y correpresores aumenta aún más el nivel de complejidad de la regulación de la actividad del RP.

#### **IV.4. Características del receptor a progesterona.**

El RP pertenece a la familia de receptores a hormonas esteroides; 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 secuencias específicas en el DNA (HRE). Este receptor 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 (Fig. 5); 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 más 7 intrones (Fig. 5) (Misrahi et al., 1993).

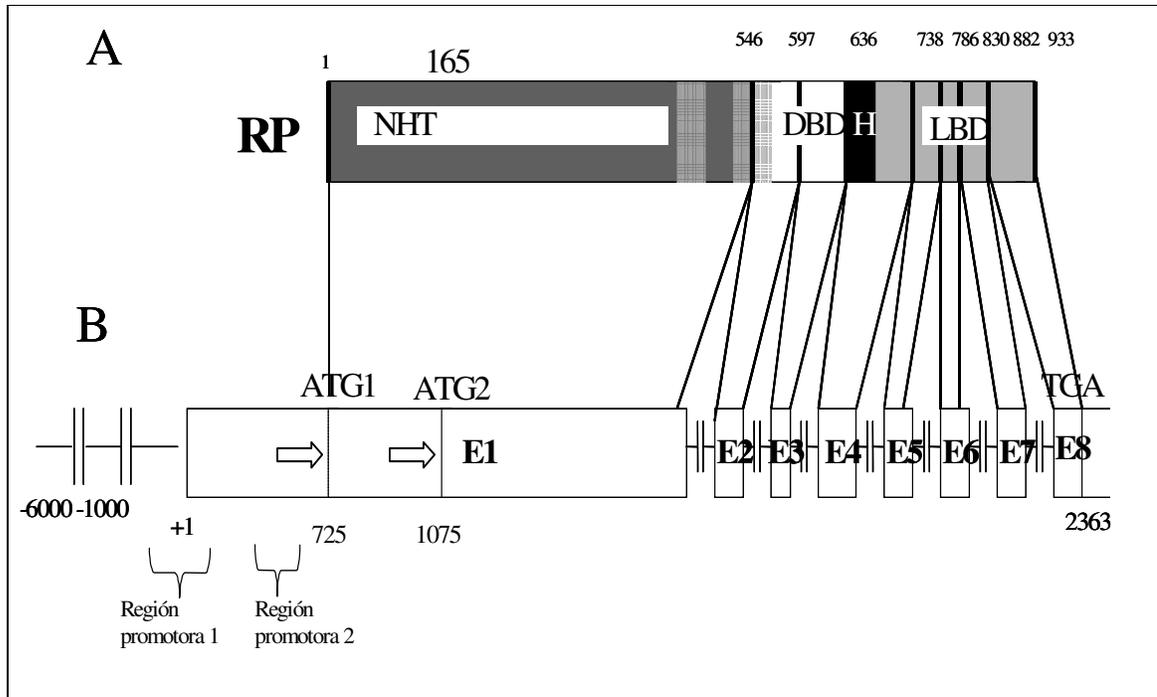
La identidad entre los genes del RP de humano y el de rata es de un 85% y la identidad entre las proteínas es de un 96% (Park-Sarge y Mayo, 1994).

Estructuralmente, las isoformas del RP están compuestas por cuatro dominios que llevan a cabo las siguientes funciones:

- 1) Dominio amino terminal (NHT):** 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.
- 2) Dominio de unión al DNA (DBD):** 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 cinc.

- 3) **Dominio bisagra (H):** 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 de localización nuclear (NLS).
- 4) **Dominio de unión al ligando (LBD):** 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 (Fig. 5).

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. En el humano el RP contiene 14 sitios de fosforilación (Fig. 6), de los cuales 10 han sido identificados mediante ensayos de fosforilación *in vitro e in vivo* (Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>162</sup>, Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>213</sup>, Ser<sup>294</sup>, Ser<sup>346</sup>, Ser<sup>400</sup>, Ser<sup>676</sup>) y cuatro únicamente por fosforilación *in vitro* (Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>130</sup>, Ser<sup>430</sup>, Ser<sup>554</sup>) (Zhang et al., 1994 y 1995, Lange et al., 2000, Knotts et al., 2001).

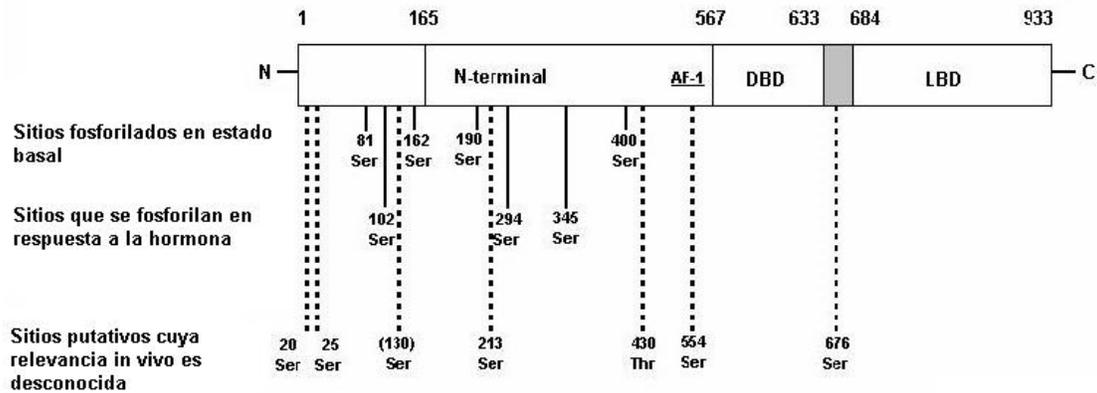


**Figura 5. Estructura del RP de la rata y su gen. A)** Organización de los dominios del RP de la rata. La secuencia de aminoácidos del RP está dividida en 4 dominios: el dominio amino terminal señalado (NHT), el dominio de unión al DNA (DBD), el dominio bisagra (H) y el dominio de unión al ligando (LBD). Las funciones de cada uno de estos dominios se describen en el texto. **B)** Estructura del gen del RP de la rata. 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. Las dos regiones altamente conservadas entre el RP del humano, el pollo y la rata están señaladas con flechas huecas. 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. Los intrones están señalados como líneas interrumpidas entre cada exón. La región promotora 1 se encuentra ubicada de la posición -131 a +65 y la 2 en la posición +461 a +675. Se señalan las dos posiciones de inicio de la traducción (ATG) y la de término (TGA); (Misrahi et al., 1993).

Se ha reportado que la P4 induce la fosforilación del RP en los residuos Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>294</sup>, Ser<sup>345</sup>, Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>162</sup>, Ser<sup>190</sup> y Ser<sup>400</sup> (Zhang et al., 1994 y 1995). Además se conocen tres diferentes cinasas capaces de fosforilar algunos de estos residuos; el residuo Ser<sup>81</sup> puede ser fosforilado por la caseína cinasa II (CKII) (Zhang et al., 1994), los residuos Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>213</sup>, Ser<sup>294</sup>, Ser<sup>430</sup>, Ser<sup>554</sup>, Ser<sup>676</sup> por la cinasa 2 dependiente de ciclina (Cdc2) (Zhang et al., 1997, Knotts et al., 2001), y los residuos Ser<sup>162</sup> y Ser<sup>294</sup> por las

proteínas cinasas activadas por mitógenos 44 y 42 (MAPK-44 y MAPK-42) (Lange et al., 2000).

Hasta el momento, no se han hecho estudios en la rata sobre los sitios de fosforilación y las cinasas que pudieran fosforilarlos, sin embargo a través de diversos algoritmos bioinformáticos (Mac. Vector y NetPhos 2.0) se han identificado 37 residuos de serina en el RP de la rata que podrían ser fosforilados por cinasas tales como la proteína cinasa C (PKC) para los residuos Ser<sup>94</sup>, Ser<sup>399</sup>, S<sup>575</sup>, S<sup>757</sup>, S<sup>857</sup>, la proteína cinasa A (PKA) para los residuos Ser<sup>98</sup>, Ser<sup>170</sup>, Ser<sup>276</sup>, Ser<sup>281</sup>, Ser<sup>344</sup>, Ser<sup>488</sup>, Ser<sup>539</sup>, caseína cinasa I (CK I) para los residuos Ser<sup>15</sup>, Ser<sup>26</sup>, Ser<sup>43</sup>, Ser<sup>50</sup>, Ser<sup>98</sup>, Ser<sup>130</sup>, Ser<sup>166</sup>, Ser<sup>202</sup>, Ser<sup>232</sup>, Ser<sup>276</sup>, Ser<sup>394</sup>, Ser<sup>397</sup>, Ser<sup>443</sup>, Ser<sup>450</sup>, Ser<sup>468</sup>, Ser<sup>542</sup>, Ser<sup>576</sup>, Ser<sup>747</sup>, Ser<sup>786</sup> y Ser<sup>888</sup>, la CK II para los residuos Ser<sup>80</sup>, Ser<sup>89</sup>, Ser<sup>113</sup>, Ser<sup>122</sup>, Ser<sup>166</sup>, Ser<sup>450</sup>, Ser<sup>829</sup> y Ser<sup>869</sup>, la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK-3) para los residuos Ser<sup>43</sup>, Ser<sup>94</sup>, Ser<sup>162</sup>, Ser<sup>166</sup>, Ser<sup>439</sup>, Ser<sup>443</sup>, Ser<sup>703</sup>, la cinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII) para los residuos Ser<sup>98</sup>, Ser<sup>170</sup>, Ser<sup>539</sup>, Ser<sup>829</sup>, la Cdc2 para el residuo Ser<sup>190</sup> y la proteína cinasa G para el residuo Ser<sup>98</sup> (Poletti et al., 1993).



**Figura 6. Sitios de fosforilación en el RP humano (hRP).** Residuos de fosforilación en el hRP identificados hasta la fecha. Tomado de Knotts et al., 2001.

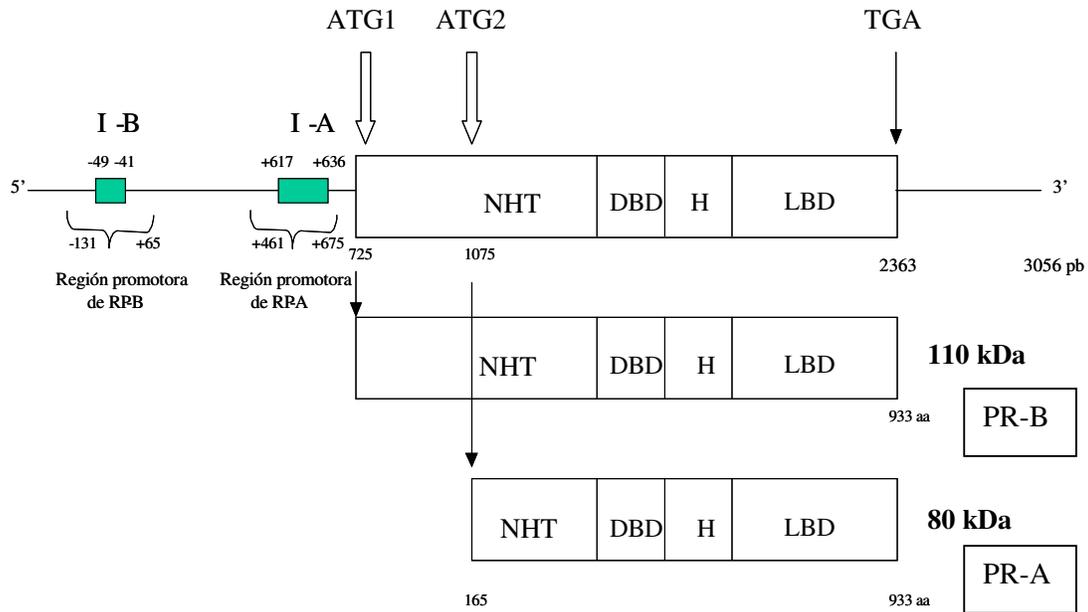
El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por los HRE (Mahesh et al., 1996; Beato, 1989). Se ha observado que la fosforilación del RP en el residuo Ser<sup>294</sup> del humano es necesaria para la ubiquitinación del receptor y su degradación por el proteosoma 26S (Lange, et al., 2000).

Se ha detectado la presencia del RP en diferentes tejidos del aparato reproductivo de distintos grupos de vertebrados; en las células de la granulosa en del ovario (Milgrom y Baulieu, 1970) en las trompas de falopio, en la vagina, en el testículo (Terner, 1977); en las células de músculo de arterias uterinas (Perrot-Applanat y David-Ferreira, 1982); así como en el oviducto y bolsa de Fabricio de pollo (Ylikomi et al., 1985; González-Morán y Camacho-Arroyo, 1998). También el RP se ha localizado 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 expresa 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., 1994b).

Como se mencionó anteriormente, se han identificado dos isoformas del RP, las cuales se han denominado RP-A (80-94 KDa) y RP-B (108-120 KDa) (Fig. 7). La isoforma RP-A carece de 164 aminoácidos en la región amino terminal que sí 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 RP-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., 1993b) (Fig. 7).

Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad tanto por la P4 como por los HRE (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).

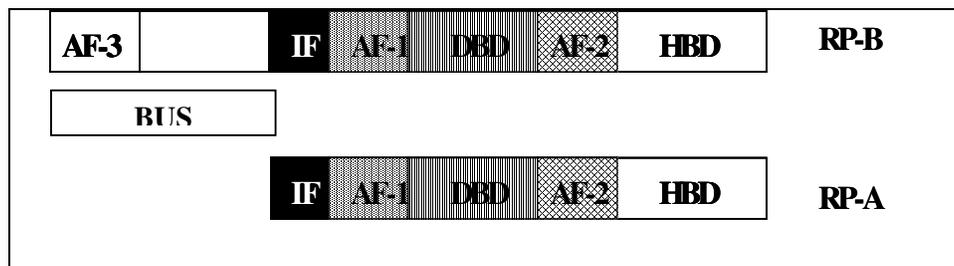


**Figura 7. Organización de las isoformas del RP de la rata.** Los números indican la posición de las bases y de los aminoácidos en el gen y en las proteínas de las isoformas de RP respectivamente. IT-B e IT-A: Sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; ATG-1 y ATG-2: Sitios de inicio de la traducción de RP-B y RP-A respectivamente; TGA: Codón de término de la traducción (Park-Sarge y Mayo 1994; Kraus et al., 1993b).

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).

RP-A puede ejercer efectos represores sobre la actividad transcripcional de otros receptores a hormonas esteroides como el receptor a estrógenos, los receptores a glucocorticoides y mineralocorticoides. Esta capacidad transrepresora permite al RP-A mediar las acciones de la P4 al mismo tiempo que regula los efectos de otras hormonas, participando de forma importante en la integración de señales (*cross-talk*) mediados por otros receptores a hormonas (Camacho-Arroyo, 2003).

La distinta actividad transcripcional de cada isoforma del RP puede ser relacionada con las diferencias en su estructura: la isoforma RP-A carece de 164 aminoácidos presentes en el extremo amino terminal de la isoforma RP-B (Graham et al., 1995). El RP-A posee solamente dos regiones con funciones de activación (AF1, AF2), mientras que el RP-B contiene además una tercera región (AF3) presente en el extremo amino terminal (“B-upstream” o BUS) (Giagrande y McDonell, 1999) (Fig. 8). La presencia de una región con función inhibitoria localizada en la región adyacente a AF1 que sólo es funcional en RP-A. Se 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).



**Figura 8. Organización estructural de las isoformas del RP.** La organización general de las proteínas de las isoformas del RP está esquemáticamente ilustrada. AF-1, AF-2 y AF-3 indican las funciones de activación, IF la función de inhibición, DBD el dominio de unión al DNA y HBD el dominio de unión a la hormona (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000).

Por otro lado, cada isoforma es más afín a coactivadores o a correpresores de la transcripción: el RP-A presenta mayor afinidad a correpresores como el SMRT, incluso 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), mientras que el RP-B es más afín a coactivadores como el SRC-1 (Camacho-Arroyo, 2003). Incluso la tasa de expresión de los coactivadores respecto a los correpresores dentro del ambiente celular influye en la actividad transcripcional de cada isoforma, provocando que en algunos casos el RP-A no ejerza su actividad represora (Camacho-Arroyo, 2003).

Se sabe que 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).

La diferente distribución y regulación de los 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. 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).

Las dos isoformas de RP tienen distinta localización subcelular en células de cáncer endometrial. Mientras que el RP-B está localizado primordialmente en el citoplasma, el RP-A se encuentra en el núcleo; lo anterior apunta a que en ausencia de ligando el RP-B puede ejercer efectos no genómicos en el citoplasma y el RP-A puede actuar de forma ligando independiente en el núcleo. Estas observaciones llevan a sugerir que una alteración en la expresión o actividad de las isoformas del RP puede tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la P4 (Mote et al., 1999).

El RP es regulado de manera positiva por el E2 y de manera negativa por P4 en muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo (Graham y Clarke, 1997; Camacho-Arroyo et al., 1994a; Mendoza-Rodríguez et al., 1999).

La regulación positiva del RP por estrógenos, como el E2, se debe a que en el promotor del gen de este receptor se han determinado los 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 palindrómica 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 y Katzenellenbogen, 1993a). 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., 1993b), 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 podrían implicar la participación otras proteínas, dada la carencia de elementos de respuesta a P4 en el gen del RP (Savouret et al., 1991).

Se sabe que el proteosoma 26S es un sistema localizado tanto en el núcleo como en el citoplasma que utiliza la célula para degradar proteínas que tienen una vida media corta, como son los factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, proto-oncogenes o genes de inducción temprana y los receptores a hormonas esteroides. Las proteínas

degradadas por el proteosoma necesitan estar ubiquitinadas lo cual implica la participación consecutiva de tres enzimas, la enzima activadora de ubiquitina, el complejo de enzimas conjugadoras de ubiquitina, y las ligasas de ubiquitina (González-Flores et al., 2004).

Se ha demostrado que al inhibir la actividad del proteosoma 26S el contenido celular del RP se incrementa, observando un mayor efecto en la expresión a nivel de proteína del RP-B en el hipotálamo y área preóptica (POA) aún en presencia de su ligando. Lo anterior sugiere que el proteosoma 26S es un importante mediador molecular en la regulación negativa del RP por parte de la P4 (González-Flores et al., 2004).

#### **IV.5. Regulación de las isoformas del RP en el SNC.**

El patrón de expresión y la regulación de las isoformas del RP en el cerebro dependen del tejido, la edad, sexo, condición hormonal, y la especie animal. La expresión de las isoformas del RP ha sido detectada a través de varias técnicas como la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), ensayos de protección a RNasa, inmunohistoquímica y western-blot (Ingar et al., 1992; Graham y Clarke, 1997; Camacho-Arroyo, 2003). Esta expresión diferencial puede ser crítica para la respuesta celular a la P4 (González-Arenas et al., 2003).

Camacho-Arroyo y sus colaboradores han reportado que en el encéfalo de ratas ovariectomizadas existe una regulación diferencial de las isoformas de RP por parte del E2 y la P4. En el hipotálamo la expresión de ambas isoformas del RP a nivel de RNAm fue inducida por E2 y regulada de forma negativa por la P4, mientras que en el POA estos cambios sólo se observan para el RP-B. En contraste, en el hipocampo y bulbo olfatorio, sólo existe inducción de la isoforma RP-A por parte del E2 y la administración de P4 no modifica la expresión de ninguna de las dos isoformas. Ni en corteza frontal ni en el cerebelo de las ratas hembra, el tratamiento con cualquiera de las dos hormonas modificó la expresión del RP (Camacho-Arroyo et al., 1998b).

El mismo grupo ha encontrado también en ratas ovariectomizadas, que la inducción de la expresión de ambas isoformas del RP por parte del E2 a nivel del RNAm es reflejada a nivel de proteína en el POA, el hipocampo y el hipotálamo (Guerra-Araiza et al., 2000 y 2003).

Por otra parte, la expresión de las isoformas del RP es tejido-específica y depende del estado hormonal del animal variando de acuerdo al ciclo reproductivo. A nivel de

RNA<sub>m</sub> la isoforma RP-B es predominante en el hipotálamo, POA y corteza frontal, mientras que en el hipocampo ambas isoformas se expresan en una tasa similar. La máxima expresión de la isoforma RP-B en cada región cerebral depende del día del ciclo estral: en el hipotálamo sucede durante el proestro, en el POA y corteza frontal se presenta durante el metaestro y diestro, respectivamente (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000); mientras que no se observa cambio alguno en el hipocampo, ni a nivel de RNA<sub>m</sub>, ni a nivel de proteína (Guerra-Araiza et al., 2003).

En el hipotálamo el contenido de proteína para ambas isoformas es casi constante durante todo el ciclo y solamente disminuye significativamente para la isoforma RP-A en el diestro; en contraste, el contenido más alto de ambas isoformas se observó durante el diestro. En la corteza frontal el contenido a nivel de proteína más bajo de la isoforma RP-B se hizo notorio sólo en el estro y el contenido de la isoforma RP-A no se modificó significativamente (Guerra-Araiza et al., 2003).

En la hipófisis de la rata también 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 cuando son altos los niveles de E2 (Szabo et al., 2000).

El dimorfismo sexual del patrón de expresión de las isoformas del RP se evidencia en ratas gonadectomizadas: en contraste con los datos reportados para las ratas hembra, sólo el E2 induce la expresión de la isoforma RP-A en el cerebelo de ratas macho gonadectomizados; en otras regiones del encéfalo la expresión del RP no se ve modificada ni por el E2 ni por la P4 (Guerra-Araiza et al., 2003).

Se ha reportado que a nivel del RNA<sub>m</sub> existen diferencias durante el desarrollo y de forma tejido-específica en la regulación en el patrón de expresión de ambas isoformas del RP, por ejemplo, en el mesencéfalo de ratones machos y hembras, el contenido a nivel de proteína del RP-B es significativamente más alto que el de RP-A en ratas prepúberes (Guerra-Araiza et al., 2002).

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 POA, la corteza frontal, el hipocampo y el bulbo olfatorio ambas isoformas se expresaron de manera similar (Guerra-

Araiza et al., 2001) y en ambas edades de la rata macho en el cerebelo predomina la isoforma RP-B (Kato et al., 1993).

## **V. RELACIÓN ENTRE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR A PROGESTERONA Y LOS EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y OTROS TEJIDOS**

### **V.1. Regulación del RP en el SNC durante la ovulación.**

La ovulación se manifiesta cuando la LH actúa sobre las células de la granulosa del folículo de De Graaf del ovario, induciendo la secreción rápida de hormonas esteroides foliculares, que incluyen una pequeña cantidad de P4, lo que hace que el folículo se rompa, se transforme en el cuerpo lúteo y, por tanto, se produzca la expulsión del óvulo.

La P4 puede inhibir o estimular la liberación de la hormona luteinizante (LH), la cual es fundamental dentro del proceso de ovulación a través del control de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); (Ronnekleiv y Kelly, 2005). La mayor distribución de células RP positivas en el cerebro se ha encontrado en el POA, el núcleo ventromedial (VMH) y el núcleo arcuato del hipotálamo, así como en la hipófisis anterior (Ronnekleiv y Kelly, 2005); la localización del RP dentro de la hipófisis sólo se restringe a los gonadotropos de ratas y primates (Turgeon y Waring, 2000).

En primates y roedores se ha demostrado que la GnRH es secretada por las neuronas localizadas en el hipotálamo medial y, para el caso de la rata hembra, en el proestro (cuando existe una alta concentración plasmática de P4). La GnRH alcanza el lóbulo anterior de la hipófisis a través del sistema portal hipotálamo-hipófisis e induce la síntesis de la LH de forma pulsátil (Turgeon y Waring, 2000).

La importancia del patrón de expresión del RP respecto a la ovulación queda al descubierto gracias a estudios realizados con ratones que no expresan el RP (PR-KO) y ratones que no expresan la isoforma RP-A (PRA-KO). Sólo las ratonas PR-KO no producen óvulos aún cuando muestran ovarios normales, lo cual sugiere que la P4 ejerce su efecto genómico positivo a través del RP-B sobre el gen de la GnRH de las células del hipotálamo (Connely et al., 2001).

Una vez completada la ovulación el proceso se detiene debido al efecto de inhibición de la P4 en la secreción GnRH y de LH (Ronnekleiv y Kelly, 2005) probablemente por la disminución de la expresión del RP-B mediada por el proteosoma 26S (González-Flores et al., 2004).

## **V.2. Participación del RP en la conducta sexual.**

En la tarde del proestro y la mañana del estro, se presenta en la rata hembra la conducta de lordosis, cuyo objetivo es facilitar la monta del macho. Esta conducta podría estar mediada por el RP-B, incluso durante la mañana del estro cuando los niveles de RNAm para dicha isoforma son altos (Guerra-Araiza et al., 2000).

Se ha demostrado que cuando se inhibe la actividad del proteosoma 26S se incrementa la expresión del RP, con un notable incremento en el contenido del RP-B durante la conducta de *lordosis* (González-Flores et al., 2004). La importante participación del RP-B podría evidenciarse durante el proestro, cuando la dopamina y la P4 en el hipotálamo incrementan la concentración del AMPc que activa a la proteína cinasa A (PKA). El incremento de PKA provoca la fosforilación de fosfoproteínas neuronales como la fosfoproteína-32 regulada por dopamina y AMPc (DARPP-32). Se sabe que la fosforilación de DARPP-32 favorece la fosforilación del RP y el reclutamiento de cofactores de transcripción (específicamente el RP-B que es más afín a coactivadores de la transcripción) provocando que se exacerbe *lordosis* aumentada (Mani S, 2001). Estos datos coinciden con el incremento en la transcripción del gen de la GnHR por parte del RP-B, lo que a su vez desencadena la secreción de la LH en la pituitaria para la inducción posterior de la ruptura folicular y ovulación (Chabbert-Buffet et al., 2000).

## **V.3. Expresión del RP durante el embarazo**

En el embarazo, cuando los niveles séricos de P4 se encuentran en su máximo, la ovulación se inhibe. El RP-A en presencia de su ligando inhibe la transcripción del RNAm para la GnRH tanto en placenta como en la hipófisis (Fang et al., 2002).

Además, el efecto estimulador del RP-B sobre la transcripción disminuye debido a su degradación mediada por el proteosoma 26S.

Se ha demostrado que en la placenta la expresión del RP-A durante el embarazo predomina sobre la expresión del RP-B, y la P4 a través del RP-A favorecerá el crecimiento de la placenta de forma independiente a los factores de crecimiento como el IGF-II ó el IGFBP-2 (Mark et al., 2006).

En los roedores, al final del embarazo existe una disminución de los niveles plasmáticos de la P4 (Brown et al., 2004); sin embargo, en humanos esta disminución no es significativa y solamente se observa el aumento en la tasa de expresión del RP-A respecto al RP-B en las células miometrales debido al efecto estimulador de los estrógenos sobre la transcripción de su gen.

Al aumentar el contenido del RP-B y en presencia de su ligando se favorece la transcripción del gen de la oxitocina en el POA, en el núcleo paraventricular (PV) y en el núcleo supraóptico del hipotálamo. La oxitocina actúa sobre la glándula mamaria y el útero favoreciendo la contracción de las células mioepiteliales e iniciando el trabajo de parto (Mesiano et al., 2002).

#### **V.4. Participación del RP en la conducta maternal y paternal.**

Investigaciones recientes demuestran que los cambios hormonales que ocurren durante el embarazo, gestación y lactancia pueden remodelar el cerebro de las hembras, incrementando el número de neuronas en algunas regiones como en el POA y provocando cambios estructurales en otras como sucede durante el aumento en la densidad de las espinas dendríticas de la región CA1 del hipocampo. Algunos de los sitios involucrados regulan el comportamiento maternal, tal como la construcción de nidos, el acicalamiento y la protección de los jóvenes. Otras regiones afectadas se relacionan con la memoria, el aprendizaje y las repuestas al miedo y al estrés (Kinsley y Lambert, 2006).

Kinsley y colaboradores sugieren que la sola presencia de las crías, al estimular la secreción de oxitocina, se promueve el desarrollo de conexiones a largo plazo en el hipocampo, por lo que la memoria espacial y el aprendizaje de la rata madre mejoran.

Para los roedores la conducta maternal involucra más allá del comportamiento de protección a las crías, incluye el desarrollo de actividades arriesgadas a fin de atender las necesidades del nido; con relativa frecuencia, la madre se aleja del nido a fin de encontrar el alimento que sostiene a su descendencia. El riesgo del alejamiento se compensa por la

confianza que la rata adquiere al aumentar su memoria espacial y por lo tanto, la seguridad que tiene al saber cómo regresar al nido.

Por otro lado, una vez que la rata macho llega a su etapa adulta, en el hipotálamo la expresión del RP-A es predominante mientras que en el cerebelo predomina la expresión del RP-B a nivel de RNAm (Guerra-Araiza et al., 2000). La información somatosensorial, principalmente auditiva se procesa en el cerebelo, mientras que el hipotálamo se relaciona más con procesos de conducta.

Estudios con roedores que no expresan el RP (PR-KO) demuestran que la activación del RP en el macho adulto incrementa la conducta agresiva contra las crías, sin modificar la agresividad contra otros machos. Lo anterior sugiere que algún gen que determina la conducta relacionada hacia las crías es regulado a la baja por el RP (Schneider et al., 2003).

#### **V.5. Relación entre la expresión del RP y la excitabilidad neuronal.**

Existe evidencia de que los neuroesteroides interactúan alostéricamente con canales iónicos ligados a ligando anclados en la membrana celular, disminuyendo la excitabilidad neuronal. Pero por otro lado, algunos metabolitos  $3\alpha$ -reducidos de la P4 pueden regular la expresión del RP a nivel de RNA m después de una oxidación intracelular a esteroides  $5\alpha$ -pregnanos y tener algún efecto fisiológico. En hombres y en mujeres los esteroides neuroactivos  $3\alpha$ -reducidos producen perfiles EEG del sueño parecidos a la inducción con benzodiazepinas (Oettel y Mukhopadhy, 2004).

Los metabolitos  $3\alpha$ -reducidos de la P4 podrían estar activando el RP-B de forma independiente al ligando: El desencadenamiento de una cascada de fosforilación por la misma P4 (por vías no genómicas) o como consecuencia de estímulo ambiental (la activación de receptores a dopamina D1 ó D5), puede traer consigo la fosforilación del RP y la consecuente unión del receptor a DNA (Blaustein, 2003).

Además la P4 muestra actividad anestésica a nivel de médula gracias al incremento de la monoamino-oxidasa (MAO), la enzima que cataboliza la serotonina en el cerebro (Sherwin, 1999), el incremento de la MAO podría ser debido a la expresión del RP-B.

## **V.6. Participación del RP en la neuroprotección, memoria y aprendizaje.**

En varios modelos experimentales de daño cerebral (por la administración de colchicina o el péptido  $\beta$ -amiloide ) la P4 induce la recuperación y la neuroregeneración, debido a la inducción de la síntesis de componentes mielínicos en células de Schwann y oligodendrocitos (Guennoun et al., 2001). Otras acciones de la P4 que reflejan neuroprotección pueden demostrarse a través de la modulación de la plasticidad sináptica.

La plasticidad neuronal es la adaptación estructural de las neuronas a los requerimientos fisiológicos, por ejemplo la formación de espinas dendríticas. Este proceso requiere cambios dinámicos estructurales por parte del citoesqueleto o de proteínas asociadas a sus componentes. Se ha demostrado, que en la región CA1 del hipocampo de ratas hembra la P4 modifica la densidad de las espinas dendríticas por la inducción en el contenido de la proteína asociada a microtúbulos (MAP2); (Reyna- Neyra et al., 2004). Aún cuando a nivel de RNAm o a nivel de proteína la expresión de ambas isoformas del RP en el hipocampo de la rata hembra es similar (Camacho-Arroyo, 2003) el RP-A podría mediar el aumento en el contenido de la MAP2, a nivel de proteína y no en la expresión génica, a través de la disminución de su degradación. El RP-B podría contribuir de manera significativa en el aumento de la expresión a nivel de RNAm de la MAP2, ya que durante el proestro el ligero aumento en la expresión de dicha isoforma del receptor coincide con el incremento significativo de la MAP2 (Reyna- Neyra et al., 2002).

La región CA1 del hipocampo ha sido relacionada con la memoria, es en esta región en donde el E2 aumenta la densidad de las espinas dendríticas y la P4 a través de sus receptores modula la morfología neuronal. De este modo se favorecen los procesos de aprendizaje (Camacho-Arroyo, 2003).

## **VI. TRABAJO EXPERIMENTAL**

### **VI.1. Justificación.**

Las isoformas del RP juegan un papel importante en los efectos mediados por la P4. El análisis de la actividad de ambas isoformas en varios modelos experimentales y tipos celulares, nos llevan a la conclusión de que el RP-A y el RP-B poseen diferentes propiedades de transactivación, desencadenan efectos fisiológicos distintos y se regulan de manera diferente por el E2 y la P4. Sin embargo, se desconoce la distribución de las isoformas del RP en el hipotálamo de la rata, por lo que su conocimiento llevará a entender algunos aspectos sobre los mecanismos por los cuales la P4 ejerce sus efectos en el SNC.

## **VI.2. Planteamiento del problema.**

La información generada hasta el momento sobre la expresión de las isoformas del RP en el SNC se ha basado en preparaciones de homogenados de regiones cerebrales que contienen diversos grupos neuronales con distintas características fisiológicas, lo que ha impedido establecer una relación entre la expresión de las isoformas del RP y la función de grupos neuronales específicos de las regiones cerebrales en donde ejerce sus acciones la P4 y que están relacionadas con la conducta sexual y la ovulación. Por lo cual, resulta de gran importancia contar con una técnica estandarizada que permita estudiar la distribución y la regulación de las isoformas del RP dentro de una misma neurona.

### **VI.3. Hipótesis.**

- Si el E2 y la P4 regulan de manera tejido-específica el contenido del RP-A y RP-B en el SNC de la rata, entonces la distribución y el contenido de las isoformas del RP en los núcleos ventromedial, arcuato y POA se modificarán al administrar estas hormonas.
- La estandarización de la técnica de inmunofluorescencia para colocalizar el RP-A y el RP-B permitirá conocer la distribución de ambas isoformas en la misma neurona.

### **VI.4. Objetivos.**

- Estandarizar la técnica de inmunofluorescencia que permitirá conocer la colocalización de las isoformas del RP en el SNC de la rata.
- Determinar por inmunofluorescencia la distribución de las isoformas de RP en el POA y los núcleos ventromedial y arcuato del hipotálamo de ratas ovariectomizadas tratadas con E2 y P4.

## VI.5. Metodología.

### VI.5.1 Estandarización de la técnica de inmunohistoquímica.

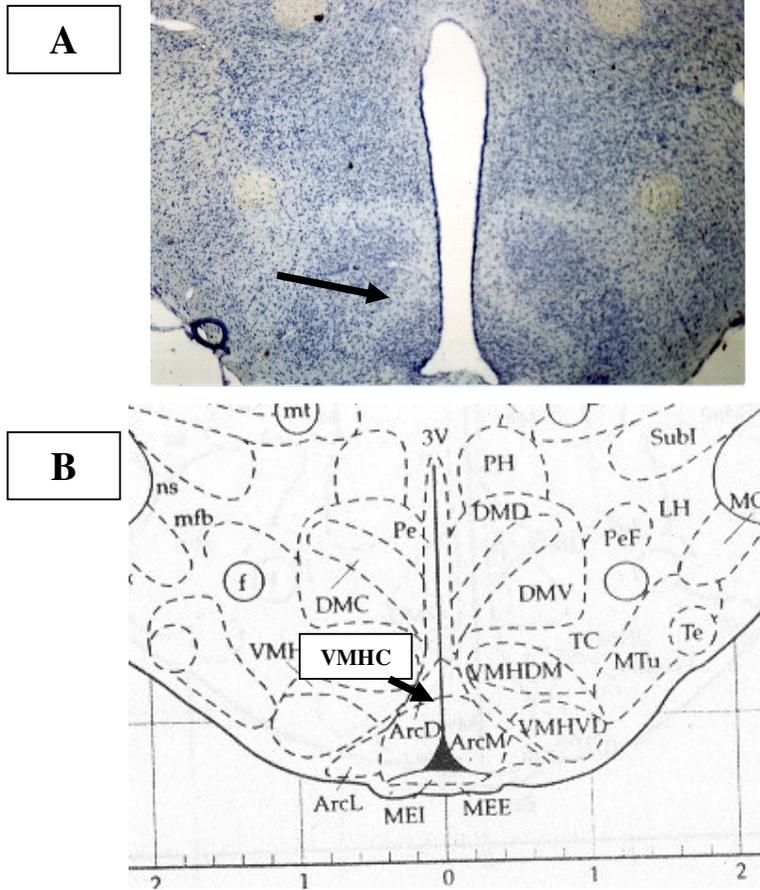
A fin de establecer las condiciones iniciales para el desarrollo de la técnica de inmunofluorescencia de doble tinción, se llevó a cabo la localización del RP y del RE en cortes transversales de útero y cortes coronales de la región media del cerebro montados en parafina. Se incluyó la detección del RE con el objetivo de precisar si existían problemas metodológicos que evitaran la obtención de resultados.

Cuatro ratas adultas Sprague-Dawley (200-250 g) mantenidas bajo un ciclo luz-oscuridad de 12:12 h (7-19 hrs.) con agua y alimento *ad libitum* fueron ovariectomizadas bajo anestesia (80 mg/ kg) con ketamina (Galen S. A., México). Dos semanas después fueron asignados de forma aleatoria los siguientes tratamientos tomando 2 ratas por grupo:

- a) Vehículo (aceite de maíz) administrado por vía subcutánea (s.c.) por un día.
- b) E2 (25 µg/100 g de peso) administrado por vía s.c. por un día.

La administración de vehículo permitiría observar la expresión del RE, mientras que la dosis de E2 utilizada induciría la expresión del RP. Veinticuatro horas después del tratamiento los animales fueron sacrificados, se realizó la perfusión intracardiaca con 250 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.4 (PBS) y 25 mL de paraformaldehído al 4%. Inmediatamente después se disectaron el cerebro y el útero. Los tejidos de tres animales (el otro se utilizó para estandarizar la técnica histológica que se describirá más adelante) se mantuvieron a 4°C en paraformaldehído al 4% de 2 a 3 horas, posteriormente fueron conservados en una solución de sacarosa al 10% en PBS a 4° C durante toda la noche.

Cabe mencionar que para localizar los núcleos cerebrales sobre los cuales se trabajaría, se estandarizó la técnica histológica. Para ello, inmediatamente después de ser fijados, uno de los cerebros fue mantenido a 4° C en soluciones de sacarosa al 20 y 30% en PBS (dos horas en cada solución) y posteriormente, con ayuda de un crióstato, se obtuvieron cortes coronales de 10 µm por congelación. Estos cortes se montaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina y se tiñeron con violeta de cresilo. Se demostró que los cortes se realizaron correctamente (Fig. 9) identificando los núcleos de interés, por lo cual se continuó con la estandarización de la técnica inmunohistoquímica.



**Fig. 9.** Estandarización de la técnica histológica. **A:** corte coronal de cerebro teñido con violeta de cresilo. **B:** detalle de de la figura 33 del Atlas de Paxinos y Watson (1998). El corte del panel A corresponde al núcleo ventromedial del hipotálamo (indicado con una flecha) que se muestra en el panel B (VMHC).

Al día siguiente de su obtención, los tres cerebros y los úteros fueron colocados en rejillas de plástico a fin de ser incluidos en parafina. La deshidratación se llevó a cabo con lavados de una hora en soluciones de alcohol (70, 80, 96 y 100 %), alcohol-xilol 50% - 50% y xilol al 100%. Posteriormente, fueron embebidos en parafina. Con el uso de un microtomo se obtuvieron cortes coronales seriados de 10  $\mu$ m de POA y del hipotálamo de cada cerebro de acuerdo al Atlas de Paxinos y Watson y cortes transversales de 10  $\mu$ m de los úteros los cuales fueron montados en laminillas tratadas con poli-L-lisina.

La técnica inmunohistoquímica se realizó sobre los tejidos incluidos en parafina y montados sobre las laminillas de la siguiente forma:

1. La rehidratación de los tejidos consistió en lavados de dos minutos en: xilol al 100%, xilol-álcohol 50%-50%, alcohol en alcohol (al 100, 96, 80, y 50%), y agua destilada.
2. Incubación con citrato de sodio (10mM) a pH 6.0 bajo ebullición durante 5 minutos.
3. Incubación con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% en PBS pH 7.4 durante 20 minutos.
4. Permeabilización de la membrana con Tritón X-100 al 0.5% durante 20 minutos.
5. Bloqueo de la reactividad inespecífica (disminución del fondo) con suero normal de cabra (NGS) al 0.1% en PBS pH 7.4 durante 30 minutos.
6. Incubación con el anticuerpo primario durante 48 horas a 4°C. Para detectar ambas isoformas del RP se empleó el anticuerpo monoclonal PRAB-52: sc-810 en una dilución 1:50 en Tritón X-100 al 3%, NGS al 3% y PBS pH 7.4. Para detectar el RE se utilizó el anticuerpo monoclonal. ERαD-12: sc-8005 en una dilución 1:50 en Tritón X-100 al 3%, NGS al 3% y PBS pH 7.4. Ambos anticuerpos de Santa Cruz Biotechnology Inc.
7. Después de tres lavados con PBS pH 7.4 cada uno de 10 minutos, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-ratón diluido 1:50 en PBS durante 24 horas a 4° C.
8. Se realizaron dos lavados en PBS pH 7.4 cada uno de 10 minutos y se agregó el complejo avidina-biotina durante dos horas a temperatura ambiente. Después se realizaron dos lavados más en PBS.
9. La inmunoreactividad fue detectada revelando con una solución de DAB de la casa VECTOR durante 2 a 5 minutos a temperatura ambiente. Se inactivó la reacción con agua destilada a través de dos lavados de 5 minutos cada uno, y se realizó la deshidratación de los tejidos empleando las soluciones descritas en el inciso 1, comenzando por el agua hasta una solución de xilol al 100%. Y las laminillas fueron conservadas con el medio de montaje *PermOUNT (Vectashield)*.

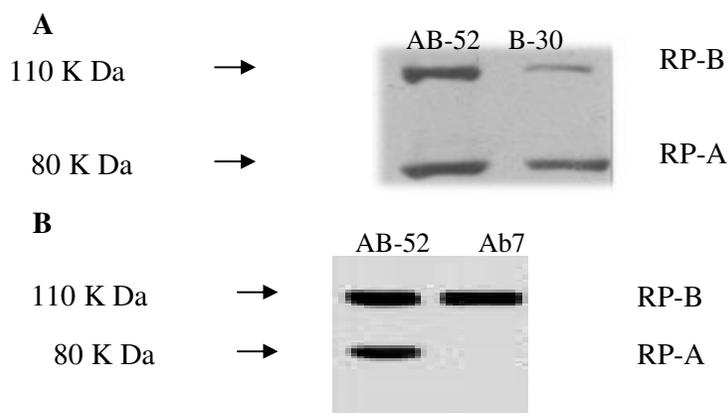
### VI.5.2 Análisis de la especificidad de los anticuerpos monoclonales.

Para comprobar la especificidad de los anticuerpos monoclonales que se utilizarían para colocalizar las isoformas del RP mediante la técnica de inmunofluorescencia, se llevó a cabo un análisis de Western-Blot.

Los anticuerpos empleados en la caracterización cualitativa fueron los siguientes: Para reconocer a la isoforma A (80 kDa) se empleó el anticuerpo monoclonal de ratón Ab7 de LabVision Corp.; para reconocer a la isoforma B (110 kDa) se usó el anticuerpo monoclonal de ratón PRB-30: sc-811 y como control para identificar ambas isoformas se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón PRAB-52: sc-810 estos últimos de Santa Cruz Biotechnology Inc.

El ensayo de Western-Blot se realizó con homogenados de hipotálamo de una rata adulta Sprague-Dawley de 250 g que fue tratada con una dosis elevada de E2 (25  $\mu$ g/ 100 g de peso).

Como se puede observar en la Fig. 10 el anticuerpo Ab7 reconoce preferentemente a la isoforma RP-A mientras que el anticuerpo B-30 reconoce específicamente el RP-B permitiendo continuar con la estandarización de la técnica de inmunofluorescencia.



**Fig. 10.** Especificidad de los anticuerpos anti RP. **A:** Ensayo de Western Blot donde se muestra que el anticuerpo AB-52, reconoce a ambas isoformas del RP (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y el anticuerpo Ab7 reconoce preferentemente la isoforma RP-A (Labvision, Neomarkers). **B:** El anticuerpo B-30 reconoce a la isoforma RP-B (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

### *VI.5.3 Estandarización de la técnica de inmunofluorescencia. Tinción simple.*

Para asegurar la alta expresión del RP se administró una dosis de 25 µg/ 100 g de peso de E2 a tres ratas hembra adultas Sprague-Dawley de 250 g. A las 24 h se sacrificaron por sobredosis de Pentobarbital (30 mg/ 100 g de peso), e inmediatamente después se llevó a cabo la perfusión intracardiaca con 250 mL de PBS seguida por 250 mL de paraformaldehído al 4%, en PBS pH 7.4 y la disección del cerebro. Los tejidos se mantuvieron a 4° C en paraformaldehído al 4% de 2 a 3 horas conservados a 4° C durante la noche en una solución de sacarosa al 10% en PBS durante toda la noche. De los cerebros disectados se obtuvieron cortes de 10 µm de tres formas distintas:

- Cortes montados en parafina. Uno de los cerebros se deshidrató e incluyó en parafina tal como se describió anteriormente; los cortes coronales seriados obtenidos con ayuda de un microtomo se montaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina.
- Cortes obtenidos por congelación y conservados en laminillas. Otro cerebro se sometió a tres lavados en PBS pH 7.4 durante 5 minutos cada uno y con ayuda de un crióstato se obtuvieron cortes coronales seriados del POA y del VMH. Los cortes obtenidos fueron montados en laminillas tratadas con poli-L-lisina y secados al vacío durante tres horas y se almacenaron a temperatura ambiente.
- Cortes obtenidos por congelación y conservados en solución anticongelante. Un último cerebro se sometió a tres lavados en PBS pH 7.4 durante 5 minutos cada uno y con ayuda de un crióstato se obtuvieron cortes coronales seriados del POA y del VMH. Los cortes obtenidos fueron almacenados en una solución anticongelante a 4° C durante toda la noche. Estos cortes se emplearían en ensayos de inmunofluorescencia por flotación.

El anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-ratón (BA-9002) fue revelado por fluoresceína acoplada a avidina (A-2001) ambos reactivos de la casa VECTOR. En todos los casos como control negativo se evitó la incubación con el anticuerpo primario sustituyéndolo por NGS.

La técnica de inmunofluorescencia de tinción simple se realizó como se describe a continuación. Es importante mencionar que los tejidos montados en parafina fueron

previamente rehidratados según se describió en el inciso 1 de la técnica inmunohistoquímica.

1. Se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS pH 7.4 a temperatura ambiente. Cada lavado de los tejidos se realizó en las mismas condiciones.
2. Para la recuperación del antígeno los tejidos se incubaron 4 veces durante cinco minutos en solución de citrato de sodio 10 mM pH 6.0 en ebullición.
3. Lavado de los tejidos en PBS.
4. La permeabilización de la membrana se llevó a cabo incubando los tejidos con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 30 minutos.
5. Lavado de los tejidos en PBS.
6. El bloqueo de la inmunoreactividad inespecífica se realizó mediante la incubación a temperatura ambiente con NGS al 5% y Tritón X-100 al 2% en PBS durante 30 min.
7. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario diluido 1:50 en Tritón X-100 al 0.5%, NGS al 2% en PBS durante 48 hrs. a 4° C.
8. Lavado de los tejidos en PBS.
9. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado 1:50 en PBS durante 24 horas a 4°C y posteriormente con la fluoresceína acoplada a avidina en una dilución 1:250 en PBS durante dos horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
10. Lavado de los tejidos en PBS.
11. Los tejidos fueron conservados con medio de montaje Vectashield H-1000 de la casa VECTOR, siempre protegidos de la luz.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un aspecto central para entender el mecanismo molecular involucrado en el esclarecimiento de los efectos fisiológicos de la P4 mediados por sus receptores es la colocalización de las isoformas del RP a nivel de proteína en la misma célula intacta y no en homogenizados del tejido; no obstante una de limitantes para lograr la estandarización de la técnica de inmunofluorescencia de doble tinción, fue la falta de un anticuerpo que reconociera específica y no preferentemente, a la isoforma RP-A.

Mote y colaboradores (Mote et al., 1999) han reportado que el anticuerpo Ab7 puede reconocer únicamente la isoforma RP-A, mediante las técnicas de inmunofluorescencia, donde las proteínas mantienen su conformación y el plegamiento de la isoforma RP-B hace inaccesibles algunos epítopes reconocidos por el anticuerpo. Sin embargo, es posible que durante la desnaturalización que se provocó durante la recuperación del antígeno en los ensayos de inmunohistoquímica realizados, se haya favorecido la exposición de estos epítopes y el reconocimiento de la isoforma RP-B.

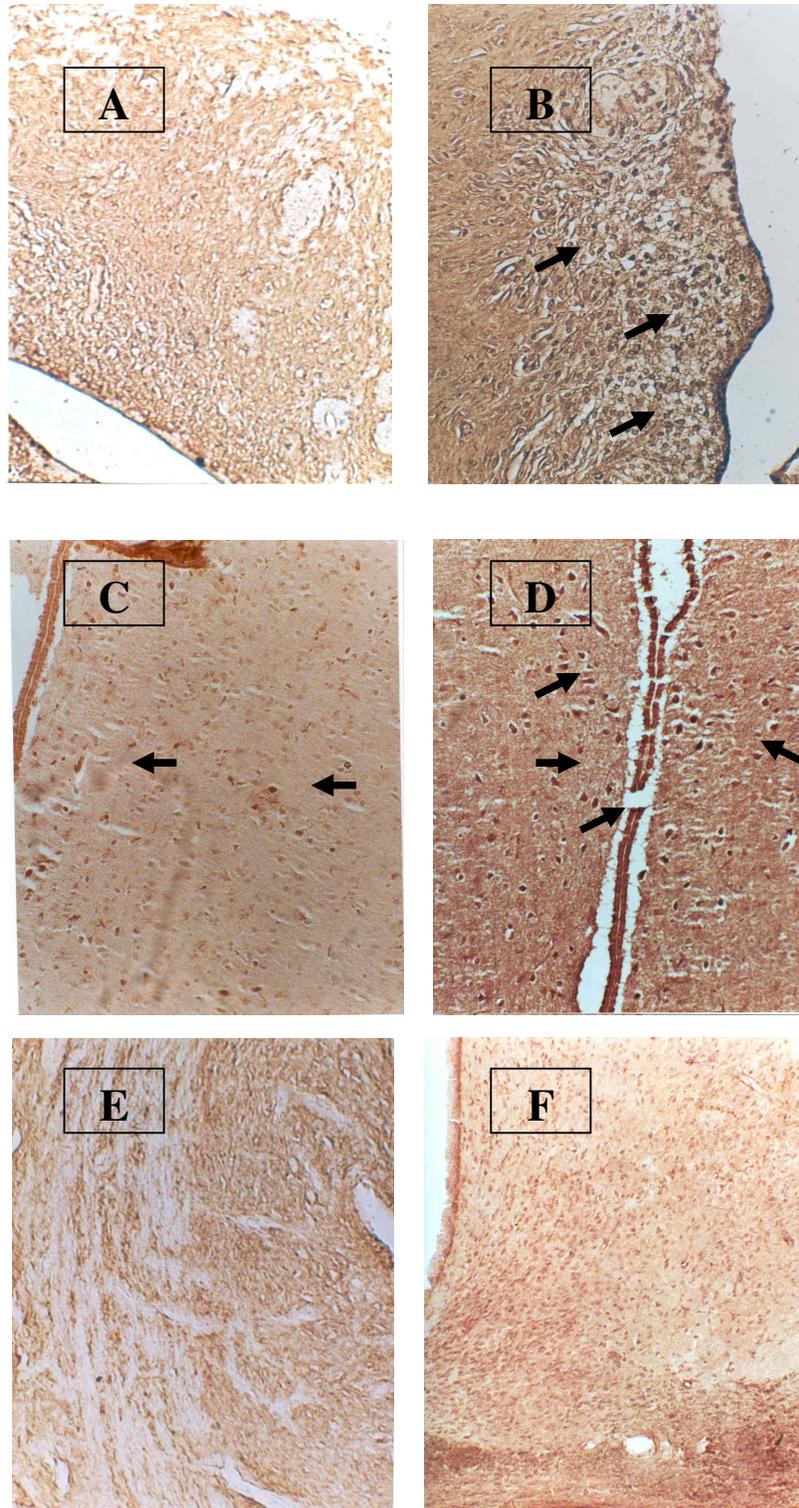
Además, el anticuerpo primario Ab7 utilizado en la metodología, había permitido la localización del RP-A en células de endometrio humano (Mote et al, 1999) y no existe reporte alguno sobre su uso en células del SNC.

También se ha reportado que la expresión del RP es inducida por el E2, por lo cual en los cortes tanto del útero como del cerebro de la rata a la que se le había administrado E2 se encontraron células inmunoreactivas al RP total. Como era de esperarse en los cortes de los tejidos de la rata a la cual se le administró el vehículo, no se encontró un número significativo de células inmunoreactivas en comparación con la intensidad y número de células que expresan el RP en los cortes que corresponden a los tejidos de la rata tratada con E2 (Fig. 11).

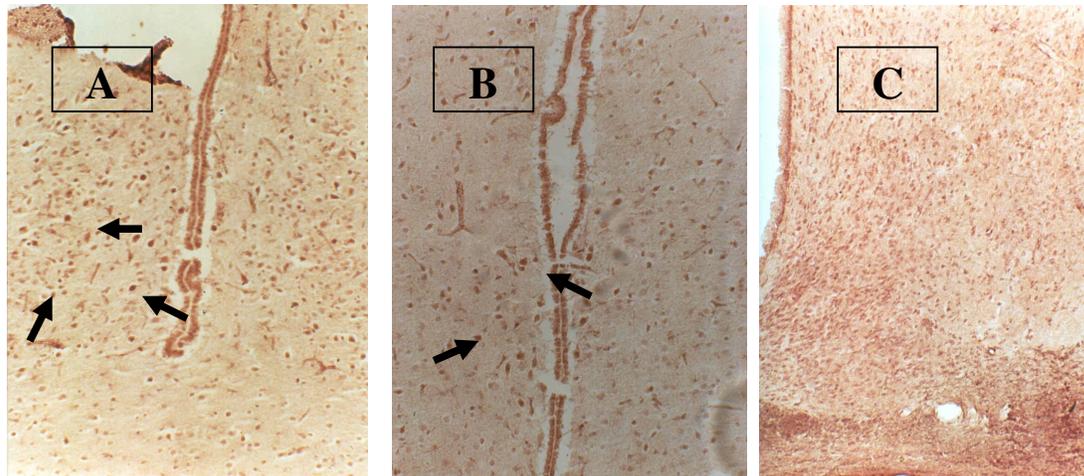
A fin de contar con una referencia sobre la metodología, se incluyó la detección del RE a través de la técnica de inmunohistoquímica sobre los cortes del cerebro (correspondientes al VMH) de la rata tratada con E2 y de la rata a la cual se le administró el vehículo. El E2 disminuyó el número de células inmunoreactivas al RE en el VMH de la rata en comparación con el número de células inmunoreactivas encontradas en la rata tratada con vehículo (Fig. 12). Lo anterior coincide con estudios que reportan una regulación negativa del RE por su ligando (Mendoza-Rodríguez et al., 1999).

Por otro lado, la expresión de RE- $\alpha$  también fue detectada en el hipocampo por la técnica de inmunohistoquímica descrita anteriormente (Fig. 13). En la localización tanto del RP como del RE, se consideraron como controles negativos aquellos cortes en los que se omitió la incubación con el anticuerpo primario correspondiente, en ambos casos ninguna célula inmunoreactiva fue encontrada; descartando así errores metodológicos.

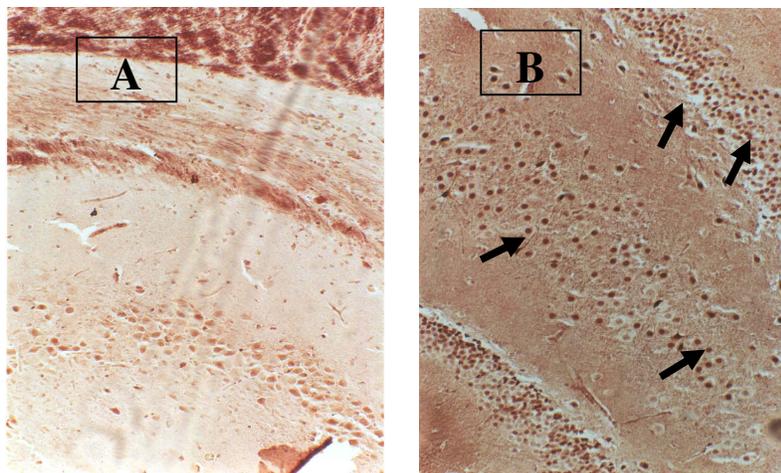
Antes de intentar la estandarización de la técnica de fluorescencia para una doble tinción y la colocalización de ambas isoformas del RP, se comenzó por utilizar los anticuerpos primarios por separado en una tinción simple (anticuerpo Ab7 para reconocer la isoforma RP-A y el anticuerpo). Se observó reactividad inespecífica tanto en los ensayos donde se utilizaron los tejidos congelados y conservados en laminillas con poli-L-lisina, como tejidos montados en parafina (los resultados no se muestran).



**Fig. 11.** Detección del RP por la técnica inmunohistoquímica. Cortes transversales del útero (10X) de una rata tratada con vehículo (A) y de una rata tratada con E2 (B). Cortes coronales del cerebro correspondientes al VMH (10X) de una rata tratada con vehículo (C) y de una rata tratada con E2 (D). Controles negativos (cortes en los que se evita la incubación con el anticuerpo primario): corte transversal del útero (10X) (E) y corte coronal del cerebro correspondiente al VMH (F). Las células inmunoreactivas al RP se indican con una flecha.

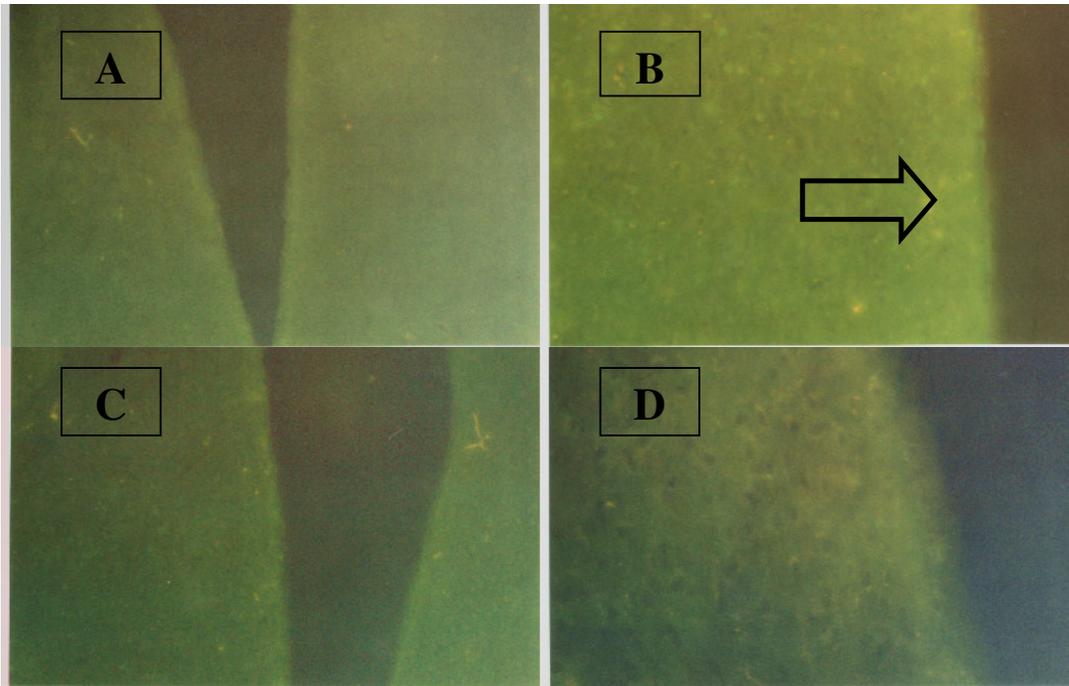


**Fig. 12.** Detección del RE- $\alpha$  por la técnica inmunohistoquímica. Cortes coronales del cerebro correspondiente al VMH (10X): tratamiento con vehículo (A), tratamiento con E2 (B), control negativo (cortes en los que se evita la incubación con el anticuerpo primario) (C). Las células inmunoreactivas al RE se indican con una flecha.

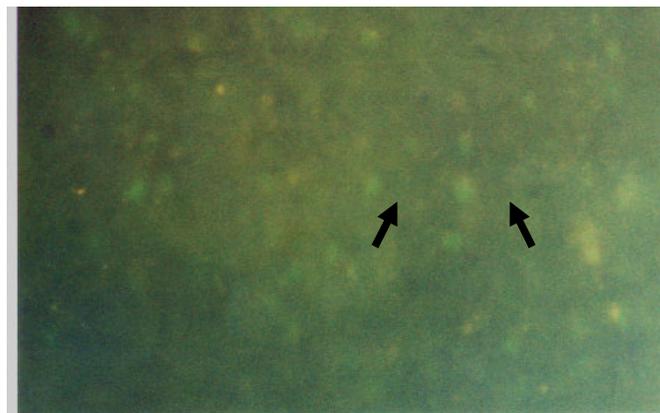


**Fig. 13.** Detección del RE- $\alpha$  por la técnica inmunohistoquímica en el hipocampo (10X). (A) Control negativo, evitando la incubación con el anticuerpo primario. (B) Tratamiento con vehículo donde se observan células inmunoreactivas indicadas con una flecha.

Para los cortes obtenidos por congelación y que se sometieron a la técnica de inmunofluorescencia por flotación se localizaron algunas células inmunoreactivas positivas para el RP-A y ninguna para el RP-B o el RP total, cabe mencionar que la fluorescencia fue muy débil. (Fig. 14 y 15).



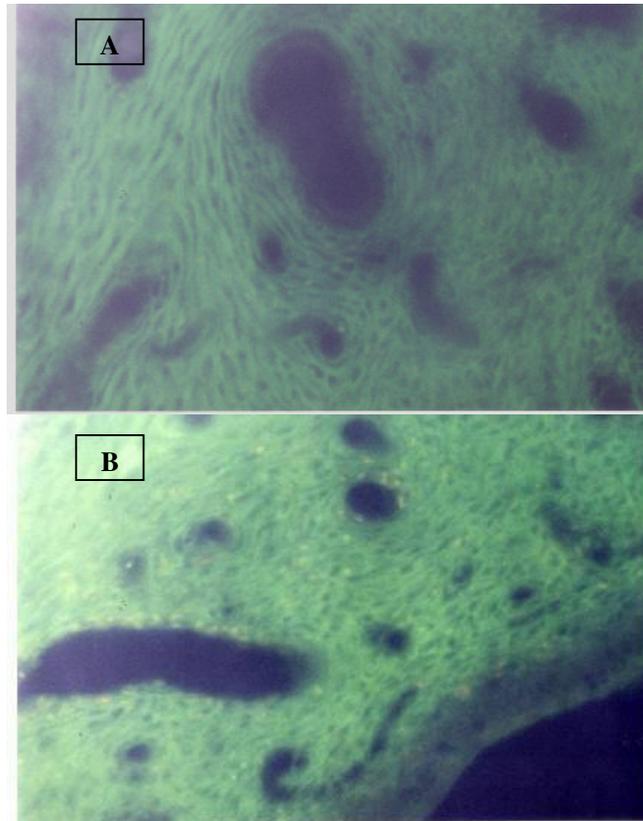
**Fig. 14.** Inmunofluorescencia para el RP en los cortes coronales de POA, 10X. **A:** Tejido incubado con el anticuerpo B-30 que reconoce a la isoforma RP-B. **B:** Tejido incubado con el anticuerpo Ab7 que reconoce principalmente a la isoforma RP-A. La flecha vacía indica la zona donde se encontraron algunos núcleos inmunoreactivos al RP-A. **C:** Tejido incubado con el anticuerpo AB-52 que reconoce a ambas isoformas del RP. **D:** Control negativo.



**Fig.15.** Detalle (40X) de la imagen del panel B de la figura 14 (zona marcada con una flecha vacía) se señalan algunos núcleos inmunoreactivos al RP-A con flechas sólidas.

Por lo anterior y a fin de contar con control positivo, se eligió un tejido donde fuera alta la expresión del RP. Se realizaron cortes transversales de tejido congelado de 10  $\mu\text{m}$  del útero de una rata tratada con una dosis de E2 de 25  $\mu\text{g}/100$  g de peso.

Se llevó a cabo la inmunofluorescencia en las condiciones ya mencionadas, sin embargo sólo se observó reactividad inespecífica (propia del tejido) para cualquiera de los anticuerpos primarios a pesar de haber incrementado la concentración utilizada (de una dilución 1:50 a 1:10); (Fig. 16).



**Fig. 16.** Inmunofluorescencia para el RP de los cortes transversales de útero, 10X. **A:** Control negativo en el cual sólo se omite la incubación con el anticuerpo primario. **B:** Corte correspondiente a la inmunofluorescencia para el reconocimiento de la isoforma RP-A con el anticuerpo Ab7 (Labvision, Neomarkers).

Con la intención de favorecer el reconocimiento del RP-A por parte del anticuerpo primario Ab7 se incrementó el tiempo de incubación con el anticuerpo primario (hasta 72 hrs.) a diferentes temperaturas (4 y 25° C), o se disminuyó el tiempo de bloqueo de la inmunoreactividad inespecífica (de 30 a 10 minutos); incluso se retomaron las condiciones iniciales de experimentación pero se trabajó con tejidos obtenidos de animales que fueron ovariectomizados, anestesiados con éter (J.T.BAKER, México) y sacrificados por decapitación en lugar de ser sacrificados por perfusión intracardiaca. No se obtuvieron resultados satisfactorios lo que impidió la realización de la inmunofluorescencia de doble tinción y colocalización de las isoformas del RP.

Cabe mencionar que existen reportes sobre la diferente localización subcelular y actividad de las isoformas del RP a través de la utilización de genes reporteros y receptores modificados que incluyen a la proteína verde fluorescente (GFP-PR), demostrando que es posible colocalizar a las isoformas del RP dentro de una misma célula (Lim et al, 1999). El uso de genes reporteros podría ser una alternativa técnica viable para colocalizar las isoformas del RP; sin embargo los resultados son obtenidos empleando cultivos de líneas celulares que no expresan el RP y que son transfectados *in vitro* y no en cortes de tejido de animales sometidos a ciertas condiciones farmacológicas.

Por otro lado, sería posible utilizar la técnica de hibridación *in situ* (ISH) sobre cortes de tejidos embebidos en parafina e incluso se emplearían híbridos etiquetados con diferentes fluoróforos; en este caso se detectaría el RP a nivel de mRNA (Curran-Rauhut y Petersen, 2002). Sin embargo, en un modelo de regulación hormonal y debido a que el RP sufre modificaciones post-traduccionales, existiría una variación entre los resultados de la colocalización del RP a nivel de mRNA y el patrón de expresión del RP a nivel de proteína.

## VIII. ABREVIATURAS

AF	Función de activación.
AMPC	Adenosin monofosfato cíclico.
BUS	Extremo amino terminal de la isoforma B del receptor a progesterona (B-upstream segment).
CaMKII	Cinasa II dependiente de calmodulina.
Cdc2	Cinasa 2 dependiente de ciclina.
CKII	Caseína cinasa II.
D1, D5	Receptor 1 y receptor 5 a dopamina.
DARPP-32	Fosfoproteína – 32 regulada por dopamina y AMPC
DBD	Dominio de unión al DNA.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
E2	Estradiol.
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos.
FSH	Hormona folículo estimulante.
GABA	Ácido $\gamma$ -amino butírico.
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas.
GRIP-1	Proteína que interactúa con el receptor a glucocorticoides.
GSK-3	Glucógeno sintasa cinasa 3.
HAT	Histona acetil transferasa.
HDAC	Desacetilasas de histonas.
HRE	Elementos de respuesta a hormona.
HSP	Proteínas de choque térmico.
KKI	Caseína sinasa I.
LBD	Dominio de unión al ligando.
LH	Hormona luteinizante.
MAO	Monoamino oxidasa.
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2.
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos.
MOR	Receptor a $\mu$ -opioides.
mRNA	Mensajero del ácido ribonucleico.
NcoR	Correpressor de receptores nucleares.
NHT	Dominio amino terminal.
NGS	Suero normal de cabra.
P4	Progesterona (4-pregnen-3,20-diona).

PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PKA	Proteína cinasa A.
PRKO	Especies “knot out” que no expresan el RP.
POA	Área preóptica medial del hipotálamo.
RP-A	Isoforma A del receptor a progesterona.
RP-B	Isoforma B del receptor a progesterona.
RP	Receptor a progesterona.
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada ala reacción en cadena de la polimerasa.
Sp1	Proteína específica 1.
s.c.	Vía subcutánea de administración.
SMRT	Silenciador mediador para el receptor a ácido retinóico y a hormonas tiroideas.
SNC	Sistema nervioso central.
SRC	Coactivadores de receptores a esteroides.
VMH	Núcleo ventromedial del hipotálamo.

## IX. REFERENCIAS

1. Backstrom T, Andreen L, Birzniece V, Bjorn I, Johansson IM, Nordenstam-Haghjo M, Nyberg S, Sundstrom-Poromaa I, Walstrom G, Wang M, Zhu D, 2003. The role of hormones and hormonal treatments in premenstrual syndrome. *CNS Drugs* 17:325-342.
2. Beato M, 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-344.
3. 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.
4. Beyer C, González-Flores O, González-Mariscal G, 1997. Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LHRH, prostaglandin E2, and cyclic AMP on lordosis and proceptive behaviours in rats. *J Neuroendocrinol* 9: 609 – 614.
5. Beyer C, Kuppers E, Karolczak M, Trotter A, 2003. Ontogenetic expression of estrogen and progesterone receptors in the mouse lung. *Biol Neonate* 84:59-63.
6. Blaustein J D, 2003. Neuronal Integrators of Hormonal and Environmental Stimulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1007: 238 – 250.
7. Bramley T, 2003. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary:some unresolved issues. *Reproduction* 125:3 - 15.
8. Brown A G, Leite R S, Strauss J F 3<sup>rd</sup>. 2004. Mechanisms underlying “functional” progesterone withdrawal at parturition. *Ann N Y Acad Sci* 1034:36 – 49.
9. Caba M, Gonzalez-Mariscal G, Beyer C, 1994. Perispinal progestins enhance the antinociceptive effects of muscimol in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 47:177-78.
10. 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.
11. 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.
12. Camacho-Arroyo I, Mendez-Cruz ST, Guerra-Araiza C, Cerbon MA, 1998a. Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J Endocrinol* 157:71-74.
13. Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM, Cerbón MA, 1994a. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid

- hormones in the hypothalamus and cerebral cortex of the rabbit. *J Steroid Biochem Molec Biol* 50:299-303.
14. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA, 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. *Rev Invest Clin* 47:329-340.
  15. 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.
  16. Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA, 1994b. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J Endocrinol* 142:311-316.
  17. Chabbert-Buffet N, Christin-Maitre S, Olivennes F, Dubourdiou S, Charbonnel B, Frydman R, Bouchard P. 2000. Effect of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist during the LH surge in normal women and during controlled ovarian hyperstimulation. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 52(6):721 – 726.
  18. 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.
  19. 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.
  20. Clarke C L, 1993. Ovarian steroid hormone receptors and their mechanism of action. In: *Molecular Aspects of Placental and Fetal Autacoids*. Rice GE, Brennecke SP (eds). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp 27-54.
  21. Clemm D L, 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.
  22. Conn PM, Freeman ME, *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Human Press 2000
  23. Conneely OM, Ludon JP, 2000. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoformas. *Steroids* 65:571 – 577

24. Cooneely O M, Mulac-Jericevic B, Lydon J P, De Mayo F J. 2001. Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinology* 179:97-103.
25. Csapo AI, Resch BA, 1979. Induction of preterm labor in the rat by antiprogesterone. *Am J Obstet Gynecol* 134:823-827.
26. Curran-Rauhut MA, Petersen SL, 2002. The distribution of progestin receptor mRNA in rat brainstem. *Brain Res Gene Expr Patterns*. Oct 1(3-4):151-157.
27. 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.
28. Delville Y, Blaustein JD. 1989. Long-term ovariectomy and hormone-induced sexual behaviour, progestin receptors and hypothalamic morphology in the female rats. *Horm Behav* 23(2):269 – 278.
29. Dluzen DE, Ramírez VD, 1991. Modulatory effects of progesterone upon dopamine release from the corpus striatum of ovariectomized estrogen-treated rats are stereospecific. *Brain Res* 538:176-179.
30. Evans R, 1988 The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-895.
31. Fang X, Wong S, Mitchell B F. 2002. Messenger RNA for progesterone receptor isoforms in the late-gestation rat uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 283( 6): 1167 – 1172.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. González-Agüero G, Ondarza R, Gamboa-Domínguez A, Cerbón M A, 2001. Progesterone receptor isoforms expresión pattern in human astrocytomas. *Brain Res Bull* 56 (1): 48 – 48.

36. 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.
37. González-Flores O, Guerra-Araiza C, Cerbón M, Camacho-Arroyo I, Etgen A M. 2004. The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone rats. *Endocrinology* 145(5): 2328 – 2336.
38. 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.
39. Gould E, Woolley C, Frankfurt M, McEwen BS, 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.* 10:1286 – 1291.
40. Gore-Langton RE, 1988. Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 57:187-198.
41. Graham JD, Clarke CL, 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-519.
42. 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.
43. Green IC, Howell SL, El Seifi S, Perrin D, 1978. Binding of 3h-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetology* 15:349-355.
44. Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I, 2000 Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev In Clin* 52:686-691.
45. 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.
46. Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, Camacho-Arroyo I, 2002. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res Bull* 59:105-109.
47. Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Salazar AM, Cerbon 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.

48. 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.
49. Guennoun R, Shcumacher M, Mercier G, Desarnaud F, Lacor P, Benavides J, Ferzaz B, Robert F. 2001. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res Rev* 37(1-3):343 – 359.
50. 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.
51. Heinzel 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
52. Horwitz KB, McGuire WL, 1975. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids* 25:497-505.
53. Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr, 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5:76-127.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. Inoue T, Akahira J, Suzuki T, Darnel AD, Kanako C, Takahashi K, Hatori M, Shirane R, Kumabe T, Kurakawa Y, Satomi S, Sasano H. 2002. Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *87:5325- 5331.*
58. 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.
59. 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* 94:7879-7884.
  60. Kandel, ER, Schwartz JH, Jessell TM, 2000. *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill Cuarta Edición. Pág. 317 – 381.
  61. 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.
  62. Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N, 1993. The ontogeny of gene expression of progesterone receptors in the female rat brain. *J Steroid Biochem Molec Biol* 47:173-182.
  63. Ke FC, Ramírez VD, 1987. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinol* 45:514-517.
  64. 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.
  65. Kinsley C H, Lambert K G. 2006. The Maternal Brain. *Sci Am Jan* 72 – 79.
  66. Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, Weigel NL, 2001. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem* 276:8475-8483.
  67. 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.
  68. Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS, 1993b. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 7:1603-1616.
  69. 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* 97:1032-1037

70. Lemon B, Tjian R, 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Develop* 14:2551-2569.
71. 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.
72. Lim CS, Baumann CT, Htun H, Sian W, Irie M, Smith CL, Hager GL, 1999. Differential localization and activity of the A and B forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol Endocrinol* 13:366-375.
73. 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.
74. Mahesh V, Brann D, Hendry L, 1996. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J Steroid Biochem Molec Biol* 56:209-219.
75. Mani S. 2001. Ligand-independent activation of progestin receptors in sexual receptivity. *Horm Behav.* 40(2):183 – 190.
76. Mark PJ, Smith JT, Waddell BJ. 2006. Placental and fetal growth retardation following partial progesterone withdrawal in rat pregnancy. *Placenta* 27: 208-214.
77. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW, 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20:321-344.
78. Medina VM, Dawson-Basoa ME, Gintzler AR, 1993. 17 beta-estradiol and progesterone positively modulate spinal cord dynorphin: relevance to the analgesia of pregnancy. *Neuroendocrinology.* 58: 310 – 305.
79. Meizel S, Turner KO, 1991. Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol Cell Endocrinol* 77:R1-5.
80. 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.
81. Mesiano S, Chan EC, Fitter JT, Kwet K, Yeo G. 2002. Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2924-2930.

82. 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.
83. Misrahi M, Venencie PY, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E, 1993. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochem Biophys Acta* 1216:289-292.
84. 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.
85. 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.
86. Murphy LJ, Sutherland RL, Stead B, Murphy LC, Lazarus L, 1986. Progestin regulation of epidermal growth factor receptor in human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 46:728-734.
87. Musgrove EA, Hamilton JA, Lee Cs, Sweeney KJ, Watts CK, Sutherland RL, 1993. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation on cyclin gene expression associated with changes in T47-D human breast cancer cell progression. *Mol Cell Biol* 13:3577-3587.
88. Musgrove EA, Lee Cs, Sutherland RL, 1991. Progestins both stimulate and inhibit breast cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor  $\alpha$ , epidermal growth factor receptor, c-fos and c-myc genes. *Mol Cell Biol* 11:5032-5043.
89. Nakayama T, Susuki M, Ishizuka N, 1975. Action of progesterone on preoptic thermosensitive neurons. *Nature* 258: 5530 – 5580.
90. Oettel M, Mukhopadhyay AK. 2004. Progesterone: the forgotten hormone in men ?. *Aging Male* 7:236-257.
91. 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.
92. Pearce PT, Khalid BAK, Funder JW, 1983. Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology* 113:1287-1291.

93. 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.
94. Perrot-Applanat M, David-Ferreira JF, 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. *Cell Tissue Res* 223:1511-1519.
95. Petitti N, Etgen AM, 1992. Progesterone promotes rapid desensitization of alpha 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* 55:1-8.
96. Poletti A, Conneely OM, McDonnell DP, Schrader WT, O'Malley BW, Weigel NL, 1993. Chicken progesterone receptor expressed in *Saccharomyces cerevisiae* is correctly phosphorylated at all four Ser-Pro phosphorylation sites. *Biochemistry* 32:9563-9569.
97. 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.
98. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Kats LC, LaMantia AS, McNamara Jo, Williams SM. 2001. *Neuroscience* 2<sup>nd</sup> Ed.
99. Reyna-Neyra A, Arias C, Ferrera P, Morimoto S, Camacho-Arroyo I 2004. Changes in the content and distribution of microtubule associated protein 2 in the hippocampus of the rat during the estrous cycle. *J Neurobiol* 15:60(4):473- 480.
100. Reyna-Neyra A, Camacho-Arroyo I, Ferrera P, Arias C. 2002. Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein 2 in the rat hippocampus. *Bain Res Bull.* 30:58(6):607:612.
101. Ronnekleiv OK, Kelly MJ. 2005 Diversity of ovarian steroid signaling in the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* 26(2): 56 – 84.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
  106. 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.
  107. 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.
  108. Schaeffer C, Roos J, Aron C, 1990. Lordosis behavior in intact male rats: effects of hormonal treatment and manipulation of the olfactory system. *Horm Behav* 24:50-61.
  109. Schneider JS, Stone MK, Wyenne-Edwards KE, Horton TH, Lydon J, O'Malley B, Levine JE, 2003. Progesterone receptors mediate male aggression toward infants. *Proc Natl Acad Sci* 100: 2951- 2956.
  110. 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.
  111. Schumacher M, Coirini H, Rofert 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.
  112. Schumacher M, Guennoun R, Robert F, Carelli C, Gago N, Ghoumari A, Gonzalez- Deniselle Mc, Gonzalez SL, Ibañez C, Laombarda F, Coirini H, Bauliue EE, De Nicola AF, 2004. Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth. Horm. IGF Res.* 14: S18 – S33.
  113. 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.

114. Sherwin BB. 1999. Progestogens used in menopause, side effects, mood and quality of life. *J Reprod Med* 44: 227-232.
115. 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.
116. Skinner DC, Evans NP, Delaleu B, Goodman RL, Bouchard P, Caraty A, 1998. The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. *Proc Natl Acad Sci* 95:18: 10978 – 10983.
117. Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389: 194-198.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. Terner C, 1977. Progesterone and progestins in the male reproductive system. *Ann NY Acad Sci* 286:313-320.
122. Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Fenichel P, Fehlmann M, 1992. Progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane. *FEBS Lett* 1308:116-120.
123. Topper YJ, Freeman CS, 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60:1049-1106.
124. 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.
125. Turgeon JL, Waring DW. 2000. Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology* 141: 3422-3429.

126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. Wong MSJ, Murphy LC, 1991. Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T47-D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:39-44.
132. Ylikomi T, Gasc JM, Isola J, Baulieu EE, Tuohimaa P, 1985. Progesterone receptor in the chick bursa of fabricius: characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology* 117:155-160.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. Zwain IH, Yen SS, 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology* 140:3843-3852.