



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACION DEL CONTENIDO DE LA TIROSINA
HIDROXILASA Y LA DESCARBOXILASA DEL ACIDO
GLUTAMICO POR LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR A
PROGESTERONA EN EL HIPOTALAMO DE LA RATA
DURANTE EL DESPLIEGUE DE LA CONDUCTA
SEXUAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALFREDO MIRANDA MARTINEZ



TUTOR
DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Miranda
Martínez
Alfredo
5171 3577
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
089241305

2. Datos del tutor

Dr.
Christian Humberto
Guerra
Araiza

3. Datos del sinodal 1

Mtra. en Ciencias
Violeta
Patiño
Conde

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Ana Erika
Rodríguez
Martínez

5. Datos del sinodal 3

Mtra. en Ciencias
Edith Araceli
Cabrera
Muñoz

6. Datos del sinodal 4

Biol.
Octavio Fabián
Mercado
Gómez

7. Datos del trabajo escrito.

Regulación del contenido de la Tirosina Hidroxilasa (TH) y la Descarboxilasa del Acido Glutámico (GAD) por las isoformas del receptor a progesterona en el hipotálamo de la rata durante el despliegue de la conducta sexual.

57 p
2008

Este proyecto de investigación se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) bajo la dirección del Dr. Christian Humberto Guerra Araiza y con el apoyo del CONACyT proyecto 46608-Q.

A ti **mamá**, que fuiste mi puntal,
mi inspiración y mi ejemplo,
a pesar de lo adverso de tus circunstancias.
Eres mi amor más grande.

Papá, fue maravilloso compartir contigo,
ahora entiendo muchas cosas.

Agradecimientos

Valeria Monserrat, llegaste para dar sensaciones desconocidas, te quiero mucho; eres una asignatura por cumplir.

Gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, mi alma mater, mi casa.

También deseo hacer un reconocimiento a los maestros, a todos mis maestros, por que forman parte estructural de algo que está en construcción, de algo que sigue en marcha, de algo que busca trascender más allá de su propio origen.

Dr. Christian Guerra, la grandeza de las personas y de las cosas se basa en los pequeños detalles que las conforman, y ud. está lleno de pequeños detalles. Es una sorpresa descubrirle y un honor trabajar a su lado.

Un agradecimiento especial a mis sinodales, por su amistad, su solidaridad y por aceptar evaluar este trabajo.

Gracias a la gente del Laboratorio de Farmacología, Dra. Morali, mi más profunda admiración. Alejandra, que la vida te llene de bendiciones junto a tu familia. Rodolfo, carpa, espero que te vaya muy bien en lo que emprendas. Abraham, Pedro, Claudia, Sandra, Tomás, Gloria, Gabriela, Adriana, arrieros somos y en el camino andamos.

Gracias a Héctor por las grandes charlas y la insistencia en hacer esto. Beto, tu guía hizo más ameno este recorrido. A la banda de la ramona: Erika, Erika Laura, Melchor, Alejandro, José, Roberto, Arturo, Miriam, Liliana, Pavka y todos los que pasaron por ahí, entre quesadillas, gorditas, sopas maruchan y algunas cervezas, muchas calorías después. Tonatiuh, eres un tipo extraordinario, de grande quiero ser como tú. Octavio, por tu amistad y por las sesiones de basquetbol y cerveza. Jesús y mis limitaciones tecnológicas, gracias por tu ayuda. David Villarreal, ¿donde estabas perejila?, al verte están presentes épocas de mucha vitalidad y alegría, un enorme gusto estar a tu lado. Iván Villa, y lo que empezó en una cancha de frontón, cerca de 20 años después. Bruno, por que estando lejos, reafirmamos afinidades y diferencias; Norma Angélica, Sergio y críos y a toda la familia por *cuasi* adoptarme, estar ahí ha sido un refugio a mis locuras.

María de Jesús Ruiz, por el apoyo, la paciencia, la confianza que me brindas y por ese jalón de orejas cuando me ha hecho falta... ¡ahí madre!

María Isabel y Adriana, gracias por estar ahí, cuando creí que estábamos solos y cuando más lo necesitábamos, pero todos los recorridos llegan a un destino.

Edgar Raúl, no repitamos los errores que separaron a los demás.

A la gente del teatro: Guillermo García, muchas cosas en un espacio reducido, un abrazo enorme. Laura Zamora, que te vaya bien. Fabiola Ramírez, chiquitita, bastante tiempo después. Espiridión, tan ocurrente y locuaz. Sandra Narváez, mucha energía en un envase pequeño, eres muy importante en mi equilibrio. Marco Vieyra, Daniel Vázquez, Julián Martínez, Elizabeth Domínguez, Eduardo Leybón, Dione Luz, muchas veces haciendo equipo, y muchas otras haciendo *amistad*, y... *the show must go on*.

También, echando una vista al pasado, es un honor haber podido coincidir en tiempo y espacio con mucha gente. Y es también un gusto poder agradecerles, por que de todos he tenido, más que una formación académica, enseñanzas de vida que me hacen saber, personalmente, lo que quiero y lo que no quiero ser. Gracias a aquellos con los que he tenido diferencias irreconciliables y grandes distanciamientos, por que así sé que puedo cambiar muchas cosas.

Gela, jefa de jefes, gracias por dedicarme tiempo, por demostrar tu preocupación, por escuchar mis problemas, por tu tiempo para sonreír y mostrarme afecto; sé que puedo contar contigo cuando necesito en quien confiar, cuando necesito ayuda y consejos. Sin ti, esto habría sido más difícil. Gracias por tantas cosas, pero sobre todo por tu amistad incondicional, y ahora en tu actividad más importante no puedes ser menos, besos Amaya.

En este camino largo y lleno de vertientes, hay situaciones en las que tienes que estar **solo** para poder avanzar con cierta premura y también donde es imprescindible ir en compañía para que el recorrido sea menos duro; compartir la vida contigo fué una fortuna y una bendición, aún así, me ha sido incierto hacia donde ir y aún más incierto hasta donde puedo llegar. Y en este andar, la mayor parte de lo que ahora aplico lo sé por que lo aprendí de ti. Me satisface pensar que en poco tiempo se hayan logrado tantas cosas, más las que se quedaron sin completar. Y empezando ahora, me haría falta tiempo para poder agradecer lo que hiciste por mí. Eso es invaluable. Solo resta decirte que en cada página de este trabajo está mi cariño, mi admiración y mi más sincero deseo de que la siguiente vez que nos veamos sea para reírnos de nosotros mismos.

Por que a pesar de que hay un espacio tan grande entre nosotros y nuestros destinos, también hay un horizonte al que van muchos caminos; un argumento, un ensayo, sensaciones sin explicación, solo sentimientos. En el azul del cielo he encontrado tu mundo y el mío, también bajo los rayos de luna que abrigan mucho cariño. Aún en la distancia, siempre estás en mi corazón por lo que representas. Gracias Mónica.

Mamá... te quiero mucho... te quiero un chingo

1. Índice

Agradecimientos	
1. Índice	1
2. Resumen	2
3. Antecedentes	3
3.1 Estructura y función de las hormonas esteroides	3
3.1.1 Generalidades	3
3.1.2 La progesterona	3
3.1.2.1 Acciones generales de la P ₄	5
3.1.2.2 Acciones de la P ₄ en el SNC	6
3.1.2.3 Mecanismos de acción de la P ₄	8
3.2 El receptor a P ₄ (RP)	10
3.2.1 Características del RP	10
3.2.2 Isoformas del RP	13
3.2.3 Regulación de la expresión del RP	15
3.3 Neurotransmisores	17
3.3.1 Principales neurotransmisores	17
3.3.1.1 Serotonina	17
3.3.1.2 Dopamina	18
3.3.1.3 Acido γ -amino-butírico (GABA)	18
3.3.2 Receptores de neurotransmisores	19
3.4 Participación de la P ₄ y sus receptores en la conducta sexual	20
3.4.1 Progesterona y conducta sexual	20
3.4.2 Receptores a progesterona y conducta sexual	21
4. Planteamiento del problema	23
5. Hipótesis	24
6. Objetivos	25
7. Materiales y métodos	26
7.1 Animales	26
7.2 Ovariectomía	26
7.3 Implantación de cánulas de microinyección	26
7.4 Diseño de los oligonucleótidos antisentido (ODNs)	27
7.5 Esquema hormonal	27
7.6 Pruebas de conducta sexual	28
7.7 Obtención de tejido	28
7.8 Extracción y cuantificación de proteínas	29
7.9 Western Blot	29
7.10 Análisis estadístico	30
8. Resultados	31
9. Discusión	34
10. Conclusiones	37
11. Anexo	38
12. Referencias	40

2. Resumen

La actividad copulatoria es la expresión conductual de una función importante en la fisiología reproductiva del organismo, que hace posible la unión de las gametas masculina y femenina de una pareja de individuos de la misma especie y con ello la conservación a través de la trasmisión de las características genéticas a la siguiente generación. Esta, al igual que otras funciones que le preceden durante el desarrollo de los individuos o durante su vida reproductiva, tales como la diferenciación sexual, la pubertad, la esteroidogénesis y gametogénesis, la ovulación, entre otras, y dependen de la interacción precisa de diversos fenómenos neuroendocrinos que dan como resultado el establecimiento de características morfológicas y funcionales particulares en una variedad de estructuras periféricas y neuronales (Moralí 1992).

La progesterona y sus metabolitos poseen un amplio espectro de actividad biológica sobre el sistema nervioso central (SNC) y periférico. La acción de los esteroides a nivel neuronal se lleva a cabo a través de receptores intracelulares específicos y mediante efectos no genómicos al interactuar con receptores membranales desencadenando cascadas de señalización.

Entre los efectos que se producen, está su papel en la reproducción, y además influyen en otros aspectos conductuales por la interacción de las isoformas, las cuales regulan la expresión de diferentes genes cuyos productos modulan distintas funciones como la regulación del desarrollo y el funcionamiento de los tejidos reproductivos, así como la excitabilidad neuronal, la ovulación, el despliegue de la conducta sexual y el sueño en el sistema nervioso central de los mamíferos.

Diversas evidencias experimentales sugieren que la progesterona modula otros sistemas de receptores de membrana tales como el serotoninérgico, el noradrenérgico y el dopaminérgico, junto con el receptor a GABA.

En este trabajo se determinó la regulación de las isoformas A y B, del receptor a progesterona mediante la administración de oligos antisentido en el tercer ventrículo cerebral disminuyendo el contenido de las isoformas en el hipotálamo de ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol y progesterona.

Se buscaron los efectos provocados, por la inhibición de la traducción de las isoformas del RP, en la expresión de genes del ácido glutámico descarboxilasa, tirosina hidroxilasa y triptófano hidroxilasa, que son fundamentales en la síntesis de neurotransmisores para que se lleve a cabo el despliegue de la conducta sexual.

3. Antecedentes

3.1 Estructura y función de las hormonas esteroides

3.1.1 Generalidades

Las hormonas esteroides son lípidos no saponificables hidrofóbicos, solubles en disolventes orgánicos y que estructuralmente presentan en común como núcleo químico básico, el ciclopentanoperhidrofenantreno (hidrocarburo cíclico constituido por diecisiete átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono y un anillo de cinco átomos de carbono) (Knobil y Neill, 1988). El término *esteroide* se deriva de la palabra griega *estéreo*, que significa sólido; la mayoría de ellos se sintetizan en el ovario, testículo y glándulas adrenales utilizando al colesterol como precursor. (Fig. 1). (Gore-Langton y Armstrong, 1988). Las hormonas esteroides desempeñan un papel muy importante en la regulación de múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre ellos destacan la homeostasis hidrolítica, el dimorfismo sexual, la función reproductiva y la respuesta al estrés. Entre las hormonas esteroides se encuentran los estrógenos, las progestinas, los andrógenos, los glucocorticoides y los mineralocorticoides (González-Arenas et al., 2001).

Estas hormonas modifican la actividad celular al interactuar con receptores específicos que tienen una alta afinidad para cada hormona esteroide. Los receptores a hormonas esteroides son proteínas que en su mayoría se localizan en el núcleo de la célula y pertenecen a la familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos, positiva o negativamente, a través de la interacción con distintas secuencias en el DNA denominadas elementos de respuesta hormonal (Zhang et al., 1996).

3.1.2 La progesterona

La progesterona (P_4) (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides. Su nombre se deriva del latín: *pr* = a favor y *gestare* = llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción (Pérez-Palacios et al., 1985).

La estructura química de la P_4 y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del pregnano, constituido por 21 átomos de carbono -C 21- (Fig. 2).

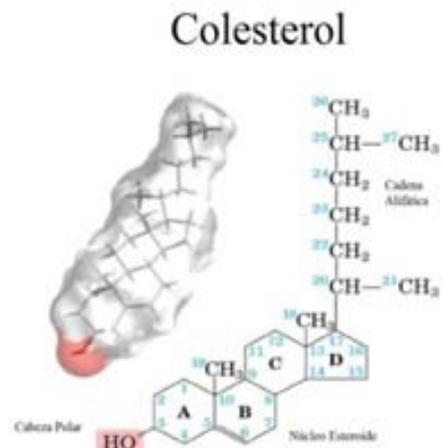


Figura 1. En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una cola o porción apolar formada por 4 anillos de núcleos condensados (ciclopentanoperhidrofenantreno) y los sustituyentes alifáticos.

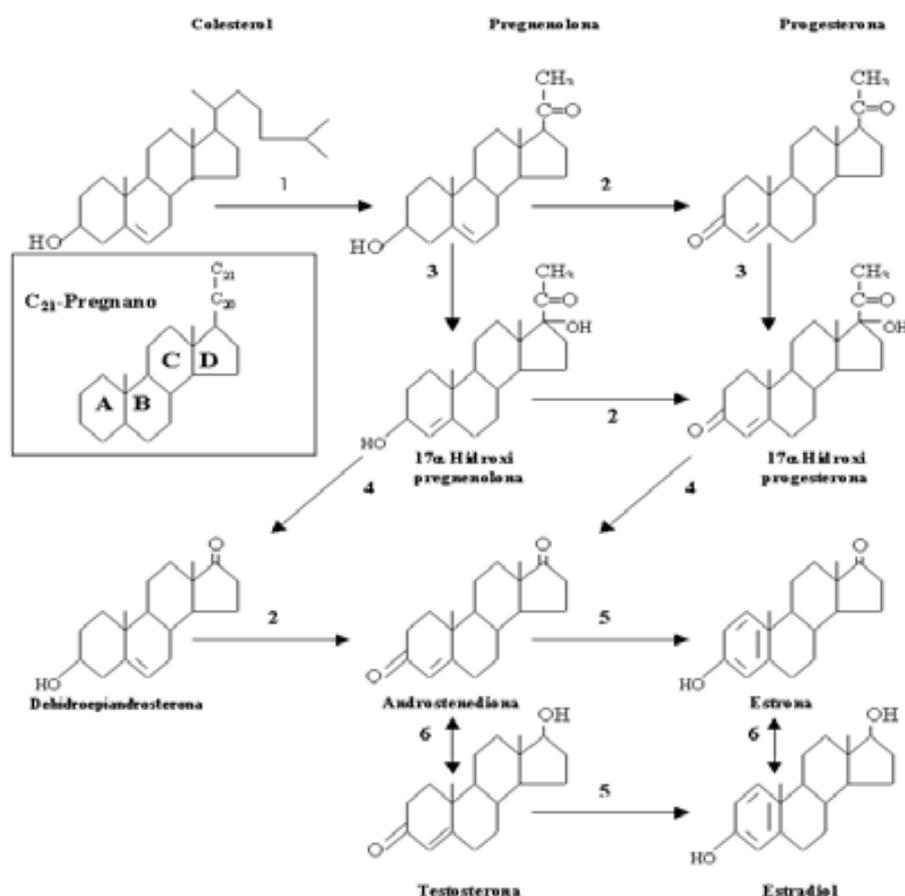


Figura 2. Síntesis de los principales esteroides. 1) 20,22 desmolasa; 2) 3β-OH-esteroide deshidrogenasa, 3) 17α-hidroxilasa; 4) 17, 20-esteroide liasa; 5) aromatasa; 6) 17β-OH-esteroide deshidrogenasa. En el recuadro se encuentra la estructura del pregnano al igual que las letras con las que se denominan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

La P₄ se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso de las células del cuerpo lúteo del ovario, durante el ciclo menstrual (Hsueh et al., 1984; Hutchison et al., 1986). Otros órganos donde también se ha demostrado su síntesis son la corteza adrenal, la placenta (Goroscope y Freeman, 1985; Perrot-Appianat et al., 1982), el testículo, (Weisz y Ward, 1980; Dalkin et al., 1992) y el cerebro (Zwain y Yen, 1999b; Ukena et al., 1999).

Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y la adrenalina (Graham y Ckarke., 1997). La síntesis de P₄ se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a P₄ (Fig. 3), por medio de distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

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

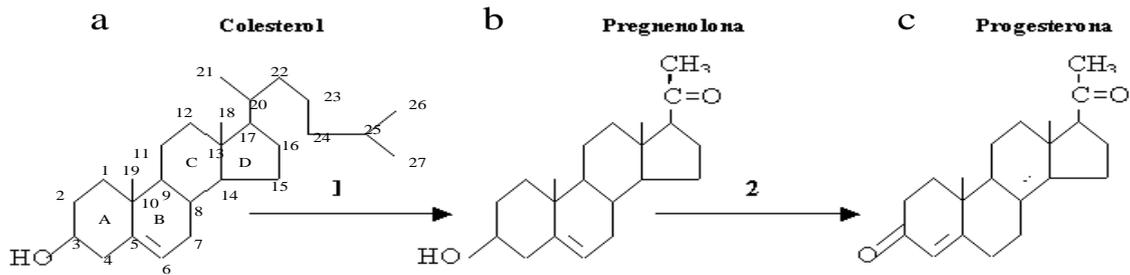


Figura 3. Biosíntesis de la P₄. La biotransformación de colesterol a P₄ implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17 por medio de la enzima 20,22 esteroide liasa (1), b) la oxidación del grupo alcohol en el C-3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

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

La reducción de los pregnandiolos forma glucurónidos, lo que incrementa la polaridad de la molécula formándose así compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción por la orina (Fig. 4).

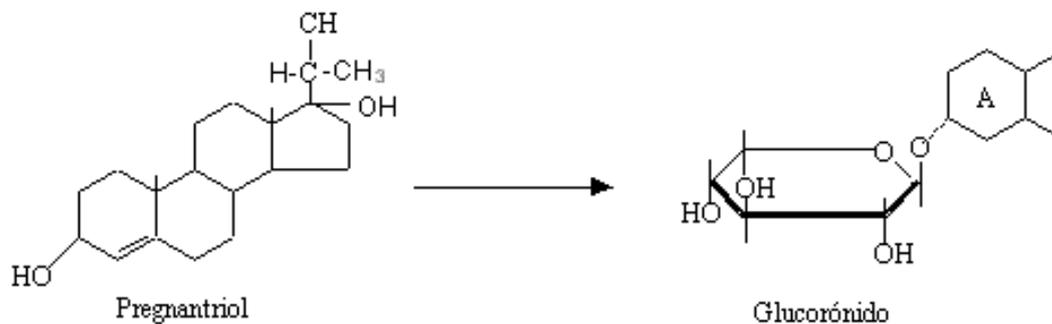


Figura 4. Principales catabolitos de la P₄ (Renwick 1970).

3.1.2.1 Acciones generales de la P₄

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

Tabla 1. Acciones fisiológicas de la P₄.

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

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

3.1.2.2 Acciones de la P₄ en el SNC

Existe una gran variedad de acciones reguladas por P₄ en diferentes regiones del cerebro de mamíferos, incluyendo la médula espinal, el tallo cerebral, el cerebelo, el hipotálamo, el hipocampo, la amígdala, la corteza y el bulbo olfatorio (Camacho-Arroyo, 1995; Chabbert-Buffet et al., 2000, Schumacher et al., 1999; Stein, 2001). La P₄ participa en la regulación de la ovulación, de la conducta sexual, en la diferenciación sexual en el cerebro, en la excitabilidad neuronal y en procesos como el dolor, la respiración, el sueño, el ciclo sueño-vigilia, la memoria y el aprendizaje, la neuroprotección y el desarrollo de tumores cerebrales (Schumacher et al., 1999, Grunberg et al., 1991).

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

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

En años recientes, se ha reportado que la expresión del RP en el hipotálamo y el área preóptica presenta cambios utilizando un modelo de ratas desfeminizadas con

estradiol (E_2) durante el período crítico de diferenciación del cerebro (primeros 5 días del desarrollo postnatal) (Arrieta et al., 2003).

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

En relación a la excitabilidad neuronal, se ha reportado que la P_4 modula la actividad de varios neurotransmisores como el ácido γ -amino-butírico (GABA), glutamato, acetilcolina, dopamina, norepinefrina y serotonina (Rupprecht, 2003; Melcangi et al., 2001; Bethea et al., 2002). En general, se ha observado que la P_4 disminuye la excitabilidad neuronal por el incremento de la actividad de GABA o por la modulación del glutamato (Melcangi et al., 2001; Engel y Grant, 2001).

Se ha reportado que la P_4 tiene efectos anestésicos en varias especies y tiene propiedades anticonvulsivas en varios modelos animales y en humanos (Backstrom et al., 1984; Beyenburg et al., 2001). De manera interesante, se ha observado que muchos de los efectos de la P_4 en la excitabilidad neuronal son mediados a través de sus metabolitos reducidos como 3α , 5α tetrahidroprogesterona, que también tiene actividad biológica y en algunos casos su actividad es mayor que la misma P_4 (Frye et al., 2000; Herzog y Frye, 2003).

En la vida postnatal temprana las neuronas de Purkinje en el cerebelo sintetizan P_4 , y esto promueve el crecimiento de dendritas y la sinaptogénesis en estas células, contribuyendo a la formación de circuitos neuronales en esta estructura durante la vida neonatal (Sakamoto et al., 2001 y 2002).

La P_4 participa en la regulación del sueño durante el embarazo y su administración en machos adultos muestra efectos hipnogénicos (Friess et al., 1997). Se ha reportado que las microinyecciones de P_4 en la formación reticular pontina de ratas macho intactos y hembras ovariectomizadas, produce una marcada disminución en la latencia a la fase de sueño de movimientos oculares rápidos (Camacho-Arroyo et al., 1999).

La aparición de síntomas del síndrome premenstrual en las mujeres, así como la ansiedad observada al final de la fase lútea ha sido correlacionada con la disminución en los niveles de P_4 . De acuerdo con esta evidencia, se ha encontrado que la P_4 y sus metabolitos poseen propiedades ansiolíticas (Backstrom et al., 2003; Freeman, 2002; Gómez et al., 2002; Picazo y Fernández-Guasti, 1995).

La P_4 también participa en la modulación de la plasticidad sináptica y se sabe que la memoria espacial varía durante el embarazo en ratas, y la retención de la memoria es aumentada por el tratamiento de E_2 y P_4 (Galea et al., 2000; Sandstrom y Williams, 2001). Se ha reportado que un tratamiento agudo con P_4 (5 h) aumenta la formación de espinas dendríticas en el hipocampo de la rata (Gould et al., 1990). También se ha observado que el aumento en la densidad de espinas dendríticas por E_2 y P_4 podría estar regulado por un incremento en el contenido de la proteína MAP-2 en el hipocampo (Reyna-Neyra et al., 2002).

Uno de los aspectos más interesantes y de aplicación de las acciones de la P₄ en el cerebro es la capacidad tanto de prevenir la degeneración como promover la neuroprotección y la neuroregeneración. En varios modelos animales de daño cerebral se ha observado que la P₄ muestra un papel neuroprotector contra varios agentes y procesos traumáticos (Stein, 2001, Callier et al., 2001; Cervantes et al., 2002; Nilsen y Brinton, 2002). El conocimiento sobre los mecanismos involucrados en estos procesos podría ser de gran importancia, con el propósito de utilizar a la P₄ en humanos no sólo después de un trauma cerebral, sino en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la de Alzheimer y la de Parkinson.

3.1.2.3 Mecanismos de acción de la P₄

Los mecanismos celulares mediante los cuales la P₄ puede llevar a cabo sus efectos se dividen en dos: **genómico** y **no genómico** (Bramley, 2003). El primero involucra la interacción de la P₄ con sus receptores nucleares específicos (RP) (Evans, 1988), mientras que el segundo requiere la interacción de la P₄ con receptores membranales o sitios de regulación presentes en los receptores a neurotransmisores como el GABA_A, canales iónicos, receptores de tipo cinasa de tirosina y receptores de siete dominios transmembranales (Fig. 5) (Camacho-Arroyo, 2003).

Mediante el mecanismo no genómico se modifican la conductancia iónica, la formación de segundos mensajeros y la activación de cascadas de fosforilación (Bramley, 2003). De esta manera, la P₄ puede regular diferentes funciones 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 Receptor a Progesterona (RP) (Fig. 5)

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

- a) Unión de la P₄ al RP, el cual se encuentra transcripcionalmente inactivo formando complejos oligoméricos con proteínas de choque térmico (HSP) como las HSP 70, 90, 59 (Beato, 1987; Chambraud et al., 1990; Schowalter et al., 1991).
- b) Cambio conformacional inducido por la unión del ligando, separación de las HSP, fosforilación y activación del RP.
- c) Dimerización del RP y aumento en su afinidad por secuencias reguladoras en el DNA, denominadas elementos de respuesta a P₄ (ERP).
- d) Unión del RP activado a su elemento de respuesta, el reclutamiento de cofactores de transcripción hacia la región promotora, que junto con la maquinaria basal de transcripción inician y regulan la síntesis del mRNA (Mahesh et al., 1996; Rowan et al., 2000).
- e) Una vez que se ha llevado a cabo la transcripción de los genes, el RP y la maquinaria transcripcional se desensamblan de ellos, y el receptor regresa a la fase de inactivación.

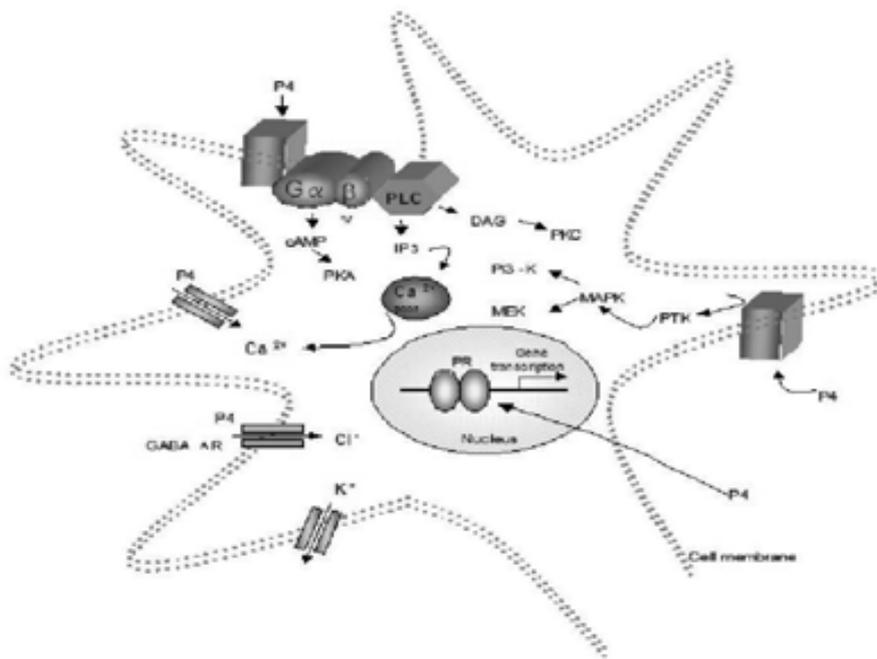


Figura 5. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de la P4. Los efectos de la P4 ocurren por 2 diferentes mecanismos celulares: 1) en la membrana, incluyen receptores membranales y canales, cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la intervención de mensajeros intracelulares; 2) en el núcleo donde receptores a P4 (PR), que son moduladores directos de la expresión génica, mediante la interacción del complejo hormona-receptor con elementos de respuesta a hormonas, ubicados en las regiones reguladoras de los genes blanco en el DNA. G: Proteína G, $\alpha\beta\gamma$: Subunidades de la proteína G, PKA: Proteína Cinasa A, RGABA_A: Receptor a GABA tipo A, RP: Receptor a P4, PLC: Fosfolipasa C, IP3: Inositol Trifosfato, DAG: Diacil glicerol, PKC: Proteína Cinasa C, PI3-K: Cinasa de Inositol Trifosfato, PTK: Proteína de Tirosina Cinasa, MAPK: Proteína Cinasa Activada por Mitógeno, MEK: Cinasa de MAPK, Cl⁻: Cloro, Ca²⁺: Calcio, K⁺: Potasio (Camacho-Arroyo, 2003).

Como se mencionó anteriormente, existen proteínas cofactoras que son capaces de regular la expresión y actividad del RP, por lo tanto se pueden considerar como reguladores fundamentales del RP. Funcionalmente los coactivadores sirven como puentes moleculares que unen al receptor con la maquinaria basal de transcripción (McKenna et al., 1999). Se ha observado que algunos coactivadores tienen actividades enzimáticas que contribuyen a potenciar la transcripción de genes. Los coactivadores de receptores a esteroides (SRC-1, SRC-2, SRC-3), y el factor asociado a p300/CBP (p300/CBP y PCAF) tienen actividad de histona acetiltransferasa (HAT), mientras que miembros del complejo SWI/SNF presentan actividad de ATPasa (Lemon y Tjian, 2000). La actividad HAT modifica la estructura de la cromatina, neutralizando la carga positiva de las histonas, interrumpiendo las interacciones iónicas entre las histonas cargadas positivamente y cargando negativamente el esqueleto del DNA.

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

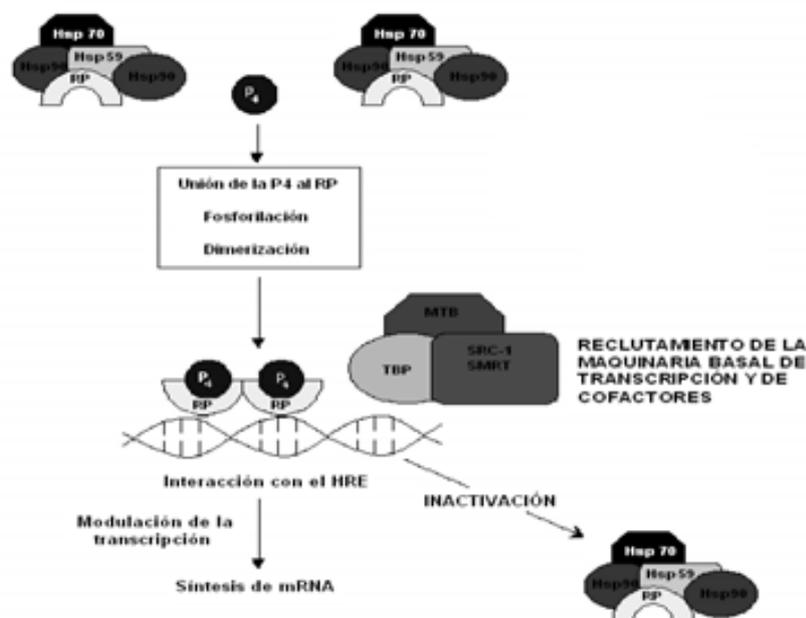


Figura 6. Mecanismo de acción genómica de la P₄. El RP está presente en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico (HSP); cuando la P₄ se une al RP, las HSP se disocian y el RP sufre cambios conformacionales que le permiten unirse a un elemento de respuesta hormonal (HRE), reclutar a cofactores y a la maquinaria basal de transcripción (MBT), lo cual modifica la transcripción del gen blanco. El complejo formado puede reclutar otros cofactores al promotor como el SRC-1 que pueden: 1) abrir la estructura de la cromatina a través de su actividad de histona acetil transferasa en el caso de los coactivadores; si se reclutan correpresores como SMRT, se presenta una estructura más compacta de la cromatina por la actividad de histona desacetiltransferasa, y 2) contribuir a la estabilización del complejo de pre-iniciación (Giangrande et al., 1997).

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

3.2 El Receptor a P₄ (RP)

3.2.1 Características del RP

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 los elementos de respuesta a P₄ (ERP), localizados principalmente en la región promotora de los genes regulados por P₄. El RP presenta dos isoformas: una larga denominada B (108-120 KDa) y una corta

denominada A (80-94 KDa) (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000). Ambas isoformas se generan a partir del mismo gen pero son reguladas por distintas regiones promotoras; las características de estas isoformas se describirán más adelante.

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

- a) Dominio NH₂ terminal (A/B): Se codifica a partir del exón 1 (2380 pb). Participa en la regulación de la transcripción de genes blanco ya que contiene funciones de transactivación.
- b) Dominio de unión al DNA (C): Se codifica a partir de los exones 2 (152 pb) y 3 (117 pb). Participa en la dimerización con otro receptor y en la unión al DNA a través de la presencia de dedos de zinc.
- c) Dominio bisagra (D): Se codifica a partir del exón 4 (306 pb). Participa en procesos de estabilización del receptor por unión a proteínas de choque térmico como Hsp90 y en la localización nuclear, ya que contiene el péptido señal de localización nuclear (NLS).
- d) Dominio de unión al ligando (E): Se codifica a partir de los exones 5 (145), 6 (131), 7 (158) y 8 (153 pb). Participa en la interacción con el ligando y en la regulación de la transcripción, ya que contiene una función de transactivación.

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

La fosforilación es un evento muy importante para que se lleve a cabo la transactivación de genes mediada por P₄. El hRP contiene 14 sitios de fosforilación (Fig. 7), de los cuales 10 han sido identificados mediante ensayos de fosforilación *in vitro* e *in vivo* (Ser²⁰, Ser⁸¹, Ser¹⁰², Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰, Ser²¹³, Ser²⁹⁴, Ser³⁴⁶, Ser⁴⁰⁰, Ser⁶⁷⁶) y cuatro únicamente por fosforilación *in vitro* (Ser²⁵, Ser¹³⁰, Thr⁴³⁰, Ser⁵⁵⁴) (Zhang et al., 1994 y 1995, Lange et al., 2000, Knotts et al., 2001). Hasta ahora se sabe que la P₄ induce la fosforilación del RP en tres residuos que son la Ser¹⁰², Ser²⁹⁴ y Ser³⁴⁵ y que los residuos Ser⁸¹, Ser¹⁶², Ser¹⁹⁰ y Ser⁴⁰⁰ son sitios basales que incrementan su fosforilación después del tratamiento con la hormona (Zhang et al., 1994 y 1995). Hasta el momento se conoce que los residuos Ser¹⁶² y Ser²⁹⁴ son fosforilados por las proteínas cinasas activadas por mitógenos 44 y 42 (MAPK-44 y MAPK-42) (Lange et al., 2000).

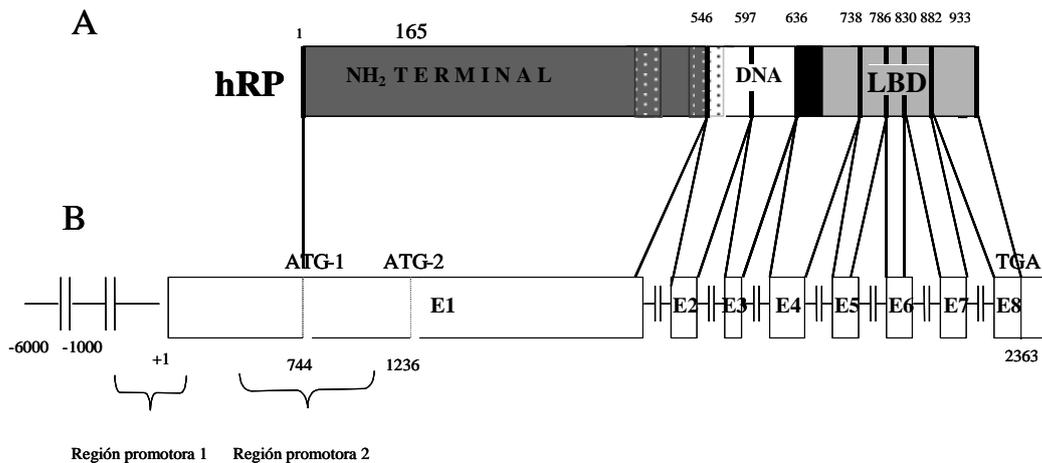


Figura 7. Estructura del gen del RP humano. A) Se esquematiza el RP del humano (hRP). La secuencia de aminoácidos del hRP está dividida en 4 dominios: el dominio amino terminal señalado en color gris oscuro, el dominio de unión al DNA señalado en color blanco, el dominio bisagra señalado en color negro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

La fosforilación de sitios específicos del RP está acoplada a múltiples funciones del mismo, incluyendo localización nuclear en respuesta a la activación de MAPK, sinergismo transcripcional en presencia de P_4 y regulación a la baja por acción del complejo ubiquitina-proteosoma 26S (Kazmi et al., 1993; Lange, 2004).

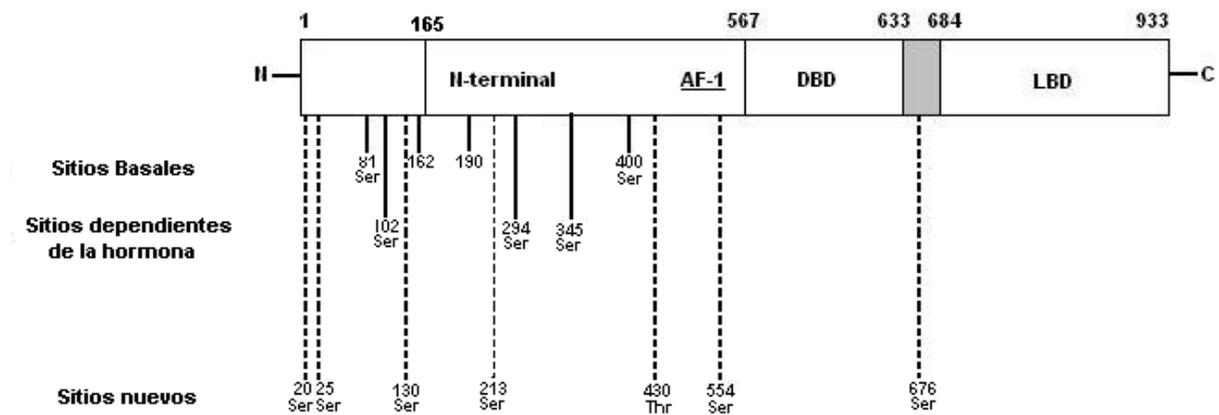


Figura 8. Sitios de fosforilación en el RP humano (hRP). Residuos de fosforilación en el hRP identificados hasta la fecha. Tomado de Knotts et al., 2001.

En estudios recientes se reportó que la CDK2 regula la actividad del RP en ausencia de progestinas a través de la fosforilación de la Ser 400 (Pierson-Mullany y Lange, 2004).

El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por los ERP (Mahesh et al., 1996; Beato et al., 1989), y como se mencionó antes, la P_4 induce la fosforilación del receptor para que éste pueda ser funcional y entonces pueda llevar a cabo su efecto genómico, así que por un lado la P_4 induce la fosforilación del receptor. Sin embargo, la misma P_4 induce la fosforilación en serinas como la 294, y al fosforilarse este residuo se activa una vía de degradación del receptor, mediante la vía ubiquitina-proteosoma 26S. El proteosoma 26S es un complejo multiproteínico que degrada proteínas poliubiquitinadas (Lange, 2000; Lange et al., 2004).

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

3.2.2 Isoformas del RP

Como ya se mencionó, se han identificado dos isoformas del RP, las cuales se han denominado A (80-94 kDa) y B (108-120 kDa) (Fig. 9). La isoforma A es la forma truncada de la isoforma B, ya que no contiene 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 B (Loosfelt et al., 1986).

En el ser humano y en la rata, ambas isoformas del RP son codificadas por el mismo gen, pero se transcriben a partir de dos secuencias promotoras distintas, una distal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-B) y otra proximal (que corresponde a la secuencia promotora de RP-A), que dan lugar a diferentes mRNA (Kastner et al., 1990, Kraus et al., 1993) (Fig. 9).

Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad tanto por la P_4 como por el ERP (Christensen et al., 1991). El RP tiene la capacidad de unirse al DNA como tres especies dimericas: AA, AB, BB. Se ha demostrado que la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman homodímeros o heterodímeros e interactúan con agonistas y antagonistas (Leonhardt et al., 1998). Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo de célula, del gen blanco y del promotor (Tung et al., 1993). En muchos sistemas celulares la isoforma RP-B actúa como un activador transcripcional, mientras que el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto

por RP-B como por otros receptores a hormonas esteroides (Vegeto et al., 1993; Tung et al., 1993; Sartorius et al., 1994; Clemm et al., 1995). En el útero del ratón se demostró que RP-A regula a los genes de la calcitonina y anfiregulina, mientras que RP-B a los de histidina descarboxilasa y lactoferrina (Mulac-Jericevic et al., 2000). En células T47D, derivadas de cáncer de mama, se observó que de 94 genes regulados por P_4 , 65 se regulan por medio del RP-B, 4 por el RP-A y 25 por ambas isoformas (Richer et al., 2002).

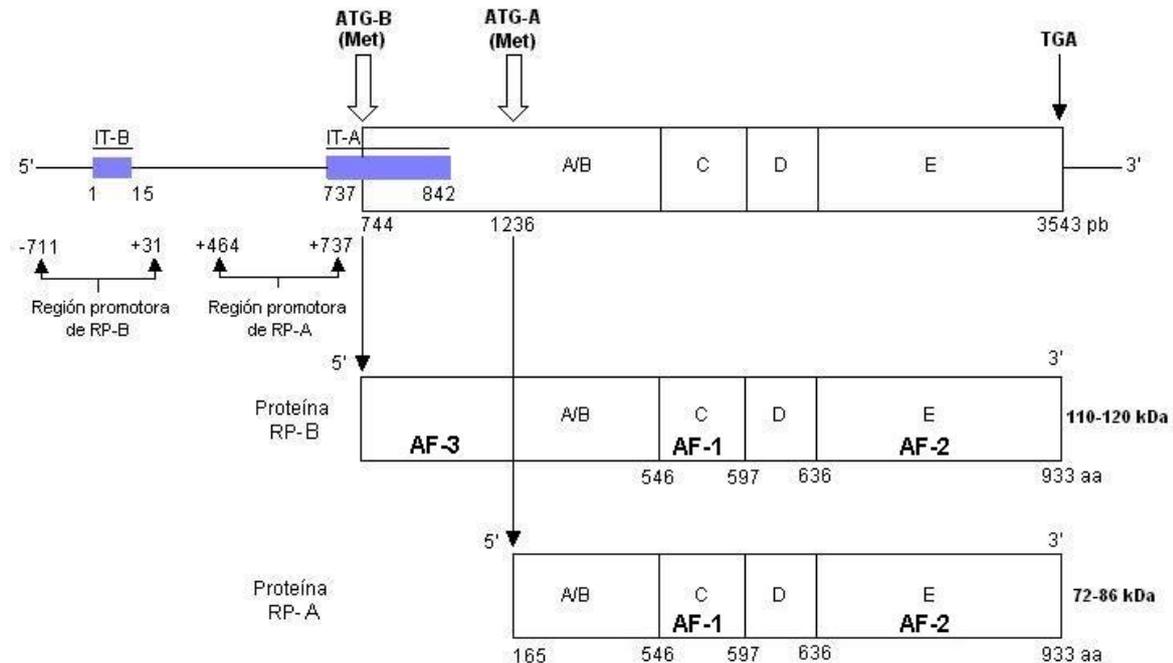


Figura 9. Organización de las isoformas del RP. Los números indican la posición de las bases y de los aminoácidos en el gen y en las proteínas de las isoformas de RP respectivamente. IT-B e IT-A: sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; A-E: dominios funcionales del RP; ATG-B y ATG-A: Inicio de la traducción de RP-B y RP-A respectivamente; Met: Metionina; TGA: Codón de término de la traducción. AF: Función de activación. Están indicados los pesos moleculares para las isoformas del RP de rata y humano, RP-A: 72-86 kDa y RP-B: 110-120 kDa (Kastner et al., 1990; Fujimoto et al., 1997, Park-Sarge y Mayo 1994; Kraus et al., 1993).

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

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

1. La isoforma A carece de los primeros 164 aminoácidos presentes en la isoforma B (Graham et al., 1995).
2. La existencia de tres regiones con funciones de activación (AF1, AF2 y AF3). Las dos primeras están presentes en ambas isoformas, mientras que AF3 solamente se encuentra en el RP-B (Giangrande et al., 1999) (Fig. 9).
3. La presencia de una región con función inhibitoria localizada en la región adyacente a AF que sólo es funcional en RP-A. Estudios recientes han

demostrado que esta región bloquea la activación de la transcripción mediada por AF1 y AF2, pero no por AF3, presente en RP-B (Huse et al., 1998; Wen et al., 1994).

4. Los homodímeros son más estables que los heterodímeros. En cuanto a la actividad, los homodímeros B:B son mejores activadores de la transcripción que los heterodímeros B:A, mientras que los homodímeros A:A son los que presentan la menor actividad transcripcional (Leonhardt et al., 1998).
5. El RP humano es fosforilado al menos en catorce residuos, seis de estos sitios sólo se encuentran en el RP-B mientras que los otros ocho los comparten ambas isoformas (Knotts et al., 2001). La diferente distribución y regulación de estos sitios de fosforilación en las isoformas del RP puede conferirles diferentes estados conformacionales, que los pueden hacer más o menos afines por las secuencias blanco y regular la transcripción de un gen.
6. RP-A presenta mayor afinidad por el correpresor SMRT mientras que RP-B tiene mayor afinidad por el coactivador SRC-1. Por otro lado, RP-A es incapaz de reclutar eficientemente a los coactivadores transcripcionales como la proteína que interactúa con el receptor a glucocorticoides-1 (GRIP-1) y SRC-1 (Giangrande et al., 1999).

Estas observaciones llevan a sugerir que una alteración en la expresión o actividad de las isoformas del RP puede tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la P_4 .

La tasa de expresión de las dos isoformas varía en diferentes órganos y tejidos blanco (Ing et al., 1993, Graham y Clarke, 1997; Camacho-Arroyo, 2003), lo que sugiere que la expresión diferencial puede ser crítica para la respuesta celular a la P_4 (Camacho-Arroyo et al., 1998).

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

3.2.3 Regulación de la expresión del RP

El RP es regulado de manera positiva por estrógenos y de manera negativa por P_4 en muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo (Graham et al., 1997, Camacho-Arroyo et al., 1994 y 1996, Mendoza-Rodríguez et al., 1999).

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

(Kraus et al., 1993), que puede actuar junto con el RE (Salvatori et al., 2003, Khan et al., 2003) para promover la transcripción del RP.

En la rata, los mecanismos moleculares involucrados en la regulación negativa de la transcripción del gen del RP por P_4 son hasta el momento desconocidos. Es posible que en tal regulación participen otras proteínas, dada la carencia de elementos de respuesta a P_4 (ERP) en el gen del RP (Kraus et al., 1993a, Savouret et al., 1991).

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

En el útero de roedores y primates la tasa de expresión de RP-A varía durante los ciclos reproductivos (Ilenchuk y Walters, 1987; Mangal et al., 1997 y Duffy et al., 1997, Mote et al., 1999). Para el caso de la mujer se sabe que la expresión de ambas isoformas alcanza su máximo durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual cuando las concentraciones de E_2 son elevadas y las de P_4 bajas; sin embargo, la tasa de expresión RP-A:RP-B es de 10:1 durante la primera semana del ciclo (niveles de E_2 y P_4 bajos); en los días 9 a 13 es aproximadamente de 5:1 (niveles de E_2 altos y P_4 bajos); en los días 14-16 es 2:1 (niveles altos de P_4 y E_2) y hacia el final del ciclo RP-B es prácticamente indetectable (niveles bajos de E_2 y P_4) (Mangal et al., 1997).

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

Se han observado claras diferencias en la regulación de la expresión del mRNA de las isoformas del RP (Camacho-Arroyo et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2000). En el hipotálamo de ratas ovariectomizadas, la expresión del mRNA de ambas isoformas del RP fue inducida por estrógenos y reducida por la P_4 , y en el área preóptica estos cambios sólo se presentaron en RP-B, mientras que en el hipocampo la isoforma que presentó inducción con estrógenos fue RP-A sin que la P_4 tuviera efectos en la expresión de ambas isoformas (Camacho-Arroyo et al., 1998b). Las proteínas de ambas isoformas se regularon positivamente por E_2 en el hipotálamo y en el área preóptica, mientras que la P_4 reguló negativamente a ambas isoformas en el hipotálamo más no en el área preóptica. En el hipocampo sólo el contenido de RP-A se incrementó por E_2 y disminuyó por P_4 (Guerra-Araiza et al., 2003). En el ciclo estral de la rata el mRNA del RP-B fue predominante en el

hipotálamo en el día del proestro, mientras que el contenido más bajo de la proteína de ambas isoformas se detectó durante el diestro. En el hipocampo no se detectó una diferencia importante entre la expresión del mRNA y de las proteínas de las isoformas del RP (Guerra-Araiza et al., 2000 y 2003). En varios sistemas celulares in vitro, se ha reportado que la P₄ regula negativamente a su receptor a nivel de su degradación por el proteosoma 26S (Lange, 2000; Turgeon y Waring, 2000; Shen et al., 2001; Lange et al., 2004).

3.3 Neurotransmisores

3.3.1 Principales neurotransmisores

Un neurotransmisor (NT) es una sustancia química liberada selectivamente de una terminación nerviosa por la acción de un potencial de acción, que interacciona con un receptor específico en una estructura adyacente y que, al entrar en contacto, produce una determinada respuesta fisiológica. (Kendel, 2000)

Hay cuatro criterios para que una sustancia química sea considerada como neurotransmisor:

1. Debe ser sintetizada en la neurona
2. Debe estar presente en la terminal presináptica y ser liberada en cantidad suficiente por un potencial de acción (PA) para ejercer una acción definida en una neurona postsináptica u órgano efector y cuando se une al receptor, producir siempre el mismo efecto
3. Cuando es administrado de manera exógena, en concentraciones adecuadas, mimetiza la acción, de manera exacta, del transmisor endógeno
4. Hay un mecanismo específico para removerlo de su sitio de acción. (Kendel, 2000)

A diferencia de una hormona, el neurotransmisor es sintetizado cerca del sitio de liberación y de acción, mientras que las hormonas son liberadas al torrente sanguíneo para actuar en blancos diversos y más distantes. (Kendel, 2000)

El sistema nervioso central hace uso de dos clases principales de sustancias químicas para señalizar: transmisores en forma de moléculas pequeñas y péptidos neuroactivos. Ambos tipos están contenidos en vesículas, que liberan su contenido por exocitosis.

En la tabla 2 aparecen los principales neurotransmisores y las enzimas que los sintetizan, siendo muchas veces el paso limitante de actividad transmisora.

3.3.1.1 Serotonina

La serotonina se sintetiza a partir del triptófano por medio del enzima triptófano hidroxilasa (que es el paso limitante de la síntesis), que lo convierte en 5-hidroxitriptofano y luego en serotonina (5HT). Las proyecciones serotoninérgicas se originan en los cuerpos neuronales localizados principalmente en el mesencéfalo y tronco del encéfalo, los denominadas núcleos del rafe. Estas proyecciones inervan

prácticamente todo el cerebro y alcanzan su mayor densidad en áreas límbicas como el hipocampo, amígdala o corteza cerebral. También hay proyecciones serotoninérgicas hacia el cerebelo y la médula espinal. (Agüera-Ortiz et al 2006). Los niveles de 5-HT están regulados por la captación de triptófano y por la acción de la monoaminoxidasa (MAO) intraneuronal. Se estima que el 95% de la serotonina corporal se encuentra en el tracto gastrointestinal el 5% restante es encontrado en el cerebro.

Tabla 2. Principales neurotransmisores y sus enzimas biogénicas

Transmisor	Enzimas	Actividad
Acetilcolina	Colina aciltransferasa	Específica
Aminas biogénicas		
Dopamina	Tirosina hidroxilasa	Específica
Norepinefrina	Tirosina hidroxilasa y dopamina β hidroxilasa	Específica
Epinefrina	Tirosina hidroxilasa y dopamina β hidroxilasa	Específica
Serotonina	Triptofano hidroxilasa	Específica
Histamina	Histidina descarboxilasa	Especificidad incierta
Aminoácidos		
Acido γ -amino-butírico	Acido glutámico descarboxilasa	Probablemente específica
Glicina	Enzimas operando en metabolismo general	Ruta específica
Glutamato	Enzimas operando en metabolismo general	Ruta específica

Una vez producida, la serotonina cerebral tiene un importante desempeño en varios campos; así, modula el funcionamiento de otras neuronas, participa en la regulación del deseo sexual, en el control del apetito, mantenimiento de la vigilia, modulación de la ansiedad y de la agresividad, además de contribuir a coordinar la producción de otras hormonas. (Agüera-Ortiz et al 2006)

Aunque a través de la sangre se pueden medir las concentraciones de serotonina, esto provee poca información de lo que ocurre en el cerebro, ya que ambos espacios -el cerebro y el resto del cuerpo- se encuentran separados por la barrera hemato-encefálica, evitando un efecto no deseado sobre las señales químicas. (Agüera-Ortiz et al 2006)

3.3.1.2 Dopamina

La dopamina se sintetiza en neuronas a partir de la tirosina, que es convertido en L-DOPA por medio de la tirosina hidroxilasa. Las principales vías dopaminérgicas parten de grupos de células localizadas en el mesencéfalo y forman proyecciones nigroestriatales, que inervan principalmente el estriado dorsal (caudado y putamen) y las proyecciones mesolímbicas y mesocorticales, que inervan las regiones límbicas (*nucleus accumbens*, amígdala) y corticales (corteza prefrontal), respectivamente. (Agüera-Ortiz et al 2006)

3.3.1.3 Acido γ -amino-butírico (GABA)

La síntesis del GABA se realiza a partir del glutamato en un solo paso enzimático catalizado por la ácido glutámico descarboxilasa, enzima que se localiza

exclusivamente en neuronas GABAérgicas. El GABA es el neurotransmisor de la mayoría de las interneuronas del sistema nervioso. También aparece en algunas neuronas de proyección como las neuronas estratopalidales y palidotálamicas de los ganglios basales, y las células de Purkinje, interviniendo así en funciones motoras y cognitivas complejas. (Agüera-Ortiz et al 2006)

En la sinapsis GABAérgica, como en la glutamatérgica, los astrocitos también llevan a cabo una función importante, recapturando el GABA liberado en la sinapsis mediante transportadores situados en la membrana y transformando éste en glutamina que será utilizado como precursor para la síntesis de nuevo GABA en la terminación presináptica. Los astrocitos también pueden liberar GABA, si bien las pruebas sobre el posible papel de esta GABA astrocitario como modulador de la actividad neuronal son escasas. (Agüera-Ortiz et al 2006)

3.3.2 Receptores de neurotransmisores

Los receptores de los NT son complejos proteicos presentes en la membrana celular. Los receptores acoplados a un segundo mensajero suelen ser monoméricos y tienen tres partes: una extracelular donde se produce la glucosilación, un sitio de unión del ligando, donde actúa el NT y una parte intracitoplasmática donde se produce la unión de la proteína G o la regulación mediante fosforilación del receptor. Los receptores con canales iónicos son poliméricos. En algunos casos, la activación del receptor induce una modificación de la permeabilidad del canal. En otros, la activación de un segundo mensajero da lugar a un cambio en la conductancia del canal iónico.

Los receptores que son estimulados continuamente por un NT o por fármacos (agonistas) se hacen hiposensibles; aquellos que no son estimulados por su NT o son bloqueados crónicamente (antagonistas) se hacen hipersensibles. La suprarregulación o infrarregulación de los receptores influye de forma importante en el desarrollo de la tolerancia y dependencia física.

Los receptores de serotonina se asocian con proteínas G (excepto los 5-HT₃, que son ionotrópicos) y son acoplados a la adenilato ciclasa (5-HT₁, 5-HT₄ y 5HT₇) o a fosfolipasa C (5-HT₂). En particular, los receptores 5HT_{1A} funcionan como receptores postsinápticos en áreas límbicas (hipocampo, septo, corteza) y como autorreceptores en cuerpo y dendritas de neuronas serotoninérgicas. En otras áreas cerebrales predominan otros subtipos de receptores serotoninérgicos: en sustancia negra 5HT_{1B-D} y 5HT₄; en estriado 5HT_{2A} y 5HT₆; en hipocampo 5HT₃ y 5HT₄, en tálamo y hipotálamo 5HT₇ y en corteza cerebral 5HT_{2A} y 5HT_{5, 6, 7}. (Agüera-Ortiz et al 2006)

Existen dos grupos principales de receptores dopaminérgicos: D₁ (subtipos D₁ y D₅) y D₂ (subtipos D₂, D₃ y D₄). Ambos grupos son receptores asociados a proteínas G. Los receptores D₁ estimulan a la adenilato ciclasa y, por lo tanto, aumentan la síntesis de AMPc, y los D₂ inhiben a la adenilato ciclasa reduciendo la síntesis. Ambos grupos de receptores funcionan como postsinápticos, y en el caso de los D₂ también pueden funcionar como autorreceptores y regular la actividad

dopaminérgica. La mayor densidad de los receptores D₁ se localiza en el caudado, putamen, *nucleus accumbens* y amígdala, aunque también se expresan en otras áreas cerebrales como la corteza prefrontal. Los receptores D₂ son muy abundantes en caudado, putamen y *nucleus accumbens*, pero se distribuyen también en el hipocampo, hipotálamo, tálamo y corteza cerebral. Además, la densidad de cada subtipo varía en áreas específicas del cerebro. (Agüera-Ortiz et al 2006)

En el caso del NT GABA, existen dos tipos de receptores: GABA-A y GABA-B. El GABA-A es un receptor ionotrópico con permeabilidad selectiva para el ión cloruro, y su apertura induce potenciales postsinápticos inhibidores. Los receptores GABA-B están acoplados a proteínas G y producen la activación de canales permeables para K, cuya apertura provoca la hiperpolarización de la membrana. Los receptores GABA-B se pueden localizar presinápticamente y funcionar como autorreceptores para inhibir la liberación de GABA. Los receptores GABA-B median potenciales inhibidores lentos, cooperando en muchos casos con las acciones mediadas por los receptores GABA-A con los que coexisten. (Agüera-Ortiz et al 2006)

Desde el punto de vista funcional, las interneuronas GABAérgicas forman parte de los circuitos locales que median señales inhibitorias y suelen aumentar la relación señal-ruido en la información de salida de las áreas donde se localizan. De esta manera forman parte de circuitos de retroalimentación negativa, así como de inhibición lateral que modulan la actividad de las neuronas de proyección. En algunas regiones como la corteza cerebral, el tálamo, el estriado o el cerebelo, las interneuronas GABAérgicas se encuentran físicamente unidas por uniones de hendidura (*gap junctions*), lo que facilita una acción sincronizada sobre la actividad de los diferentes circuitos en los que se integran. (Agüera-Ortiz et al 2006)

3.4 Participación de la P₄ y sus receptores en la conducta sexual

3.4.1 Progesterona y conducta sexual

La progesterona es un componente importante en la regulación de la retroalimentación del ovario en la secreción de gonadotropinas y acelera la pulsabilidad en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en ratas ovariectomizadas (Bauer-Dantoin, 1993). La progesterona actúa a través de la interacción con el RP ya que un antagonista de la progesterona, que se une al RP, como el RU486 puede bloquear los efectos de esta hormona en la secreción de GnRH y de la hormona luteinizante (LH) responsable de la ovulación en los roedores (Simerly, 1996). Se ha reportado que la progesterona aumenta la expresión del gen que codifica para GnRH en el hipotálamo-área preóptica de la rata (Haywood, 1999).

Las implicaciones fisiológicas del conocimiento de la distribución y regulación por estradiol y progesterona de las isoformas del PR son de gran importancia ya que se ha reportado que la progesterona participa en la comunicación mediada por diferentes neurotransmisores entre los que se encuentran las aminas biogénicas que son elementos importantes en las redes neuronales que regulan la

reproducción. El RP se encuentra en neuronas noradrenérgicas del núcleo del tracto solitario durante el ciclo estral (Lu, 1999). La progesterona aumenta tanto la expresión del RNA mensajero como la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa que participa en la síntesis de la serotonina (Arbogast, 1993), así como de la enzima tirosina hidroxilasa la cual sintetiza dopamina y noradrenalina en el hipotálamo (Fenelon, 1996).

Estos datos sugieren que la progesterona participa en la modulación de la liberación de neurotransmisores como la dopamina y la noradrenalina, los cuales permiten la secreción de GnRH y ésta a su vez aumenta la síntesis de LH permitiendo la liberación del óvulo. Se ha reportado también que en el hipotálamo de la rata la progesterona aumenta la expresión del gen que codifica para el receptor a receptor al ácido γ -amino-butírico A (GABA_A) (Frye, 2000), así como de la descarboxilasa del ácido glutámico, enzima responsable de la producción de GABA (Beyer-González Flores, 1997), aumentando la síntesis de GnRH.

En los roedores el despliegue de la conducta sexual requiere de la actividad coordinada de diversas regiones del SNC. Sin embargo la exposición al estradiol y a la progesterona de algunos de estos núcleos cerebrales como el núcleo ventromedial (VMH) y el núcleo arcuato en el hipotálamo es suficiente para que se lleve a cabo la postura receptiva femenina o conducta de lordosis (Etgen, 1999). En el hipotálamo, las células del VMH y el área preóptica medial (MPOA) son los mayores sitios de la facilitación de la lordosis por estradiol y progesterona (Ogawa, 1994). El despliegue de la conducta sexual en la rata hembra requiere la activación del RP en el hipotálamo, ya que la aplicación hipotalámica (Mani, 1994) o intraventricular (Coirini, 1992) de oligonucleótidos antisentido del RP reduce la conducta de lordosis, así como las conductas proceptivas en animales tratados con estradiol y progesterona. Esta a través de la interacción con sus receptores puede regular la síntesis de diversos neurotransmisores como la dopamina, la noradrenalina, la somatostatina y la oxitocina, así como de sus receptores (Tetel, 2000) los cuales son fundamentales para que exista una adecuada estimulación en el hipotálamo de la rata y se lleve a cabo el despliegue de la conducta sexual

3.4.2 Receptores a progesterona y conducta sexual

Debido a que el estradiol y la progesterona tienen influencias muy predecibles en la conducta sexual femenina, la regulación de este sistema provee un modelo fisiológicamente relevante con el cual investigar como los procesos celulares de E₂, P₄ y otros factores actúan sobre el cerebro e influenciar la función neuronal y conductual a través de estos procesos. (Fig. 10) (Blaustein, 2003)

Generalmente, cuando los niveles de RP están elevados, los animales responden la P₄ expresando conducta sexual, y cuando están reducidos, ya sea por interferencia con el receptor, por la ausencia de estradiol o por una regulación descendente de la misma P₄, los animales son hiposensibles o no responden a ella. (Blaustein, 2003)

4. Planteamiento del problema

Las evidencias experimentales sobre la regulación de la expresión de las isoformas de RP tanto a nivel mensajero como de la proteína en el SNC, indican mecanismos de regulación tejido-específicos, que varían de acuerdo a las condiciones hormonales presentes en los mamíferos. En el hipotálamo de la rata, se conoce el papel del RP sobre la regulación de expresión de genes que participan en la modulación de funciones reproductivas como la ovulación y la conducta sexual, sin embargo se desconoce cual de las isoformas del RP participa en la modulación de estas funciones.

El conocimiento acerca del papel de las isoformas del RP en funciones reproductivas es fundamental para llegar a establecer los mecanismos por los cuales la P₄ ejerce sus efectos en el hipotálamo y el área preóptica a través de la interacción con sus receptores, por la regulación génica que ejercen en estos tejidos. A partir de esto se pretende:

Estudiar el efecto de cada una de las isoformas sobre la lordosis, mediante pruebas de conducta sexual.

Investigar, de manera indirecta, la relación de cada una de las isoformas de RP sobre la expresión de algunos genes como Th y GAD, que participan en la ovulación y la conducta sexual a nivel traduccional en el hipotálamo de las ratas hembra, utilizando la técnica de Western blot.

5. Hipótesis

En base a la información anterior se espera bloquear la traducción del RP total y de la isoforma B por la inyección de oligonucleótidos antisentido en el tercer ventrículo, disminuyendo el contenido de las isoformas del RP, en el hipotálamo de ratas ovariectomizadas tratadas con estradiol y progesterona.

En el mismo sentido, se plantea que la inhibición de la traducción de la isoforma B del RP en el hipotálamo de la rata, disminuya el coeficiente de lordosis, por lo que se espera que la isoforma B del RP participe en la regulación de la expresión de los genes de la tirosina hidroxilasa (TH) y de la ácido glutámico descarboxilasa (GAD) que son fundamentales en la ovulación y el despliegue de la conducta sexual.

6. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es conocer el efecto de los desoxinucleótidos (ODNs) antisentido de las isoformas del RP sobre el despliegue de la conducta sexual y los mecanismos implicados en el hipotálamo de la rata.

De ello se desprende determinar los efectos de los ODNs sobre la expresión de las isoformas del receptor a progesterona, así como evaluar las repercusiones sobre la conducta sexual de las ratas ovariectomizadas con tratamientos hormonales suplementarios.

Además, se pretende averiguar los efectos de los ODNs, a nivel proteína, sobre la expresión de la Tirosina Hidroxilasa y la Acido Glutámico Descarboxilasa en el hipotálamo de las ratas ovariectomizadas tratadas con E₂ y P₄.

Finalmente, establecer la relación entre el bloqueo de la síntesis de las isoformas del RP, la expresión de TH y GAD y la conducta sexual que muestren los animales durante los tratamientos.

7. Materiales y métodos

7.1 Animales

Se utilizaron ratas hembras de 240 a 260g de peso de la cepa Sprague-Dawley, las cuales se mantuvieron a 23 ± 2 °C con un ciclo invertido de luz-obscuridad (14h de luz, 10h de obscuridad), la fase de luz fue desde las 20:00 hasta las 10:00 hrs. Todas las pruebas se hicieron 1 hr después de apagada la luz. Fueron alimentadas y provistas de agua *ad libitum*.

En cada uno de los tratamientos se utilizaron 5 grupos con 8 animales cada uno.

7.2 Ovariectomía

Para la ovariectomía, se anestesiaron los animales con éter, seguido de la eliminación del pelo en la zona lumbar en cada costado. Se ligó el útero y se extirparon los ovarios. Se suturaron las heridas y finalmente se les inyectó antibiótico (Pentrexil) vía intramuscular.

7.3 Implantación de cánulas de microinyección por estereotaxia

Dos semanas más tarde, los animales fueron anestesiados con xilazina (4 mg / kg) y ketamina (80 mg / kg); se colocaron en el aparato estereotáxico (David Kopf; Tujunga, CA.) para la implantación de una cánula de acero inoxidable del no. 5 (22 g, 17 mm de largo) en el ventrículo lateral derecho, el punto de intersección es entre la sutura sagital y la frontoparietal (punto Bregma). Las coordenadas estereotáxicas utilizadas para la implantación de la cánula guía fueron: 1.4mm lateral, - 0.80mm posterior y 3.9mm vertical desde la superficie del cráneo (Paxinos ,1989) (Fig. 11) por último se colocaron dos tornillos de acero inoxidable (Small Parts; Miami Lakes, FL.) en el cráneo y el dispositivo se fijó con cemento dental. Una cánula de menor calibre (30 g), con capucha fue introducida en la cánula guía para prevenir la obstrucción y la contaminación.

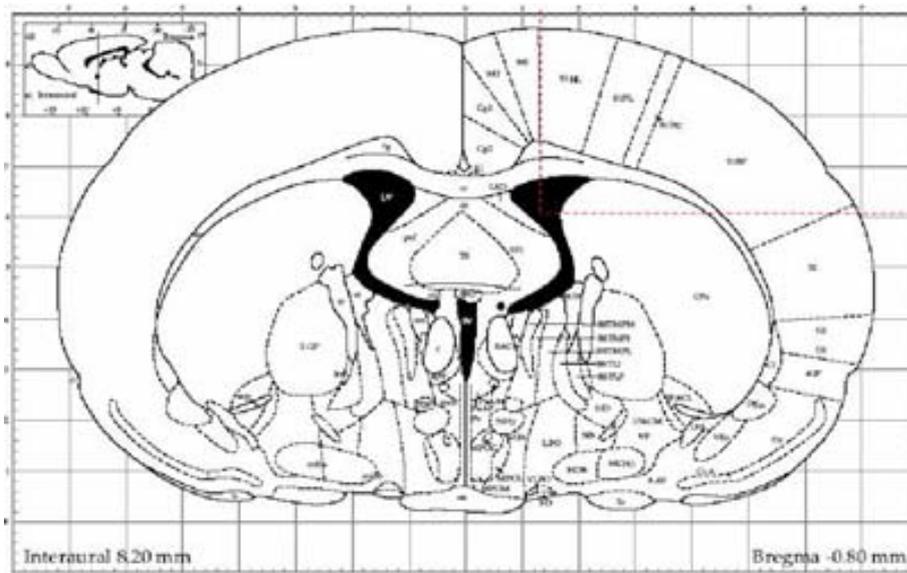


Figura 11. Coordenadas estereotáxicas utilizadas para la implantación de la cánula guía en el ventrículo lateral (LV) las cuales fueron: 1.4mm lateral, -0.80mm posterior y 3.9mm vertical desde la superficie del cráneo (Paxinos y Watson, 1986)

Después de la implantación de cánula se inyectó vía intramuscular penicilina (22.000 UI/kg) y se suturó la herida. Los animales se dejaron en recuperación en

cajas individuales de acrílico durante siete días. Durante los primeros tres días post cirugía se les administró antibiótico en el agua de beber (Baytril, Bayer).

7.4 Diseño de los oligonucleótidos antisentido (ODNs)

Las secuencias del RNAm para las isoformas del RP se buscaron en PubMed y a partir de ellas se diseñaron los oligonucleótidos con el programa Primer 3 (V.0.3.0).

Tabla 3. Regiones del RP que se utilizaron para el diseño de los oligonucleótidos sentido y antisentido.

Oligonucleótidos	Secuencia
Sentido PR A+B	5'-CTCCTGGATGAGCCTGATGGTG-3'
Anti Sentido PR A+B	5'-CACCATGCCCCGCCAGGATCTTG-3'
Sentido PR-B	5'-CTGAGCTGCAGGCAAAGGAT-3'
Anti Sentido PR-B	5'-AGCTCTGGGATTTCTGCTTCTT-3'

* Los oligos se procesaron con INVITROGEN

7.5 Esquema hormonal

Dos semanas después de la ovariectomía se administraron vía subcutánea: Benzoato de estradiol (EB) (Sigma), 5 µg por 2 días consecutivos (5 mg/0.1 ml en aceite de cártamo).

En el día 3, EB en el mismo esquema anterior, seguido de 130ng progesterona (P) (Sigma), vía intracerebroventricular (ICV) disuelto en aceite de cacahuate.

Tanto las dosis de estradiol y progesterona como el esquema de tratamiento han sido utilizados en diversos trabajos sobre la regulación del RP en homogenados de distintas regiones cerebrales (Camacho-Arroyo, 1998; McLusky 1978; Vongher 1999).

En cada uno de los tratamientos hormonales se les administró en el segundo día de tratamiento vía la cánula implantada:

1. Solución Salina (Control)
2. Oligonucleótidos sentido para el RP total (4 nmol) (S A+B)
3. Oligonucleótidos antisentido para el RP total (4 nmol) (As A+B)
4. Oligonucleótidos sentido para la isoforma B (4 nmol) (S B)
5. Oligonucleótidos antisentido para la isoforma B (4 nmol) (As B)

Los ODNs fueron disueltos en solución salina. Todas las microinyecciones se aplicaron en un volumen total de 1 µl durante 5 minutos, utilizando una cánula de inyección de acero inoxidable calibre 32, los animales fueron observados durante una hora a partir de la microinyección para evaluar que no hubiera alteraciones en la conducta y capacidad motora. (Fig. 12)

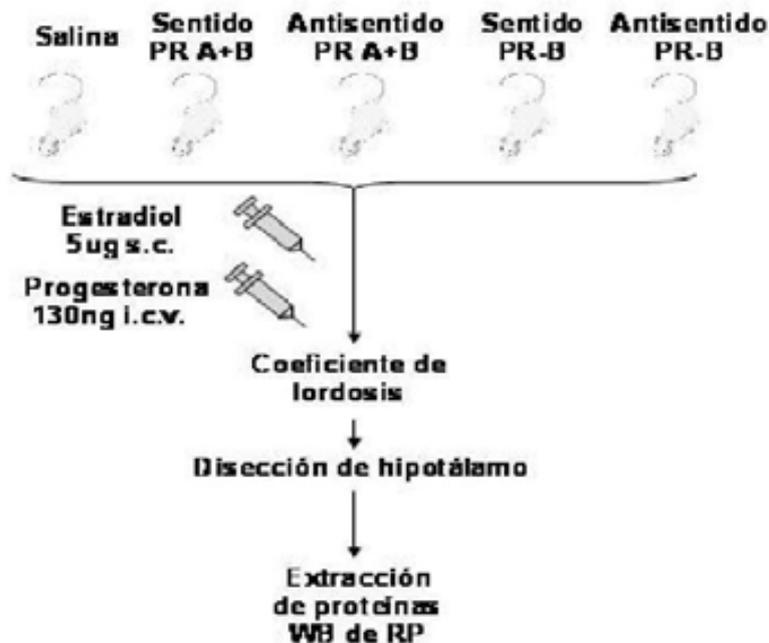


Figura 12. Esquema de tratamiento hormonal y de ODNs sentido y antisentido. El estradiol fue administrado vía subcutánea y la progesterona al igual que los ODNs vía intracerebroventricular.

7.6 Pruebas de conducta sexual

Cuatro horas después de la administración de progesterona, los animales fueron sometidos a pruebas de conducta sexual. Colocando a las hembras en un escenario circular de Plexiglas (53 cm de diámetro) con un macho vigoroso. El cociente de lordosis [$LQ = (\text{número de lordosis}/10 \text{ montas}) \times 100$] se utilizó para evaluar el comportamiento receptivo.

La lordosis es un comportamiento donde las hembras de roedores, gatos, conejos y primates realizan un arqueamiento del dorso y una elevación de la pelvis, frecuentemente acompañada de una desviación de la cola que facilita la receptividad. Solo se utilizaron los animales que exhibieron altos niveles de lordosis.

La conducta receptiva de cada rata fue observada durante 10 min. en presencia de un macho, anotada y registrada a los minutos 30, 60 y 120. La conducta receptiva fue medida al evaluar

1. el número de lordosis
2. aceptación del macho por la hembra
3. número de montas por el macho y coeficiente de lordosis (LQ)

7.7 Obtención del tejido

24 horas después del último tratamiento las ratas fueron sacrificadas por decapitación, rápidamente se abrió el cráneo con cuidado de no lastimar el tejido encefálico, una vez extraído se puso en una caja Petri sobre hielo con un filtro de

papel humedecido con Buffer de TBS en concentración 1X *(anexo), el tejido que se separó para este estudio fue el Hipotálamo (Ht) (Paxinos, 1989), las muestras se pusieron rápidamente en tubos Eppendorf de 1.5 ml y preservados en hielo seco para evitar la degradación y se almacenaron en congelación a -72°C.

7.8 Extracción y cuantificación de proteínas

Se homogenizaron los tejidos en buffer de lisis (PIK) con un coctel de inhibidores de proteasas *(anexo) en una concentración de 1:1000 y en una relación de 1 ml de buffer/1 g de tejido a 4°C. Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 15,000 rpm, durante 15 min., a 4°C y se recuperó el sobrenadante, que es la fracción donde se encuentran las proteínas. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) y leída en un espectrofotómetro (Thermo spectronic Genesis 20) a una longitud de onda de 590λ.

7.9 Western Blot

Para obtener las muestras a la concentración necesaria, se calculó el volumen en el cual se cargan 30µg de proteínas en cada uno de los pozos de los geles de acrilamida *(anexo). Cada muestra se preparó con Buffer de carga (LB) 5X *(anexo), con su fracción de la muestra y agua bidestilada; las proteínas se hirvieron durante 5 minutos para desnaturalizarlas. Después, se separaron por electroforesis en los geles desnaturalizantes al 10% a 110 volts durante 150 minutos aproximadamente.

Las proteínas, ya separadas por peso molecular en el gel, fueron transferidas a membranas de polivinilfluoridona (PVDF) (Millipore) a 20 volts, durante 1 hora en una cámara de transferencia semi húmeda (Bio-Rad, Trans Blot sd, semi-dried). Posteriormente, las membranas fueron teñidas para una primera inspección con solución Rojo Ponceau *(anexo), bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente con una solución de bloqueo al 5% *(anexo). Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios, dependiendo de la proteína que se fuera a detectar.

Terminada la incubación primaria, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween *(anexo) 3 veces por 5 minutos. Después, fueron incubadas durante 60 minutos con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.

Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (GE Healthcare, Piscataway, NJ) para determinar la presencia de las proteínas. Con este sistema, se genera una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico utilizando un equipo Scan HP y el programa Kodak 1D para cuantificar la expresión de las proteínas de acuerdo a la presencia e intensidad de cada banda.

Tabla 4. Relación de anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Anti Acido Glutámico Descarboxilasa (Anti-GAD) monoclonal (Chemicon)	Mouse (Santa Cruz)
Anti Tirosina Hidroxilasa (Anti-TH) monoclonal (Chemicon)	Mouse (Santa Cruz)
Anti Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (Anti-GAPDH) monoclonal (Chemicon)	Mouse (Santa Cruz)

Los anticuerpos primarios fueron utilizados en proporción 1:1,000 y los secundarios en 1:10,000 diluidos en TTBS.

7.10 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del Western blot fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de un análisis *post hoc* con una prueba de Tukey. El Coeficiente de Lordosis y lordosis se analizaron con una prueba de U de Mann-Whitney y la conducta preceptiva de los animales se analizó con una prueba exacta de Fisher. Las variables independientes fueron los tratamientos con los oligonucleótidos sentido y antisentido (control, SA+B, ASA+B, SB y ASAB), las variables dependientes fueron la conducta de lordosis y el contenido de proteína (RP-A y RP-B). Para calcular los valores de probabilidad se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph pad, CA). Para todas las pruebas estadísticas se consideró una significancia de $P < 0.05$.

8. Resultados

Cociente de Lordosis

La infusión de EB y P, estimuló el comportamiento sexual de las ratas en las pruebas de lordosis a diferentes tiempos. Se observó respuesta sexual 30 min. después de su inyección, mientras que el valor máximo del cociente de lordosis fue observado a 120 min. (Fig. 13)

Los parámetros de lordosis permanecieron esencialmente sin cambios a 240 min. en el caso del grupo control.

También se pudo ver el efecto de los ODNs sobre el cociente de lordosis. La inyección del S A+B no modificó significativamente el comportamiento inducido por progestágenos, mismo comportamiento que se observó en el grupo de administración del S B.

En contraste, el As A+B bloqueó, de manera significativa, la lordosis durante toda la prueba. El As B también inhibió la lordosis aunque con menos eficacia que el caso anterior. Los efectos del As B no fueron estadísticamente diferentes en comparación a los observados con el As A+B.

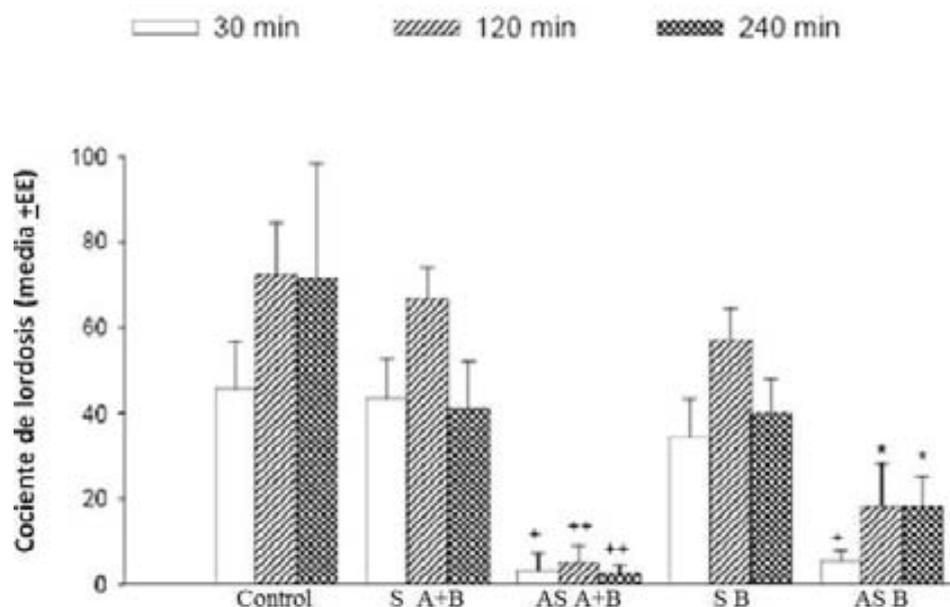
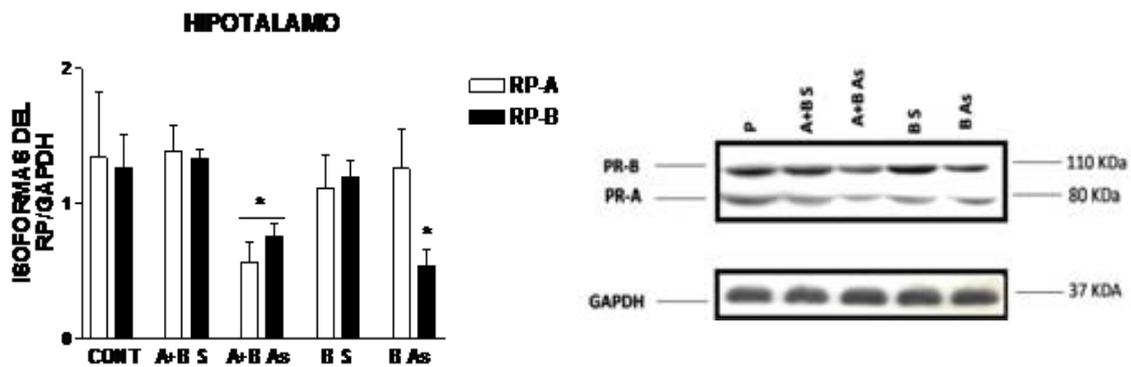


Figura 13. El cociente de facilitación de lordosis en ratas ovariectomizadas, tratadas con EB al suministrar P se antagoniza con la infusión ICV de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de antisentido PR A+B (A + B As) o antisentido PR B (B As), mientras que el sentido PR A+B (A + B S) o el sentido PR B (B S) no influyeron en el LQ inducida por P. Todos los ODNs se administran en el ventrículo lateral derecho del hipotálamo, inmediatamente antes y 24 horas más tarde de la administración de EB. El comportamiento sexual se puso a prueba 30 (blancas), 120 (líneas) y 240 (cuadrícula) minutos. ++ $P < 0,001$; + $P < 0,01$; * $P < 0,05$ vs grupos de control (progestinas más solución salina).

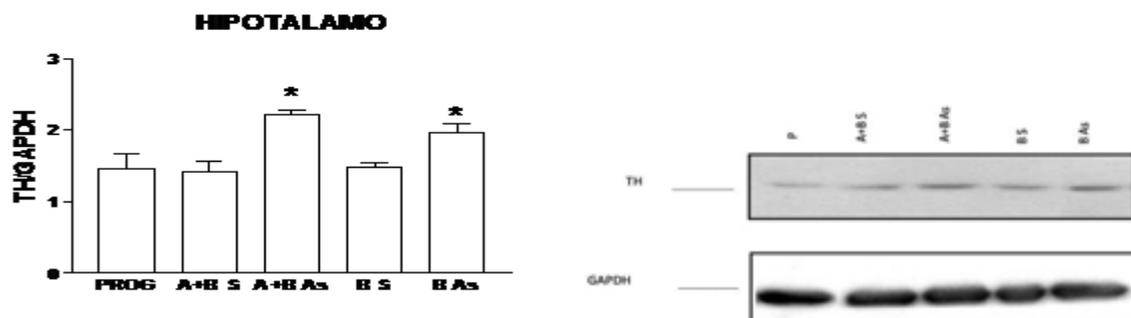
Contenido de proteínas

En la caracterización de las isoformas del RP, en todos los tratamientos con ODNs se detectaron dos bandas de 110 y 80 KDa correspondientes a RP-B y a RP-A. La gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como un control de carga de proteínas y se reconoció como una banda de 37 kDa.

A)



B)



C)

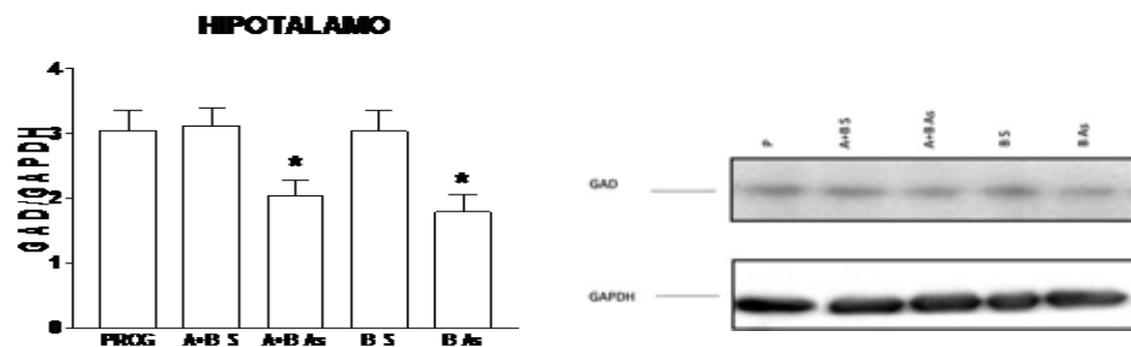


Figura 14. Análisis densitométrico e imágenes de Western Blot de A) las isoformas del RP, B) Tirosina Hidroxilasa C) Descarboxilasa del ácido glutámico, en el hipotálamo de ratas tratadas con distintos ODNs. GAPDH sirve como proteína de control.

Se observó que con la inyección de los ODNs S A+B y S B no se modificaron los contenidos de las isoformas de PR, mientras que con As A+B hubo un marcado decremento en la cantidad de ambas isoformas. Con la administración de As B solo disminuyó el contenido de la isoforma B. (Fig. 14)

En el caso de las otras proteínas que se estudiaron en este trabajo se tiene a la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) que es el paso limitante en la conversión de ácido glutámico en ácido γ -amino-butírico, cuyas cantidades no se vieron modificadas de manera significativa en los tratamientos con S A+B y S B respecto a las ratas control. De la misma forma, las inyecciones de As A+B y de As B arrojaron

una disminución del contenido de la GAD en el hipotálamo de las ratas tratadas; todos estos resultados están en paralelo con los obtenidos para las isoformas de RP. (Fig. 14)

La tirosina hidroxilasa (TH) participa en la síntesis de dopamina, epinefrina y norepinefrina. La progesterona regula la síntesis de la TH por lo que se estudió el papel de las isoformas del RP en la expresión del gen de esta enzima.

Hubo aumento en la expresión de la tirosina hidroxilasa en las ratas a las que se les administró el As A+B y As B, mientras que en las ratas tratadas con S A+B y S B no se observó cambio alguno con respecto al control. (Fig. 14)

9. Discusión

El comportamiento sexual puede ser descrito en términos de dos componentes: 1) la búsqueda de una pareja y el despliegue del cortejo para estimular el interés sexual de la misma, que está unido al grado de motivación; 2) el denominado comportamiento *consumatorio*, el cual incluye el despliegue del comportamiento que conduce al apareamiento: adopción de una postura de la hembra y la intromisión y eyaculación del macho.

La receptividad sexual consiste en aquellos comportamientos que permiten la copulación y en varias especies, incluyen la inmovilidad. En roedores, conejas, gatas y primates, la hembra adopta la postura de lordosis, la cual es un arqueo reflexivo del lomo y una elevación de la pelvis, frecuentemente acompañada por desviación de la cola. Esta postura es el parámetro utilizado comúnmente para cuantificar el comportamiento sexual en las hembras. Esta postura facilita la inserción peneana intravaginal y eventualmente la eyaculación. (Moralí, 1999).

El despliegue de la conducta sexual es presenta generalmente en las hembras sólo en un corto periodo durante el ciclo estral, cerca de la ovulación. En todas las especies, la expresión de la conducta sexual es precedida por un incremento en las concentraciones de estradiol en plasma. Un agudo tratamiento con estradiol en animales ovariectomizados induce este comportamiento, de cualquier forma en la mayoría de los casos es necesaria la combinación de progesterona con estradiol. (Fabre-Nys, 1998)

El sitio de acción de las hormonas esteroideas puede ser inferido por la observación de la localización de sus receptores. En los vertebrados que han sido estudiados y en ambos sexos, el receptor es encontrado en el hipotálamo y en el área preóptica. Las áreas entre las hembras y los machos varían, pero son marcadamente similares a través de las especies. El comportamiento sexual femenino es más eficientemente estimulado por estradiol cuando es administrado en la parte ventrolateral del hipotálamo mediobasal (VHM), mientras que el área preóptica medial es el sitio más eficiente para estimular el comportamiento sexual masculino. Se ha reportado que en las hembras, el estradiol y la progesterona son los principales componentes para la estimulación de la conducta sexual. (Fabre-Nys, 1998)

El bloqueo de la síntesis de una proteína al administrar ODNs, se logra por la unión de éstas secuencias al RNAm a partir del cual esa proteína es normalmente sintetizada. En los experimentos, se observa una disminución en la síntesis de ambas isoformas del RP al aplicar ODNs As A+B y de la isoforma B al administrar As B respectivamente, en comparación a las ratas control y las que recibieron los ODNs sentido; esta información es congruente con los resultados de cociente de lordosis, en donde se manifiesta una menor conducta sexual con esos mismos tratamientos.

Los resultados de las pruebas de lordosis, demuestran que las ratas tratadas con As A+B y As B presentaron una disminución significativa en el cociente con respecto a

las tratadas sólo con progesterona y las tratadas con los ODNs sentido. Se observó menor lordosis en las ratas administradas con el As A+B con respecto a las ratas tratadas con el As B. Estos resultados sugieren que la presencia del RP en el hipotálamo es necesaria para el despliegue de la conducta sexual en las ratas hembras, y que la isoforma B tiene un rol preponderante sobre la isoforma A. (Guerra-Araiza, 2000)

Otro de los objetivos de este trabajo fue, conocer el efecto de las isoformas del RP, mediante el uso de los ODNs antisentido, sobre la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en el hipotálamo de ratas ovariectomizadas, ya que en ésta región cerebral se regula parte del despliegue de la conducta sexual de la rata mediada por la progesterona. (González-Flores, 2004).

Las implicaciones del conocimiento de la distribución y regulación de las isoformas del PR son de gran importancia, ya que se ha reportado que la progesterona participa en la comunicación mediada por diferentes neurotransmisores que son importantes en las redes neuronales que regulan la reproducción. La progesterona aumenta tanto la expresión del RNAm como la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa que participa en la síntesis de la serotonina, así como de la tirosina hidroxilasa la cual sintetiza dopamina y noradrenalina en el hipotálamo.

La TH cataliza, en un paso limitante, la conversión de tirosina a dopa, precursor de la DA y otras catecolaminas. La progesterona regula la expresión de TH, y en consecuencia la síntesis de DA. Existe evidencia de que este neurotransmisor inhibe la receptividad sexual en el hipotálamo de la rata hembra. (Mani, 2001; McGinnis, 1980).

Por estudios anteriores se sabe que la fosfoproteína DARPP-32 es reguladora de dopamina y cAMP, la cual está asociada con neuronas relacionadas al receptor de dopamina subtipo D₁. (Mayerhofer, 1999) La DA con su receptor inducen un incremento en los niveles de adenosina 3'-5' monofosfato (cAMP), y activa a la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA). La DARPP-32 es fosforilada por PKA. En estado fosforilado ésta molécula por inhibición de la actividad de la fosfatasa-1 (PP1), incrementa el estado de fosforilación de varios substratos, iniciando así varias respuestas fisiológicas. (Mani, 2000)

La progesterona incrementa la fosforilación de DARPP-32 por activación de PKA en neuronas del hipotálamo, resultando en un aumento en la lordosis. Se ha observado que la lordosis facilitada con progesterona fue reducida con oligonucleótidos antisentido para DARPP-32 en ratas, ya que la DARPP-32 inhibe la actividad de PP-1 dando como resultado la fosforilación de los substratos de ésta molécula y es probable que la fosforilación del RP o sus coactivadores asociados sean modulados por DARPP-32. (Mani, 2000, Mayerhofer, 1999)

Los datos obtenidos sugieren que la interacción de la progesterona con RP-B podría participar en la regulación de la lordosis mediada por la proteína DARPP-32 en el hipotálamo de la rata.

Los experimentos muestran, disminución de lordosis, ante el bloqueo de traducción de GAD y a la vez, menor síntesis y actividad de GABA. De este modo a mayor cantidad de GAD y actividad de GABA se facilita el comportamiento sexual. Esto nos dice que la baja actividad de GABA se traduciría en un aumento de DA, mientras que GABA tiene alta actividad suprimiendo la acción de DA. Se ha reportado que los agonistas de DA inhiben el comportamiento de sexual en las ratas, mientras que los antagonistas facilitan este comportamiento. (McGinnis, 1980) Nuestros resultados indican una baja en los niveles de HT, asociado con un cociente mayor de lordosis, mientras que un descenso en los niveles de GAD, resulta en una menor expresión de conducta sexual.

Es importante mencionar que las hormonas no *activan* la conducta de lordosis, sino que el medio hormonal determina la probabilidad de que los animales desplieguen esta conducta en respuesta a la estimulación sensorial apropiada (Etgen, 1999). De esta manera, las vías aferentes y los componentes moleculares post-sinápticos como por ejemplo los canales iónicos, receptores a neurotransmisores y las enzimas que sintetizan a los neurotransmisores son candidatos blanco sobre los cuales las hormonas pueden actuar para regular la lordosis.(Pfaff, 1994).

10. Conclusiones

Los oligonucleótidos antisentido administrados vía ICV redujeron la traducción de las isoformas del RP en el hipotálamo de manera significativa y de forma específica, el ODN As B sólo redujo la expresión de RP-B sin afectar la expresión de RP-A, mientras que el As A+B actuó sobre ambas isoformas.

La presencia del RP en el hipotálamo es necesaria para el despliegue de la lordosis, y es mediada principalmente por la isoforma B.

La interacción de la progesterona con RP-B podría participar en la regulación de la lordosis mediada por la proteína DARPP-32 en el hipotálamo de la rata.

Estos resultados sugieren que la isoforma B del receptor a progesterona ejerce un efecto inhibitor sobre la expresión de TH y un efecto promotor en la síntesis de GAD en el hipotálamo, con la consecuente inhibición o promoción de conducta sexual, respectivamente.

11. Anexo

❖ BUFFER DE TBS 10X, pH 7.5

Tris-Base 60.5g

NaCl 87.6g

Se pone en agitación con agua destilada y se ajusta el pH con HCl. Se afora a 1lt.

❖ BUFFER DE CORRIDA 10X

Tris-Base 29g

Glicina 144g

SDS 10g

Se pone en agitación con agua destilada y se afora a 1lt.

❖ TBS TWEEN (TTBS)

TBS 1X 1000ml

TWEEN 20 1ml

❖ BUFFER DE CARGA 5X (LB5X)

SDS 20g

Glicerol 100 ml

Dithiothreitol(DTT) 15.4g

Tris 0.5M pH 8.5 26 ml

Azul Bromofenol 0.1g

Poner en agitación y aforar con agua destilada a 200 ml.

❖ BUFFER TRANSFERENCIA 10X

Tris-Base 29g

Glicina 144g

❖ BUFFER DE TBS 1X, pH 7.5

Se toman 100 ml de TBS 10X, pH 7.5 y se afora a 1lt. con agua destilada.

❖ BUFFER DE CORRIDA 1X

Se toman 100ml de Buffer de Corrida 10X y se afora a 1 lt. con agua destilada

❖ SOLUCION DE BLOQUEO

Para dos membranas. 2.5g de leche descremada en polvo en 50 ml de TTBS 1X

❖ BUFFER LISIS PROTEÍNAS (PIK)

NaCl 1.75g

Tris HCl 0.485g

EDTA stock 0,5M 2 ml

Se ajusta el pH a 7.4

Glicerol 10% 20 ml

NP 40 1% 2 ml

Se afora a 200ml con agua desionizada
Los inhibidores de proteasas Leupeptina, Pepstatina, Aprotinina se utilizan en proporción 1:1000 con el Buffer de Lisis de Proteínas

❖ BUFFER TRANSFERENCIA 1X

Se toman 100ml de Buffer de Transferencia 10X y se afora a 1 lt. con agua destilada

SDS 2g
 Se pone en agitación con agua destilada y se afora a 1lt.

❖ **SOLUCIÓN ROJO PONCEAU**

Ácido Acético concentrado 5ml
 Agua destilada 95ml
 Rojo Ponceau 0.1g

❖ **PERSULFATO DE AMONIO**

Persulfato de Amonio (APS) 0.1g
 Agua destilada 1ml

❖ **GEL DE POLIACRILAMIDA**

El gel tiene dos partes: Stacking (concentrante) y Resolving (separador)

RESOLVING (100ml) dependiendo el tamaño de las proteínas

Tamaño de la proteína (Kda)	14	15-70	20-100	50-250	>250
% Gel	14%	12%	10%	8%	7%
Glicerol 50%	20ml	20ml	20ml	20ml	20ml
H ₂ O	8.33ml	15ml	21.68ml	28.33ml	31.66ml
Tris 1,5M pH 8,8	25ml	25ml	25ml	25ml	25ml
Bisacrilamida 30%	46.66ml	40ml	33.32ml	26.66ml	23.33ml
SDS 10%	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

STACKING (100 ml)

H₂O 61ml
 Tris 0,5M pH 6,8 25ml
 Bisacrilamida 30% 13ml
 SDS 10% 1ml

RESOLVING (para dos geles)

Resolving 15 ml
 APS 150 µl
 TEMED 15 µl

STACKING (para dos geles)

Resolving 7 ml
 APS 90 µl
 TEMED 9 µl

12. Referencias

1. Agüera-Ortiz L. *Psiquiatría Geriátrica*. Elsevier-Masson. 2006
2. Arrieta I, Diaz-Ibañez LB, Morales T, Mendoza-Garces L, Morimoto S, Moreno-Mendoza N, Carbon MA. 2003. Progesterone receptor gene and protein expression in the anterior preoptic area and hypothalamus of defeminized rats. *J Neurobiol*. 56:338-46.
3. Backstrom T, Andreen L, Birzniece V, Bjorn I, Johansson IM, Nordenstam-Haghjo M, Nyberg S, Sundstrom-Poromaa I, Wahlstrom G, Wang M, Zhu D. 2003. The role of hormones and hormonal treatments in premenstrual syndrome. *CNS Drugs*. 17:325-42
4. Backstrom T, Zetterlund B, Blom S, Romano M. 1984. Effects of intravenous progesterone infusions on the epileptic discharge frequency in women with partial epilepsy. *Acta Neurol Scand*. 69:240-8.
5. Baulieu EE. 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res*.52:1-32
6. Beato M. 1987. Induction of transcription by steroid hormones. *Biochem Biophys Acta* 910:95-102.
7. Beato M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 56:335-44.
8. 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.
9. Bethea CL, Lu NZ, Gundlah C, Streicher JM. 2002. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin neural system. *Front. Neuroendocrinol*. 23:41-100.
10. Beyenburg S, Stoffel-Wagner B, Bauer J, Watzka M, Blumcke I, Bidlingmaier F, Elger CE. 2001. Neuroactive steroids and seizure susceptibility. *Epilepsy Res*. 44:141-53.
11. Blaustein J. Progesterone receptors, neural integrators of hormonal and environmental stimulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1007: 238-250. 2003
12. Bramley T. 2003. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 125:3-15.
13. Camacho-Arroyo I, González-Arenas A, González-Aguero G, Guerra-Araiza C, González-Moran G. 2003. Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 136:447-52.
14. 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.
15. Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 1998; 9:3993-6.
16. 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.

17. Camacho-Arroyo I, Mendez-Cruz ST, Guerra-Araiza C, Cerbon MA. 1998. Changes in progesterone receptor mRNA content in the rabbit lung during early pregnancy and after sex steroid hormone treatment. *J. Endocrinol.* 157:71-74.
18. Camacho-Arroyo I, Neri-Gómez T, González-Arenas A, Guerra-Araiza C. 2005. Changes in the content of steroid coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors in the rat brain during estrous cycle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* in press.
19. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Cerbón MA. 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci. Lett.* 214:25-8.
20. 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.
21. Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. 1994. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. *J. Endocrinol.* 142:311-316.
22. Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Guerra-Araiza C. 2002. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology.* 76:267-71.
23. 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.
24. Cervantes M, Gonzalez-Vidal MD, Ruelas R, Escobar A, Morali G. 2002. Neuroprotective effects of progesterone on damage elicited by acute global cerebral ischemia in neurons of the caudate nucleus. *Arch Med Res.* 33:6-14.
25. Chabbert-Buffet N, Skinner DC, Caraty A, Bouchard P (2000) Neuroendocrine effects of progesterone. *Steroids* 65: 613-620
26. Chambrud 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.
27. Charkoudian N, Johnson JM. 2000. Female reproductive hormones and thermoregulatory control of skin blood flow. *Exerc Sport Sci Rev.* 28:108-12
28. 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.
29. Clarke PB. 1993. Ovarian steroid hormone receptors and their mechanism of action: In: *Molecular aspects of placental and fetal Autacoids*. Rice GE, Brennecke SP (eds). CRP Press, Inc., Boca Raton, FL, pp 27-54.
30. Clemm DL, Macy BL, Santiso-Mere D, McDonnell DP, 1995. The critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol* 53:487-495.
31. 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.
32. Duffy MD, Wells TR, Haluska JG, Stouffer RL, 1997. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod* 57:693-699.
 33. Engel SR, Grant KA. 2001. Neurosteroids and behavior. *Int Rev Neurobiol.* 46:321-48
 34. Etgen AM, Chu HP, Fiber JM, Karkanas GB, Morales JM. 1999. Hormonal integration of neurochemical and sensory signals governing female reproductive behaviour. *Behav Brain Res*;105:93-103
 35. Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240:889-95
 36. Fabre-Nys C. 1998. Steroid control of monoamines en relation to sexual behavior. *Reviews of Reproduction.*, 3:1-41
 37. Francis K, Meddle SL, Bishop VR, Russell JA. 2002. Progesterone receptor expression in the pregnant and parturient rat hypothalamus and brainstem. *Brain Res.* 927:18-26.
 38. Freeman EW. 2002. Current update of hormonal and psychotropic drug treatment of premenstrual dysphoric disorder. *Curr Psychiatry Rep.* 4:435-40.
 39. Freeman ME, 1988. In: The ovarian cycle of the rat. The Physiology of Reproduction.
 40. Friess E, Tagaya H, Trachsel L, Holsboer F, Rupprecht R. 1997. Progesterone-induced changes in sleep in male subjects. *Am. J. Physiol.* 272:E885-91.
 41. 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.
 42. Galea LA, Ormerod BK, Sampath S, Kostaras X, Wilkie DM, Phelps MT. 2000. Spatial working memory and hippocampal size across pregnancy in rats. *Horm. Behav.* 37:86-95.
 43. 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.
 44. 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.
 45. Gómez C, Saldivar-Gonzalez A, Delgado G, Rodriguez R. 2002. Rapid anxiolytic activity of progesterone and pregnanolone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 72:543-50.
 46. González-Arenas A, Neri-Gomez T, Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. 2004. Sexual dimorphism in the content of progesterone and estrogen receptors, and their cofactors in the lung of adult rats. *Steroids.* 69:351-6
 47. González-Arenas A, Reyna-Neyra A, Gómez MJ, Méndez I, Larrieta-Carrasco ME, Haces ML, Jiménez B, Camacho-Arroyo I. 2001. Los mensajeros químicos del

- sistema neuroendocrino. *Educ. Quím.* 3:158-162.
48. 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.
 49. González-Flores O, Guerra-Araiza C, Cerbón M, Camacho-Arroyo I, Etgen AM. The 26S proteasome participates in the sequential inhibition of estrous behavior induced by progesterone in rats. *Endocrinology.* 2004. 145:2328-36.
 50. González-Mariscal G, Melo AI, Beyer C. 1993. Progesterone, but not LHRH or prostaglandin E₂, induces sequential inhibition of lordosis to various lordogenic agents. *Neuroendocrinology.* 57:940-5.
 51. González-Mariscal G. 2001. Neuroendocrinology of maternal behavior in the rabbit. *Horm Behav.* 40:125-32.
 52. 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.
 53. González-Vidal M.D. Cervera-Gaviria, M. Ruelas, R. Escobar, A. Moralí, G. Cervantes, M. 1998. Progesterone: Protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res.* 29:117-124.
 54. Gorosope WC, Freeman ME. 1985. Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion *in vitro*. *Biol. Reprod.* 32:279-83.
 55. Gould E, Woolley CS, Frankfurt M, McEwen BS. 1990. Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci.* 10:1286-91.
 56. Graham JD y Clarke CL. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18:502-519.
 57. 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.
 58. Green IC, Howell SL, El Seifi S, Perrin D, 1978. Binding of 3h-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetol* 15:349-355.
 59. Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, Ahmadi J, Sadun A, Russell CA, Lucci L, Stevenson LL. 1991. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogestone agent mifepristone. *J. Neurosurg.* 74:861-6.
 60. Guerra-Araiza C y Camacho-Arroyo I, 2000 Progesterone receptor isoforms: function and regulation. *Rev. In. Clin.* 52:686-691.
 61. 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.
 62. Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, Camacho-Arroyo I. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Research Bulletin* 2002, 59; 105-109.

63. Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Cerbón MA and Ignacio Camacho-Arroyo. Progesterone receptor isoforms expression in the male rat brain. *Brain Research Bulletin* 2001; 54:13-17.
64. Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Salazar AM, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. 2001. Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. *Brain Res. Bull.* 54:13-17.
65. 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.
66. Guerra-Araiza, et al. 2000. Las isoformas del receptor a progesterona: función y regulación. *Rev Invest. Clin.* 52:686-691
67. Guiochon-Mantel A, Delabre K, Lescop P, Milgrom E. 1994. Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91:7179-83.
68. Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Appianat M, Milgrom E. 1991. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* 10:3851-9.
69. Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Atger M, Perrot-Appianat M, Milgrom E. 1989. Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell.* 57:1147-54.
70. 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.
71. Heinzl T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie Jr, Seto E, Einsenman RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG. 1997. A complex containing NcoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature.* 387:43-48.
72. Herzog AG, Frye CA. 2003. Seizure exacerbation associated with inhibition of Progesterone metabolism. *Ann. Neurol.* 53:390-1.
73. Horwitz KB, McGuire WL. 1975. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids.* 25:497-505.
74. Horwitz KB, McGuire WL. 1978. Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer. Correlation with nuclear processing of estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 253:2223-8.
75. 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.
76. 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
77. 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
78. Ilenchuk T, Walters M. 1987. Rat uterine Progesterone receptor analyzed by [³H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology*. 120:1449-1456.
 79. Ing NH, Beekman JM, Kessler DJ, Murphy M, Jayaraman K, Zendegui JG, Hogan ME, O'Malley BW, Tsai MJ. 1993. In vivo transcription of a progesterone responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic Acids Res*. 21:2789-9276.
 80. 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.
 81. 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 U S A*. 94:7879-84
 82. Kandel E. Principles of neural science. McGraw Hill. 2000.
 83. 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.
 84. 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
 85. Kato J, Hirata S, Nozawa A, Yamada-Mouri N: Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm. Behav*. 1994; 28: 454-463.
 86. Kazmi SM, Visconti V, Plante RK, Ishaque A, Lau C. 1993. Differential regulation of human progesterone receptor A and B form-mediated trans-activation by phosphorylation. *Endocrinology*. 133:1230-8
 87. 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.
 88. Knobil E, Neill J (eds). Raven Press, Ltd, New York, pp1893.
 89. Knobil E. 1988. The hypothalamic gonadotrophic hormone releasing hormone (GnRH) pulse generator in the rhesus monkey and its neuroendocrine control. *Hum. Reprod*. 3:29-31.
 90. Knobil E. 1988. The neuroendocrine control of ovulation. *Hum. Reprod*. 3:469-72.
 91. Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, Weigel NL. 2001. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J. Biol. Chem*. 276: 8475-83.
 92. 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

93. Kraus WL, Montano MM, Katzenellenbogen BS. 1993. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol. Endocrinol.* 7:1603-1616.
94. Lange CA. 2004. Making sense of cross-talk between steroid hormone receptors and intracellular signaling pathways: who will have the last word? *Mol. Endocrinol.* 18: 269-78.
95. Lemon B, Tjian R. 2000. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Develop.* 14:2551-2569
96. 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
97. Li S, Li Y, Carthew RW, Lai ZC. 1997. Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor. *Tramtrack.Cell.* 90:469-78
98. 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.
99. MacLusky MJ, McEwen BS. Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature.* 1978; 274: 276-278.
100. Mahesh V, Brann D, Hendry L. 1996. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 56:209-219
101. Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, Weigel LN. 1997. Differential expression of uterine progesterone receptors forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem. Molec. Biol.* 63:195-202
102. Mani SK, Blaustein JD, Allen JM, Law SW, O'Malley BW. Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology* 1994; 135:1409-1414.
103. Mani SK, et al. 2000. Requirement for DARPP-32 in progesterone-facilitated sexual receptivity in female rats and mice. *Science*; 287:1053-1056
104. Mani SK, Mitchel A, O'Malley BW. 2001. Progesterone receptor and dopamine receptors are required in Δ^9 tetrahydrocannabinol modulation of sexual receptivity in female rats. *PNAS.*, 98:1249-1254
105. Mayerhofer A, et al. 1999. Functional Dopamine-1 receptors and DARPP-32 are expressed in human ovary and granulosa luteal cells in Vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84:257-264
106. McGinnis M, et al. 1980. Influence of γ -aminobutyric acid on lordosis behavior and dopamine activity in estrogen primed spayed female rats. *Brain Research*, 184: 179-191
107. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20:321-344
108. McKenna NJ, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1998. Distinct steady-state nuclear receptor coregulator complexes exist in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:11697-702
109. Melcangi RC, Magnaghi V, Galbiati M, Martini L. 2001. Formation and effects of neuroactive steroids in the central and peripheral nervous system. *Int. Rev.*

110. 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
111. 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.
112. 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
113. Molenda HA, Griffin AL, Auger AP, McCarthy MM, Tetel MJ. 2002. Nuclear receptor coactivators modulate hormone-dependent gene expression in brain and female reproductive behavior in rats. *Endocrinology.* 143:436-44.
114. 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
115. 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
116. Nakayama T, Suzuki M, Ishizuka N. 1975. Action of progesterone on preoptic thermosensitive neurones. *Nature.* 258:80
117. Nilsen J, Brinton RD. 2002. Impact of progestins on estrogen-induced neuroprotection: synergy by progesterone and 19-norprogesterone and antagonism by medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology.* 143:205-12
118. 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
119. Paxinos, G, Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 4th edición, USA, 1989.
120. Pearce PT, Khalid BAK, Funder JW. 1983. Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology.* 113:1287-1291
121. 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
122. 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
123. Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Garcia E, Lorenzo F, Milgrom E. 1988. Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology.* 123:1511-9
124. Perrot-Applanat M, Groyer-picard MT, García E, Lorenzo F, Milgrom E. 1998.

- Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. *Endocrinology*. 123:1511-9
125. Picazo O, Fernández-Guasti A. 1995. Anti-anxiety effects of progesterone and some of its reduced metabolites: an evaluation using the burying behavior test. *Brain Res*. 680:135-41
126. Pierson-Mullany LK, Skildum A, Faivre E, Lange CA. 2003. Cross-talk between growth factor and progesterone receptor signaling pathways: implications for breast cancer cell growth. *Breast Dis*. 18:21-31
127. Pierson-Mullany LK, Lange CA. 2004. Phosphorylation of progesterone receptor serine 400 mediates ligand-independent transcriptional activity in response to activation of cyclin-dependent protein kinase 2. *Mol. Cell Biol*. 24:10542-57
128. 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
129. Quadros PS, Lopez V, De Vries GJ, Chung WC, Wagner CK. 2002. Progesterone receptors and the sexual differentiation of the medial preoptic nucleus. *J. Neurobiol*. 51:24-32
130. Renwick AG. 1970. Metabolism and function of ovarian and testicular hormones. *J Reprod. Fertil Suppl*. 12:55-64
131. Reyna-Neyra A, Camacho-Arroyo I, Ferrera P, Arias C. 2002. Estradiol and progesterone modify microtubule associated protein 2 content in the rat hippocampus. *Brain Res. Bull*. 58:607-12
132. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG, Abel MG, Wolf DM, Horwitz KB. 2002. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem*. 277:5209-5218
133. Richer JK, Lange CA, Manning NG, Owen G, Powell R, Horwitz KB. 1998. Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J. Biol. Chem*. 273:31317-26
134. 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
135. 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
136. 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
137. Rupprecht R. 2003. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*. 28:139-68

138. Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. 2001. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J. Neurosci.* 21:6221-32.
139. Sakamoto H, Ukena K, Tsutsui K. 2002. Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats. *Neurosci. Lett.* 322:111-5
140. 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
141. Sandstrom NJ, Williams CL. 2001. Memory retention is modulated by acute estradiol and progesterone replacement. *Behav. Neurosci.* 115:384-93
142. 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
143. 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.
144. Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E. 1990. Molecular action of progesterone. *Int. J. Biochem.* 22:579-594
145. Schaeffer C, Roos J, Aron C. 1990. Lordosis behavior in intact male rats: effects of hormonal treatment and/or manipulation of the olfactory system. *Horm. Behav.* 24:50-61
146. Schneider JS, Stone MK, Wynne-Edwards KE, Horton TH, Lydon J, O'Malley B, Levine JE. 2003. Progesterone receptors mediate male aggression toward infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:2951-6
147. 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.
148. Schumacher M, Coirini H, Robert F, Guennoun R, El-Etr M. 1999. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav. Brain. Res.* 105:37-52
149. Shen T, Horwitz KB, Lange CA. 2001. Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Mol. Cell Biol.* 21:6122-31
150. 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
151. 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

152. Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and estrogen receptors in the human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. *Hum. Reprod.* 9:1589-1595
153. 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
154. Takimoto G, Horwitz K. 1993. Progesterone receptor phosphorylation-complexities in defining a functional role. *Trends Endocrinol. Metabol.* 4:1-17
155. 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
156. Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J. 2004. Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J.* 23:4813-23
157. Terner C, 1977. Progesterone and progestins in the male reproductive system. *Ann. NY Acad. Sci.* 286:313-320.
158. Topper YJ, Freeman CS. 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* 60:1049-1106
159. 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
160. Turgeon JL, Waring DW. 2000. Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology.* 141:3422-9
161. Tyagi RK, Amazit L, Lescop P, Milgrom E, Guiochon-Mantel A. 1998. Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and ran guanosine triphosphate. *Mol. Endocrinol.* 12:1684-95
162. 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
163. Vallee M, Mayo W, Koob GF, Le Moal M. 2001. Neurosteroids in learning and memory processes. *Int. Rev. Neurobiol.* 46:273-320
164. 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
165. Vongher JM, Frye CA. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 64:777-785.
166. 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

167. Weigel NL. 1996. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.* 319:657-67
168. 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
169. Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:8356-8364.
170. 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
171. Zhang J, Guenther MG, Carthew RW, Lazar MA. 1998. Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev.* 12:1775-80.
172. Zhang X, Jeyakumar M, Bagchi MK. 1996. Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptors. Evidence for common transcriptional coactivator(s). *J. Biol. Chem.* 271:14825-33.
173. 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.
174. 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.
175. 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.
176. Zwain IH y Yen SS. 1999. Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain. *Endocrinology.* 140:880-7
177. Zwain IH, Yen SS, 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* 140:3843-3852