



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Regulación del receptor a progesterona
durante la transición del proestro - estro en el
hipotálamo de la rata.

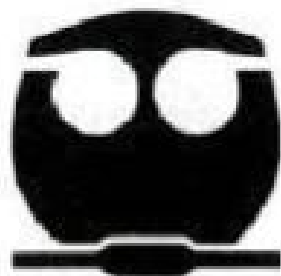
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :

QFB. LUCIANO MENDOZA GARCÉS



TUTOR: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ENTIDADES ACADÉMICAS FACULTAD DE QUÍMICA
E INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

Of. No. PMDCB/161/2007

QFB. LUCIANO MENDOZA GARCÉS
Alumno de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 26 de febrero del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICA), con la tesis titulada "Regulación del receptor a progesterona durante la transición del proestro-estro en el hipotálamo de la rata", dirigida por el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

| | |
|------------|----------------------------------|
| PRESIDENTE | Dr. Ignacio Camacho Arroyo |
| VOCAL | Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez |
| SECRETARIO | Dra. María Elena Ibarra Rubio |
| SUPLENTE | Dr. Alejandro García Carrancá |
| SUPLENTE | Dr. Edgar Zenteno Galindo |

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de febrero de 2007.
EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo



Agradecimientos

A mis padres por la vida y los consejos.

A mis hermanos por su apoyo económico y la carrilla.

Gracias a la Dra. Adriana Mendoza, al Dr. Marco A. Cerbón y al Dr. Ignacio Camacho por sus atinados consejos, gracias por tener la paciencia y la amabilidad de compartir parte de su tiempo.

A la banda, Andrea por la sana confusión, Alejandra por siempre anhelar, Toño por la búsqueda de las raíces, Daniel por la constancia, Orvil por el buen ánimo.

Al jurado de tesis que contribuyó a enriquecer este trabajo con su sabiduría.

Al comité tutorial.

A Natty, Chava, Montse, Karina, Yukari, Moni, Tania y Mauricio por los ratos de sano esparcimiento.

Gracias To, eres increíble y llegas a ser imprescindible, que las midichorians nos deparen un buen futuro.

Resumen.

Las ratas hembras presentan una ovulación cíclica. El ciclo estral está dividido en cuatro etapas que tienen el nombre de proestro, estro, metaestro, diestro. La ovulación ocurre a las 3:00 h del estro y previamente, a las 18:00 h del proestro, se presenta un cambio en el patrón de conducta, la hembra permite la cópula. La progesterona (P_4) presenta un incremento súbito en la tarde del proestro, previo al cambio observado en la conducta de las ratas hembras. La P_4 ejerce su efecto a través de la unión con sus receptores nucleares específicos, aunque se ha observado, que algunas veces, los receptores a progesterona (RP) son activados sin la interacción con P_4 , esto se asocia a estimulación vaginocervical. Se conocen isoformas del RP con diferente función y regulación. El RP A y el RP B son los más estudiados, ambas proteínas se han detectado en el hipotálamo que forma parte del diencefalo y se encarga de modular, entre otras, las funciones de conducta en los mamíferos. Se sabe poco de la función de las isoformas del RP en la conducta reproductiva. El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de las isoformas del RP en el hipotálamo de la rata hembra durante la transición proestro-estro del ciclo estral. Para esto se emplearon las técnicas de *Western blot* en macerado de hipotálamo e inmunohistoquímica en cortes coronales del cerebro de 70 ratas hembras apareadas y no apareadas de la cepa Wistar de 2 meses de edad. Además, se midieron las concentraciones plasmáticas de P_4 y estradiol (E_2) por radioinmunoensayo. Los datos obtenidos se cuantificaron con analizadores de imágenes. Los resultados en hipotálamo muestran que existen diferencias en la expresión de las isoformas del RP a lo largo de la transición proestro-estro: la isoforma B del RP disminuye en ambos grupos, la expresión de la isoforma A aumenta en ratas no apareadas, mientras que en ratas apareadas no hay cambio. En el núcleo ventromedial se observó que la expresión del RP durante la transición disminuye en ambos grupos, interesantemente el RP a las 17:00 y 21:00 h del proestro presentó un aumento en la expresión en ratas no apareadas con respecto a las apareadas. Los datos obtenidos del radioinmunoensayo verificaron que las ratas estuvieran en la transición proestro-estro del ciclo estral. Los datos sugieren que las isoformas del RP están encargadas de regular diferentes efectos fisiológicos.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Antecedentes. | 1 |
| 1.1. Ciclo estral de la rata. | 1 |
| 1.1.1. Generalidades. | 1 |
| 1.1.2. Niveles hormonales durante el ciclo estral. | 3 |
| 1.2. Conducta reproductiva. | 5 |
| 1.3. El hipotálamo. | 6 |
| 1.3.1. En la conducta. | 9 |
| 1.4. El receptor a progesterona. | 10 |
| 1.4.1. Mecanismo de acción. | 11 |
| 1.4.2. Isoformas del receptor a progesterona (RP). | 13 |
| 1.4.3. Activación del RP independiente de su ligando. | 16 |
| 1.4.4. Regulación de Isoformas del RP en el cerebro. | 17 |
| 2. Planteamiento del problema. | 19 |
| 3. Hipótesis. | 20 |
| 4. Objetivos. | 21 |
| 4.1. General. | 21 |
| 4.2. Particulares. | 21 |
| 5. Metodología. | 22 |
| 5.1. Animales de experimentación. | 22 |
| 5.2. Diseño experimental. | 22 |
| 5.3. Obtención de tejido. | 22 |
| 5.4. <i>Western blot</i> . | 23 |
| 5.5. Inmunohistoquímica. | 24 |
| 5.6. Radioinmunoensayo. | 25 |
| 5.7. Análisis. | 25 |
| 6. Resultados. | 27 |
| 7. Discusión. | 33 |
| 8. Conclusiones. | 37 |
| 9. Referencias. | 38 |

1. ANTECEDENTES.

1.1. Ciclo estral de la rata.

1.1.1. Generalidades.

La rata de laboratorio es un mamífero no estacional, de ovulación cíclica y poliestro. Ésto es, el ciclo ovulatorio continúa a través del año (caso opuesto a ciclos ovulatorios restringidos a una estación, como por ejemplo en las ovejas). A este tipo de ovulación se le conoce como ciclo estral y se divide en cuatro etapas: el proestro, el estro, el metaestro y el diestro; durante el ciclo se presentan cambios estructurales en tejido reproductivo y variaciones en las concentraciones plasmáticas de hormonas. Mediante frotis vaginal ha sido posible conocer la duración de las diferentes etapas del ciclo estral de la rata, el cual ocurre cada 4 a 5 días (Mandl AM, 1951).

El proestro tiene un periodo de 12 a 14 h; el estro de 25 a 27 h; el metaestro de 6 a 8 h y el diestro de 55 a 57 h. Los diferentes estados del ciclo estral pueden ser monitoreados por el tipo de células que aparecen en el frotis vaginal (Figura 1). El proestro está caracterizado por un predominio de células nucleadas epiteliales, que son redondas y aparecen en grupos a la mitad del proestro; ocasionalmente pueden aparecer unas cuantas células escamosas cornificadas epiteliales (Figura 1A). En el estro, la mayoría de las células son escamosas cornificadas epiteliales, este tipo de células aparecen sin un núcleo visible con un citoplasma altamente granular y de forma irregular (Figura 1B). Durante el metaestro (también llamado diestro 1) y el diestro (también llamado diestro 2) las células que predominan son los leucocitos, los cuales aparecen con un número significativo de células nucleadas epiteliales. Los leucocitos son pequeños con citoplasma granular y, si se examinan a aumentos mayores, usualmente tienen núcleos vesiculados (Figura 1C y D). La descripción anterior es válida para un ciclo de 4 días, pero si el ciclo fuera de 5 días, sería posible que en el quinto día se observaran células cornificadas (estro) o leucocitos (diestro) (Mandl AM, 1951a).

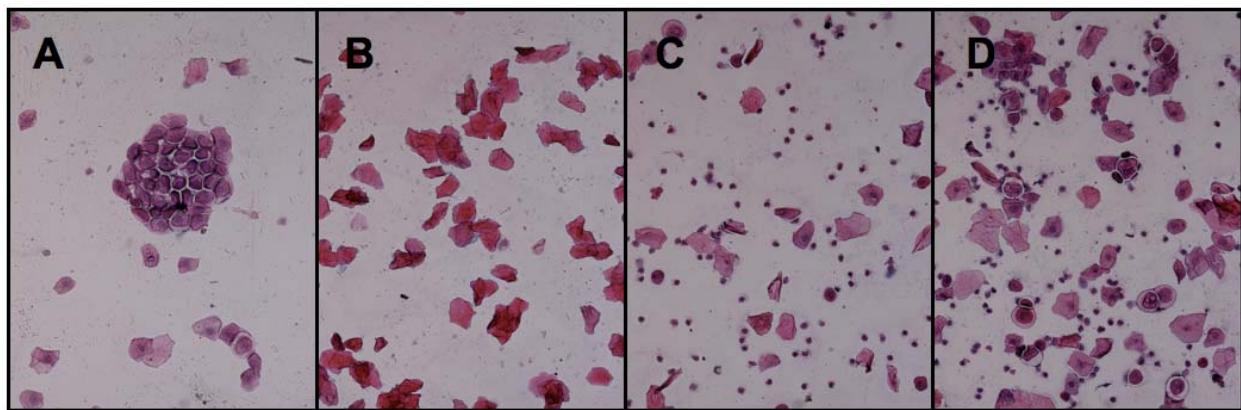
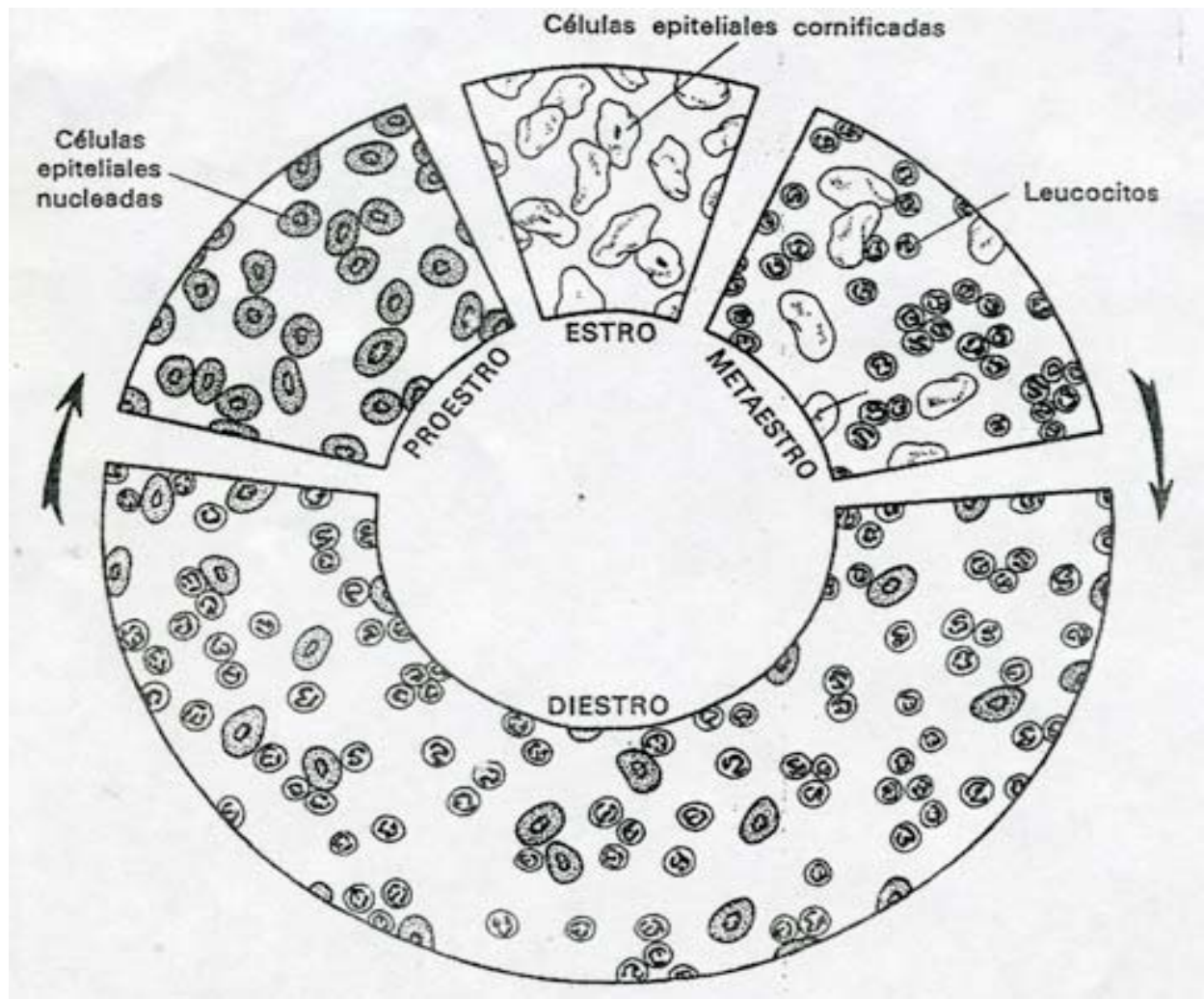


Figura 1. Etapas del ciclo estral de la rata. Análisis citológico de frotis obtenidos de la pared vaginal de la rata, las células fueron teñidas con hematoxilina y eosina para determinar los diferentes tipos celulares en cada etapa. 1A. Proestro: células epiteliales nucleadas; 1B. Estro: células epiteliales cornificadas; 1C. Metaestro: células cornificadas y leucocitos; 1D. Diestro: leucocitos con células epiteliales nucleadas. Microscopio de luz a un objetivo 10X.

1.1.2. Niveles hormonales durante el ciclo estral.

El periodo preovulatorio del ciclo estral está caracterizado por el crecimiento de los folículos ováricos y aumento en la secreción de estrógenos. En ratas con un ciclo estral de cuatro días, el nivel plasmático basal de estradiol (E_2) es de 8 ± 2 pg/ml durante la etapa del estro y se incrementa paulatinamente durante el ciclo llegando a su valor máximo de 45 ± 2 pg/ml a las 9:00 del proestro. Durante la tarde del proestro el nivel de E_2 cae rápidamente y alcanza el valor basal en las primeras horas de la mañana del estro. El E_2 es secretado por las células de la teca interna y las células de la granulosa de los folículos De Graaf que se encuentran en desarrollo (Hashimoto I et al., 1968).

En la rata adulta, los progestágenos más importantes secretados por los ovarios durante el ciclo estral son la 20α -hidroxipregn-4-en-3-ona, también conocida como 20 hidroxiprogesterona (20α -OH-P) y la progesterona (P_4). Se presentan dos fases de secreción máxima para la 20α -OH-P y la P_4 del ovario durante el ciclo estral. El primer nivel máximo de ambas hormonas se origina del cuerpo lúteo y ocurre durante la tarde del metaestro. El incremento de la P_4 en el plasma periférico es de 24 ± 3 ng/ml e inicia alrededor del medio día del metaestro, se prolonga hasta la mañana temprana del diestro y cae a nivel basal poco después del comienzo del diestro. El segundo nivel máximo ocurre durante la última parte de la tarde del proestro, donde la 20α -OH-P se sintetiza del cuerpo lúteo mientras que la P_4 se origina de las células granulosas del folículo preovulatorio y alcanza un valor de 46 ± 7 ng/ml en plasma periférico. El segundo nivel máximo se alcanza alrededor del tiempo en el que se llega al valor máximo de la LH que es en la tarde temprana y regresa al nivel basal de 2 ± 1 ng/ml por la mañana del estro (Hashimoto I y Wiest WG, 1969; Nequin LG et al., 1979).

El aumento en la concentración de estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo. La GnRH, a su vez, desencadena la secreción hipofisiaria de la hormona luteinizante (LH). Los niveles circulantes de LH empiezan a incrementarse alrededor de las 14:00 a 15:00 h del proestro y alcanzan su nivel

máximo de 37 ± 5 ng/ml entre las 17:00 y 19:00 h de la misma fase (Figura 2). El incremento de LH induce la ruptura folicular y la ovulación, la cual ocurre en las primeras horas del estro. El nivel plasmático de LH comienza a disminuir en la noche del proestro y alcanza el nivel basal de 0.5 ± 0.15 ng/ml en las primeras horas de la mañana del estro y permanece así durante el resto del ciclo estral. El patrón de secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y prolactina es similar al patrón que sigue LH durante el ciclo estral (Figura 2) (Freeman ME, 1988).

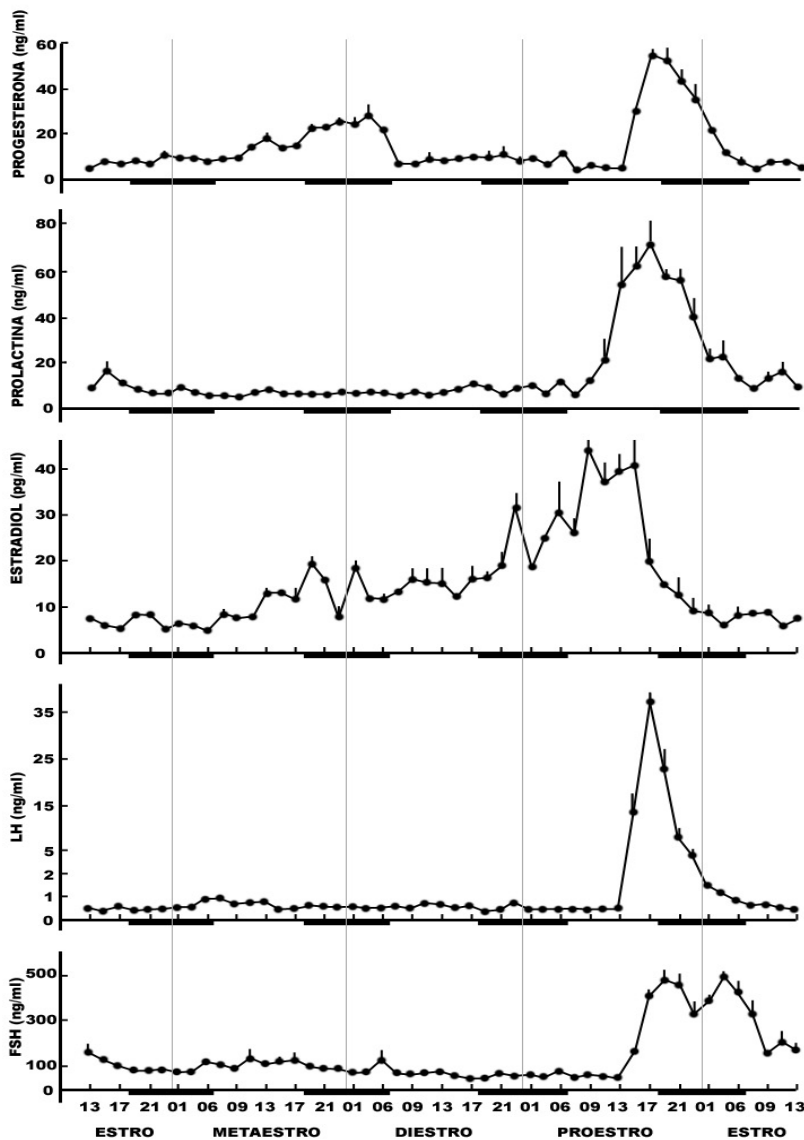


Figura 2. Concentraciones hormonales durante el ciclo estral de la rata. Concentración de P_4 , prolactina, E_2 , LH y FSH en plasma periférico obtenido en intervalos de 2 horas a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan los periodos de oscuridad en la colonia y los números en la base representan la hora del día (Freeman ME, 1988).

1.2. Conducta reproductiva.

El ciclo estral tiene la característica de presentar un periodo en el que la conducta de la hembra se hace receptiva al macho y se propicia el apareamiento. En la rata, el periodo donde se aprecia este cambio de conducta es en la transición proestro-estro, iniciando alrededor de las 17:00 h del proestro y terminando a las 3:00 h o, en algunos casos, se puede extender hasta las 13:00 h del mismo estro. Al deseo por aparearse se le conoce como conducta reproductiva y se compone básicamente de proceptividad y receptividad (Edwards DA y Pfeifle JK, 1983).

La conducta de proceptividad tiene como indicadores el “orejeo”, es decir la agitación de las orejas, y la “persecución”, que consiste en carreras que hace la hembra alrededor del macho con repentino paro y salto. Estos son comportamientos de escaqueo o insinuación. La conducta de receptividad es una postura física de “facilitación”, conocida como lordosis, que consiste en el arqueamiento de la columna de la rata y el levantamiento de la cola y presentación de la región genital hacia el macho (Erskine MS, 1989).

La conducta reproductiva de la rata está relacionada con la circulación endógena de hormonas esteroides originadas en los ovarios. Experimentos en ratas ovariectomizadas (OVX) demuestran la desaparición de la conducta reproductiva y su reestablecimiento con la administración exógena de E_2 seguida al día uno o dos por administración de P_4 . La simple administración de E_2 a ratas OVX puede inducir ciertos aspectos de la conducta reproductiva, tales como la receptividad sexual (lordosis). Sin embargo, la dosis de estradiol seguida de P_4 es capaz de presentar el cuadro completo de conducta sexual que se observa en animales fisiológicamente intactos, es decir la proceptividad y receptividad (Blaustein JD y Olster DH, 1989).

1.3. El hipotálamo.

En mamíferos, se ha demostrado que el hipotálamo es capaz de regular el sistema cardiovascular, respuestas de termorregulación y las vísceras abdominales, además de conductas de agresividad-defensa y conducta de ingesta que involucra nutrientes y agua. Además, el hipotálamo tiene una función esencial en asegurar la conservación de la especie por control de la expresión de la conducta sexual y maternal (Swanson LW, 1986). El hipotálamo representa la vía común final del control neuronal de los lóbulos anterior, intermedio y posterior de la hipófisis. Cabe mencionar que la mayoría de las neuronas que contienen hormonas liberadoras de hormonas se encuentran en la zona periventricular del hipotálamo (Swanson LW et al., 1987).

El hipotálamo ocupa la mitad ventral del diencefalo a ambos lados del tercer ventrículo y yace inmediatamente arriba de la hipófisis. Dorsalmente, el hipotálamo está unido a lo largo de la mayoría de su longitud por la *zona incerta*, y la orilla media del pedúnculo cerebral corresponde a su frontera lateral. Caudalmente, el hipotálamo se une con la sustancia gris periacueductal y área ventral tegmental del mesencéfalo (Simerly RB y Swanson LW, 1988). Crosby y Woodburne reconocieron que el hipotálamo es mejor visto como tres distintas zonas longitudinales (figura 3), que serían región periventricular, media y lateral y su perspectiva es apoyada por análisis fisiológicos y conductuales. La zona periventricular contiene la mayoría de las neuronas que proyectan a la hipófisis y está, por lo tanto, involucrada principalmente en la regulación de la secreción de hormonas de esta glándula. En general, la zona media del hipotálamo consiste en una serie de distintos grupos celulares organizados rostro-caudalmente, que reciben sus principales entradas de varias partes de la región límbica del telencéfalo, tales como el septum y la amígdala (Swanson LW, 1992).

Las neuronas localizadas en la zona lateral del hipotálamo están distribuidas entre las fibras del haz del cerebro anterior medio y pueden ser vistas como un núcleo base para este sistema complejo de fibras (Geeraedts LMG et al., 1990). Basado en la

organización de los grupos celulares de la zona media, Le Gros Clark, en 1938, dividió el hipotálamo en cuatro niveles rostro-caudales, designando las regiones preópticas, supraópticas (también conocida como anterior), tuberal y mamilar (figura 3) (Swanson LW, 1992).

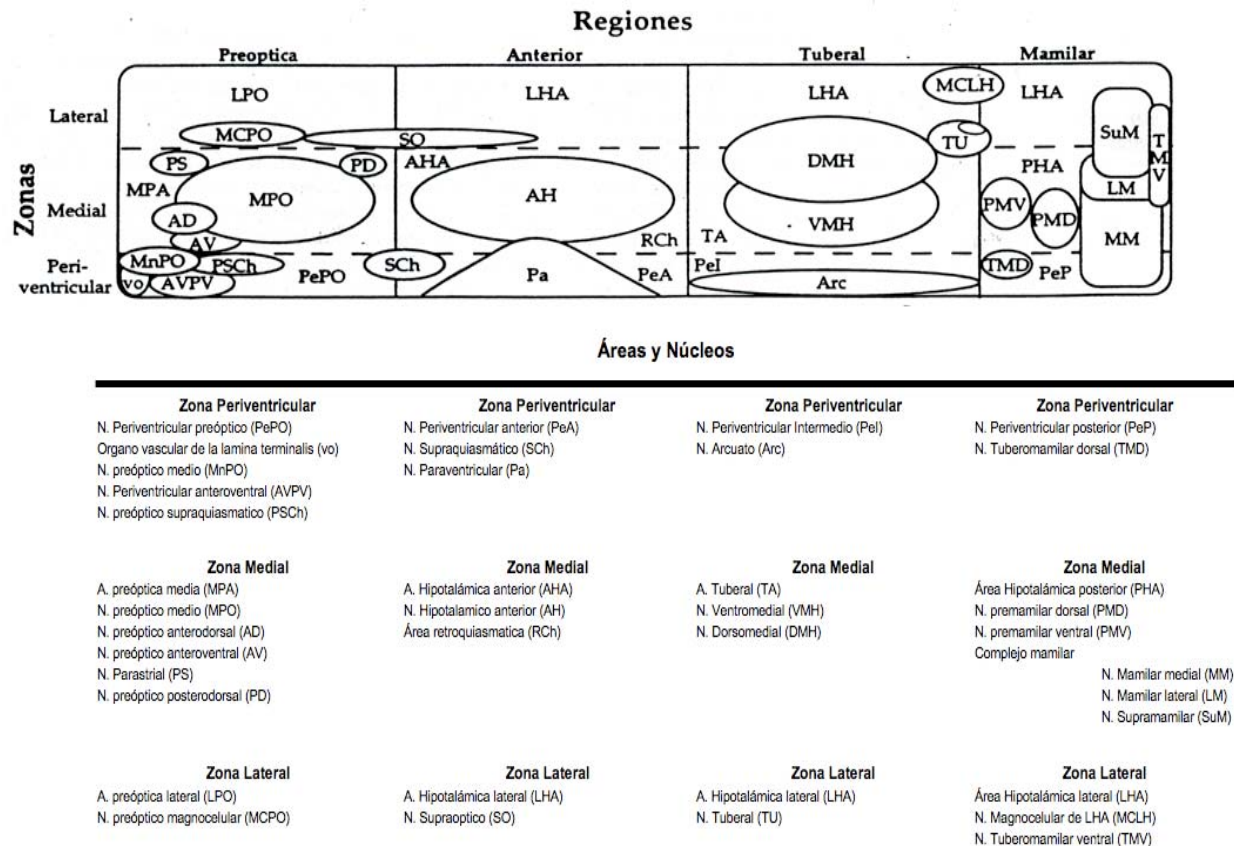


Figura 3. Organización del hipotálamo. Representación esquemática de la organización del hipotálamo, mostrando de forma muy simplificada sus zonas, regiones, áreas y núcleos. A. áreas; N. núcleos. (Simerly RB, 1995)

La zona media del hipotálamo contiene una serie de grandes núcleos que colectivamente juegan un papel clave en el inicio de conductas de motivación tales como conducta copulatoria, agresiva y apetito. Una notable característica de los núcleos en la zona media es que ellos forman una fuerte conexión bidireccional con la mayoría de las regiones límbicas y tallo cerebral que suministran vías aferentes a la zona medial. Cada una de estas áreas consiste de una especie de materia hipotalámica indiferenciada en la cual muchas condensaciones celulares, o núcleos, están embebidos (Swanson LW, 1986).

El área tuberal del hipotálamo contiene dos grandes núcleos bien diferenciados: El ventromedial hipotálamico (VMH) y el dorsomedial hipotálamico (DMH). El VMH es el grupo más grande de células en la región tuberal y está compuesto de dos agrupaciones distintas de células, definiendo las subdivisiones dorsomedial (VMHDM) y ventromedial (VMHVL), las cuales están separadas por una zona escasa de células (VMHC). Una cuarta subdivisión es aparente en niveles anteriores y se designa como la parte anterior (VMHA). El VMH está rodeado por una cápsula gruesa de fibras o “caparazón” que lo separa de la materia hipotálamica circundante (Millhouse OE, 1973).

Las principales vías aferentes a VMH son de la amígdala y subículum ventral, con entradas de los núcleos basomedial y posterior de la amígdala y subículum ventral inervando la parte ventrolateral del caparazón del VMH (Canteras NS y Swanson LW, 1992). En contraste, los núcleos medial y basolateral de la amígdala proyectan fibras al centro celular del núcleo. El VMH también recibe entradas de todas partes de la zona medial del hipotálamo (excepto el núcleo medial y lateral mamilar). Además, el VMH recibe entradas de la zona lateral, área hipotálamica anterior y núcleo supraquiasmático (Fahrbach SE et al., 1989).

Las vías aferentes del núcleo parabraquial del tallo cerebral al VMH son las que más atención han recibido debido a la posible relevancia de esta vía metabólica en conducta de inapetencia. El VMH envía proyecciones masivas a otras partes de la zona medial del hipotálamo, las proyecciones no son tan comunes en regiones periventriculares y de la zona lateral. El VMH también envía proyecciones a la amígdala y el septum, con la proyección más fuerte al núcleo striae terminalis, además de proporcionar proyecciones descendientes a regiones del tallo cerebral, tales como la sustancia gris mesencefálica que son conocidos por proyectar, ya sea a la médula espinal o a los ganglios basales (Canteras NS et al., 1994). Estas proyecciones descendientes son consistentes con el papel propuesto del VMH en la mediación de aspectos somatomotores de la compleja conducta de motivación.

1.3.1. En la conducta.

Las subdivisiones del VMH parecen tener diferentes proyecciones neuronales y algunas de estas extensiones son funcionalmente distintas. Como una gran generalización, el VMHVL tiene prolongaciones neuronales hacia regiones del cerebro anterior y tallo cerebral que contienen células que expresan receptores a hormonas esteroides sexuales y están involucradas en la mediación de la conducta reproductiva, tales como la amígdala media y el área preóptica media; mientras que el VMHDL forma fuertes conexiones con regiones involucradas con la conducta del apetito, tales como los núcleos paraventricular y dorsomedial hipotalámico (Canteras NS et al., 1994).

La asociación que se ha establecido entre la conducta reproductiva y el hipotálamo, concretamente el VMH, tiene sus bases en experimentos que involucran la lesión de éste y otros núcleos del hipotálamo. Lesiones electrolíticas en el VMH de rata hembra dan como resultado una pérdida de la ovulación y una disminución en la frecuencia de monta en el apareamiento, aunque reportan una recuperación de la conducta de lordosis con el tiempo (La Vaque TJ y Rodgers CH, 1975). El resultado hace ver que no es un solo núcleo cerebral donde se ven concentradas todas las características que componen la conducta reproductiva.

Se ha demostrado que el VMH es un núcleo sensible a la P_4 . Al colocar cánulas directas al núcleo VMH de ratas hembras ovariectomizadas (OVX) con tratamiento de E_2 y la consecuente administración de P_4 , E_2 y colesterol, la administración de P_4 provoca la conducta característica de estro, siendo inefectivos el E_2 y el colesterol (Pleim ET y Barfield RJ, 1988). El monitoreo de la actividad neuronal en monos hembras y machos durante el apareamiento ha servido para dilucidar la participación del hipotálamo en la conducta reproductiva, siendo importante para el acto copulatorio el VMH en la hembra y el DMH en el macho. El área preóptica media (MPOA) tiene gran relevancia en el despertar del acto sexual (Oomura Y et al., 1988).

El receptor a progesterona (RP) y el receptor a estrógenos (RE) se encuentran en neuronas del VMH que, como se ha visto, es importante en la conducta reproductiva.

Este núcleo proyecta conexiones hacia la sustancia gris mesencefálica, que es un núcleo intermediario hacia neuronas motoras de la lordosis. Estas proyecciones expresan RP, además de que se ha encontrado que la expresión de genes tempranos intermediarios, como Fos, se incrementan en VMH durante el apareamiento, lo que indirectamente estaría asociando la actividad de apareamiento con la activación de VMH. Muchas de las neuronas activadas expresan RE. Algunas neuronas del VMH coexpresan Fos y RP; algunas de estas neuronas se proyectan a sustancia gris mesencefálica y están en la porción rostral del núcleo (Flanagan-Cato LM et al., 2006). Estos datos indican que las neuronas involucradas en la conducta reproductiva pueden estar sensibilizadas a hormonas esteroides sexuales a través de sus receptores específicos.

1.4. El receptor a progesterona.

Las hormonas esteroides influyen en la conducta reproductiva de la rata a través de receptores específicos intracelulares que funcionan como factores de transcripción nucleares ligando-dependientes, regulando la expresión de genes y de redes genómicas (O'Malley BW, 1990).

En ratones, la pérdida funcional del gen para RP causa anomalías reproductivas pleiotrópicas incluyendo pérdida de ovulación, hiperplasia e inflamación uterinas, desarrollo muy limitado de glándulas mamarias y daño del timo, además de inhibición de la conducta sexual (Lydon JP et al., 1995).

El RP muestra una organización estructural de dominios similar a la de los miembros de la superfamilia de receptores a hormonas esteroides. Esta superfamilia se ha organizado en tres grupos generales basados en la similitud química de sus ligandos: 1) los receptores para hormonas esteroides que son receptores a andrógenos (RA), receptores a mineralocorticoides (RM), RE, receptores a glucocorticoides (RG) y RP; 2) los receptores de RXR-heterodiméricos, incluido el receptor a tirosina (RT), receptor a

vitamina D (RVD), receptor a ácido retinóico (RAR), receptor ácido 9-cis-retinóico (RXR), y receptor a ecdisona (REc), el cual se encuentra en insectos; y 3) un tercer grupo de receptores llamados huérfanos, debido a que no se conoce su ligando. Este grupo incluye a un número de receptores potencialmente importantes como el receptor activador de proliferación de peroxisomas (RAPP), el factor 1 esteriodogénico (SF-1), el receptor al factor-inducido de crecimiento nervioso (NGFI), y el receptor huérfano ligado al cromosoma X (DAX-1) (Evans RM, 1988).

Los miembros de la superfamilia de receptores a hormonas esteroides muestran tres dominios principales (figura 5). En el extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD), el cual comprende de 220 a 250 aminoácidos que contienen dos regiones con identidad de secuencias entre los receptores para sus diferentes hormonas. Le sigue una pequeña región llamada "bisagra" que contiene secuencias de reconocimiento para ciertas proteínas activadoras y/o represoras, este es el llamado dominio de unión a proteínas de choque térmico "Heat shock" (HspBD) cuya función es la localización nuclear del receptor (Jackson TA et al., 1997). A continuación está el dominio de unión al DNA (DBD), formado de unos 65 a 70 aminoácidos y que al igual que LBD, presenta una alta identidad de secuencia entre los receptores. El DBD parece tener similitudes estructurales a otras proteínas de unión al DNA. La estructura del DBD se compone de dos dedos de zinc, en los cuales cuatro cisteínas coordinan un átomo de zinc. El dominio amino terminal, algunas veces conocido como el dominio inmunogénico, es el menos conservado y varía en longitud de aproximadamente 600 aminoácidos para el receptor de mineralocorticoides a aproximadamente 25 aminoácidos del receptor de vitamina D (Orti E et al., 1992).

1.4.1. Mecanismo de acción.

El RP sufre un cambio conformacional cuando se une a su hormona, permitiendo su translocación nuclear, dimerización y unión al DNA (Beato M et al., 1995). La conformación adquirida por el receptor, una vez activado por su ligando, es capaz de reclutar factores generales de transcripción y de esta manera alterar la estructura de la

cromatina permitiendo la formación de un complejo de preiniciación y la modulación de expresión de genes blanco (Klein-Hitpass L et al., 1990).

Las secuencias específicas del DNA a las que se une el complejo receptor-ligando se conocen como elementos de respuesta hormonal (ERH). La fosforilación del receptor ocurre después de la activación por su ligando seguido de una serie final de fosforilaciones después de que el receptor se une al DNA previo a la activación del gen blanco (Figura 4). Después de esto, una variedad de cambios fisiológicos pueden originarse; por ejemplo, en respuesta a tratamientos de E₂ y/o P₄ pueden verse alterados sistemas de segundos mensajeros, niveles neurotransmisor/receptor de péptido y liberación de neurotransmisores (Bagchi MK et al., 1992; Takimoto GS et al., 1992).

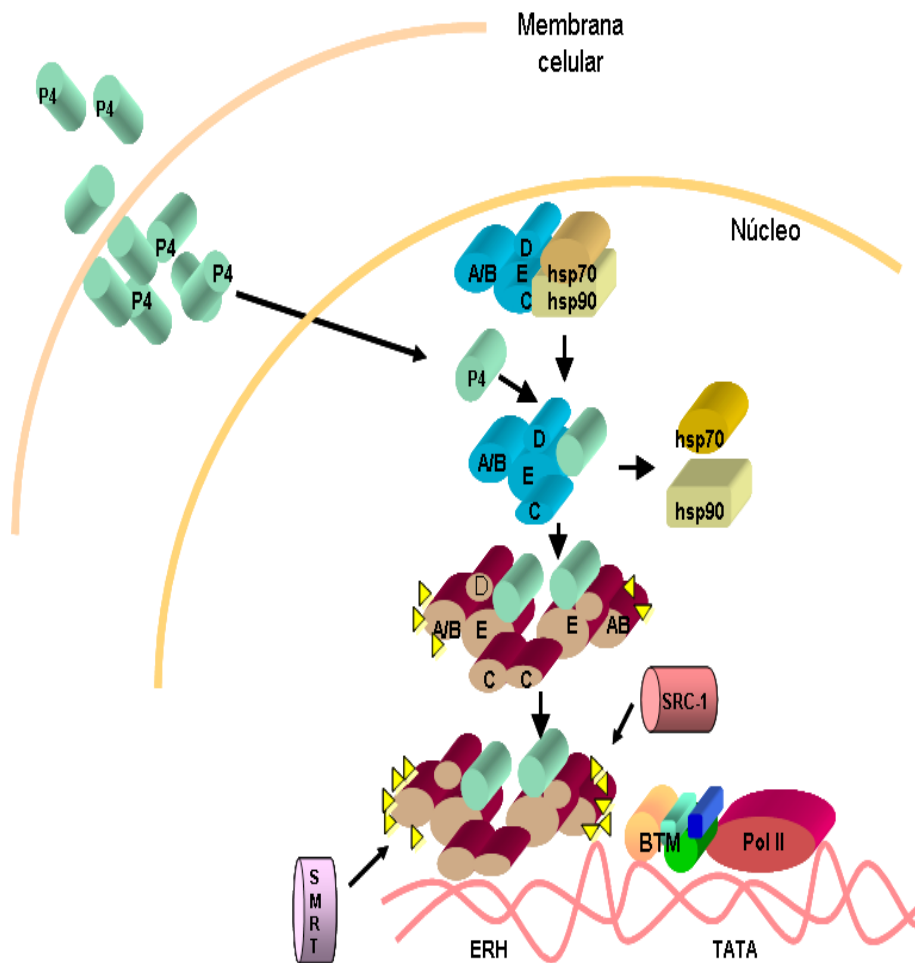


Figura 4. Regulación de la expresión génica por P₄ vía RP intracelular. En la forma sin-ligando el RP está asociado con proteínas chaperonas tales como proteínas de choque térmico HSP90 y HSP70. Después la P₄ se une y el RP se disocia de las proteínas chaperonas y se dimeriza con otras moléculas de RP. Luego el RP es fosforilado (triángulos) y se forman complejos con cofactores tales como el coactivador SRC-1 o el correpresor SMRT. El RP interactúa con ERH en la región promotora de genes blanco de la P₄, que también induce la fosforilación del RP; y la formación del complejo de transcripción basal (BTM) es reclutada. A/B, C, D y E son dominios del RP (Camacho-Arroyo I, 2003).

1.4.2. Isoformas del receptor a progesterona.

El RP es una proteína que expresa dos isoformas, conocidas como RP-A y RP-B (figura 5), que son producidos de un mismo gen por transcripción de dos distintos promotores y por la traducción de dos señales alternativas de codones de inicio AUG (Kastner P et al., 1990).

Las isoformas RP-A y RP-B difieren sólo en que RP-B contiene una extensión amino terminal adicional de aproximadamente 165 aminoácidos. Esta región contiene una función de transactivación que es específica de RP-B y es requerida para genes blanco específicos que pueden ser activados por RP-B pero no por RP-A (Wen DX et al., 1994). Cuando en cultivo celular se expresan individualmente RP-A y RP-B, las isoformas muestran diferentes propiedades de transactivación que son específicas al tipo celular y promotor del gen blanco utilizado (Hovland AR et al., 1998).

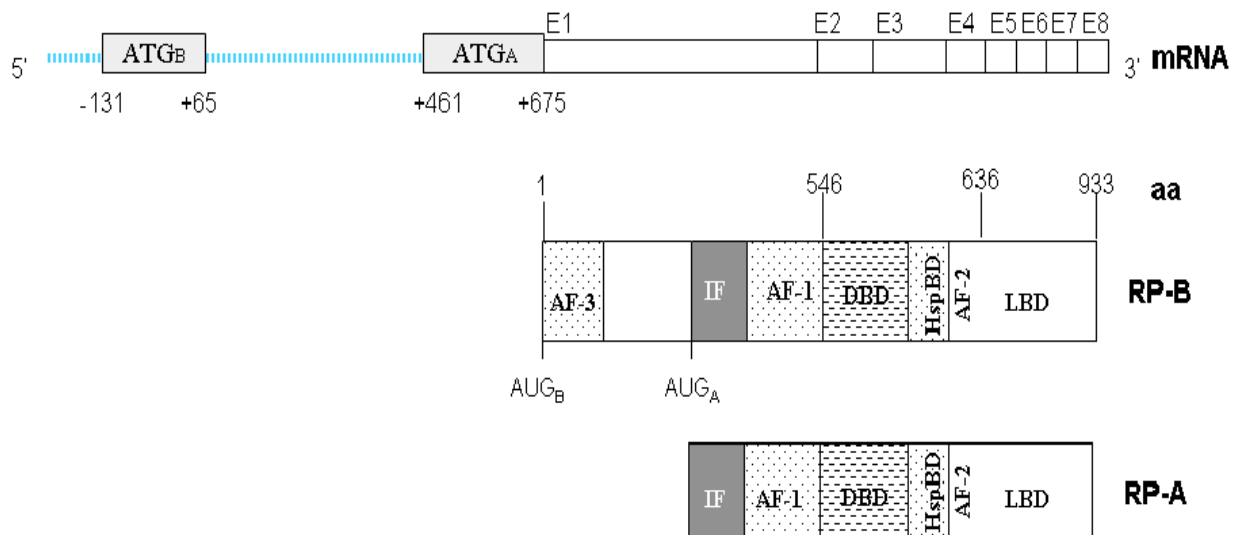


Figura 5. Representación esquemática de las isoformas RP-A y RP-B. Se muestra la organización génica y proteica de las isoformas del RP. ATG_B y ATG_A: sitios de inicio de transcripción para cada isoforma de RP; E: exones; AF: funciones de activación; IF: funciones de inhibición; DBD: dominio de unión al DNA; HspBD: dominio de unión a proteínas de choque térmico; LBD: dominio de unión al ligando; AUG_B y AUG_A: sitios de inicio de traducción para cada isoforma de RP; aa: aminoácidos (Camacho-Arroyo I, 2003).

Datos biofísicos y bioquímicos indican que el extremo amino terminal tiene una conformación no-globular. Las isoformas del RP contienen por lo menos dos dominios de activación de transcripción (AF). Estos son dominios autónomos transferibles que proveen superficie de interacción para coactivadores (Edwards DP et al., 2003).

El AF-2 localizado en el LBD ha sido bien caracterizado. Una familia de coactivadores p160 interactúa con y media la actividad de AF-2 en una manera dependiente de la hormona. AF-2 es capaz de unir coactivadores p160 como resultado del reposicionamiento inducido por la hormona esteroide de la mayoría de las alfa hélices del LBD ubicado en el carboxilo terminal. Ésto crea una cesta de unión hidrofóbica específica para coactivadores p160. El AF-2 es una región altamente conservada entre los receptores nucleares y es de resaltar que coactivadores p160 son capaces de interactuar con un amplio número de receptores nucleares. Se cree que los coactivadores p160 sirven como plataforma para reclutar y generar complejos de coactivadores más generales, tales como CBP, pCAF y CARM-1, que poseen una fuerte actividad enzimática de modificación de histonas (Edwards DP et al., 2003).

La mayoría de antagonistas de hormonas esteroides no son antagonistas puros y pueden exhibir actividad agonista parcial en células y promotores de genes blancos. Los antagonistas de hormonas esteroides son generalmente inhibidores efectivos de AF-2 como resultado de inducir una conformación alterna de la hélice 12 del LBD, que bloquea la unión de los coactivadores p160 a la cesta (Molenda-Figueira HA et al., 2006).

El RP-B funciona como un activador de transcripción de muchos promotores dependientes de RP y en una variedad de tipos celulares en los cuales RP-A está inactivo. Bajo estas condiciones, agonistas que se unen a RP-A pueden reprimir la actividad transcripcional de RP-B y otros receptores a hormonas esteroides incluyendo al $RE\alpha$ (Giangrande PH y McDonnell DP, 1999). Cuando se une un antagonista de progestinas al RP-B, pero no al RP-A, la isoforma B puede ser convertida en un factor

de transcripción activo para vías metabólicas de modulación de fosforilación intracelular (Sartorius CA et al., 1994).

AF-1 puede funcionar independientemente de AF-2 en una manera constitutiva e independiente de ligando, o puede sinergizar con AF-2 en una manera dependiente de ligando. Ha sido propuesto que la sinergia funcional puede ser mediada por una asociación intramolecular entre amino y carboxilo terminal facilitada por coactivadores p160. Sin embargo, AF-1 tiene una fuerte actividad independiente de AF-2 y coactivadores p160, sugiriendo que existen diferentes coactivadores para AF-1. Se requiere un AF-1 intacto para la actividad agonista de antagonistas de P_4 . Además, se desconocen los coactivadores responsables de mediar la potente actividad independiente de AF-1 y la actividad agonista parcial de antagonistas. Para el caso del RP existe otro dominio de activación de la transcripción conocido como AF-3 y está presente en la isoforma de la proteína conocida como RP-B. Este dominio de aproximadamente 164 aminoácidos está en el extremo del amino terminal de la isoforma (Edwards DP et al., 2003; Molenda-Figueira HA et al., 2006).

En un modelo de ratones con anulación de la expresión de la proteína RP-A se observó una deficiencia en la implantación y se asoció con la pérdida de expresión de una serie de genes relacionados con la receptividad y que son regulados por P_4 . Además, en este mismo modelo se observó que la actividad de proliferación de epitelio uterino regulada por P_4 es mediada a través del RP-B (Mulac-Jericevic B et al., 2000).

Es poco lo que se conoce de las funciones que individualmente ejercen las dos isoformas del RP en tejidos blanco de la P_4 . *In vitro*, los dos receptores presentan diferencias marcadas en efectos transcripcionales sobre promotores que responden a P_4 (Sartorius CA et al., 1994). *In vivo*, las dos isoformas del RP son usualmente coexpresadas en células normales, los índices o coeficientes varían en diferentes tejidos, estados fisiológicos y en enfermedades. Por ejemplo, en primates tratados con estrógenos, el hipotálamo expresa un exceso de RP-B, pero la hipófisis expresa un exceso de RP-A (Bethea CL y Widmann AA, 1998). En endometrio humano los niveles

y coeficiente de RP-A y RP-B varían extensivamente durante el ciclo menstrual, y la sobreexpresión de RP-B está asociada con elevada presencia de formas malignas de cáncer endometrial, cervical y ovárico (Fujimoto J et al., 1997).

1.4.3. Activación del RP independiente de su ligando.

Existen datos que sugieren que la activación independiente de P_4 de RP en tejido nervioso, bajo condiciones farmacológicas y no farmacológicas, influyen en la conducta reproductiva de la rata hembra (Blaustein JD, 2003). La reacción de lordosis de la rata se expresa por estimulación de receptores somatosensoriales en la piel de los flancos, grupa posterior y el perineo (Kow LM y Pfaff DW, 1976). La estimulación del cérvix y la vagina durante la cópula también tiene efectos sobre la reacción de lordosis, una hiperextensión del dorso de la hembra es más marcada y se prolonga si el macho logra la intromisión (Diakow C, 1975). Además, se ha mostrado un efecto prolongado de conducta de receptividad derivado de la reacción a la estimulación de piel después de la estimulación vaginocervical (VCS) (Rodríguez-Sierra JF et al., 1975).

El estímulo de apareamiento parece influir en la conducta reproductiva a través de la activación independiente de ligando del RP. El apareamiento repetido de ratas hembras tratadas con E_2 , OVX/adrenalectomizadas (ADX) incrementa los niveles de lordosis y puede prolongarla hasta en 2 horas, este incremento puede ser bloqueado por la administración previa de antagonistas de RP, tales como RU486 o ZK98299 (Auger AP et al., 1997). Una infusión intracerebral de agonista del receptor a dopamina D_1 incrementa la lordosis en ratas tratadas con E_2 , y su conducta de receptividad puede ser bloqueada por una administración previa de oligonucleótidos antisentido a RP o antagonistas de P_4 (Mani SK et al., 1994).

El VCS es un componente del apareamiento que incrementa la lordosis. El VCS incrementa la expresión de Fos en muchas áreas del cerebro de la rata y un tratamiento previo con antagonistas a P_4 bloquea este incremento en áreas que expresan altos niveles de RP, tales como área preóptica medial y ventromedial

hipotalámica (Blaustein JD y Greco B, 2002; Auger AP et al., 1996). Estos datos sugieren una vía metabólica en la cual el estímulo de apareamiento puede influir en la conducta sexual o en la expresión de genes por activación de RP en la ausencia de P₄ circulante. Por ello, el incremento en la lordosis o la expresión temprana de genes exhibidos por ratas hembras OVX/ADX tratadas con E₂, en respuesta al estímulo de apareamiento, pueden ser eliminados por administración previa de antagonistas a P₄ aún en ausencia de P₄ circulante.

1.4.4. Regulación de isoformas del RP en el cerebro.

La producción de las dos isoformas de RP a partir de un mismo gen es una característica muy conservada en un gran número de vertebrados y los coeficientes o índices de relación de las isoformas varía en tejidos reproductivos como una consecuencia del desarrollo, estatus hormonal y durante la carcinogénesis (Shyamala G et al., 1990; Duffy DM et al., 1997; Graham JD et al., 1996).

Se han hecho trabajos de investigación observando la expresión de las isoformas del RP en diferentes partes del cerebro por diversas técnicas. En modelos de ratas OVX se han encontrado diferencias en la regulación de la expresión de las isoformas en distintas regiones del cerebro. En hipotálamo, a nivel de ARNm, se observó que el E₂ incrementaba la expresión de ambas isoformas y que la P₄ la disminuía, en cambio, en área preóptica solo la isoforma B presentó este patrón. En hipocampo, la isoforma A incrementó su expresión con E₂ pero la P₄ no tuvo efecto en ninguna de las dos isoformas (Camacho-Arroyo I et al., 1998).

A nivel de proteína, la expresión de las isoformas del RP en el cerebro presenta el mismo patrón que el ARNm en las regiones de hipotálamo, área preóptica e hipocampo en ratas OVX. En corteza frontal no se observa modificación de la expresión de la proteína de RP por E₂ y P₄ (Guerra-Araiza C et al., 2003).

La expresión de las isoformas de RP en el cerebro presenta diferencias durante el desarrollo. En el mesencéfalo de ratones hembras y machos se reportó una mayor

expresión de la isoforma B durante el desarrollo embrionario y vida postnatal temprana. Durante estas mismas etapas en hipotálamo, área preóptica y corteza cerebral de rata hembra también se presentó este patrón de expresión. Interesantemente, después de la primera semana postnatal la expresión de la isoforma A es mayor y se mantiene hasta la madurez sexual (Camacho-Arroyo I, 2003).

En modelos de ratas hembras adultas intactas el patrón de expresión de isoformas de RP en diferentes regiones del cerebro a nivel de ARNm cambia durante el ciclo estral. La isoforma B se expresa más que la isoforma A a lo largo del ciclo en hipotálamo, área preóptica y corteza cerebral frontal, mientras que en hipocampo no existen diferencias significativas entre ambas isoformas. Las expresiones máximas de cada una de las isoformas se presentan en diferentes etapas del ciclo. Para la isoforma B en el hipotálamo, la expresión máxima es en el proestro; en área preóptica en el metaestro y en corteza cerebral frontal en el diestro. En el hipocampo no se observan máximos (Guerra-Araiza C et al., 2003; Guerra-Araiza C et al., 2000).

A nivel de proteína, la expresión de las isoformas presenta diferencias con respecto a lo reportado en ARNm. No existe una isoforma que se exprese más que la otra a lo largo del ciclo estral en hipotálamo, área preóptica, corteza cerebral frontal e hipocampo. En hipotálamo, la expresión de la isoforma A presenta una disminución significativa en el diestro; en corteza cerebral frontal la isoforma B presenta una disminución en la expresión en el estro. Estos datos sugieren una regulación en la expresión de las isoformas a nivel de la traducción de proteína, existiendo en el ambiente fisiológico muchos más factores para la regulación que E_2 y P_4 (Camacho-Arroyo I, 2003).

2. Planteamiento del problema.

En roedores, la aparición de la conducta sexual durante el ciclo estral depende del efecto de E_2 y P_4 , hormonas que son producidas y secretadas principalmente por el ovario. La ovulación se observa en la rata durante la transición proestro-estro del ciclo estral. Las hormonas esteroides ejercen sus efectos fisiológicos a través de sus receptores intracelulares y éstos se expresan en diversos tejidos. El hipotálamo es una estructura del SNC involucrada en el control de la conducta reproductiva y sus núcleos neuronales son sensibles a los cambios de concentraciones séricas del E_2 y P_4 . Existen, además, datos de estimulación a través de receptores somatosensoriales en la piel de los flancos, grupa posterior y el perineo que modifican la conducta sexual en roedores, involucrando una activación independiente de ligando del RP. Por tal razón es relevante estudiar el patrón de expresión de las isoformas del RP en el hipotálamo durante las etapas del proestro-estro, que es el periodo en donde se observa la conducta reproductiva de las ratas. El estudio se realizará en ratas apareadas y no apareadas para conocer la participación del coito, como estímulo VCS en la regulación de la expresión de las isoformas del RP. Es importante entender que los organismos biológicos funcionan debido a interacciones moleculares complejas, las proteínas destacan por estar involucradas en múltiples funciones y es en las proteínas en que residen los mecanismos de regulación de vías metabólicas. Este trabajo aspira a contribuir en el entendimiento de proteínas claves como las responsables de efectos fisiológicos concretos. Teniendo como premisa que existen vías metabólicas comunes a muchos modelos biológicos y que se pueden extrapolar los resultados obtenidos, es que se experimenta en modelos biológicos como la rata para poder generar conocimiento que pueda simplificar la experimentación en el humano.

3. Hipótesis.

La concentración plasmática de la P_4 se incrementa en la tarde del proestro del ciclo estral de la rata y correlaciona con un cambio en la conducta reproductiva. Si los efectos en la conducta reproductiva de la P_4 son mediados a través de su receptor, entonces se modificará la expresión de las isoformas del RP en el hipotálamo de la rata durante la transición proestro-estro.

4. Objetivos.

4.1. General.

Estudiar la expresión de las isoformas del RP en hipotálamo durante la transición proestro - estro, en ratas hembras intactas y apareadas.

4.2. Particulares.

Cuantificar la proteína del RP-A y RP-B en el hipotálamo a diferentes horas en la transición del proestro – estro.

Estudiar las diferencias en el patrón de expresión de las isoformas del RP en el hipotálamo de la rata hembra apareada y no apareada durante la transición proestro-estro.

Estudiar en núcleos del hipotálamo, como el VHM, la expresión celular del RP.

Correlacionar concentraciones séricas de E2 y P4 en la transición del proestro – estro, con la expresión de las isoformas del RP en el hipotálamo.

5. Metodología.

5.1. Animales de experimentación.

Se utilizaron 70 ratas hembras de la cepa Wistar de 2 meses de edad y 5 ratas macho de 4 meses de edad (Harlan, México). Las hembras se distribuyeron en 14 cajas, cada una con un máximo de 5 ratas. Los machos quedaron en una caja, separados de las hembras. Los animales estuvieron en un cuarto con ciclo luz:oscuridad de 14:10 y alimentación *ad libitum*.

5.2. Diseño experimental.

Durante 12 días consecutivos se determinó la etapa del ciclo estral en que se encontraba cada rata, mediante frotis vaginal. La muestra se tomó entre las 8:00 y 9:30 h. En este estudio sólo se utilizaron animales que presentaron 3 ciclos estrales consecutivos de 4 días cada ciclo. Antes de realizar eutanasia a los animales se confirmó por frotis vaginal que estuvieran en la etapa de proestro. Los animales se dividieron en dos grupos, uno que se apareó y otro que no lo hizo. Las ratas hembras del grupo de apareamiento estuvieron en la caja con el macho desde las 12:00 h del proestro. La eutanasia fue por decapitación a 5 diferentes tiempos durante la transición proestro-estro, esto es a las 13:00, 17:00, 21:00, 00:00 y 6:00 h. La sangre se recolectó para cuantificación en suero de E_2 y P_4 . Por cada hora de la transición proestro-estro se utilizó un número de 4 animales para *Western blot* y de 3 para inmunohistoquímica.

5.3. Obtención de tejido.

Para el *Western blot* se obtuvo el cerebro y se disecó el área del hipotálamo. Después se colocó en solución amortiguadora de lisis (DTT 1mM, Tris-HCl 10mM, Glicerol 30%, EDTA 1mM, Triton 1%, leupeptina 4 μ g/ml, aprotinina 22.5 μ g/ml, PMSF 1mM, ortovanadato 1mM, azida de sodio 15mM, disuelto en PBS) aproximadamente 1g de tejido por 10 ml de solución y se procedió a macerarlo con politrón. Después se

almacenó a temperatura de -70°C . Se cuantificó la concentración de proteína total de las muestras por el método de Bradford.

Para las pruebas de inmunohistoquímica, una vez obtenido el cerebro, se lavó con PBS para eliminar el exceso de sangre. Inmediatamente se fijaron los cerebros durante 24 a 72 h con solución de PBS con p-formaldehído al 4%. Posteriormente se procedió a la deshidratación del cerebro mediante soluciones de diferentes concentraciones de agua-alcohol y alcohol-xilol para seguir con la inclusión en parafina. Ésto se realizó mediante la colocación de los tejidos en recipientes de metal vertiendo parafina líquida a 60°C y dejando enfriar, para obtener los bloques de parafina en los cuales quedó embebido el tejido. Una vez obtenidos estos bloques se procedió a realizar cortes coronales seriados de $10\ \mu\text{m}$ de grosor de la región hipotalámica media en un micrótopo, colocándolos en portaobjetos distribuidos en series de 4, es decir, los cortes seguidos obtenidos se colocaron en 4 portaobjetos distintos, teniendo tres cortes de cerebro por portaobjetos completándose la serie. Lo anterior puede utilizarse para la identificación de dos o más proteínas localizadas a similar nivel de corte en los diferentes portaobjetos.

5.4. Western blot.

Las proteínas totales obtenidas de la región del hipotálamo ($80\ \mu\text{g}$) se prepararon con solución amortiguadora de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol al 10%, SDS al 2%, β -mercapto etanol al 5%) en una proporción 1:1 en volumen. Se colocaron en baño María durante 5 min. Se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 7.5% a 95 volts durante 2 h. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 20 volts durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por 15 min a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 10% en PBS-Tween (PBS + Tween 20 al 0.2%). Las membranas fueron incubadas durante 2 h a TA, con un anticuerpo primario policlonal de conejo, anti-RP (IgG)(Santa Cruz sc-539) en una dilución de 1:250. Las membranas fueron lavadas con PBS-Tween (PBS+Tween

20 al 0.2%) 3 veces por 5 min; posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo (IgG-HRP)(Santa Cruz sc-2030) conjugado a peroxidasa en una dilución de 1:1000. Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la presencia de las isoformas del RP. En este sistema, el peróxido de luminol y un potenciador son sustrato de la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario y se detecta una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas. Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada pozo, se lavaron las membranas con solución de glicina (glicina 0.1 M SDS 0.5 % pH 2.5) toda la noche a 4°C y 30 min a 37°C para posteriormente incubarlas con un anticuerpo primario anti- α -Tubulina en una dilución 1:10000 (Sigma 104K4800) durante 1 h a TA. Las membranas fueron lavadas con PBS-Tween (PBS+Tween 20 al 0.2%) 3 veces por 5 min; después se incubaron 1/2 h con un anticuerpo secundario anti-ratón (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una dilución 1:15000 (Santa Cruz sc-2005). Se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

5.5. Inmunohistoquímica.

Para la inmunohistoquímica se colocaron los cortes de tejido con parafina en horno a 60°C por 15 min. Inmediatamente se eliminó la parafina con xilol y alcohol: Xilol 5 min, xilol 2 min, xilol-alcohol 2 min, alcohol 100% 2 min, alcohol 96% 2 min, alcohol 90% 2 min, alcohol 70% 2 min, alcohol 50% 2 min, agua destilada 2 min. Se colocaron las laminillas en citrato de sodio 10 mM pH 6.0 y se calentaron en horno de microondas, 5 min (Horno en alta potencia). Se dejó enfriar el citrato de sodio a TA. Se Lavó en PBS, 2 veces por 5 min c/u. Se bloqueó con suero normal de cabra al 5% + PBS por 30 min. Se aplicó el primer anticuerpo por 72 h (policlonal de conejo para RP Santa Cruz Biotechnology dil 1:100) en suero normal de cabra al 5% + PBS a 4°C. Se Lavó con PBS, 2 veces por 5 min c/u. Se incubó con anticuerpo secundario biotinilado (ABC-GO Staining System contra conejo) en suero normal de cabra al 5% en PBS por 2 h a TA. Se Lavó con PBS, 2 veces por 5 min c/u. Se aplicaron soluciones de Avidina y Biotina, dilución 1:50 para cada compuesto en PBS. Se Lavó con PBS, 2 veces por 5 min c/u. Se Incubó con el cromógeno (Glucose Oxidase substrate kit NBT SK-3100 Vector)

preparado minutos antes de ser usado. A 5 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 9.5, se le adicionaron dos gotas de cada uno de los reactivos 1, 2 y 3 del kit y se mezcló. Se incubó a TA y protegido de la luz hasta observar tinción, generalmente alrededor de 10 min. Se lavó con agua. Se deshidrató, a través de alcohol 50% 2 min, alcohol 70% 2 min, alcohol 90% 2 min, alcohol 95% 2 min, alcohol 100% 2 min, xilol-alcohol 2 min, xilol 2 min, xilol 5 min. Se agregó resina Clarion y se cubrió con cubreobjetos.

5.6. Radioinmunoensayo.

La cuantificación de E₂ y P₄ en el plasma de las ratas se realizó con kit de radioinmunoanálisis (RIA) marca DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles CA, USA). La sensibilidad del ensayo fue de 5.4 pg/ml para el E₂ y de 8.3 ng/ml para la P₄. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron de 5.3 ± 8% y 6.5 ± 10% respectivamente.

5.7. Análisis.

Para la inmunohistoquímica se observaron los cortes en el microscopio óptico con objetivo 10X para determinar el área de interés, el cual fue hipotálamo medial en el VMH. Se cuantificó la región inmunoreactiva para RP en el área de interés, por medio del analizador de imágenes KS300 (Karl Zeiss). Se analizó el número de células. Este conteo consistió en digitalizar la imagen capturada por el microscopio y en la computadora se procedió a la selección de células inmunoreactivas para RP (RP-ir) delimitándose un área cuyo radio fue de 545µm que incluye la mayor parte de células del VMH. Se procuró que las zonas seleccionadas fueran las mismas para cada corte analizado. Una vez hecho esto se transformó la imagen a un fondo negro y las células RP-ir en blanco sirvieron para contabilizar.

Una vez que se obtuvieron los datos se procedió a realizar un análisis estadístico que consistió en determinar el número estimado de células contadas para evitar dobles conteos, para esto se utilizó el método de Abercrombie (Abercrombie M, 1946), que se basa en la siguiente fórmula:

$(a/(a+b))(c) = \# \text{ células}$

donde:

a, es el grosor del corte.

b, es el promedio del diámetro de las células contadas.

c, es el promedio del # de células contadas por el programa de computadora en cada corte de la laminilla de una sola rata. El número obtenido por el conteo de computadora se multiplica por 4, ya que los cortes se hicieron en series de cuatro.

Una vez obtenido el número real de células de cada rata se realizó un promedio de aquellas inmunoreactivas para RP en VMH en los diferentes puntos seleccionados de la transición proestro-estro del ciclo estral. Con estos datos se realizó un histograma y se analizaron estadísticamente los grupos estudiados con la prueba "t student" no pareada de doble cola con un nivel de significancia del 0.05.

Para el *Western blot* las placas radiográficas con las bandas de expresión de las proteínas se capturaron digitalmente y la imagen obtenida se analizó con el programa Kodak ID 3.6 asignándole un valor numérico en pixeles y después se calculó el coeficiente de la expresión de las isoformas del RP sobre la expresión de la tubulina (isoforma RP/Tubulina). Con estos datos se realizó un histograma y se analizaron los diferentes grupos con la prueba "t student" no pareada de doble cola con un nivel de significancia del 0.05.

6. Resultados.

Se cuantificaron las concentraciones séricas de E₂ y P₄ en ratas no apareadas a las horas de la transición proestro-estro seleccionados con el objeto de corroborar con datos ya reportados y confirmar la etapa del ciclo estral de interés. Los resultados muestran que el E₂ tiene su máximo a las 13:00 h existiendo diferencias significativas con respecto a las 21:00, 00:00 y 7:00 h; después descienden a valores basales para la mañana del estro, mientras que para la P₄ sus valores al inicio son ascendentes observándose un nivel máximo a las 21:00 h que tiene diferencias significativas con respecto a 13:00, 17:00 y 7:00 h (Tabla1), con un posterior descenso de los valores para la mañana del estro.

| Concentraciones séricas de P₄ y E₂ a diferentes horas de la transición proestro-estro en ratas no apareadas. | | |
|---|------------------------------|------------------------------|
| HORA | P₄ (ng/ml) | E₂ (pg/ml) |
| 13:00 | 4.38 ± 0.34 * | 74.56 ± 10.13 |
| 17:00 | 8.07 ± 1.51 ** | 68.06 ± 13.11 |
| 21:00 | 42.42 ± 1.07 | 20.39 ± 3.86 + |
| 00:00 | 37.99 ± 1.85 | 10.70 ± 2.41 + |
| 7:00 | 7.01 ± 1.81 ** | 13.40 ± 2.90 + |

Tabla 1. Concentraciones séricas de P₄ y E₂ en ratas no apareadas. Los resultados se expresan en media ± error estandar (n=4, excepto 21:00 donde n=2). * P < 0.05 comparado con 17:00, 21:00, 00:00 y 7:00 P₄. ** P < 0.05 comparado con 21:00 y 00:00 P₄. + P < 0.05 comparado con 13:00 y 17:00 E₂.

Para la identificación de la expresión de isoformas de RP en hipotálamo de rata se utilizó la técnica de *Western blot* (figuras 6 y 9). La expresión de la proteína del RP en el hipotálamo de ratas no apareadas mostró diferencias de regulación en la expresión de sus isoformas. La isoforma A se incrementó durante la transición proestro-estro, mientras que la isoforma B disminuyó. En general, se observó esta tendencia en los diferentes ensayos realizados. Sin embargo, los máximos de expresión de RP-A variaban, siendo en algunos casos a las 21:00 h, mientras que en otros eran a las 00:00 h (figura 6).

Al realizar el análisis de la expresión relativa de las isoformas de RP en hipotálamo de ratas no apareadas se identificaron diferencias significativas ($P < 0.05$), mostrando una tendencia de disminución de la expresión de la isoforma B del RP a lo largo de la transición proestro-estro, con una ligera recuperación a las 00:00 h. Por el contrario, la isoforma A del RP tiende a aumentar su expresión, existiendo diferencias significativas entre las dos isoformas a partir de las 21:00 h, en la cual la isoforma A predomina sobre la isoforma B y esto se mantiene en el resto de la transición proestro-estro (figura 7).

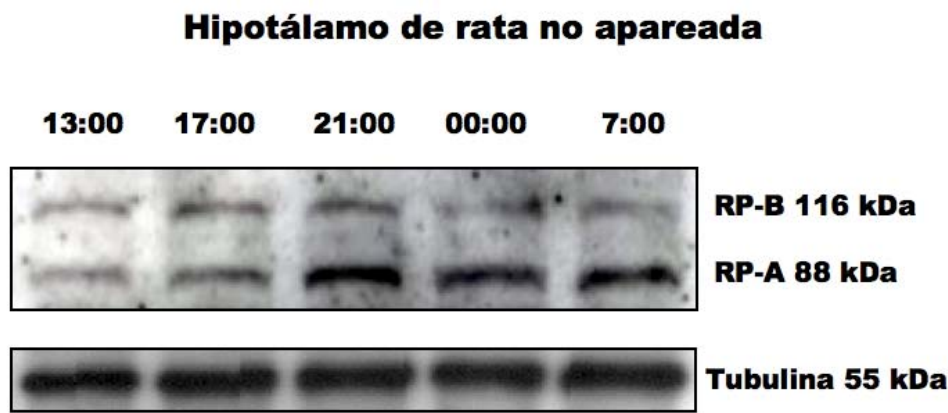


Figura 6. Imagen representativa de un *Western blot* de hipotálamo de rata no apareada. Se muestra la expresión de las isoformas del RP en diferentes horas de la transición Proestro-Estro. La α -Tubulina se utilizó como control de carga de proteína total.

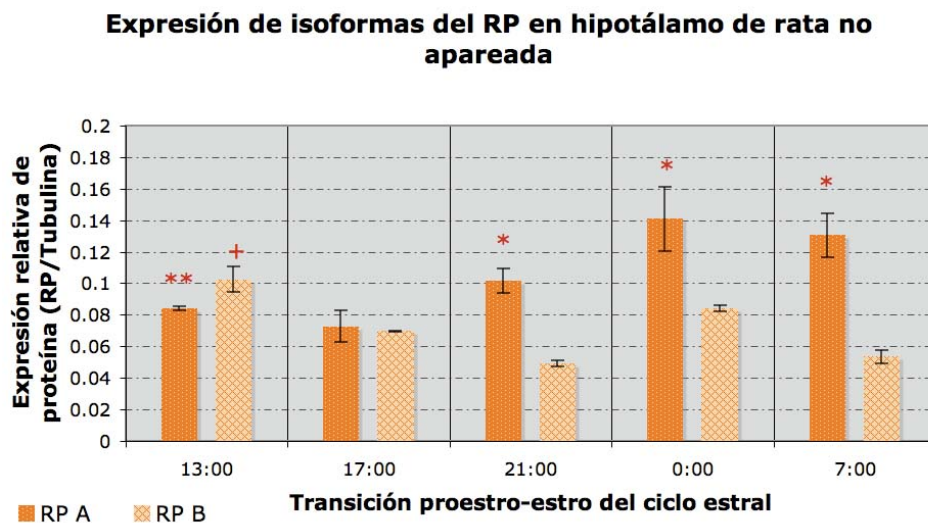


Figura 7. Gráfica de la expresión relativa de isoformas de RP en hipotálamo de rata no apareada. Los resultados se expresan en media \pm error estándar ($n = 4$), * $P < 0.05$ comparado con RP-B a la misma hora. ** $P < 0.05$ comparado con 00:00 y 7:00 h de RP-A. + $P < 0.05$ comparado con 21:00 y 7:00 h de RP-B.

En las concentraciones séricas a las diferentes horas de la transición proestro-estro de ratas apareadas se obtuvo un máximo de P₄ a las 21:00 h aunque a las 17:00 h ya se observa un incremento en la concentración, mostrando diferencias significativas con respecto a las 13:00 y 7:00 h. Por otro lado, las concentraciones séricas más altas de E₂ se observan a las 13:00, 17:00 y 21:00 h con una posterior caída de los valores a las siguientes horas teniendo diferencias significativas con respecto a las 7:00 h (Tabla 2).

Concentraciones séricas de P₄ y E₂ a diferentes horas de la transición proestro-estro en ratas apareadas.

| HORA | P ₄ (ng/ml) | E ₂ (pg/ml) |
|-------|------------------------|------------------------|
| 13:00 | 9.57 ± 2.55 * | 47.43 ± 13.40 |
| 17:00 | 32.02 ± 4.54 | 66.90 ± 10.32 |
| 21:00 | 63.51 ± 4.98 | 48.24 ± 10.22 |
| 00:00 | 42.48 ± 3.62 | 27.07 ± 8.10 |
| 7:00 | 5.5 ± 1.36 * | 23.30 ± 4.49 + |

Tabla 2. Concentraciones sericas de P₄ y E₂ en ratas apareadas. Los resultados se expresan en media ± error estandar (n=4). * P < 0.05 comparado con 17:00, 21:00 y 00:00 P₄. + P < 0.05 comparado con 13:00, 17:00 y 21:00 E₂.

Se compararon los valores de concentraciones séricas de E₂ y P₄ de ratas apareadas y no apareadas. El patrón es semejante en ambos grupos encontrándose diferencias significativas (P<0.05) a las 21:00 h en los valores de E₂ y a las 17:00 y 21:00 h en los de P₄ (figura 8).

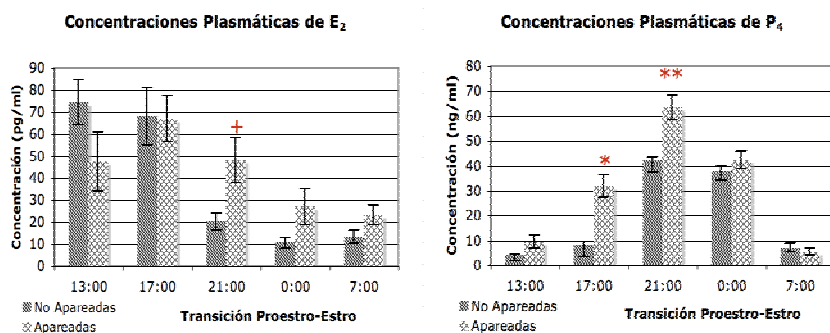


Figura 8. Gráfica de concentraciones plasmáticas de E₂ y P₄. Los resultados se expresan en media ± error estándar (n = 4), + P < 0.05 comparado con 21:00 h de E₂ no apareadas. * P < 0.05 comparado con 17:00 h de no apareadas. ** P < 0.05 comparado con 21:00 h de P₄ no apareadas.

En ratas apareadas no se encontraron cambios significativos para la isoforma A del RP en hipotálamo a lo largo de los puntos estudiados de la transición proestro-estro. Por el contrario, la isoforma B tiende a disminuir a lo largo de la transición habiendo cambios significativos a las 21:00 h con respecto a las 13:00 y 17:00 h, siendo las 7:00 h el punto que presenta menor expresión relativa. La expresión relativa de la isoforma B es menor y muestra diferencias significativas con respecto a la isoforma A a partir de las 21:00 h (figura 10). La expresión relativa no rebasó más de 0.12, salvo en ratas no apareadas en la isoforma A a las 0:00 h y 7:00 h (figura 7).

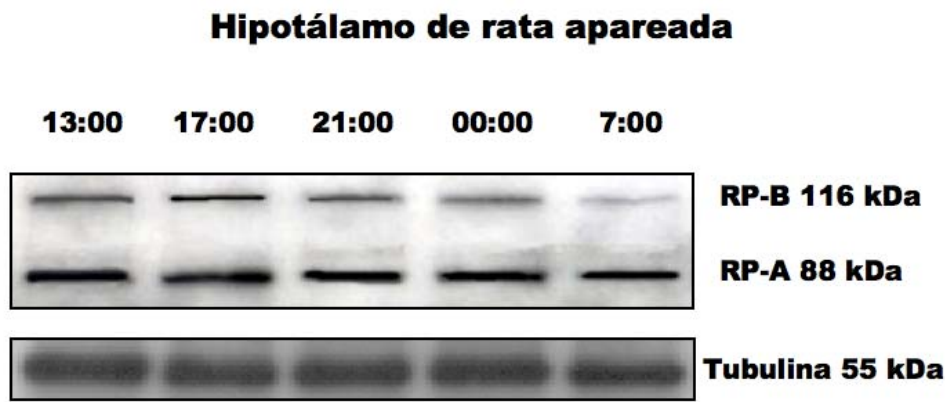


Figura 9. Imagen representativa de un *Western blot* de hipotálamo de rata apareada. Se muestra la expresión de las isoformas del RP en diferentes horas de la transición Proestro-Estro. La α -Tubulina se utilizó como control de carga de proteína total.

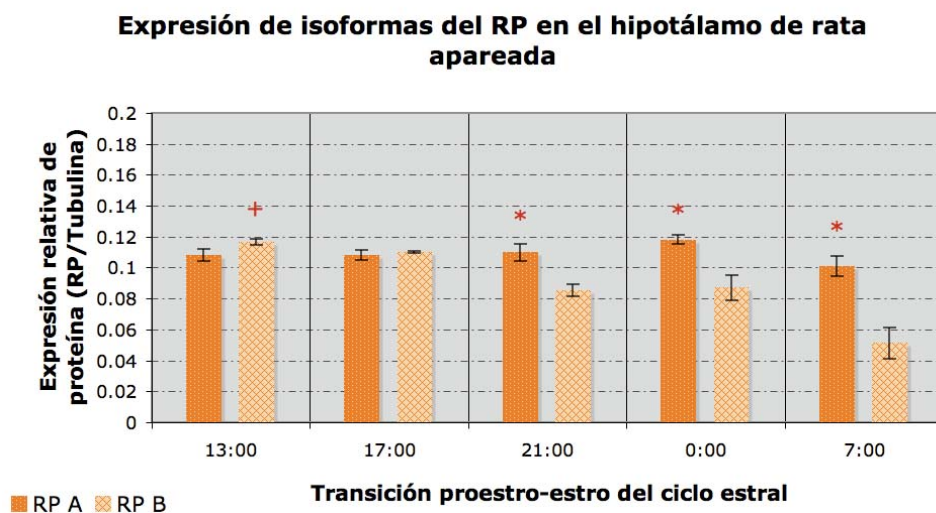


Figura 10. Gráfica de la expresión relativa de isoformas de RP en hipotálamo de rata apareada. Los resultados se expresan en media \pm error estándar ($n = 4$), * $P < 0.05$ comparado con RP-B a la misma hora. + $P < 0.05$ comparado con 21:00, 00:00 y 7:00 h de RP-B.

El núcleo VMH es señalado como un importante regulador de la conducta reproductiva. En este estudio se observó la expresión de RP total por la técnica de inmunohistoquímica y se puede apreciar una disminución en la cantidad de proteína a lo largo de la transición del proestro-estro. En cuanto a la comparación entre los grupos de ratas apareadas y no apareadas se aprecia un cambio significativo en la expresión a las 21:00 h, siendo menor la cantidad de RP en las ratas apareadas a esta hora y sigue la tendencia a disminuir (figura 12).

La expresión de la proteína del RP en VMH de cerebro de rata en las horas seleccionadas para el estudio de la transición proestro-estro del ciclo estral mostró diferencias significativas de ratas apareadas y no apareadas. En ambas isoformas la expresión tiende a disminuir durante la transición proestro-estro, teniendo que a las 7:00 h ambos grupos presentaron similar expresión de RP, menor a 50 células, cuando a las 13:00 h había más de 120 células (figura 11). Además, se observó que a horas más avanzadas de la transición, las células RP-ir se distribuyeron en la periferia del VMH y su intensidad en la expresión de la proteína fue menor (figura 12). A las 17:00 h, el grupo de las ratas no apareadas tuvo un nivel máximo de expresión y presentó diferencia significativa con respecto al grupo de ratas apareadas, a la misma hora.

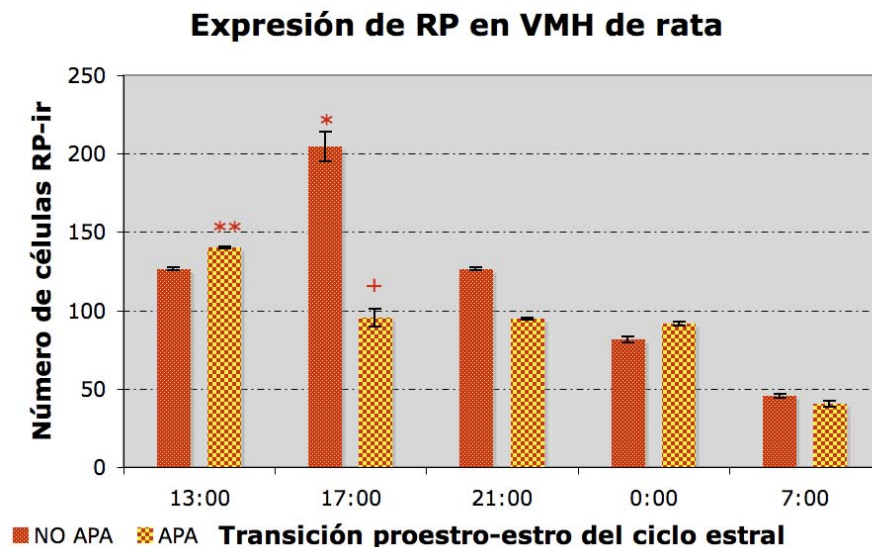


Figura 11. Gráfica del número de células inmunoreactivas para RP en hipotálamo de rata. Los resultados se expresan en media \pm error estándar ($n = 3$), * $P < 0.05$ comparado con 13:00, 21:00, 0:00 y 7:00 NO APA. ** $P < 0.05$ comparado con 17:00, 21:00, 0:00 y 7:00 APA. + $P < 0.05$ comparado con 17:00 y 21:00 NO APA.

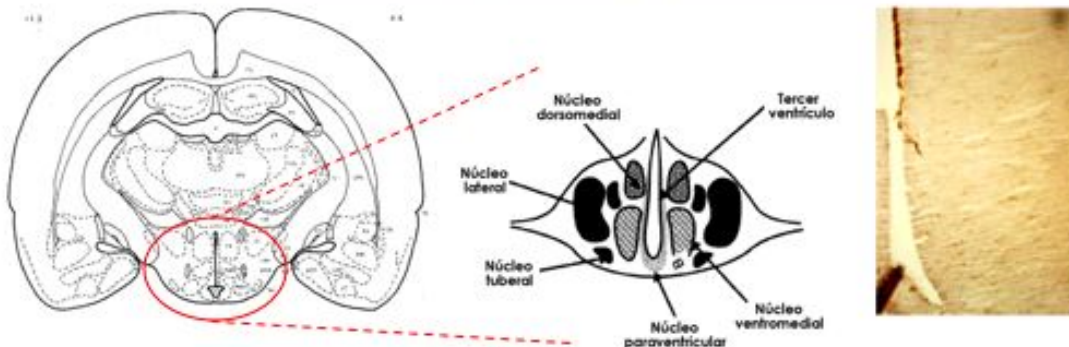
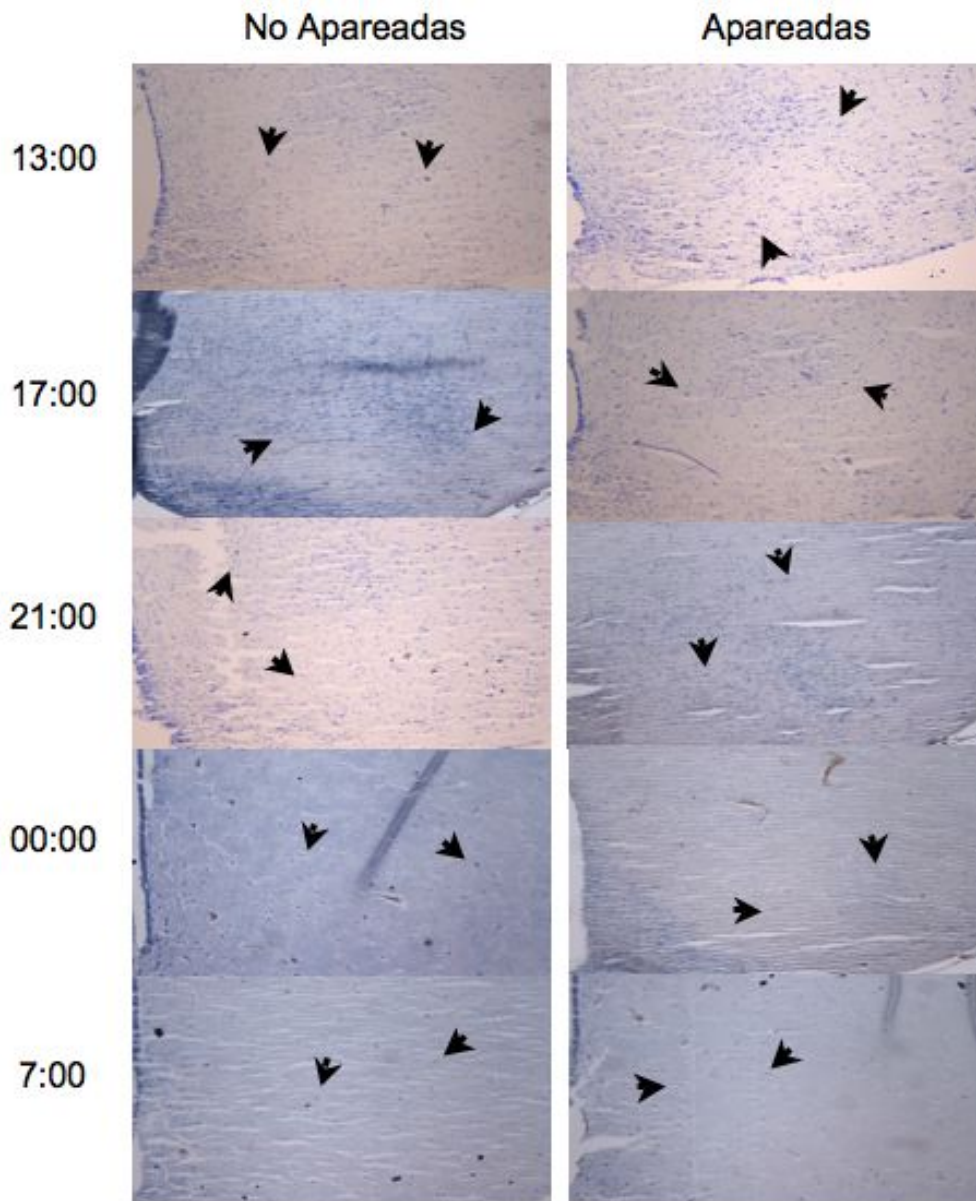


Figura 12. Composición de imágenes representativas de inmunohistoquímica de RP en VMH de cerebro de rata apareada y no apareada durante la transición proestro-estro. Las imágenes son a un objetivo 10x. Las flechas indican células inmunoreactivas para RP. En la parte baja se observa un esquema de corte coronal de cerebro de rata que muestra la ubicación del núcleo VMH junto con una imagen representativa de control negativo de la técnica.

7. Discusión.

Las hormonas esteroides sexuales pueden ejercer efectos sobre células blanco a través de receptores intracelulares que funcionan como factores de transcripción. Este mecanismo se conoce como clásico o genómico (Wierman ME, 2007). La transcripción en células depende de factores de transcripción. Estos son complejos de proteínas de interacción específica que facilitarán o reprimirán la expresión de un gen (Mani SK, 2006; Wu RC et al., 2005). Con lo anterior se entiende la complejidad que representa el estudio de la regulación de la expresión de proteínas para el funcionamiento de la célula. Así tenemos que en el caso del RP, aún conociéndose posibles genes blanco por la identificación de sus elementos de respuesta a P_4 (ERP), es importante conocer las isoformas del RP que predominan en una célula para entender un aumento o una disminución en la expresión del gen cuyo promotor presenta ERP. Las isoformas de RP están sujetas a ejercer su acción fisiológica dependiendo de la disponibilidad en una célula, ya que tienen diferente afinidad a ciertos coactivadores o correpresores (Matthews J y Gustafsson JA, 2003).

En este trabajo se observa que la alteración en la expresión de las isoformas del RP durante la transición del proestro-estro de ratas apareadas y no apareadas da evidencia de la participación de estas proteínas en el cambio de conducta reproductiva observado. Anteriormente se había reportado la diferente función que presentan las isoformas del RP en la conducta, ésto en ratones knock out, en donde se le asigna a la isoforma A del RP un papel primordial para la aparición de la conducta de lordosis, mientras que la isoforma B del RP se le asocia más con conducta proceptiva (Mani SK et al., 2006).

El incremento y la disminución en la expresión de la isoforma A y de la isoforma B, respectivamente, durante la transición del proestro-estro del ciclo estral de ratas no apareadas correlaciona con la aparición de conducta reproductiva. La misma correlación se aprecia en el grupo de ratas apareadas sólo que en este grupo la isoforma A del RP no presenta un cambio significativo en la expresión a lo largo de la transición, pudiendo especularse que la isoforma A del RP estaría involucrada en

cambios de conducta generados por la presencia de la variable, que es el estímulo VCS generado por el macho en el apareamiento.

Es interesante que la isoforma B del RP es la proteína que presenta una disminución en la expresión a lo largo de la transición en ambos grupos, apareadas y no apareadas. Ésto se puede explicar por una activación de la proteína y consecuente degradación (Lange CA et al., 2000; Camacho-Arroyo I et al., 2002; Gonzalez-Flores O et al., 2004), lo que estaría indicando que la regulación de la expresión y funciones del RP-B no se alteran por el apareamiento, pero podría estar involucrada en cambios de conducta pues correlaciona la disminución en el contenido de RP-B con la aparición de un cambio en la conducta. Además existen estudios en los cuales a la isoforma B se le ha asignado una función primordial en la conducta de proceptividad (Mani SK et al. 2006). Ésta parte de la conducta obedecería a ciclos reproductivos generados por incremento en los niveles plasmáticos de hormonas esteroides sexuales cuyos efectos estarían mediados por la isoforma B del RP.

Ahora bien, existen efectos fisiológicos mediados por RP que son independientes de la activación por la P_4 . Estos efectos se han reportado en vías metabólicas que involucran la aparición de la conducta de lordosis: estos experimentos reportan una activación de la conducta reproductiva independiente de la P_4 al administrar agonistas de dopamina (Mani SK et al. 1994). Hay estudios que han asociado la activación de la conducta reproductiva independiente de ligando con vías metabólicas aferentes derivadas del estímulo de apareamiento (Rajendren G et al., 1990; Auger AP et al., 1997).

En el apareamiento se observa que la isoforma A se mantiene constante a lo largo de la transición proestro-estro, contrario a lo que sucede en las ratas no apareadas en donde la expresión de la proteína se ve incrementada a lo largo de la transición proestro-estro. Posiblemente la isoforma A en ratas apareadas se está activando y como consecuencia se degrada (Camacho-Arroyo I et al. 2002) no pudiendo acumularse comparado con las ratas no apareadas, es decir que en las ratas apareadas el estímulo VCS está utilizando esta isoforma del RP para mediar la conducta receptiva de la rata. Estos resultados se pueden apoyar en los obtenidos en

ratones Knock Out de la isoforma A del RP en donde se ve disminuida la conducta receptiva asociada a una activación independiente de ligando del RP (Mani SK et al. 2006).

Este trabajo ayuda a esclarecer las diferentes funciones que tienen las isoformas del RP. Si se considera que la estructura química de las isoformas es diferente, esto implica una interacción variada con cofactores y por consecuencia un efecto fisiológico distinto. Los estudios de regulación de isoformas del RP son hechos en su mayoría en modelos farmacológicos y muy pocos en condiciones fisiológicas in vivo. El presente trabajo muestra la influencia que tiene la variable de apareamiento en la regulación de la expresión de las isoformas del RP comparado con ratas no apareadas, en un ambiente complejo y de múltiples interacciones como es el de un organismo en condiciones fisiológicas.

En los resultados de inmunohistoquímica se puede apreciar que el núcleo VMH presenta una disminución de la expresión de la proteína de RP total a lo largo de la transición proestro-estro del ciclo estral de la rata. Este resultado confirma los reportes previos en donde se observaba por un lado la expresión del RP de este núcleo que es clave en la regulación de la conducta reproductiva; y por el otro la regulación de expresión a la baja del RP por P_4 (Flanagan-Cato LM et al., 2006; Camacho-Arroyo I, 2003).

La disminución de la expresión de la proteína de RP correlaciona con la aparición de la conducta reproductiva, sólo hay cambios significativos a las 17:00 y a las 21:00 h entre los dos grupos de ratas, nuevamente esto se puede explicar por una activación del RP y una consecuente degradación (Camacho-Arroyo I et al. 2002).

A las 17:00 h del proestro se reporta el máximo nivel de concentración sérica de P_4 . La expresión de RP en los grupos de ratas apareadas y no apareadas disminuye a lo largo de la transición proestro-estro igualándose a las 7:00 h del estro, pero existen diferencias significativas a las 17:00 y 21:00 h entre los dos grupos, siendo mayor la expresión de la proteína de RP en el grupo de ratas no apareadas. Las ratas

apareadas fueron receptivas con el macho sólo hasta las 19:00 h aproximadamente, el macho estuvo en la misma caja con las hembras desde las 12:00 h del proestro. Los datos anteriores indican que el apareamiento involucraría otras variables a parte del estímulo VCS, que estaría regulando la expresión de RP de manera diferente en el VMH en ratas apareadas y no apareadas.

Es necesario observar la expresión de las isoformas del RP en el VMH, ya que si se observara que la isoforma A disminuyera a las 17:00 h en ratas apareadas debido a una activación y subsiguiente degradación, se confirmaría que esta isoforma es la utilizada en vías metabólicas de activación independiente de ligando del RP que se asocia a estímulos externos como el estímulo VCS.

Por último, tenemos las concentraciones séricas de E_2 y P_4 de las ratas a las 13:00, 17:00, 21:00, 00:00 y 7:00 h de la transición proestro-estro del ciclo estral en apareadas y no apareadas. Como se puede ver los datos se apegan a lo publicado donde se reporta que los niveles de concentración plasmática de E_2 alcanzan los niveles más altos en la mañana del proestro y llegan a niveles basales en la mañana del estro. En el caso de la P_4 su nivel máximo de concentración plasmática lo alcanza en la tarde del proestro y llega a niveles basales en la mañana del estro. Con esto se confirma que las ratas estudiadas presentan el patrón reportado previamente de concentraciones séricas de P_4 y E_2 correspondientes a la transición proestro-estro de ratas intactas.

8. Conclusiones.

Se observó una expresión diferencial de las isoformas RP-A y RP-B durante la transición del proestro-estro.

En el hipotálamo de las ratas no apareadas la expresión de la isoforma A es mayor que la de la B a partir de las 21:00 hrs de la transición proestro-estro.

La isoforma B del RP tiende a disminuir, mientras que la isoforma A tiende a aumentar en los tiempos estudiados durante la transición proestro-estro en ratas no apareadas.

En ratas apareadas no hay un cambio significativo en la isoforma A del RP. La isoforma B tiende a presentar una disminución en la cantidad de proteína a lo largo de los puntos estudiados, siendo significativa a partir de las 21:00 hrs.

En núcleo ventromedial de hipotálamo presenta diferencias en la cantidad del RP total a lo largo de la transición proestro-estro, con tendencia a disminuir.

9. Referencias.

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

Auger AP, Moffatt CA y Blaustein JD (1996). Reproductively-relevant stimuli induce Fos-immunoreactivity within progestin receptor-containing neurons in localized regions of female rat forebrain. *J Neuroendocrinol*, 8:831-838.

Auger AP, Moffatt CA y Blaustein JD (1997). Progesterone-independent activation of rat brain progestin receptors by reproductive stimuli. *Endocrinology*, 138:511-514.

Bagchi MK, Tsai SY, Tsai MJ y O'Malley BW (1992). Ligand and DNA-dependent phosphorylation of human progesterone in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2664–2668.

Beato M, Herrlich P y Schutz G (1995). Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell*, 83:851-857.

Bethea CL y Widmann AA (1998). Differential expression of progestin receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques. *Endocrinology*, 139:677-687.

Blaustein JD y Olster DH (1989). Gonadal steroid hormone receptors and social behaviors. In (Balthazart, J., Ed.). *Advances in comparative and environmental physiology*, pp. 31-104. Berlin, Springer-Verlag.

Blaustein JD y Greco B (2002). A progestin antagonist blocks vaginocervical stimulation-induced Fos expression in neurons containing progestin receptors in the rostral medial preoptic area. *J Neuroendocrinol*, 14:109-115.

Blaustein JD (2003). Progesterone Receptors: neuronal integrators of hormonal and environmental stimulation. *Ann NY Acad Sci*, 1007:238-250.

Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C y Cerbón MA (1998). Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport*, 9:3993-3996.

Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A y Guerra-Araiza C (2002). Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentration in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 76:267-271.

Camacho-Arroyo I (2003). Progesterone receptor isoforms expression and progesterone actions in the brain. *Recent Res Devel Life Sci*, 1:221-242.

Canteras NS, Simerly RB y Swanson LW (1994). Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. A PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol*, 348:41-79.

Diakow C (1975). Motion picture analysis of rat mating behavior. *J Comp Physiol Psychol*, 88:704-712.

Duffy DM, Wells TR, Haluska GJ y Stouffer RL (1997). The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod*, 57:693-699.

Edwards DA y Pfeifle JK (1983). Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. *Physiology & behavior*, 30:437-443.

Edwards DP, Wardell SE y Boonyaratankornkit V (2003). Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. *J. Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1795:1-14.

Erskine MS (1989). Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. *Hormones and behavior*, 23:473-502.

Evans RM (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240:889-95.

Fahrbach SE, Morrell JI y Pfaff DW (1989). Studies of ventromedial hypothalamic afferents in the rat using three methods of HRP application. *Exp Brain Res*, 77:221-233.

Flanagan-Cato LM, Lee BJ y Calizo LH (2006). Co-localization of midbrain projections, progesterin receptors, and mating-induced fos in the hypothalamic ventromedial nucleus of the female rat. *Horm Behav*, 50:52-60.

Freeman ME (1988). The ovarian cycle of the rat. En *The Physiology of Reproduction*, (E Knobil y J Neill, ed) pp 1893, Raven Press, Ltd, New York.

Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H y Tamaya T (1997). Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B ARNms in secondary spreading of gynecologic cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 62:449-454.

Geeraedts LMG, Nieuwenhuys R y Veening JG (1990). Medial forebrain bundle of the rat. IV. Cytoarchitecture of the caudal (lateral hypothalamic) part of the medial forebrain bundle bed nucleus. *J Comp Neurol*, 294:537-568.

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

González-Flores O, Guerra-Araiza C, Cerbón M, Camacho-Arroyo I y Etgen AM (2004). The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats. *Endocrinology*, 145:2328-2336.

Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM y Clarke CL (1996). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 56:93-98.

Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S y Camacho-Arroyo I (2000). Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci*, 66:1743-1752.

Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R y Camacho-Arroyo I (2003). Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol*, 15:984-990.

Hashimoto I, Hendricks DM, Anderson LL y Melampy RM (1968). Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocr*, 82:333-341.

Hashimoto I y Wiest WG (1969). Correlation of the secretion of ovarian steroids with function of a single generation of corpora lutea in the immature rat. *Endocr*, 84: 873-885.

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

Jackson TA, Richer JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L y 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 N-CoR or SMRT. *Mol Endocr*, 11:693-705.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H y Chambon P (1990). Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two

functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO j*, 9:1603-1614.

Klein-Hitpass L, Tsai SY, Weigel NL, Allan GF, Riley D, Rodriguez R, Scharder WT, Tsai MJ y O'Malley BW (1990). The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. *Cell*, 60:247-257.

Kow LM y Pfaff DW (1976). Sensory requirements for the lordosis reflex in female rats. *Brain Res*, 101:47-66.

La Vaque TJ y Rodgers CH (1975). Recovery of mating behavior in the female rat following VMH lesions. *Physiol Behav*, 14:59-63.

Lange CA, Shen T y Horwitz KB (2000). Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *PNAS*, 97:1032-1037.

Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CAJr, Shyamala G, Conneely OM y O'Malley BW (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*, 9:2266-2278.

Mandl AM (1951). The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *J Exp Biol*, 28:576-584.

Mandl AM (1951a). Cyclical changes in the vaginal smear of adult ovariectomized rats. *J Exp Biol*, 28:585-592.

Mani SK (2006). Signaling mechanisms in progesterone-neurotransmitter interactions. *Neuroscience*, 138:773-781.

Mani SK, Blaustein JD, Allen JMC, Law SW, O'Malley BW y Clark JH (1994). Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology*, 135:1409-1414.

Mani SK, Reyna AM, Chen JZ, Mulac-Jericevic B y Conneely OM (2006). Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Mol Endocrinol*, 20:1322-1332.

Matthews J y Gustafsson JA (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*, 3:281-292

Millhouse OE (1973). The organization of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res*, 55:71-87.

Molenda-Figueira HA, Williams CA, Griffin AL, Rutledge EM, Blaustein JD y Tetel, MJ (2006). Nuclear receptor coactivators function in estrogen receptor- and progesterone receptor-dependent aspects of sexual behavior in female rats. *Horm. Behav*, 50:383-392.

Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lidon JP y Conneely OM (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science*, 289:1751-1754.

Nequin LG, Alvarez J y Schwartz NB (1979). Measurement of serum steroid and gonadotropin levels and uterine and ovarian variables throughout 4 day and 5 day estrous cycles in the rat. *Biol Reprod*, 20:659-670.

O'Malley BW (1990). The steroid receptor superfamily: More excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol*, 4:363-369.

Oomura Y, Aou S, Koyama Y, Fujita I y Yoshimatsu H (1988). Central control of sexual behavior. *Brain Res Bull*, 20:863-870.

Ortí E, Bodwell, JE y Munck A (1992). Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocrine reviews*, 13:105-128.

Pleim ET y Barfield RJ (1988). Progesterone versus estrogen facilitation of female sexual behavior by intracranial administration to female rats. *Horm Behav*, 22:150-159.

Rodriguez-Sierra JF, Crowley WR y Komisaruk BR (1975). Vaginal stimulation in rat induces prolonged lordosis responsiveness and sexual receptivity. *J Comp Physiol Psychol*, 89:79-85.

Rajendren G, Dudley CA y Moss RL (1990). Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual receptivity in female rats. *Neuroendocrinology*, 52:368-372.

Sartorius CA, Melville MY, Hovland AR, Tung L, Takimoto GS y 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.

Shyamala G, Schneider W y Schott D (1990). Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology*, 126:2882-2889.

Simerly RB y Swanson LW (1988). Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol*, 270:209-242.

Swanson LW (1986). Organization of mammalian neuroendocrine system. In "Handbook of physiology-The Nervous System," Vol. IV, pp. 317-363. Waverly, Baltimore.

Swanson LW (1992). "Brain Maps: Structure of the Rat Brain." Elsevier, New York.

Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW y Rho JH (1987). The CRH motoneuron: Differential peptide regulation in neurons with possible synaptic, paracrine, and endocrine outputs. *Ann NY Acad Sci*, 512:12-23.

Takimoto GS, Tasset DM, Eppert AC y Horwitz KB (1992). Hormone-induced progesterone-induced progesterone receptor phosphorylation consists of sequential DNA-independent and DNA-dependent stages: Analysis with zinc finger mutants and the progesterone antagonist ZK98299. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:3050–3054.

Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME y McDonnell DP (1994). The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol*, 14:8356-64.

Wierman ME (2007). Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv Physiol Educ*, 31:26-33.

Wu RC, Smith CL y O'Malley BW (2005). Transcriptional regulation by steroid receptor coactivator phosphorylation. *Endocr Rev*, 26:393-399.