



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DEL PAPEL DEL RECEPTOR A PROGESTERONA EN LA
DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS DE
OLIGODENDROCITOS DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

JUAN CARLOS GONZÁLEZ OROZCO

TUTOR PRINCIPAL:

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Leonor Pérez Martínez
Instituto de Biotecnología, UNAM

Néstor Fabián Díaz Martínez
Instituto Nacional de Perinatología

Ciudad de México, Febrero 2021



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.

Agradecimientos

La presente tesis se realizó en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

A la Dra. Aliesha González Arenas y a la Dra. Marisol De La Fuente Granada, ambas del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por la facilitación de los animales de laboratorio utilizados durante el desarrollo de esta tesis.

Al comité tutor formado por la Dra. Leonor Pérez Martínez y el Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez por su asesoría durante la elaboración de este trabajo.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de una beca para realizar estudios de Doctorado.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por la otorgación de un apoyo económico para la asistencia al congreso "*III Neurobiology Meeting of the Mexican Society for Biochemistry*".

Índice

Lista de abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	4
1. Introducción	5
1.1. Las células oligodendrogiales	5
1.2. La oligodendrogénesis embrionaria	7
2. Antecedentes	11
2.1. Funciones, síntesis y mecanismos de acción de la progesterona	11
2.2. Estructura y función del receptor intracelular a progesterona	16
2.3. Efectos de la progesterona sobre la oligodendrogénesis y la mielinización	19
3. Planteamiento del problema	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	24
6. Materiales y métodos	25
6.1. Animales	25
6.2. Disección de médula espinal embrionaria y cultivos primarios de CPO	25
6.3. Inmunofluorescencia	27
6.4. Extracción de ARN y experimentos de RT-qPCR	28
6.5. Análisis <i>In Silico</i> de potenciales elementos de respuesta a progesterona	29
6.6. Extracción de proteínas y <i>Western Blot</i>	29
6.7. Silenciamiento de la isoforma B del receptor a progesterona mediante la transfección de un ARN pequeño de interferencia (siRNA)	30
6.8. Análisis estadístico	31
7. Resultados	32
7.1. Generación de cultivos primarios de CPO derivados de la médula espinal embrionaria del ratón	32
7.2. La progesterona promueve la proliferación y diferenciación de las CPO embrionarias e incrementa su potencial de mielinización a través del RP	36

7.3. La progesterona regula positivamente la expresión de genes oligodendrogiales	43
7.4. Los efectos oligodendrogénicos de la progesterona se encuentran mediados por el RP-B.	45
8. Discusión	49
9. Conclusiones	57
10. Perspectivas	58
Referencias	59
Anexos	70

Publicaciones derivadas del trabajo de tesis

González-Orozco, J. C., & Camacho-Arroyo, I. (2019). Progesterone actions during central nervous system development. *Frontiers in Neuroscience*, 13,503. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00503>

González-Orozco, J. C., Moral-Morales, A. Del, & Camacho-Arroyo, I. (2020). Progesterone through progesterone receptor B isoform promotes rodent embryonic oligodendrogenesis. *Cells*, 9(4), 960. <https://doi.org/10.3390/cells9040960>

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario.
AF: Función de activación.
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.
ANOVA: Análisis de la varianza.
ARN: Ácido ribonucleico.
CBP: Proteína de unión a CREB.
CICUAL: Comité institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio.
CNP1/CNPasa: 2'3' nucleótido cíclico fosfodiesterasa.
CNTF: Factor neurotrófico ciliar.
CPO: Célula(s) progenitora(s) de oligodendrocitos.
CTN: Célula troncal neural.
DBD: Dominio de unión al ADN.
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium (por sus siglas en inglés).
DMSO: Dimetilsulfóxido.
E.E.M.: Error estándar de la media.
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
EGF: Factor de crecimiento epidérmico.
ERP: Elemento de respuesta a progesterona
FGF2: Factor de crecimiento fibroblástico 2.
FKBP: Inmunofilina de unión a proteínas de choque térmico.
GABA: Ácido gama-aminobutírico.
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial.
HBD: Dominio de unión a hormona.
HSD: Enzima hidroxisteroide deshidrogenasa.
HSP: Proteína de choque térmico.
LDL: Lipoproteína de baja densidad.
MAP2: Proteína asociada a microtúbulos 2.
MBP: Proteína básica de mielina.
mIgGk BP: Proteína de unión a IgG kappa de ratón.
MOCA: Mouse Organogenesis Cell Atlas (por sus siglas en inglés).
MOG: Glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos.
mRPs: Receptores membranales a progesterona.
NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica (EUA).
NCoR: Correpresor de receptor nuclear.
NG2: Neuro-glía 2.
NIH: Institutos Nacionales de Salud (EUA).
Nkx: Proteína homeobox Nkx.
O4: Antígeno glicolípido de superficie de oligodendrocitos.
Olig: Factor de transcripción de oligodendrocitos.

p23: Cochaperona de proteínas de choque térmico.
P4: Progesterona.
P450scc: Enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol.
Pax6: Proteína de caja emparejada 6.
PBS: *Buffer* de fosfatos salino.
PCAF: Factor asociado a P300/CBP.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PDGF α : Receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PKA: Proteína cinasa A.
PKC: Proteína cinasa C.
PLP: Proteína proteolipídica.
PVDF: Fluoruro de polivinilideno.
RIPA: Buffer de lisis de ensayo de radioinmunoprecipitación.
RNA-seq: Secuenciación de ARN.
RP: Receptor a progesterona.
RPM: Revoluciones por minuto.
RT: Transcripción Reversa.
SDS: Dodecilsulfato sódico.
SFB: Suero fetal bovino.
SHH: Sonic hedgehog (por sus siglas en inglés).
siRNA: ARN pequeño de interferencia.
SMRT: Mediador silenciador para receptores de retinoides o de hormonas tiroideas.
SNC: Sistema nervioso central.
SNP: Sistema nervioso periférico.
Sox: Región determinante del sexo Y-box 2.
SRC: Coactivador del receptor de esteroides.
StAR: Proteína reguladora aguda esteroideogénica.
T3: Hormona triyodotironina.
TA: Temperatura ambiente.
TBS: *Buffer* salino Tris.
TSPO: Proteína translocadora de 18 kDa.
U.A.: Unidades arbitrarias.

Resumen

Los oligodendrocitos son las células de la glía responsables de la mielinización del sistema nervioso central (SNC). Este linaje celular se origina durante el desarrollo embrionario del SNC a través de la especificación de las células troncales neurales hacia las células progenitoras oligodendrogiales (CPO), lo cual en el ratón ocurre en la etapa embrionaria E12.5. Una vez que se ha definido este destino celular, las CPO proliferarán para expandirse y migrarán activamente para alcanzar el sitio final en donde madurarán como oligodendrocitos mielinizantes.

Existen estudios que han mostrado que la progesterona promueve la proliferación y diferenciación de las CPO en la vida postnatal temprana a través de la interacción con su receptor intracelular (RP), mientras que en la vida adulta facilita la remielinización en la médula espinal después de haber sufrido alguna lesión. A pesar de esto, se desconoce si la progesterona tiene algún efecto oligodendrogénico sobre las CPO embrionarias, así como las isoformas del RP que podrían ejercer sus efectos en estas células, lo cual resulta relevante conocer para comprender los mecanismos que subyacen a la oligodendrogénesis embrionaria.

Utilizando cultivos primarios obtenidos de la médula espinal embrionaria del ratón, en este estudio demostramos que la progesterona, a través de su interacción con el RP, promueve la proliferación y diferenciación de las CPO embrionarias, y aumenta su capacidad de mielinización. Del mismo modo, se observó que la progesterona regula positivamente la expresión de diversos genes asociados a la oligodendrogénesis embrionaria. Por último, demostramos que las CPO embrionarias expresan las isoformas A y B del RP y que los efectos oligodendrogénicos de la progesterona están mediados por la isoforma RP-B, pues el silenciamiento de la expresión de esta isoforma bloqueó los efectos de la progesterona sobre la proliferación y diferenciación de las CPO. Con estos resultados se sugiere que la progesterona, a través de la isoforma RP-B, participa en el proceso de oligodendrogénesis durante la vida embrionaria.

Abstract

Oligodendrocytes are the myelinating glial cells of the central nervous system (CNS). The oligodendroglial cells arise during the embryonic development of the CNS by the specification of neural stem cells to the oligodendroglial progenitor cells (OPC), which occurs in the embryonic stage E12.5 of the mouse development. Once this phenotype is acquired, the OPC proliferate to expand and migrate to reach the final site, where they will mature as myelinating oligodendrocytes.

There are studies that have showed that the hormone progesterone promotes OPC proliferation and differentiation in early postnatal life through the interaction with its intracellular receptor (PR), while in adult life, it facilitates remyelination in the spinal cord after injury. Despite this, it is currently unknown if progesterone has also oligodendrogenic effects on embryonic OPC, as well as the specific PR isoform involved in progesterone effects on these cells, which is relevant in order to understand the mechanisms underlying the embryonic oligodendrogenesis.

By using primary cultures derived from the mouse embryonic spinal cord, here we show that progesterone, through the interaction with PR, promotes the proliferation and differentiation of the embryonic OPC, and increases their myelination capacity. Also, it was observed that progesterone upregulates the expression of various genes associated with embryonic oligodendrogenesis. Finally, we demonstrated that embryonic OPC express the isoforms A and B of the PR, and that its oligodendrogenic effects are mediated by the PR-B isoform since the silencing of this isoform blocked the effects of progesterone on the proliferation and differentiation of OPC. These results suggest that progesterone, through the PR-B isoform, participates in the process of oligodendrogenesis during embryonic life.

1. Introducción

1.1. Las células oligodendrogliales.

Los oligodendrocitos son células de la glía cuya función primordial es la de recubrir y proteger los axones de las neuronas presentes en el SNC a través del proceso de mielinización, función que en el sistema nervioso periférico (SNP) es realizada de manera análoga por las células de Schwann (1). Para cumplir con la función de mielinización, los oligodendrocitos emiten prolongaciones especializadas desde su membrana plasmática que, una vez que alcanzan el axón de una neurona activa, lo comienzan a recubrir con capas de un complejo lipoproteínico llamado mielina. Las capas de mielina se disponen de manera concéntrica alrededor del axón para originar lo que se conoce como las vainas de mielina (2, 3). Es importante mencionar que estas vainas de mielina no se disponen de manera continua a lo largo de los axones mielinizados, sino que siempre se observan espacios de membrana axónica no recubiertos de mielina referidos como nodos de Ranvier, los cuales se caracterizan por contener una alta acumulación de canales iónicos de sodio y potasio (4) (Fig. 1).

Dado que la mielina actúa como un aislante electroquímico, ésta aumenta la resistencia de la membrana axónica, lo cual se traduce en un aumento significativo en la velocidad con la cual los impulsos nerviosos, en forma de potenciales de acción, se transmiten de un nodo de Ranvier a otro (3, 4), produciendo una mayor eficacia en la comunicación neuronal y por tanto en el funcionamiento del SNC. De este modo, las múltiples complicaciones y déficits neurológicos observados en casos de lesiones o enfermedades desmielinizantes, como por ejemplo la esclerosis múltiple, ilustran convenientemente la importancia de los oligodendrocitos y de la mielinización para el organismo (5).

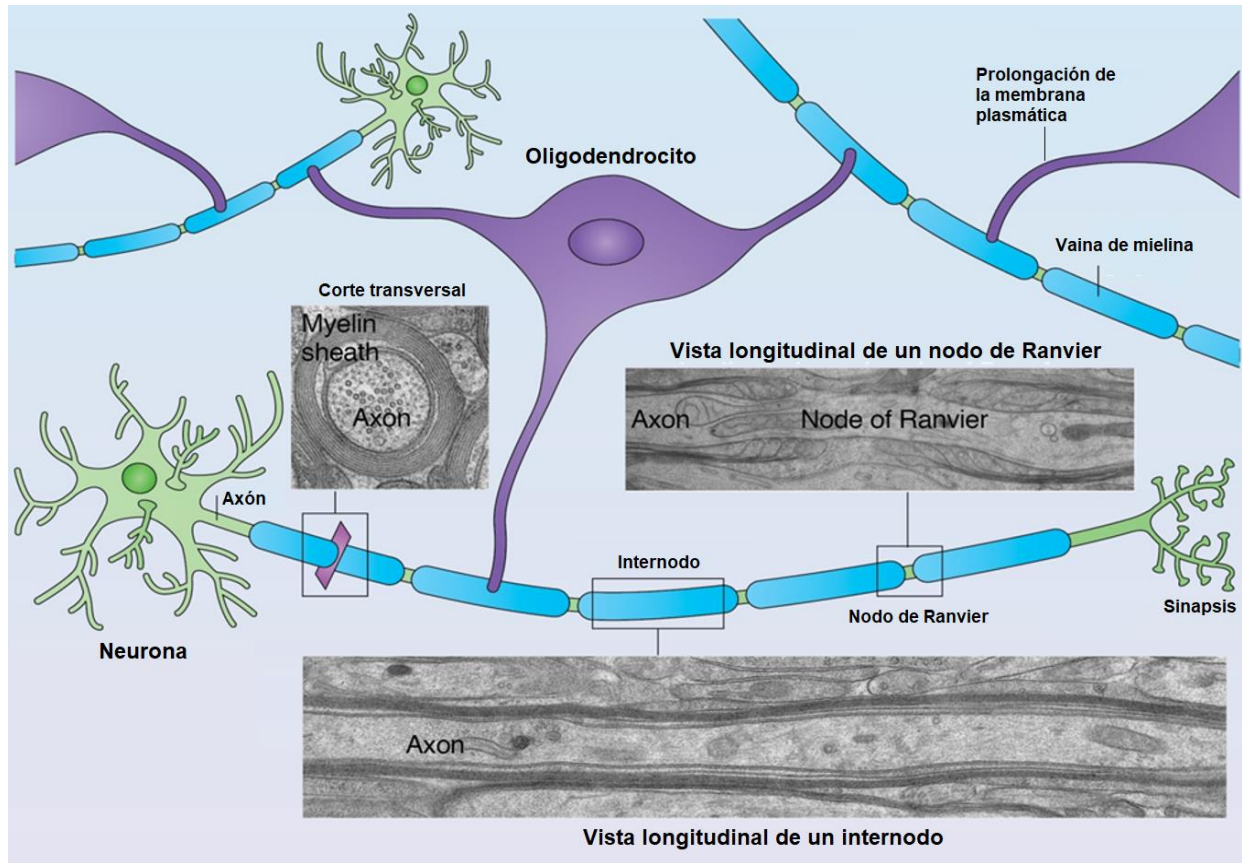


Figura 1. Los oligodendrocitos son las células mielinizantes del SNC. Este tipo de células gliales emiten prolongaciones que entran en contacto con los axones de las neuronas para recubrirlos con un complejo de lipoproteínas llamado mielina. Tomado y modificado de (3).

La oligodendrogénesis (i.e. la formación de los oligodendrocitos) en el SNC es un proceso largo y finamente regulado de manera espacio-temporal, que da inicio desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario y que incluso se extiende hasta la vida adulta (6). Los diferentes procesos moleculares y celulares que ocurren durante el neurodesarrollo y que habrán de culminar con la formación de los oligodendrocitos mielinizantes son descritos a mayor detalle a continuación.

1.2. La oligodendrogénesis embrionaria.

Durante la vida prenatal de los mamíferos, las células troncales neurales (CTN) son las células multipotentes del CNS que darán origen a las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos de un organismo adulto (7). Las CTN son originadas en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario a partir de la inducción neural del ectodermo, y pueden ser identificadas por la expresión de marcadores específicos como los factores de transcripción *SoxB1*, *Sox2 Pax6*, o la proteína de filamentos intermedios Nestina (8, 9).

Las CTN tempranas también se les conoce como células neuroepiteliales, pues se organizan en un epitelio de tipo pseudoestratificado que da lugar al tubo neural, el cual es la estructura embrionaria precursora del SNC (10). En un principio, las células neuroepiteliales proliferarán activamente para expandir el tamaño del tejido neural (11). Posteriormente, éstas darán origen a las células de la glía radial, las cuales son también CTN multipotentes pero caracterizadas, a diferencia de las células neuroepiteliales, por poseer prolongaciones radiales que asemejan a la morfología de los astrocitos y por su capacidad migratoria (12).

Conforme el desarrollo embrionario progresa, y después de haber efectuado varias rondas de divisiones simétricas, las células de la glía radial darán origen a las células progenitoras intermediarias, las cuales ya no son células multipotentes, pues su potencial de diferenciación se restringe hacia un linaje neuronal o glial dependiendo la etapa del desarrollo que se observe; de este modo, en un principio el potencial de diferenciación de las células progenitoras intermediarias será mayoritariamente neurogénico y posteriormente casi exclusivamente gliogénico (13, 14). Así, de manera particular, en el desarrollo del ratón se sabe que la etapa neurogénica comienza a partir del día embrionario 9 (E9), mientras que la etapa gliogénica a partir del día E12, etapa en la cual se comenzarán a producir las células progenitoras de los astrocitos y oligodendrocitos del SNC (15).

De acuerdo con lo anterior, los oligodendrocitos se originan en el desarrollo embrionario a partir de las células progenitoras de oligodendrocitos (CPO). En el

ratón, las células de la glía radial son especificadas hacia CPO concretamente a partir del día E12.5, mientras que en humanos esto ocurre aproximadamente entre las semanas 16 y 18 de gestación (16, 17).

Espacialmente, se tiene identificado que el primer sitio de especificación de las CPO en el desarrollo embrionario de los mamíferos se encuentra en la región ventral del tubo neural a la altura de la prospectiva región cervical de la médula espinal (16, 18, 19), el cual corresponde al mismo sitio en donde se habrán de generar las primeras neuronas motoras de la médula espinal durante la etapa neurogénica (20).

La especificación de las células de la glía radial hacia CPO en el sitio ya mencionado es inducida por la acción del morfógeno *sonic hedgehog* (SHH), misma molécula que también es indispensable para el establecimiento del eje dorso-ventral de todo el tubo neural (18). En este contexto, SHH promueve la inducción al linaje oligodendroglial a través de regular positivamente la expresión de factores de transcripción específicos como *Sox9/10*, *Olig1/2* y *Nkx 6.1/6.2*, los cuales a su vez promueven la expresión de genes asociados al fenotipo de las CPO, siendo ejemplo de ellos el receptor al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α), o el antígeno neuro-glía 2 (NG2) (18, 21, 22).

Una vez especificadas en la región ventral, las CPO proliferarán activamente y migrarán hacia los sitios laterales y dorsales del SNC en desarrollo para alcanzar una distribución relativamente homogénea dentro de él (23) (Fig. 2). Sin embargo, al final de la oligodendrogénesis se observará una mayor presencia de oligodendrocitos diferenciados en la denominada sustancia blanca del SNC, la cual debe precisamente sus características a la alta presencia de axones mielinizados (24). De igual modo, cabe mencionar que aún después de haber concluido el proceso de oligodendrogénesis en la vida postnatal temprana, un número considerable de CPO se mantendrán en un estado indiferenciado, las cuales incluso pueden persistir hasta en la vida adulta como potenciales células mielinizantes (25).

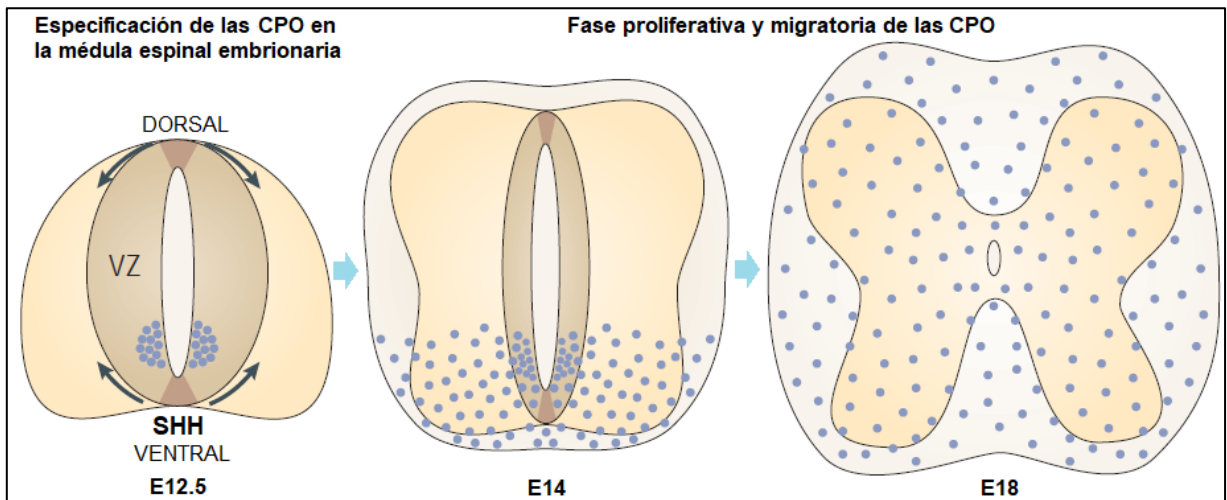


Figura 2. Las CPO recién especificadas en el desarrollo embrionario proliferan y migran activamente. En este esquema se ilustra primero a la izquierda el sitio primario de especificación de las CTN a CPO (puntos azules) en la región ventral a la altura de la prospectiva porción cervical de la médula espinal. Posterior a la especificación, las CPO recién formadas migrarán lateral y dorsalmente para alcanzar una distribución relativamente homogénea en el SNC en desarrollo. Tomado y modificado de (23).

Como ya se mencionó, una vez que las CPO se han establecido en un sitio definido, éstas se diferenciarán a oligodendrocitos, lo cual en el desarrollo del ratón comienza a observarse a partir del día E18 (26); sin embargo, un oligodendrocito no se considera plenamente maduro sino hasta que éste comienza a mielinizar axones, lo cual comienza a suceder poco antes del nacimiento tanto en ratones como en humanos, esto una vez que los circuitos neurales ya hayan comenzado a consolidarse. De esta manera, el proceso de mielinización puede extenderse muy activamente hasta varios días (en el caso del ratón) o meses (en el humano) después del nacimiento (27, 28).

Diversos factores moleculares intrínsecos y extrínsecos a las CPO regulan la progresión de la oligodendrogénesis embrionaria. De este modo, la proliferación y el fenotipo migratorio de las CPO embrionarias es mantenida por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) (29), mientras que el arresto mitótico y la subsecuente diferenciación hacia

oligodendrocitos son promovidos por la acción de las hormonas tiroideas, el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y la proteína de matriz extracelular Laminina $\alpha 2$ (30-32). Éstas últimas, en conjunto con la presencia de axones activos, promoverán también la maduración de los oligodendrocitos al regular la expresión de genes pro-mielinizantes como lo son el de la proteína básica de mielina (MBP), el de la proteína proteolipídica (PLP), el gen de la glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG) o el de la proteína CNPasa (también llamada CNP1) (3, 33), siendo todas estas últimas moléculas los principales componentes proteínicos de las vainas de mielina.

Si bien los factores moleculares ya mencionados regulan el progreso de la oligodendrogénesis (Fig. 3), existen estudios donde se ha mostrado que la hormona sexual progesterona también puede regular la proliferación y diferenciación de las CPO, así como el proceso de mielinización durante el desarrollo postnatal del SNC (34). Además, una de las funciones principales de la progesterona es la del mantenimiento de la gestación, por lo que esta hormona se encuentra presente durante todo el desarrollo prenatal, ya sea en la circulación embrio-fetal o en la circulación materna (35); además, la progesterona continúa siendo sintetizada *de novo* en el SNC de ambos sexos después del nacimiento (36), donde regula diferentes funciones neurales tanto asociadas con la vida postnatal temprana como a la vida adulta.

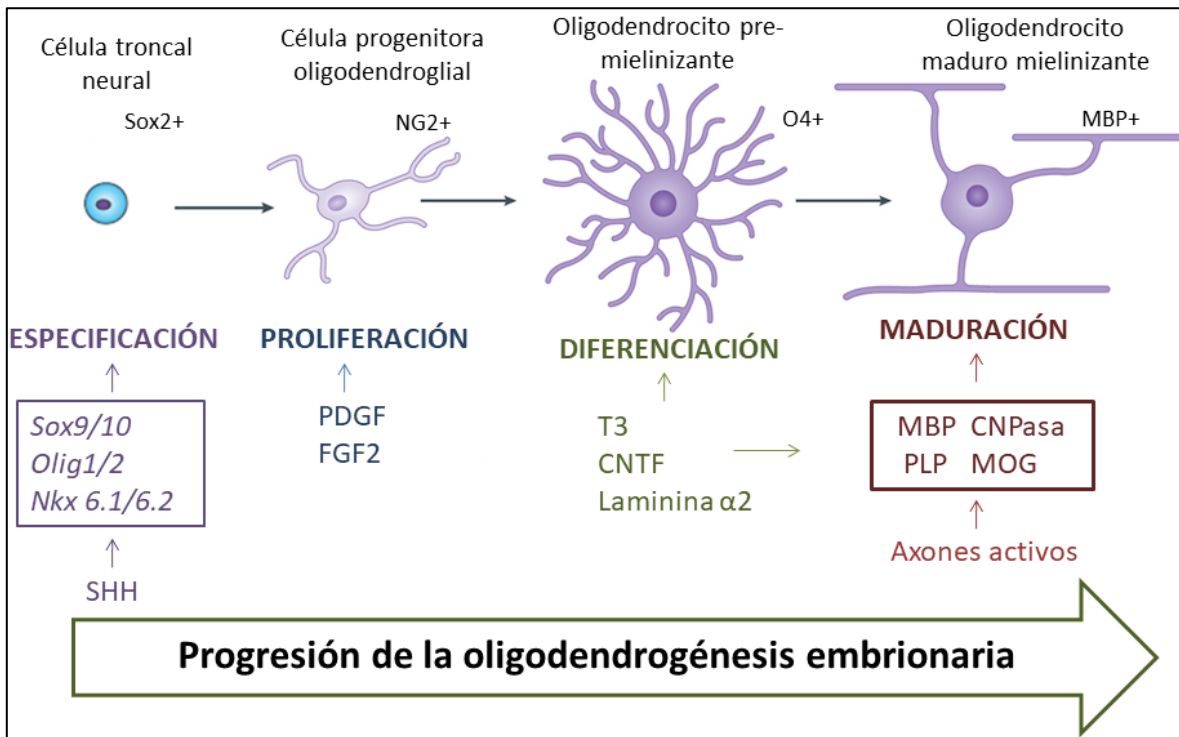


Figura 3. Progreso de la oligodendrogénesis embrionaria. En este esquema se resumen los eventos moleculares y celulares que anteceden a la formación de los oligodendrocitos mielinizantes; el primer paso es la especificación de las CTN hacia CPO por acción de SHH, el cual regula la expresión de los factores de transcripción *Sox9/10*, *Olig1/2* y *Nkx 6.1/6.2*. Luego, la expansión de las CPO es mantenida por el PDGF y el FGF2, mientras que la diferenciación a oligodendrocitos es promovida por la hormona T3, el CNTF y la laminina $\alpha 2$. La maduración final hacia células mielinizantes es alcanzada por la estimulación tanto de las citocinas oligodendrogénicas mencionadas, como por la presencia de axones activos, factores que promueven la expresión de genes que codifican para las proteínas MBP, CNPasa, PLP y MOG.

2. Antecedentes

2.1. Funciones, síntesis y mecanismos de acción de la progesterona.

La progesterona es una hormona esteroide, ampliamente asociada a funciones reproductivas femeninas, que se sintetiza esencialmente en ovarios y placenta (37). Esta hormona regula la conducta sexual femenina, la preparación del útero para la implantación del embrión y el mantenimiento de la gestación tanto en humanos como en muchas otras especies de vertebrados (38). Sin embargo, la progesterona es también sintetizada y metabolizada por neuronas y células gliales

en diferentes regiones del SNC como la corteza cerebral, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, hipocampo, cerebelo y médula espinal, así como en nervios del sistema nervioso periférico (SNP) de ambos sexos (39, 40), donde regula diferentes procesos neurales como neuroprotección, excitabilidad neuronal, plasticidad neuronal, y remielinización, los cuales pueden tener efectos en el estado anímico, el aprendizaje y la memoria (41, 42), por lo cual la progesterona es considerada como un neuroesteroide.

Las funciones de la progesterona no se restringen a la vida adulta, pues diversos estudios indican que esta hormona participa en eventos claves del desarrollo prenatal y postnatal temprano del SNC como la neurogénesis, el proceso de oligodendrogénesis, la mielinización, la organización y maduración de los circuitos neurales, y la diferenciación sexual del cerebro (43). Para más detalles, se puede consultar el artículo de revisión “Progesterone actions during central nervous system development” por González-Orozco & Camacho-Arroyo (2019) incluido como anexo al final de esta tesis.

Al ser una hormona esteroide, el precursor primario para la síntesis de la progesterona es el colesterol. Las células de los distintos tejidos con capacidad de síntesis de hormonas esteroides captan el colesterol circulante en plasma, el cual se transporta unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), a través de un proceso de endocitosis mediado por el receptor de LDL (44). Sin embargo, a pesar de que el SNC es un sitio de síntesis de progesterona y otras hormonas esteroides, la barrera hematoencefálica es impermeable al colesterol LDL, por lo que todo el colesterol presente en SNC es producto de síntesis local (42), siendo además este lípido un componente importante (hasta en un 25%) de las vainas de mielina (45).

Las células de las glándulas esteroideogénicas del organismo (e.g. gónadas y glándulas suprarrenales), así como las neuronas y células gliales con capacidad esteroideogénica, son responsables de la síntesis de la progesterona que puede estar presente en sistema nervioso. La síntesis de progesterona comienza con la movilización del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna por proteínas transportadoras como la proteína translocadora TSPO o la proteína StAR (46, 47). Allí, el colesterol es convertido en pregnenolona por acción del citocromo P450_{scc};

luego la pregnenolona es convertida en progesterona, ya sea en la mitocondria o en el citoplasma, por la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β -HSD).

En SNC, la progesterona de síntesis local puede ejercer acciones autocrinas o paracrinas (42, 48), o puede ser directamente metabolizada por la enzima 5α -reductasa para la formación de dihidroxiprogesterona, la cual puede ser posteriormente reducida a alopregnanolona por acción de la enzima 3α -HSD (49) (Fig. 4), lo cual es relevante de mencionar, ya que estas dos últimas hormonas son también importantes neuroesteroides; por ejemplo, se sabe ampliamente que la alopregnanolona es un potente modulador alostérico de los receptores ionotrópicos al neurotransmisor GABA (50).

Cabe destacar que la presencia y actividad de las enzimas involucradas en la vía de síntesis y metabolismo de la progesterona no está restringida solo a la vida adulta, sino que también puede ser detectada desde etapas tempranas del neurodesarrollo embrionario (43, 51). Verbigracia de ello es el hecho de que la expresión del citocromo P450_{scc} en ratones ha sido detectada desde el día embrionario E9.5 en células de la cresta neural (52), mientras que la expresión y actividad de la enzima 3β -HSD se ha detectado en el cerebro fetal de roedores y ovejas de ambos sexos a partir de la segunda mitad del período de gestación, con la particular observación de que su actividad se incrementa, en concordancia con los niveles de progesterona, conforme avanza el tiempo de desarrollo prenatal (53, 54).

Es importante mencionar que, en el humano, la actividad de la 3β -HSD en el cerebro fetal se ha detectado a partir del segundo trimestre de gestación (51). Por último, en cuanto a las enzimas 5α -reductasa y 3α -HSD, su expresión y actividad también ha sido detectada en el cerebro fetal a partir de la segunda mitad del periodo de gestación en conejillos de indias y ovejas, mientras que en ratas y ratones se detecta en los últimos días de gestación (53, 55-57).

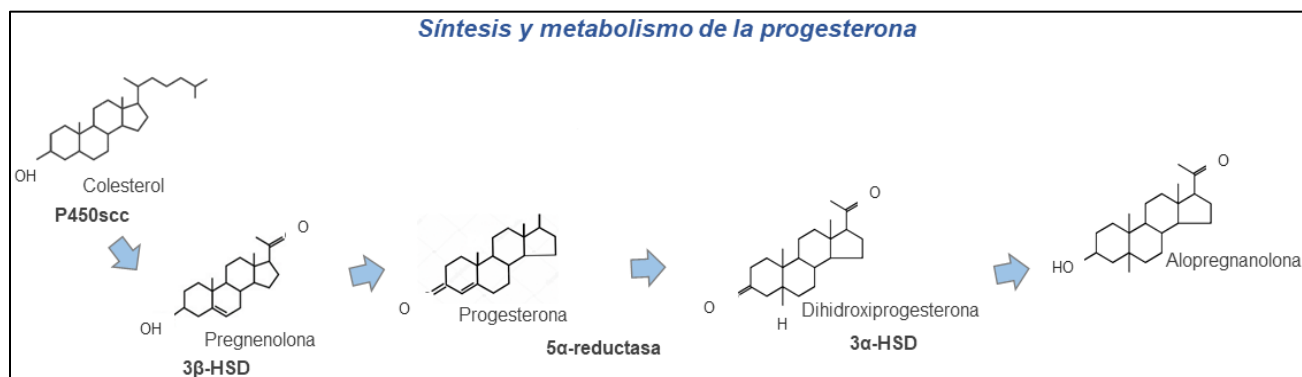


Figura 4. La síntesis de la progesterona inicia con la conversión del colesterol hacia pregnenolona por el citocromo P450scc en la membrana mitocondrial interna. Luego la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β-HSD) convierte la pregnenolona en progesterona, ya sea en mitocondria o citoplasma. La progesterona puede ser metabolizada a dihidroxiprogesterona por acción de la 5α-reductasa y posteriormente a alopregnanolona por la 3α hidroxisteroide deshidrogenasa (3α-HSD).

Como se mencionó, la progesterona regula importantes aspectos reproductivos, pero también no reproductivos, como aquéllos ligados al funcionamiento del SNC. La progesterona ejerce sus efectos en sus células blanco a través de dos mecanismos de acción: el clásico y el no clásico. En el mecanismo clásico (también llamado mecanismo genómico), la progesterona primero permea a través de la membrana plasmática a consecuencia de su naturaleza lipofílica, y en el citoplasma se une a su receptor intracelular (RP), el cual funciona comúnmente como un factor de transcripción inducible por ligando (58). En ausencia de progesterona, el RP se mantiene unido a las proteínas de choque térmico HSP90/70 y a las proteínas chaperonas FKBP51 y p23, las cuales estabilizan la forma inactiva de dicho receptor; una vez que la progesterona se ha asociado al RP, ésta induce un cambio conformacional que promoverá la fosforilación del RP (residuos Ser102, 294 y 345) y su consecuente disociación de las proteínas ya mencionadas, lo cual a su vez permitirá la asociación del RP a otras proteínas como lo es la chaperona FKBP52, la cual facilita la homodimerización del RP y su translocación hacia el núcleo (59, 60). En éste, el homodímero RP/RP se unirá a secuencias específicas de ADN denominadas “elementos de respuesta a la

progesterona” (ERP) (61), las cuales se ubican generalmente en regiones promotoras de genes, donde el RP regulará la expresión de dichos genes, por ejemplo, a través del reclutamiento de coactivadores como SRC-1, CBP o PCAF, los cuales promoverán el ensamblaje de la maquinaria de transcripción (Fig. 5). Dado lo anterior, los efectos fisiológicos de la progesterona mediados por este mecanismo clásico de acción no suelen ser rápidos y requieren de hasta varias horas para completar la transcripción de los genes blancos y su posterior traducción a productos proteínicos (59).

Por otro lado, el mecanismo de acción no clásico (no genómico) está asociado a rápidas respuestas celulares a la progesterona, las cuales van de segundos hasta pocas horas después de la exposición a dicha hormona. Diversos mecanismos moleculares asociados a estas respuestas rápidas han sido identificados a la fecha, en donde se incluyen: 1) La activación de receptores membranales a progesterona acoplados a proteínas G, de los cuales existen los subtipos mRP α , mRP β , mRP γ , mRP δ y mRP ϵ , y cuya estimulación aumenta los niveles intracelulares de AMPc o Ca²⁺, desencadenando así la activación de varias cinasas como lo son la Proteína cinasa A (PKA) o la Proteína cinasa C (PKC) respectivamente. 2) La activación del componente de la membrana de los receptores a progesterona (PGRMC), cuya función es la de aumentar la actividad de los mRPs ya mencionados una vez que estos han sido estimulados por su ligando y, por último, 3) La activación de citocinas de la vía de señalización MAPK/ERK por parte del RP unido a su ligando (62-64).

Puesto que los efectos de la progesterona sobre la oligodendrogénesis y la mielinización en el desarrollo postnatal se han asociado a la activación del RP (34), a continuación, se darán detalles más específicos sobre la estructura y función de dicho receptor.

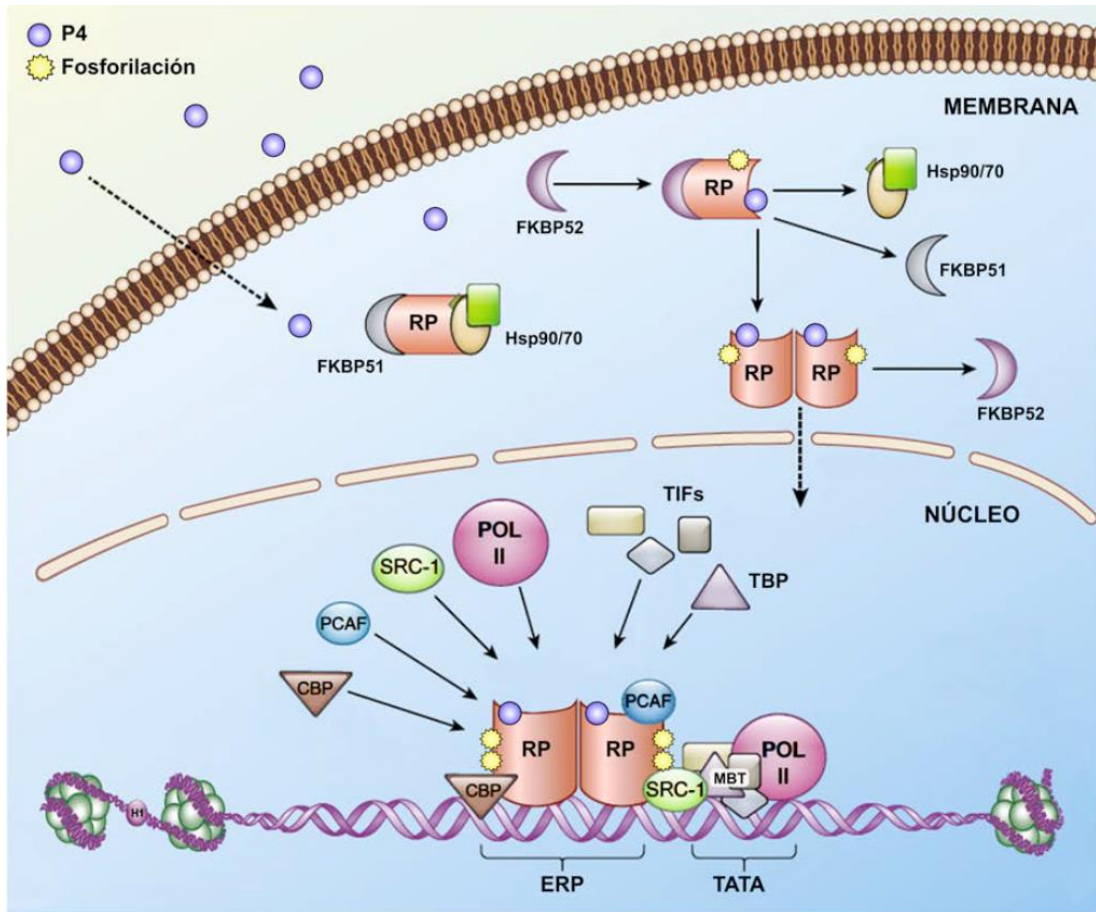


Figura 5. Mecanismo de acción clásico de la progesterona. En ausencia de progesterona, el RP inactivo se mantiene unido a las proteínas HSP90/70 y FKBP51. Una vez que la progesterona permea hacia el citoplasma se une al RP e induce un cambio conformacional que promueve su fosforilación y asociación a la proteína FKBP52, la cual inducirá la dimerización del RP. Luego, el homodímero RP se transloca al núcleo, en donde se unirá a secuencias específicas del ADN denominadas “elementos de respuesta a progesterona”, las cuales se ubican generalmente en regiones promotoras de genes específicos, regulando así su transcripción a través del reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción (MBT) compuesta por los factores de inicio de la transcripción (TIFs), la ARN polimerasa II (POL II) y la proteína de unión a los nucleótidos TATA (TBP). Tomado y modificado de (59).

2.2. Estructura y función del receptor intracelular a progesterona.

Como se mencionó, el RP es un factor de transcripción inducible por ligando perteneciente a la familia de receptores nucleares a hormonas esteroides. Además, en muchas especies de mamíferos, incluidos el ratón y el humano, existen dos isoformas del RP, RP-A y RP-B (65), cuya expresión es detectada en

los tejidos blanco de la progesterona. Sin embargo, el balance de expresión de cada isoforma dependerá del tipo y/o contexto tisular (66, 67).

Ambas isoformas del RP son transcritas a partir del mismo gen (locus 9qA1 en el ratón) pero a partir de dos distintos sitios de inicio de la transcripción regulados por dos regiones promotoras diferentes, las cuales se ubican en la secuencia correspondiente al primer exón de dicho gen, sin embargo, la región promotora para el RP-A se encuentra varios cientos de pares de bases río arriba de la región promotora del RP-B. Dada esta circunstancia, el transcrito para el RP-A es de menor longitud con respecto al transcrito del RP-B, lo cual se traduce en que la isoforma RP-A sea una proteína menos larga que la isoforma RP-B debido a que es una forma trunca en el amino-terminal de esta última (65) (Fig. 6). Además, otra diferencia importante entre las secuencias promotoras de ambas isoformas es que la región promotora del RP-A contiene un mayor contenido de dinucleótidos CpG (citosina-fosfato-guanina), lo cual le confiere mayor susceptibilidad de ser metilada y reprimir así su expresión (66).

Estructuralmente ambas isoformas del RP están divididas en varios dominios, cada uno con una función bien definida. Así, hacia el extremo amino se observa primero la presencia de un dominio con función de activación (AF-1), el cual participa en la regulación de la expresión de genes blanco. Luego sigue el dominio de unión al ADN (DBD), seguido después de un dominio denominado bisagra (hinge en inglés; H), el cual sirve como el sitio de unión del RP en su forma inactiva a las proteínas chaperonas ya mencionadas anteriormente, o como el sitio de homodimerización del mismo una vez que ya se ha activado; en este dominio bisagra además se encuentra una secuencia de aminoácidos de localización nuclear, la cual funciona para la translocación del RP hacia el núcleo. Por último, ya más orientado hacia el extremo carboxilo-terminal, se observa la presencia del dominio de unión a ligando (HBD), el cual es el sitio al que se une la progesterona y, por último, un dominio con función de activación (AF-2) adicional. La diferencia estructural entre ambas isoformas radica en que el RP-B, al ser un proteína de secuencia más larga que el RP-A, contiene un dominio de más con función de activación (AF-3) en el extremo amino (59, 68) (Fig. 6).

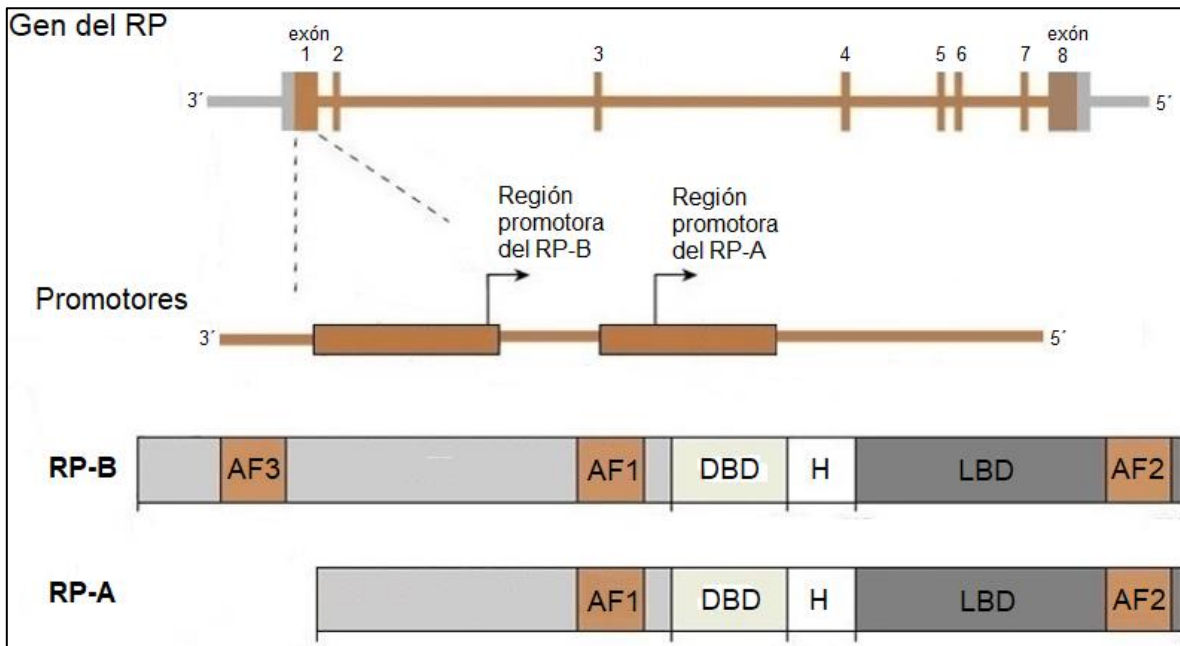


Figura 6. Estructura de las isoformas del RP. Existen dos isoformas del RP: RP-A y RP-B, las cuales se transcribe a partir del mismo gen, pero partiendo de distintos sitios de inicio de la transcripción regulados por diferentes regiones promotoras. En general, ambas isoformas comparten los siguientes dominios: Dos dominios con función de activación (AF-1 y AF-2), dominio de unión al ADN (DBD), dominio bisagra (H), y dominio de unión a ligando (LBD). Al ser un péptido más largo, el RP-B contiene un tercer dominio AF. Tomado y modificado de (59).

Si bien ambas isoformas son estructuralmente muy similares, éstas presentan un patrón de expresión y regulación diferente, aún dentro de una misma célula, además de cumplir diferentes funciones dependiendo del tipo celular, del contexto tisular, e incluso de la etapa del desarrollo (69-72); de este modo, la función de cada isoforma suele ser antagónica a la otra. Por ejemplo, se sabe que, en humanos como en otras especies de mamíferos, al final del embarazo los niveles de expresión del RP-A en miometrio aumentan significativamente para inhibir los efectos progestacionales de la progesterona mediados a través del RP-B, induciendo así el trabajo de parto (73).

Por su parte, el largo del péptido no es la única diferencia entre ambas isoformas. Hay otra diferencia muy importante que define la función específica de cada isoforma que consiste en el hecho de que el RP-B cuenta con un dominio AF adicional, lo cual le otorga una mayor afinidad por reclutar activadores de la transcripción como por ejemplo son los factores SRC-1/3, mientras que el RP-A

tiene una mayor afinidad por reclutar represores transcripcionales como NCoR y SMRT (59, 74-77).

Entre otras diferencias que pudieran explicar la actividad particular de las isoformas del RP radican en la sub-localización celular de cada una, pues la isoforma RP-A es detectada predominantemente en núcleo (incluso en ausencia de progesterona), mientras que el RP-B en citoplasma; también, existen diferentes modificaciones post-traduccionales para cada isoforma, siendo por ejemplo el RP-B una proteína con mayor número de sitios de fosforilación con respecto al RP-A (59, 78) (Tabla 1). Si bien ambas isoformas del RP pueden llegar a activar la transcripción, las diferencias ya mencionadas derivan en que el RP-B sea un activador de la transcripción más potente que el RP-A, por lo que, generalmente, el RP-B es el principal mediador de los efectos genómicos de la progesterona en sus células blanco (79).

Tabla 1. Principales diferencias estructurales y funcionales entre las isoformas del RP.

Característica	PR-A	PR-B
Peso molecular	<i>83 KDa</i>	<i>115 KDa</i>
Región N-terminal	<i>Trunca</i>	<i>Completa</i>
Localización subcelular	<i>Núcleo</i>	<i>Citoplasma</i>
Dominios de activación (AF)	<i>2</i>	<i>3</i>
Sitios de fosforilación	<i>9</i>	<i>14</i>
Afinidad de correguladores	<i>Correpresores</i>	<i>Coactivadores</i>
Principal actividad transcripcional	<i>Represora</i>	<i>Activadora</i>

2.3. Efectos de la progesterona sobre la oligodendrogénesis y la mielinización.

A la fecha, varios estudios han documentado los efectos de la progesterona sobre los procesos de generación de oligodendrocitos y mielinización. Los primeros estudios que exploraron los efectos de la progesterona en la mielinización fueron

conducidos en ratones con lesiones traumáticas en nervios periféricos, donde se observó que la administración de inhibidores farmacológicos de la síntesis de progesterona, o la del antagonista farmacológico del RP, RU486 (mifepristona), reducía significativamente la remielinización del nervio ciático, mientras que la administración de dosis altas de progesterona aceleraba el proceso de remielinización en el mismo nervio (48, 80).

En el SNC se ha reportado que la administración de progesterona durante 21 días promueve progresivamente la remielinización de la médula espinal en ratas adultas con lesiones traumáticas a través de aumentar la proliferación y posterior diferenciación de las CPO remanentes adultas. Esto, debido a que la progesterona reguló positivamente la expresión de genes clave en el proceso de oligodendrogénesis y mielinización como *Olig1/2*, *Mbp*, *Plp* y *Mog* en estas células (81). Estos mismos hallazgos han sido replicados en modelos murinos de esclerosis múltiple, donde se observó que la administración de progesterona mejora los signos clínicos y reduce la pérdida de proteínas asociadas a mielina como MBP y PLP, a la par de ejercer efectos neuroprotectores, al reducir la inflamación local en médula espinal (82), por lo que se ha propuesto el uso de la progesterona como agente terapéutico para el tratamiento de lesiones y enfermedades desmielinizantes (83).

Particularmente, en el desarrollo, se ha identificado que las CPO en el cerebro de ratas recién nacidas sintetizan y metabolizan progesterona muy activamente, previo a su diferenciación a oligodendrocitos (84), lo cual sugiere que las acciones autocrinas y paracrinas de la progesterona contribuyen a la oligodendrogénesis y mielinización justo después del nacimiento en el SNC.

De igual modo, se ha reportado en cultivos organotípicos de cerebelo obtenidos de ratas y ratones de 7 días después de haber nacido (edad en la que el proceso de mielinización ocurre muy activamente en estas especies), que la adición de progesterona al medio de cultivo inmediatamente incrementa la proliferación de las CPO, y después de una semana, incrementa significativamente su diferenciación, así como también incrementa, de manera dependiente de la dosis, la mielinización de las fibras nerviosas. Todos estos efectos de la progesterona fueron mediados

por la activación del RP, pues el tratamiento conjunto de progesterona más el antagonista RU486 bloqueaba los efectos observados solo con progesterona (85, 86).

A pesar de todos estos estudios, aún se desconoce si la progesterona puede promover la oligodendrogénesis durante la etapa embrionaria, así como también se desconoce en general la isoforma del RP a través de la cual la progesterona pudiera ejercer sus efectos en este tipo de células gliales.

Lo anterior resulta por lo tanto relevante de estudiar para comprender mejor los mecanismos moleculares que subyacen a la oligodendrogénesis durante el neurodesarrollo temprano y así aportar conocimientos que puedan ser utilizados por ejemplo en la elaboración de estrategias terapéuticas más efectivas para el tratamiento de las lesiones y/o enfermedades desmielinizantes que se puedan presentar en el SNC.

3. Planteamiento del problema

Se sabe que la progesterona promueve la oligodendrogénesis en roedores recién nacidos y adultos, sin embargo, se desconoce si esta hormona participa en la oligodendrogénesis embrionaria y sus mecanismos de acción en dicho proceso. Asimismo, se desconoce el perfil de expresión de las isoformas del PR y si la activación específica de alguna de ellas pudiera mediar los efectos de la progesterona en las células oligodendrogiales.

4. Hipótesis

La progesterona promoverá la proliferación, diferenciación y maduración de las CPO de la médula espinal embrionaria del ratón, a través de un mecanismo de acción clásico, mediado por la isoforma PR-B.

5. Objetivos

Objetivo general

Estudiar los efectos de la progesterona y el papel de las isoformas del RP en la proliferación, diferenciación y maduración de las CPO de la médula espinal embrionaria del ratón.

Objetivos particulares

- 1.-Aislar y cultivar CPO a partir de la médula espinal embrionaria de ratones en la etapa E14.5 del desarrollo.
- 2.-Evaluar los efectos de la progesterona, el agonista R5020 y el antagonista RU486 del RP en la proliferación, diferenciación y maduración de las CPO embrionarias.
- 3.- Determinar si la progesterona regula la expresión de genes asociados a la proliferación, diferenciación y maduración de las CPO embrionarias.
- 4.-Caracterizar el perfil de expresión de las isoformas RP-A y RP-B en las CPO aisladas de la médula espinal embrionaria del ratón.
- 5.-Estudiar el efecto del silenciamiento del RP-B en la proliferación y diferenciación de las CPO.

6. Materiales y métodos

6.1. Animales.

Para este estudio se utilizaron ratonas de la cepa CD-1 con 14.5 días de gestación. Todas las ratonas fueron adquiridas de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). Para controlar el tiempo de gestación, las ratonas fueron apareadas con ratones copuladores expertos por 12 horas, considerándose como día 0.5 de la gestación el día en que se observó la presencia del tapón vaginal. Todos los animales fueron mantenidos en cajas individuales con libre acceso a comida y agua. El día de su uso, las ratonas fueron eutanizadas mediante dislocación cervical y los embriones fueron cuidadosamente extraídos, siempre procurando de no romper el saco amniótico que envolvía a cada embrión; por último, estos fueron transferidos a una solución *buffer* de fosfatos salino (PBS) fría y estéril en cajas Petri estériles, para así proseguir inmediatamente con el procedimiento de cultivo celular. Cada cultivo celular independiente fue generado a partir de los embriones obtenidos de una sola ratona gestante. Todos los animales en este estudio fueron manejados bajo los lineamientos bioéticos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química-UNAM siguiendo la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

6.2. Disección de médula espinal embrionaria y cultivos primarios de CPO.

Los embriones mantenidos en solución PBS fría fueron separados de su saco amniótico y luego transferidos a cajas Petri con medio de cultivo frío DMEM/F-12, HEPES (ThermoFisher Scientific, EUA) adicionado con antibióticos (estreptomina 10 g/L; penicilina G 6.028 g/L; anfotericina B 0.025 g/L) (ThermoFisher Scientific, EUA). Con ayuda de un microscopio estereoscópico y pinzas de cirugía de punta fina estériles, se aislaron los segmentos cervicales de la médula espinal de cada embrión, los cuales eran luego transferidos a microtubos de 1.5 ml con medio de cultivo frío DMEM/F-12, HEPES adicionado con antibióticos para formar un pool de varios segmentos cervicales (máximo 7

segmentos por tubo). Los tubos fueron luego centrifugados a 1000 RPM por 3 minutos a temperatura ambiente (TA); se descartó el sobrenadante y el tejido fue digerido en 0.5 ml de una solución de verseno (EDTA 0.48 mM en PBS) con tripsina al 0.1% durante 20 minutos a 37°C; al final de ese lapso, la actividad de la tripsina fue inhibida añadiendo 0.5 ml de verseno con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Después, el tejido fue disgregado mecánicamente con una micropipeta de 1000 µl hasta obtener una suspensión homogénea, la cual fue centrifugada a 1000 RPM por 5 minutos a TA. El pellet de células disgregadas fue resuspendido en 1 ml de medio DMEM/F-12, HEPES sin rojo fenol adicionado con antibióticos y suplementado con B-27 (ThermoFisher Scientific, EUA) (de aquí en adelante llamado como medio B-27). Aproximadamente 5×10^5 células fueron sembradas en 2 ml de medio B-27 por pozo en cajas de cultivo de 12 pozos, añadiendo factores de crecimiento FGF2 y EGF (20 ng/ml cada uno); estos factores de crecimiento continuaron añadiéndose cada dos días después de haber iniciado el cultivo. Después de 7 días, se observó la presencia de agregados celulares en suspensión referidos como neuroesferas, las cuales fueron disgregadas para ser subcultivadas. Para ello, las neuroesferas fueron transferidas a 1 ml de verseno con tripsina al 0.025% durante 10 minutos a 37 °C; luego se agregó 1 ml de verseno con SFB al 10% y las células se disgregaron con ayuda de una micropipeta. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en medio B-27, y después, 1.5×10^5 células fueron sembradas en las mismas condiciones ya descritas, pero a partir del tercer día de subcultivo, se añadió el factor FGF2 (20 ng/ml), y PDGF (10 ng/ml) en sustitución de EGF, los cuales se continuaron añadiendo cada dos días. La expansión selectiva de CPO a partir de las neuroesferas del segundo pase se llevó a cabo de la siguiente manera: una semana después de iniciar el subcultivo de las neuroesferas, estas fueron disgregadas como se describió anteriormente; luego se sembraron 8×10^4 células disgregadas en 1 ml de medio B-27 en cajas de 12 pozos previamente tratadas con poli-L-lisina al 0.01% (Merck, EUA), añadiendo los factores FGF2 y PDGF (10 ng/ml cada uno), los cuales se siguieron agregando cada dos días. Aproximadamente una semana después se observó confluencia celular, entonces las CPO eran despegadas de los pozos de cultivo con verseno más tripsina al

0.025% durante 10 minutos a 37 °C, para ser luego subcultivadas en las mismas condiciones ya descritas. Todos los experimentos en este estudio fueron realizados en CPO del tercer al décimo pase. Para los experimentos de proliferación y diferenciación, los siguientes agentes farmacológicos fueron utilizados: Triyodotironina (T3; Sigma-Aldrich, EUA), para evaluar el potencial de diferenciación de las CPO aisladas de médula espinal, progesterona (P4; Sigma-Aldrich, EUA), el antagonista del RP RU486 (mifepristona; Sigma-Aldrich, EUA), el agonista del RP R5020 (promegestona; PerkinElmer Inc., EUA) y el agonista de mRPs Org OD 02-0 (10-etenil-19-norprogesterona; Sigma-Aldrich, EUA).

6.3. Inmunofluorescencia.

La proliferación y diferenciación de las CPO, así como el potencial de mielinización, fue evaluado a través de la detección de marcadores característicos de cada proceso mediante la técnica de inmunofluorescencia. Para ello, las células eran fijadas en una solución de paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a TA, seguido de 3 lavados en PBS; posteriormente fueron permeabilizadas y bloqueadas en una solución de PBS con 1% de albúmina de suero bovino, 1% de glicina, y 0.2% de Tritón X-100 (Sigma Aldrich, EUA) a TA durante 30 minutos. Después las células fueron incubadas con anticuerpos primarios a 4 °C durante 12 horas; los anticuerpos y diluciones utilizadas fueron las siguientes: 1:500 de ratón anti-Sox2 (Santa Cruz; sc-365964), 1:200 de ratón anti-NG2 (Millipore, EUA; mab5384), 1:300 de ratón anti-O4 (Millipore, EUA; mab345), 1:500 de ratón anti-MBP (Millipore, EUA; 05-675), 1:100 de conejo anti-MAP2 (Invitrogen, EUA; pa5-17646), 1:200 de conejo anti-Ki67 (Millipore, EUA; ab9260), y 1:500 de conejo anti-GFAP (Abcam, EUA; ab7260). Todos los anticuerpos fueron diluidos en solución de bloqueo cuya formulación se definió anteriormente. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces en PBS y luego incubadas con anticuerpo secundario cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 o cabra anti-conejo Alexa Fluor 568, ambos en dilución 1:500 (ThermoFisher Scientific, EUA) a TA por 60 minutos. Los núcleos fueron teñidos con 1 mg/ml de Hoechst 33342 (ThermoFisher Scientific, EUA) durante 5 minutos; las células fueron lavadas 3 veces en PBS y finalmente, fueron montadas sobre portaobjetos en

medio de montaje para microscopía (Polysciences Inc., EUA). Las preparaciones fueron observadas en un microscopio Olympus Bx43 (Tokio, Japón). Para cada preparación se tomaron capturas digitales de 3 campos distintos seleccionados al azar; todas las capturas se realizaron a un aumento de 400X. El número de células, el área de ramificación celular en las células marcadas con anti-O4, y la densidad fluorescente en las células marcadas con anti-MBP se midieron con las opciones “Cell Counter”, “Area” e “Integrated Density” contenidas en el software ImageJ (NIH, EUA).

6.4. Extracción de ARN y experimentos de RT-qPCR.

Se extrajo ARN total de las células utilizando el reactivo Trizol LS (Thermo Fisher Scientific, EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de las muestras de ARN extraídas fue determinada en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), mientras que la integridad de éstas fue evaluada a través de electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Después, 1 µg de ARN de cada muestra fue empleado como molde para la síntesis de la primera cadena de ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Thermo Fisher Scientific, EUA) y siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego, 2 µL de la reacción anterior fueron empleados para preparar las mezclas de PCR punto final o PCR cuantitativa utilizando la enzima Platinum Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific, EUA) o el kit FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, ALE) respectivamente. Los resultados de las PCR punto final fueron visualizados en electroforesis de geles de agarosa al 1.5%. Los experimentos de PCR cuantitativa fueron realizados en un equipo Light Cycler 1.5 (Roche, ALE); los niveles de expresión relativa en este tipo de PCR fueron calculadas bajo el método $\Delta\Delta Ct$. Todos los primers utilizados para los experimentos de PCR se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista y secuencia de los primers utilizados en los experimentos de PCR.

Blanco	Secuencia FW (5'-3')	Secuencia RV (5'-3')	Tamaño del amplificado
<i>Ng2</i>	GCCCGTGCCCTCAGC	CAAGTCTGACCTGGAGGCAT	143 pb
<i>Pdgfra</i>	GGAAGAGGATGACTCTGCCAT	CGAAGCCTTTCTCGTGGACA	524 pb

<i>Olig1</i>	GCAGCCACCTATCTCCTCAT	GTGGCAATCTTGGAGAGCTT	309 pb
<i>Sox9</i>	GAGCTGGAAGTCGGAGAGC	CTCTCGTTCAGCAGCCTCCA	820 pb*
<i>Sox10</i>	AGCCCAGGTGAAGACAGAGA	AGTCAAACCTGGGGTCGTGAG	146 pb
<i>Mbp</i>	TCACAGAAGAGACCCTCACA	GCCGTAGTGGGTAGTTCTTG	195 pb
<i>Cnp1</i>	TCCACGAGTGCAAGACGCTATTCA	TGTAAGCATCAGCGGACACCATCT	123 pb
<i>Nkx 6.1</i>	CTTCTGGCCCGGAGTGATG	GGGTCTGGTGTGTTTTCTCTTC	115 pb
<i>Nkx 6.2</i>	CTTCTGGCCCGGAGTGATG	CGGTTGTATTCGTCATCGTC	372 pb
<i>RP-B</i>	ACCTGAGGCCAGATTCAGAAG	GTATCCCCCACATGCACGTAT	622 pb*
<i>18S</i>	AGTGAAACTGCAATGGCTC	CTGACCGGGTTGGTTTTGAT	167 pb

*Los tiempos de elongación en el programa del termociclador fueron ajustados de acuerdo al tamaño del amplicón siguiendo las indicaciones del fabricante del kit para RT-qPCR.

6.5. Análisis *In Silico* de potenciales elementos de respuesta a progesterona.

Se obtuvieron las secuencias promotoras y los sitios de inicio de la transcripción de los genes *Ng2*, *Sox9*, *Nkx 6.1*, *Cnp1*, y *Mbp* de la Base de Datos de Promotores Eucariontes (<https://epd.epfl.ch//index.php>). Después se analizó la presencia de elementos de respuesta a progesterona en las secuencias promotoras de los genes mencionados utilizando los algoritmos depositados en las bases de datos JASPAR (87), TRANSFAC (88) y NUBIsScan (89). Las secuencias identificadas por dos o más bases de datos con un porcentaje de probabilidad de unión al RP mayor a 0.8 fueron establecidas como potenciales elementos de respuesta a progesterona.

6.6. Extracción de proteínas y Western Blot.

Para extraer proteínas totales, las CPO fueron despegadas de los pozos de cultivo con verseno y ayuda de un raspador de células. Luego las células fueron centrifugadas para remover el exceso de verseno y los pellets obtenidos fueron homogenizados en buffer de lisis RIPA (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS) complementado con un mix de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, EUA). Las muestras fueron después centrifugadas a 14000 RPM a 4°C durante 15 minutos; se recuperó el sobrenadante y la proteína obtenida fue cuantificada en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 utilizando el producto Pierce 660 nm Protein Assay (ThermoFisher Scientific, EUA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizaron 100 µg de proteína total para correr

electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%; el tiempo de corrimiento en estos geles fue de 2 horas a 80 V. Después se transfirió la proteína a membranas de PVDF (Merck, EUA) durante 1 hora a 25 V en condiciones semisecas. Las membranas fueron bloqueadas con Albúmina de suero bovino al 5% por 12 horas a 4°C, y luego incubadas por 48 horas a 4°C con anticuerpos primarios ratón anti-RP en dilución 1:300 (Abcam, EUA; ab58568) o conejo anti- α Tubulina en dilución 1:1000 (Sigma-Aldrich, EUA; t3195). Después las membranas fueron lavadas 3 veces en TBS con Tween al 0.1% (Sigma-Aldrich, EUA) e incubadas con anticuerpo secundario cabra anti-conejo conjugado a la peroxidasa de rábano en dilución 1:4500 (Santa Cruz, EUA; sc-2004) o proteína de unión a IgG kappa de ratón (mIgGk BP) acoplada a la peroxidasa de rábano en dilución 1:5000 (Santa Cruz, EUA; sc516102) a TA por 45 minutos. Las membranas fueron lavadas 3 veces y la señal de los anticuerpos fue detectada mediante quimioluminiscencia con el sustrato para la peroxidasa Super Signal West Femto Maximum Sensitivity (ThermoFisher Scientific, EUA); la señal fue revelada por exposición a películas fotográficas. Las imágenes de los blots fueron capturadas en una cámara digital; el análisis densitométrico de las bandas detectadas se realizó en el software ImageJ.

6.7. Silenciamiento de la isoforma B del receptor a progesterona mediante la transfección de un ARN pequeño de interferencia (siRNA).

Se silenció la expresión del RP-B mediante la transfección de un siRNA dúplex específico para el transcrito de esta isoforma en ratón diseñado con ayuda del sitio web <http://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/design.do> (ThermoFisher Scientific, EUA). Para la transfección, se cultivaron CPO hasta alcanzar una confluencia de entre el 60% y 80%; entonces el día de la transfección el medio de cultivo B-27 fue remplazado por 300 μ l de medio sin suplemento B-27, sin antibióticos y sin factores de crecimiento. Después, las células fueron transfectadas con 3 μ l de lipofectamina RNAimax (ThermoFisher Scientific, EUA) mezclados con 150 nM del siRNA dúplex RP-B o 150 nM del siRNA control negativo MISSION (Sigma-Aldrich, EUA) que no hibridaba con ningún transcrito específico. Después de incubar 24 horas a las células, el medio de cultivo fue remplazado por medio B-27 adicionado con factores de crecimiento, dejando

incubar a las células durante otro lapso de 24 horas. El silenciamiento de la expresión del RP-B en las CPO fue corroborado por medio de RT-qPCR. La secuencia del siRNA dúplex empleado fue: sentido 5'-AUGACUGAGCUGCAGGCAA-3', anti-sentido 5'-UUGCCUGCAGCUCAGUCAU-3'.

6.8. Análisis estadístico.

Todos los datos obtenidos fueron analizados y graficados en el software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, EUA). Los datos graficados muestran los resultados de tres experimentos independientes (i.e. de tres cultivos celulares diferentes e independientes). Se hizo una ANOVA de una vía con un post-test de Bonferroni para hacer el análisis entre grupos comparables. Los datos de RT-qPCR y Western Blot fueron analizados con una t de Student de dos colas. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

7. Resultados

7.1. Generación de cultivos primarios de CPO derivados de la médula espinal embrionaria del ratón.

Se disecaron y disgregaron los segmentos cervicales de la médula espinal de embriones de ratón en etapa E14.5 (Fig. 7A) para generar cultivos primarios de células troncales neurales en forma de neuroesferas (Fig. 7B), las cuales fueron caracterizadas por la expresión del marcador de células troncales neurales Sox2 (Fig. 7C). Posteriormente, para derivar y expandir selectivamente CPO a partir de las neuroesferas cultivadas, éstas fueron disgregadas desde el inicio del segundo pase, entonces las células resultantes fueron cultivadas a baja densidad en cajas de 12 pozos pre-tratadas con poli-L-lisina para estimular la expansión celular en monocapa. Además, se añadieron al medio de cultivo los factores de crecimiento PDGF y FGF2, ambos a una concentración de 10 ng/ml, ya que ambos son reportados frecuentemente en la literatura como esenciales para la proliferación de las CPO tanto *in vivo* como *in vitro* (29). De este modo, 24 horas después, se logró observar en los cultivos la rápida proliferación de células con morfología “bipolar” y “tripolar”, (Fig. 7D) la cual está asociada al fenotipo de las CPO que se suele describir ampliamente en la literatura (90).

Para confirmar que las células obtenidas efectivamente correspondían al linaje oligodendroglial, primero se efectuó en células fijadas la técnica de inmunofluorescencia para detectar la expresión del proteoglicano NG2, el cual es un marcador típico de CPO y cuya función se asocia a la comunicación celular (19). Así, tal como se muestra en la Figura 8A, la mayoría de las células fueron NG2 positivas (~90%; datos de cuantificación no mostrados), apreciándose además que la señal fue principalmente detectada en procesos celulares (prolongaciones de la membrana plasmática) y núcleos. Esto último no fue del todo inesperado, ya que se encuentra ampliamente reportada en la literatura la localización de NG2 tanto en citoplasma como en núcleo, pues se sabe que este proteoglicano es constantemente sujeto a proteólisis, liberándose en dicho proceso el dominio intracelular que se detecta en los sitios ya mencionados (91).

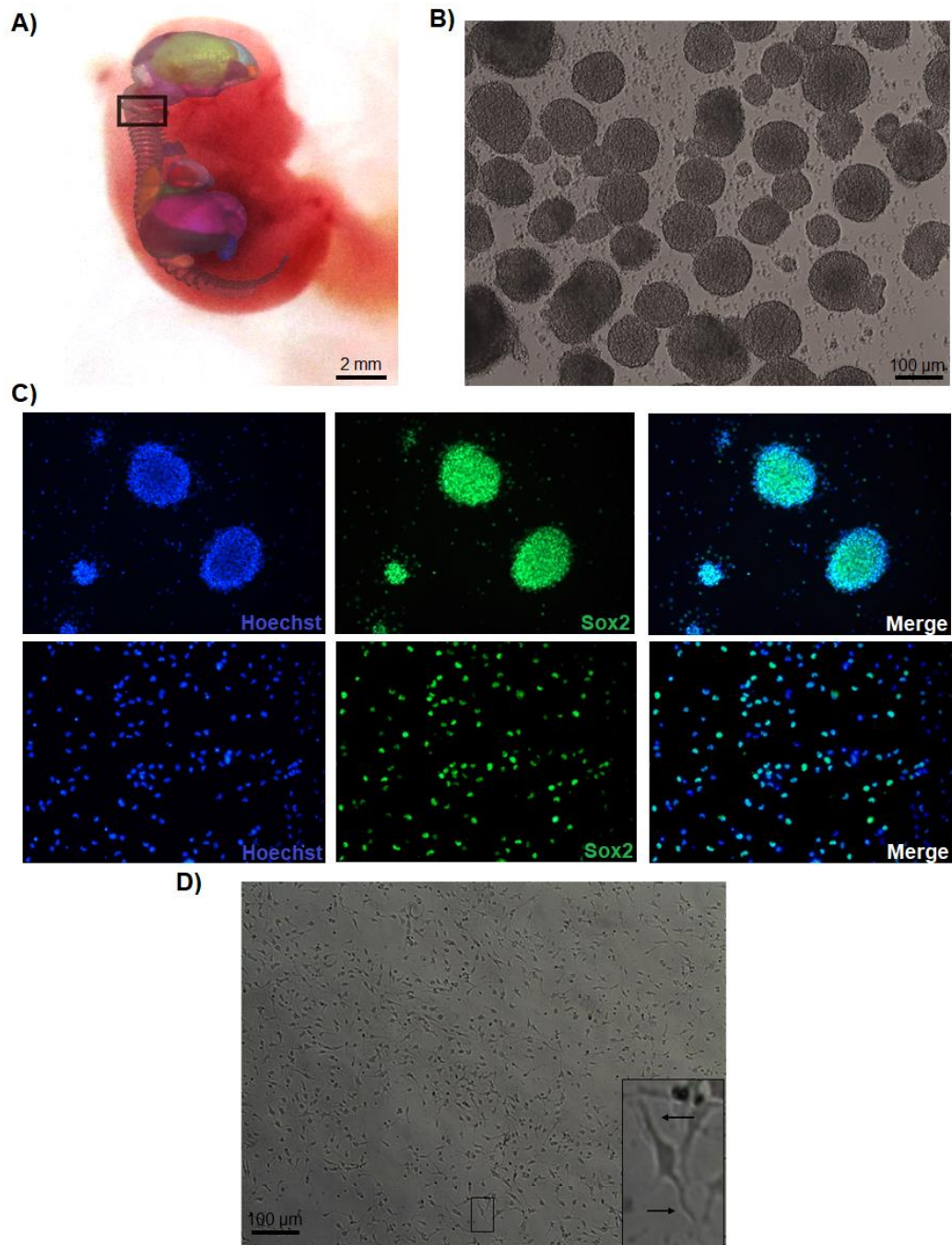


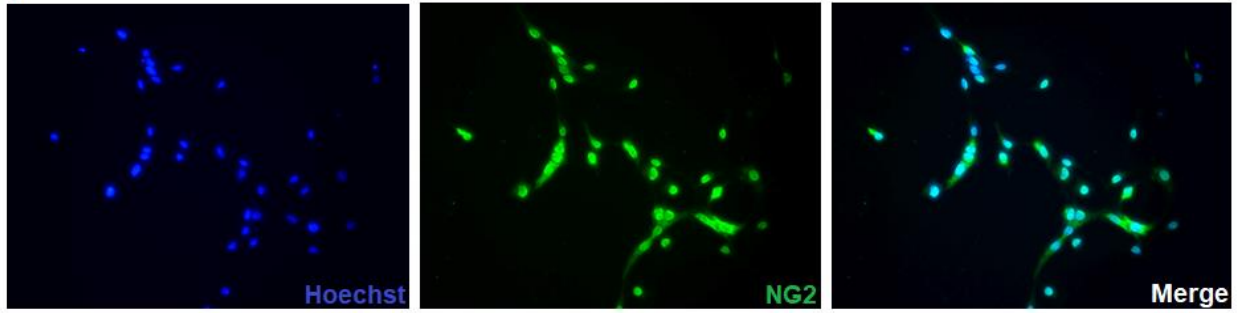
Figura 7. Cultivos de CPO derivados de la médula espinal de embriones de ratón en etapa E14.5. A) Embrión de ratón E14.5; el recuadro señala el área cervical de la médula espinal. B) Cultivo de neuroesferas generadas a partir del segmento cervical de la médula espinal embrionaria. C) Detección del marcador de células troncales neurales Sox2 (color verde) en neuroesferas completas (panel superior) y células disgregadas (de segundo pase) a partir de las neuroesferas (panel inferior). Los núcleos fueron marcados en color azul con Hoechst. D) Expansión selectiva de CPO a partir de las neuroesferas. Las flechas en el área amplificada muestran ejemplos de procesos bipolares.

Posteriormente, para tener evidencia adicional de que las células obtenidas pertenecían al linaje de las CPO, se hizo una extracción de ARN total, y mediante RT-PCR, se logró detectar en ellas la expresión de genes asociados a la especificación y mantenimiento del fenotipo oligodendroglial como lo son *Ng2*, el receptor A al factor de crecimiento PDGF (*Pdgfra*), y los factores de transcripción *Olig1* y *Sox 9/10*. (Fig. 8B).

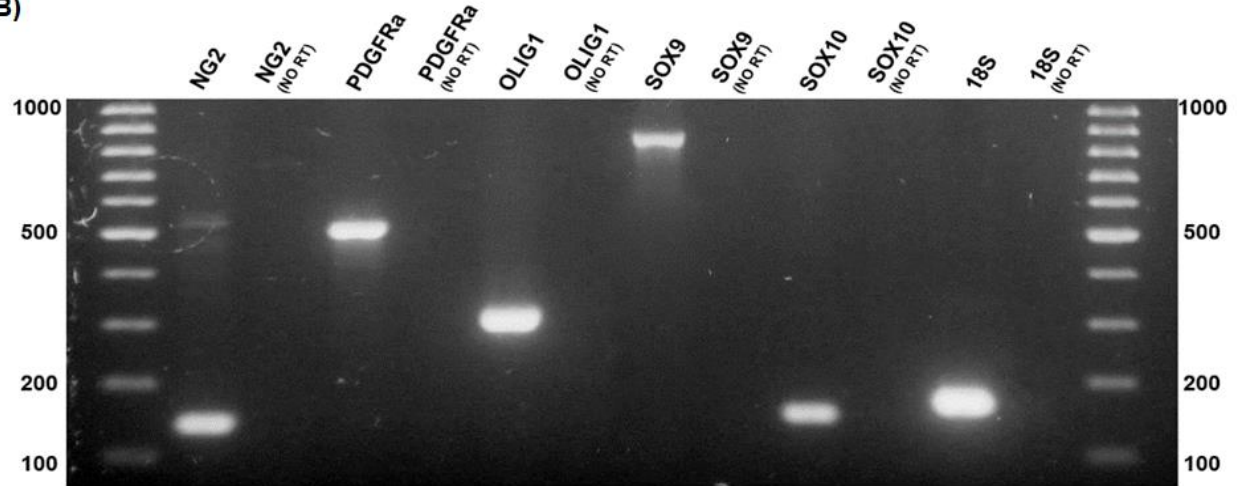
Para evaluar el potencial de diferenciación y determinar si las células cultivadas respondían a estímulos pro-oligodendrogénicos conocidos, éstas fueron cultivadas durante tres días sin factores de crecimiento y tratadas con la hormona tiroidea T3 (40 ng/ml). Después del tratamiento, y a través de inmunofluorescencia, se lograron observar células positivas al marcador de oligodendrocitos diferenciados O4, además de que también se observaron significativos cambios morfológicos en las mismas notándose la formación de diversos e intrincados procesos celulares (Fig. 8C). Adicionalmente, se logró observar la aparición de oligodendrocitos mielinizantes MBP positivos, indicando por lo tanto que las CPO obtenidas respondían apropiadamente a estímulos de diferenciación, lo cual resultó importante para el desarrollo de los siguientes experimentos farmacológicos.

Por último, se evaluó, también por inmunofluorescencia, la presencia de neuronas y astrocitos en los cultivos mantenidos por tres días sin factores de crecimiento; como se observa en la figura 8D, se detectó una baja proporción de células MAP2 o GFAP positivas en las preparaciones comparado con la proporción de células positivas a O4. Con estos resultados se demuestra la efectividad del protocolo seguido en este estudio para la obtención de un número significativo de CPO puras a partir de neuroesferas derivadas de tejido embrionario.

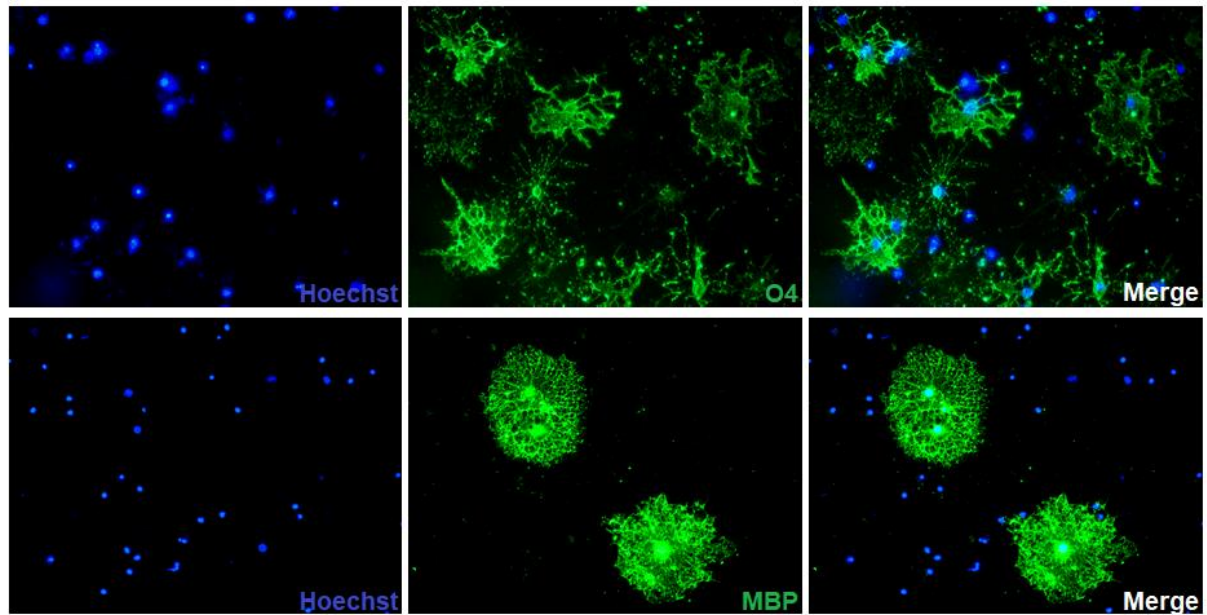
A)



B)



C)



D)

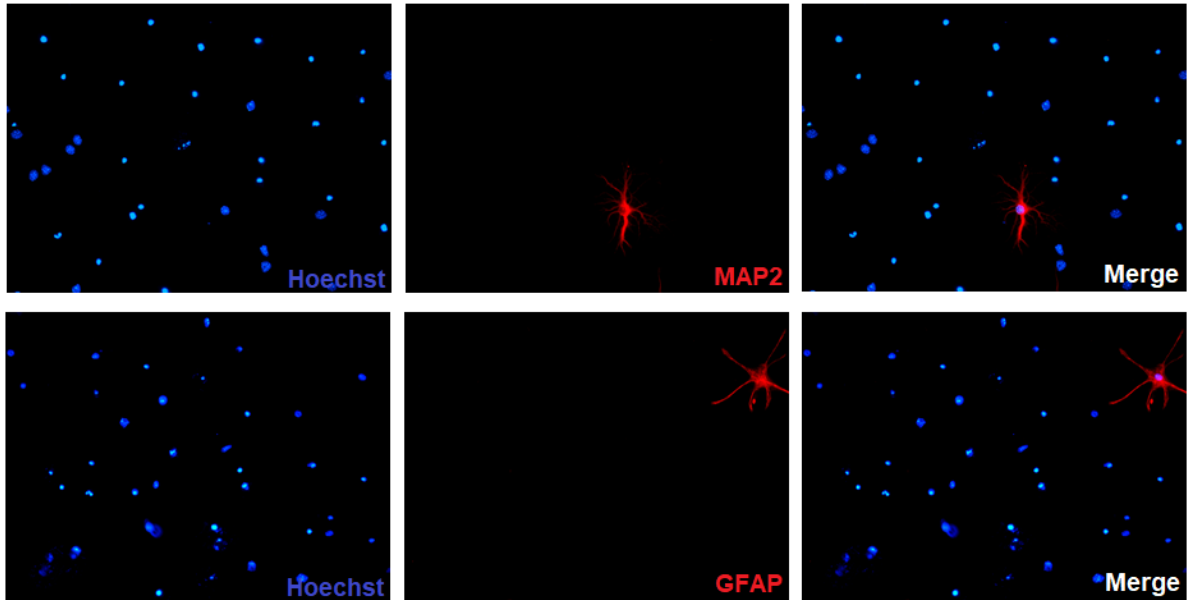


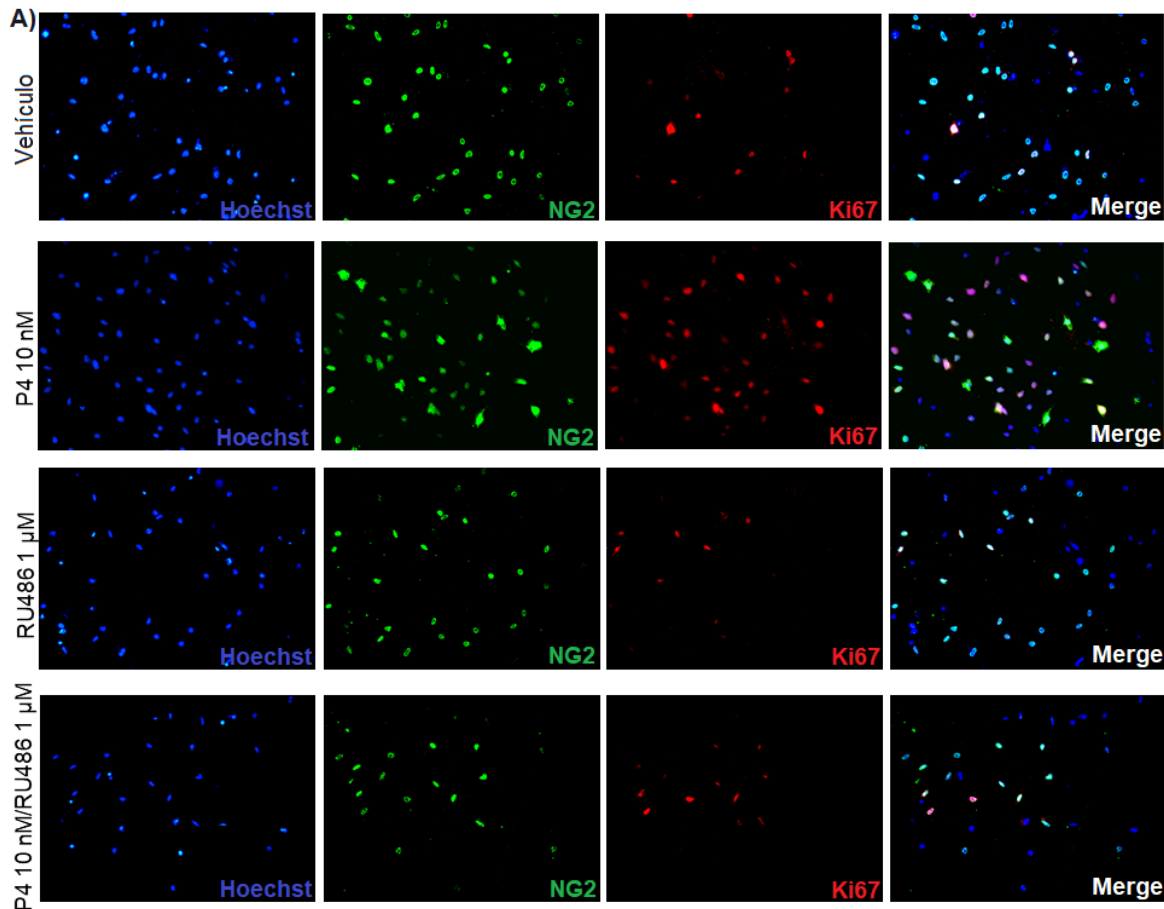
Figura 8. Caracterización de las CPO cultivadas a partir de la médula espinal embrionaria de ratón. A) Detección del marcador NG2 (color verde) típico de CPO en las células cultivadas por inmunofluorescencia. B) Detección por RT-PCR de la expresión de los genes *Ng2*, *Pdgfra*, *Olig1*, *Sox9* y *Sox10* en las células cultivadas. C) CPO cultivadas durante 3 días sin factores de crecimiento y tratadas con hormona T3 (40 ng/mL); la diferenciación celular fue evaluada por inmunodetección del marcador de oligodendrocitos O4 (color verde; panel superior) y el marcador de mielina MBP (color verde; panel inferior). D) Inmunofluorescencia para detectar MAP2 (color rojo; panel superior) y GFAP (color rojo; panel inferior) en los cultivos celulares. En ambos casos se muestra la presencia de un número muy bajo de neuronas y astrocitos en comparación con el número de oligodendrocitos O4 positivos.

7.2. La progesterona promueve la proliferación y diferenciación de las CPO embrionarias e incrementa su potencial de mielinización a través del RP.

Una vez estandarizado el protocolo para la obtención de cultivos de CPO a partir de neuroesferas derivadas de la médula espinal embrionaria del ratón, se procedió a evaluar los posibles efectos oligodendrogénicos de la progesterona en estas células embrionarias. Primero se determinó el efecto de la progesterona sobre la proliferación de las CPO; para ello, éstas fueron subcultivadas, como se describió anteriormente, con los factores de crecimiento PDGF y FGF2, ambos a una concentración de 10 ng/ml. Entonces, las células recién subcultivadas fueron tratadas durante tres días con progesterona (10 nM), el antagonista del RP,

RU486 (1 μ M), el agonista del RP, R5020 (10 nM), y un agonista farmacológico de los mRPs, Org OD 02-0 (100 nM).

Como se observa en la figura 9, el tratamiento con progesterona incrementó el porcentaje de células NG2/Ki67 positivas respecto al grupo control (vehículo, DMSO 0.01%), mientras que el RU486 bloqueó los efectos de la progesterona. Similar a la progesterona, el agonista del RP, R5020, también incrementó la proliferación celular; sin embargo, cuando las células fueron tratadas solo con RU486 o con Org OD 02-0, los niveles de proliferación se mantuvieron cercanos a aquéllos observados en el tratamiento con vehículo, lo que indica que la progesterona promueve sus efectos sobre la proliferación de las CPO derivadas de la médula espinal embrionaria a través de la activación del RP.



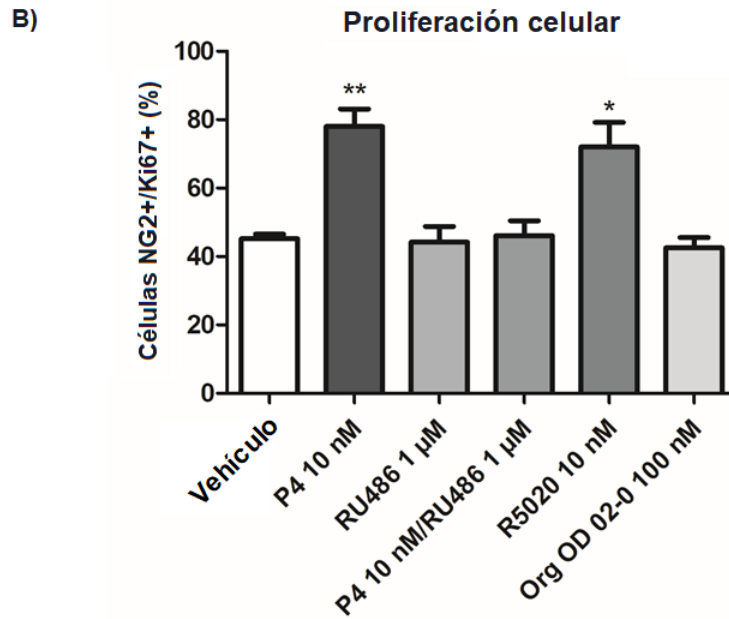
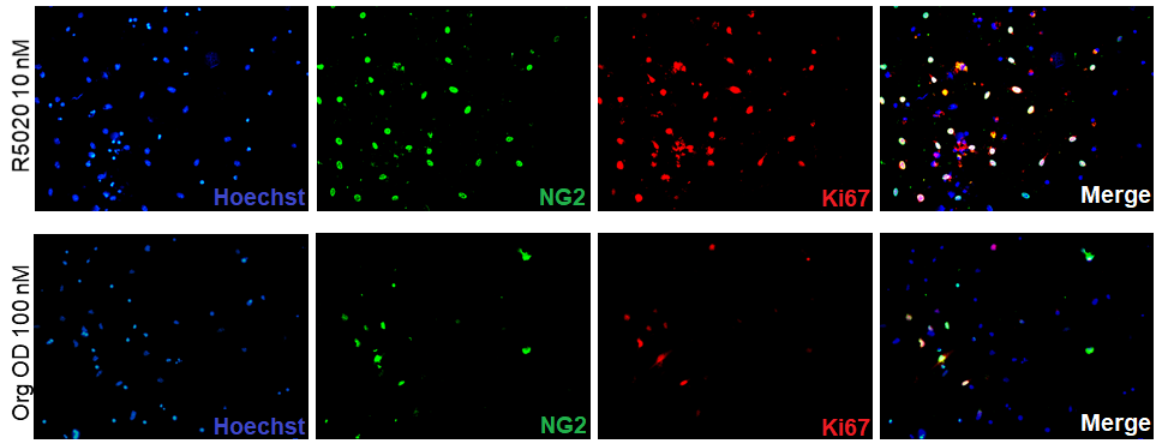
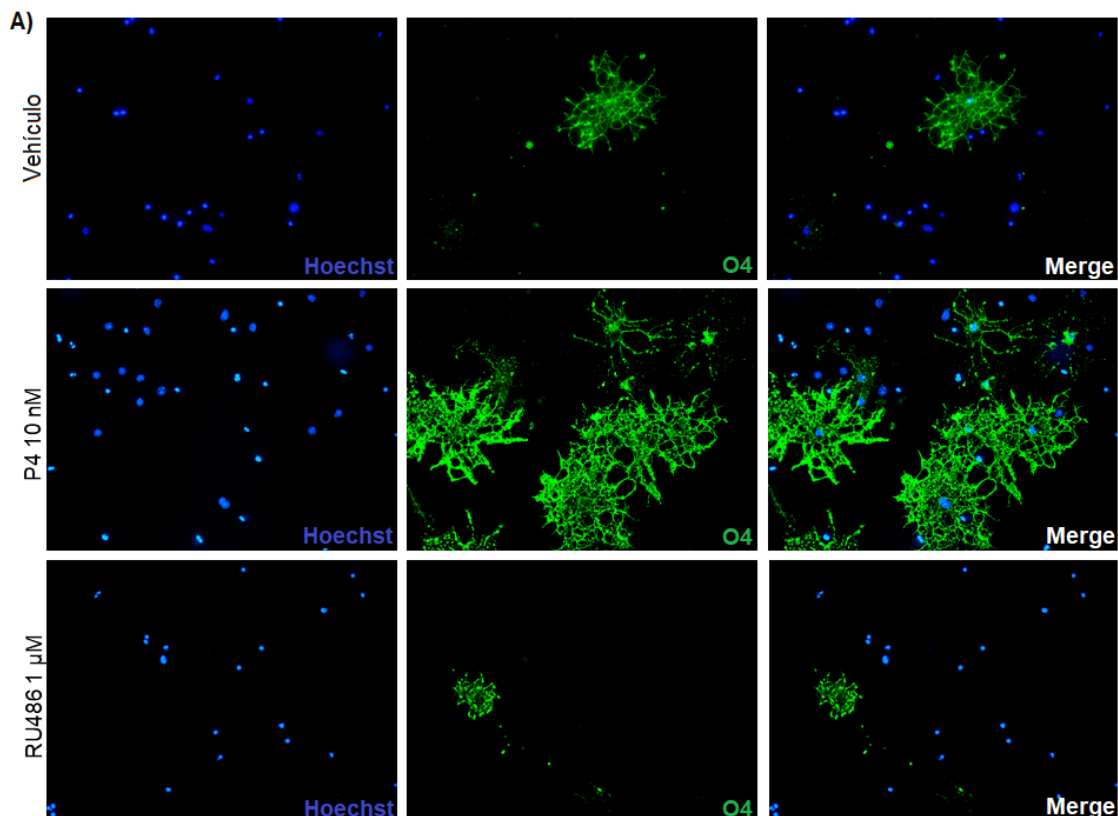


Figura 9. La progesterona incrementa la proliferación de las CPO. A) Inmunofluorescencia NG2/Ki67 (color verde y rojo respectivamente) en CPO cultivadas con factores de crecimiento y tratadas por 3 días con progesterona (P4) (10 nM), RU486 (1 μM), P4 (10 nM) + RU486 (1 μM), R5020 (10 nM), Org OD 02-0 (100 nM) y vehículo (DMSO 0.01%). B) Porcentaje de células NG2/Ki67 positivas. El porcentaje se determinó tomando en cuenta el número total de células teñidas con NG2. Los resultados están expresados como la media ± E.E.M.; n = 3; *p<0.05 y **p<0.01 vs el resto de los grupos.

Posteriormente se determinó el efecto de la progesterona y el papel del RP en el potencial de diferenciación de las CPO cultivadas, a través de la detección del glicolípido O4 como marcador de oligodendrocitos. Para estimular el arresto mitótico y la subsecuente diferenciación, las células fueron subcultivadas sin la adición de factores de crecimiento e inmediatamente tratadas de manera similar a los experimentos de proliferación, durante tres días.

La figura 10 muestra que la progesterona aumentó significativamente el número de células O4 positivas con respecto a las células tratadas con vehículo, efecto que fue revertido en los tratamientos conjuntos de progesterona/RU486; entretanto, el tratamiento con el agonista R5020 del RP también aumentó el número de células O4 positivas, en contraste con los tratamientos solo con RU486 o con Org OD 02-0 que no promovieron ningún efecto. Por último, se observó que los tratamientos con progesterona y el agonista R5020, además de aumentar el número de oligodendrocitos diferenciados, también aumentaron el área de ramificación celular de los mismos con respecto al resto de los grupos experimentales (Fig. 10C), resultados que sugieren que la progesterona promueve la diferenciación de las CPO embrionarias a través del RP.



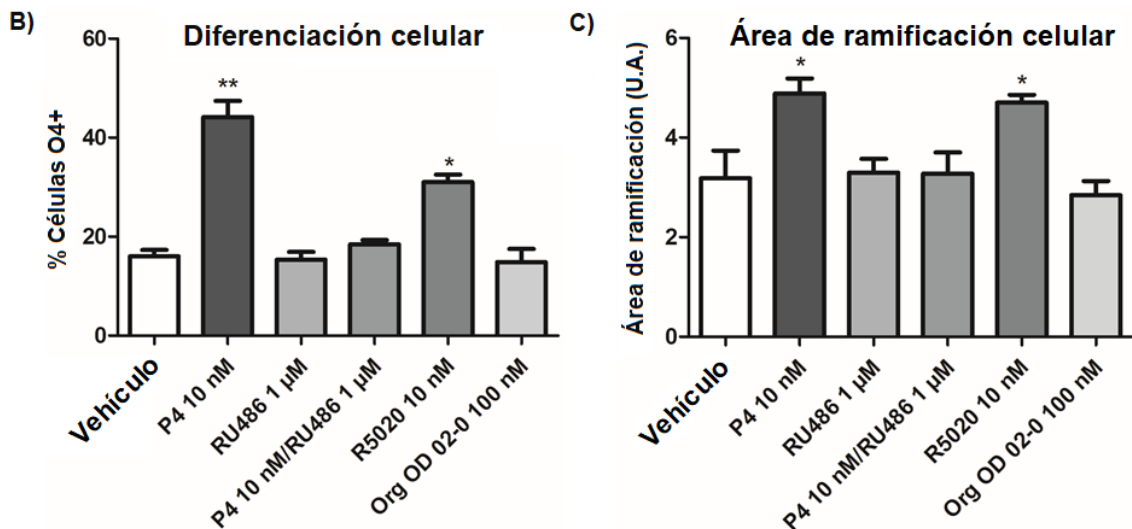
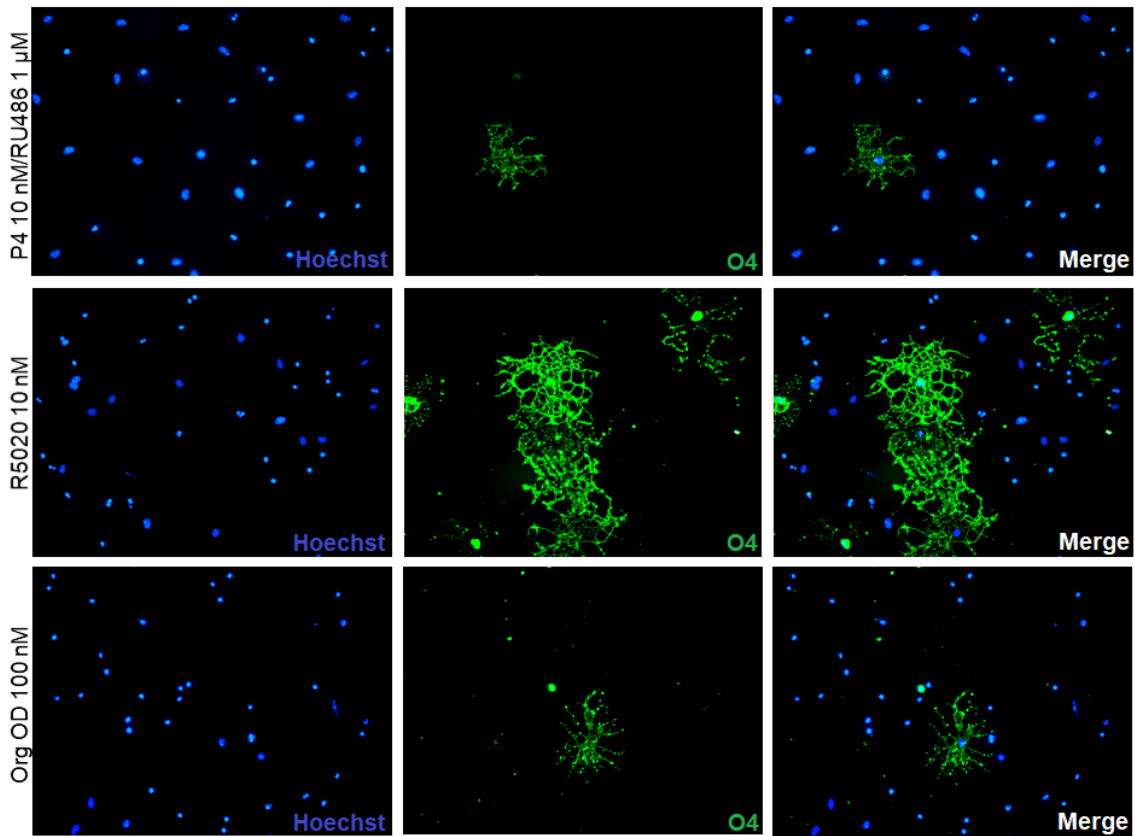
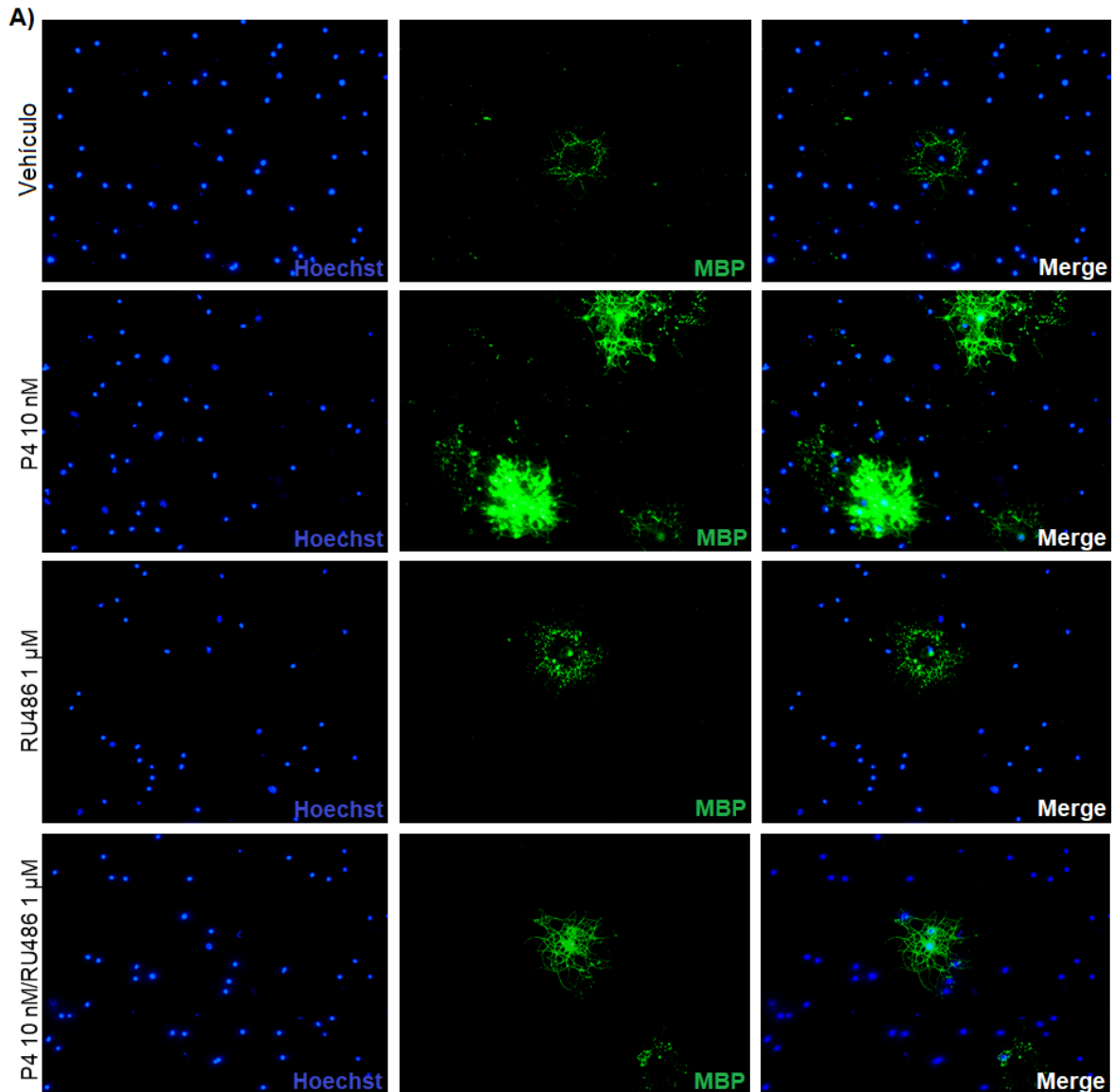
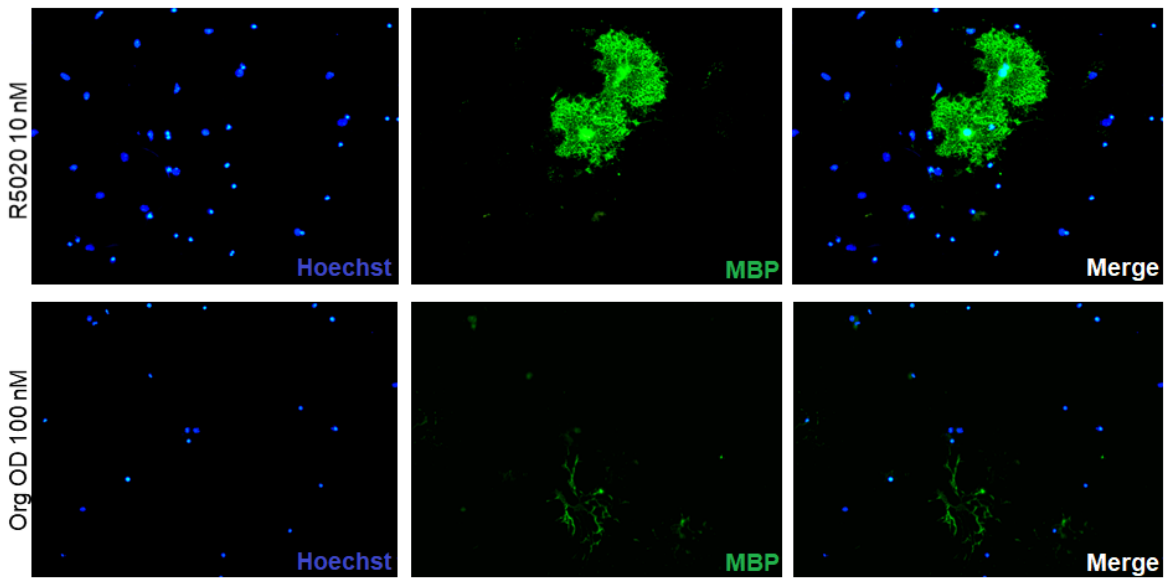


Figura 10. La progesterona promueve la diferenciación de las CPO embrionarias. A) Inmunofluorescencia para el marcador O4 (color verde) en CPO cultivadas sin factores de crecimiento y tratadas por 3 días con progesterona (P4) (10 nM), RU486 (1 μM), P4 (10 nM) + RU486 (1 μM), R5020 (10 nM), Org OD 02-0 (100 nM) y vehículo (DMSO 0.01%). B) Porcentaje de células O4+ observadas en los experimentos de inmunofluorescencia. C) Área de ramificación de las células O4+ expresada como unidades arbitrarias. Los resultados están presentados como la media ± E.E.M.; n = 3; *p<0.05 y **p<0.01 vs el resto de los grupos.

En cuanto al potencial de mielinización, la progesterona y el fármaco R5020 aumentaron significativamente la expresión del marcador de mielina MBP en las CPO diferenciadas con respecto al vehículo (Fig. 11) y, similar a los resultados anteriores, los efectos pro-mielinizantes de la progesterona fueron bloqueados cuando las células fueron tratadas en conjunto o solo con RU486, sin observarse cambios en las células tratadas con Org OD 02-0.





B)

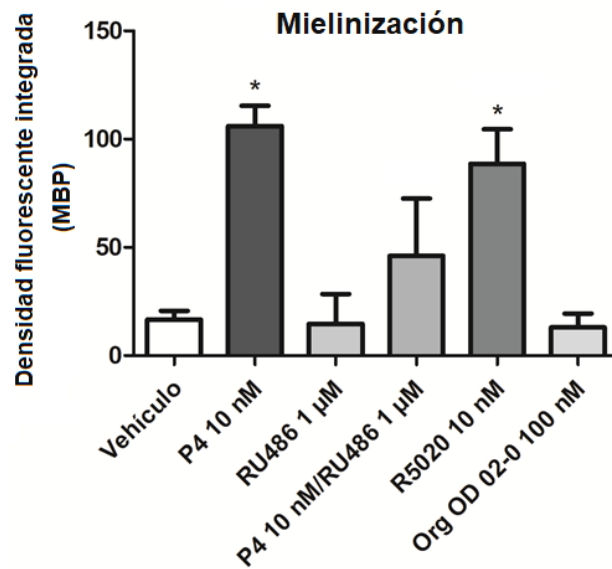


Figura 11. La progesterona incrementa el potencial de mielinización de las CPO diferenciadas. A) Inmunofluorescencia contra el marcador de mielina MBP en las CPO cultivadas sin factores de crecimiento y tratadas durante 3 días con progesterona (P4) (10 nM), RU486 (1 µM), P4 (10 nM) + RU486 (1 µM), R5020 (10 nM), Org OD 02-0 (100 nM) y vehículo (DMSO 0.01%). B) Expresión de la proteína MBP medida como densidad fluorescente. Los resultados están expresados como la media \pm E.E.M.; n = 3; *p<0.05 vs el resto de los grupos.

7.3. La progesterona regula positivamente la expresión de genes oligodendrogiales.

Teniendo en cuenta que la progesterona promovió la proliferación y diferenciación de las CPO embrionarias cultivadas a través de la activación del RP, se procedió a evaluar los efectos de dicha hormona en la expresión de genes asociados a la oligodendrogénesis durante el desarrollo. De este modo, después de tratar con progesterona (10 nM) a las CPO por 24 horas, se logró observar por medio de RT-qPCR que la expresión del factor de transcripción *Nkx 6.1* y la del marcador de oligodendrocitos mielinizantes *Cnp1*, aumentó significativamente con respecto a aquellas células tratadas con vehículo, mientras que a las 48 horas de tratamiento los genes que aumentaron sus niveles de expresión fueron *Ng2*, el factor de transcripción *Sox9*, y como se anticipaba, el gen de la proteína *Mbp* (Fig. 12). Cabe mencionar que la progesterona no aumentó significativamente los niveles de expresión de los genes *Pdgfra*, *Sox10* y *Nkx 6.2*. Estos resultados sugieren por lo tanto que la progesterona ejerce sus efectos en las CPO a través de regular la expresión de genes oligodendrogiales.

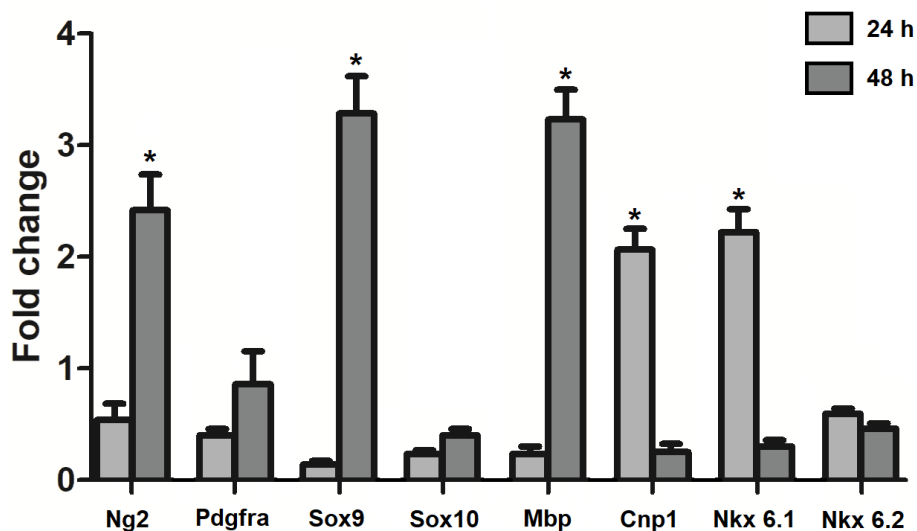


Figura 12. La progesterona regula positivamente la expresión de genes oligodendrogiales. Las gráficas muestran la tasa de cambio en la expresión relativa (normalizada a la expresión del 18S) de los genes *Ng2*, *Pdgfra*, *Sox9*, *Sox10*, *Mbp*, *Cnp1*, *Nkx 6.1* y *Nkx 6.2* después de tratar a las CPO por 24 o 48 horas con progesterona (10 nM) y vehículo (DMSO 0.01%). Los resultados fueron obtenidos a través de RT-qPCR y están expresados como la media \pm E.E.M.; n = 3; *p<0.05 vs vehículo.

Puesto que el RP funciona como un factor de transcripción activado por ligando que se une a secuencias específicas del ADN en regiones promotoras de genes regulados por la progesterona, se realizó un análisis *in silico* para detectar posibles elementos de respuesta a progesterona en las secuencias promotoras de los genes que fueron regulados positivamente en las CPO embrionarias tratadas con la hormona. Las secuencias promotoras de los genes *Ng2*, *Sox9*, *Nkx 6.1*, *Cnp1* y *Mbp* fueron obtenidas de la Base de Datos de Promotores Eucariontes (<https://epd.epfl.ch//index.php>) y corroboradas mediante un análisis BLAST en las bases de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

De acuerdo con los algoritmos contenidos en las bases de datos JASPAR, TRANSFAC y NUBIsScan, se logró detectar que todos los genes analizados contienen potenciales elementos de respuesta a progesterona en sus regiones promotoras (Fig. 13). Con estos resultados se sugiere que los efectos oligodendrogénicos de la progesterona se encuentran mediados por un mecanismo de acción genómico, y que, además, la progesterona podría regular de manera diferencial la expresión de genes asociados con la oligodendrogénesis durante la progresión de dicho proceso en la vida prenatal.

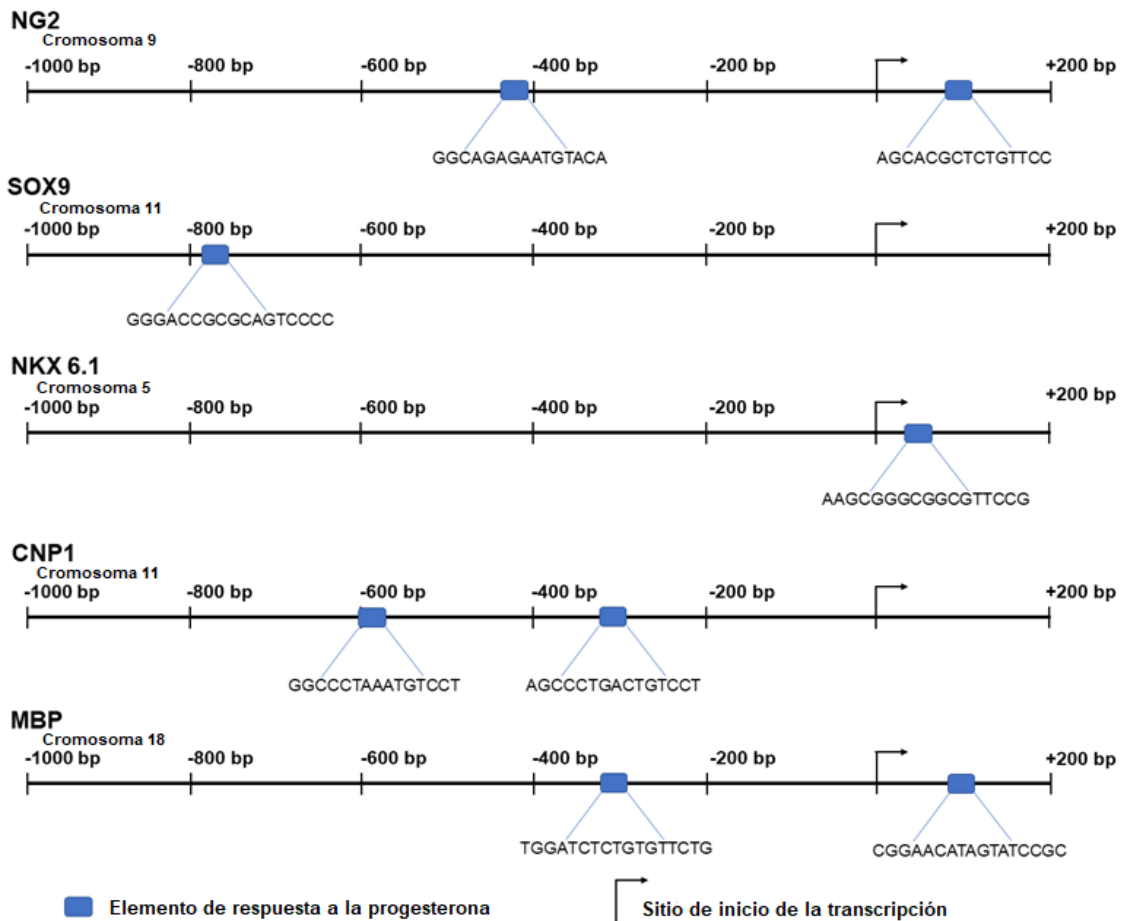


Figura 13. Análisis *in silico* para identificar potenciales elementos de respuesta a progesterona en las secuencias de los genes *Ng2*, *Sox9*, *Nkx 6.1*, *Cnp1* y *Mbp*. Las secuencias promotoras fueron obtenidas de la Base de Datos de Promotores Eucariontes y analizadas con los algoritmos contenidos en las bases de datos JASPAR, TRANSFAC y NUBIsScan. Para cada secuencia esquematizada, la flecha negra indica el sitio de inicio de la transcripción. Los potenciales elementos de respuesta a progesterona se encuentran señalados con un recuadro azul.

7.4. Los efectos oligodendrogénicos de la progesterona se encuentran mediados por el RP-B.

Tomando en cuenta que la expresión del RP en las CPO embrionarias no se encuentra aún reportada en la literatura, se procedió a realizar un análisis *in silico* utilizando la herramienta "Genes" de la base de datos "Mouse Organogenesis Cell Atlas" (<https://oncoscope.v3.sttrcancer.org/atlas.gs.washington.edu.mouse.rna/landin>) (92) para identificar si la expresión del RP había sido detectada por *single-cell RNA-seq* (secuenciación de ARN de una única célula) en células

oligodendrogliales embrionarias de ratón durante la construcción de la base de datos ya mencionada.

De este modo se encontró que las células de la glía radial, las CPO, y los oligodendrocitos prematuros (i.e. oligodendrocitos diferenciados tempranamente en el desarrollo) de ratones en edad embrionaria E9.5 a E13.5 expresan el RP. Además, se encontró particularmente que la expresión del RP aumenta cuando las células son especificadas hacia CPO y que posteriormente disminuye ligeramente cuando éstas se diferencian a oligodendrocitos (Fig. 14A), lo cual sugiere que el RP debe desempeñar un rol importante en estas células durante su etapa de progenitores oligodendrogliales.

Posteriormente se procedió a caracterizar la expresión de las isoformas del RP en las CPO embrionarias de ratón mediante la técnica de *Western Blot*. Con ello fue posible detectar la expresión del RP-A y RP-B en las CPO, observándose que el RP-B es expresado en mucho mayor proporción que el RP-A (Fig. 14B). Puesto que el RP-B es un activador de la transcripción mucho más potente que el RP-A, y dado que se observó que éste se expresaba en mayor proporción en las células cultivadas, se procedió a silenciar la expresión del RP-B mediante la transfección de un siRNA específico para así poder evaluar su rol en las CPO. El silenciamiento de la expresión del RP-B fue comprobado a través de RT-qPCR, logándose apreciar en la figura 14C que la cantidad de transcrito de esta isoforma fue reducida hasta en más de un 60% en las células transfectadas con el siRNA RP-B con respecto a aquellas células transfectadas con un siRNA control.

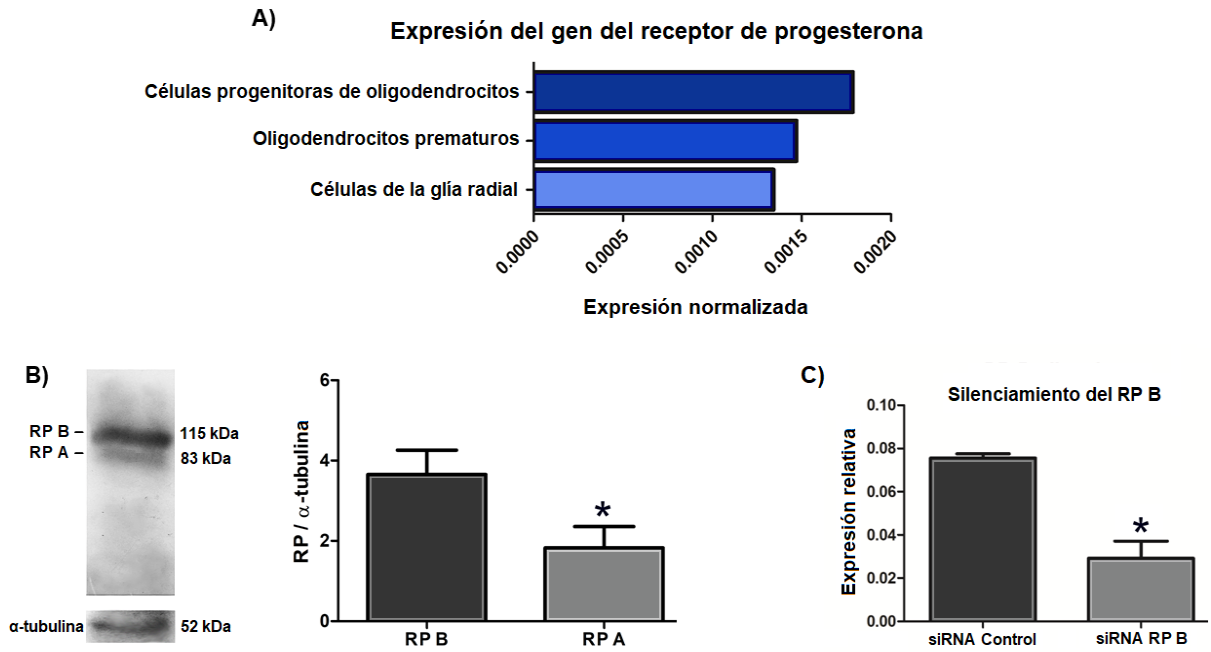


Figura 14. Las CPO de la médula espinal embrionaria del ratón expresan ambas isoformas del RP. A) Análisis de la expresión del RP en células de la glía radial, CPO y oligodendrocitos prematuros en embriones de ratón E9.5-E13.5 utilizando la base de datos MOCA; los datos se encuentran normalizados por el tamaño de la biblioteca de los ARNm secuenciados en las células mencionadas (92). B) Expresión del RP-A y RP-B detectada por *Western Blot* en las CPO cultivadas a partir de la médula espinal de embriones de ratón E14.5. C) Silenciamiento del RP-B por transfección de un siRNA en las CPO cultivadas y corroborado a través de RT-qPCR. Los resultados están expresados como la media \pm E.E.M.; n = 3; *p<0.05 vs RP-B; *p<0.05 vs siRNA control.

Para evaluar el rol del RP-B, 24 horas después de haber sido transfectadas las CPO, éstas fueron tratadas con progesterona (10 nM) e incubadas por tres días con o sin factores de crecimiento para determinar su capacidad de proliferación y potencial de diferenciación respectivamente. Así, se pudo observar que la proliferación (vista como porcentaje de células NG2/+Ki67+) de las CPO transfectadas con el siRNA RP-B y tratadas con progesterona fue mucho menor con respecto a las células transfectadas con el siRNA control y también tratadas con progesterona. De la misma manera se observó un porcentaje mucho menor de oligodendrocitos O4+ diferenciados en las células que fueron transfectadas con el siRNA RP-B y tratadas con progesterona, indicando por lo tanto que el silenciamiento del RP-B disminuyó la diferenciación de las CPO. Por lo tanto,

estos resultados sugieren que los efectos oligodendrogénicos de la progesterona están mediados a través de la activación específica del RP-B (Fig. 15).

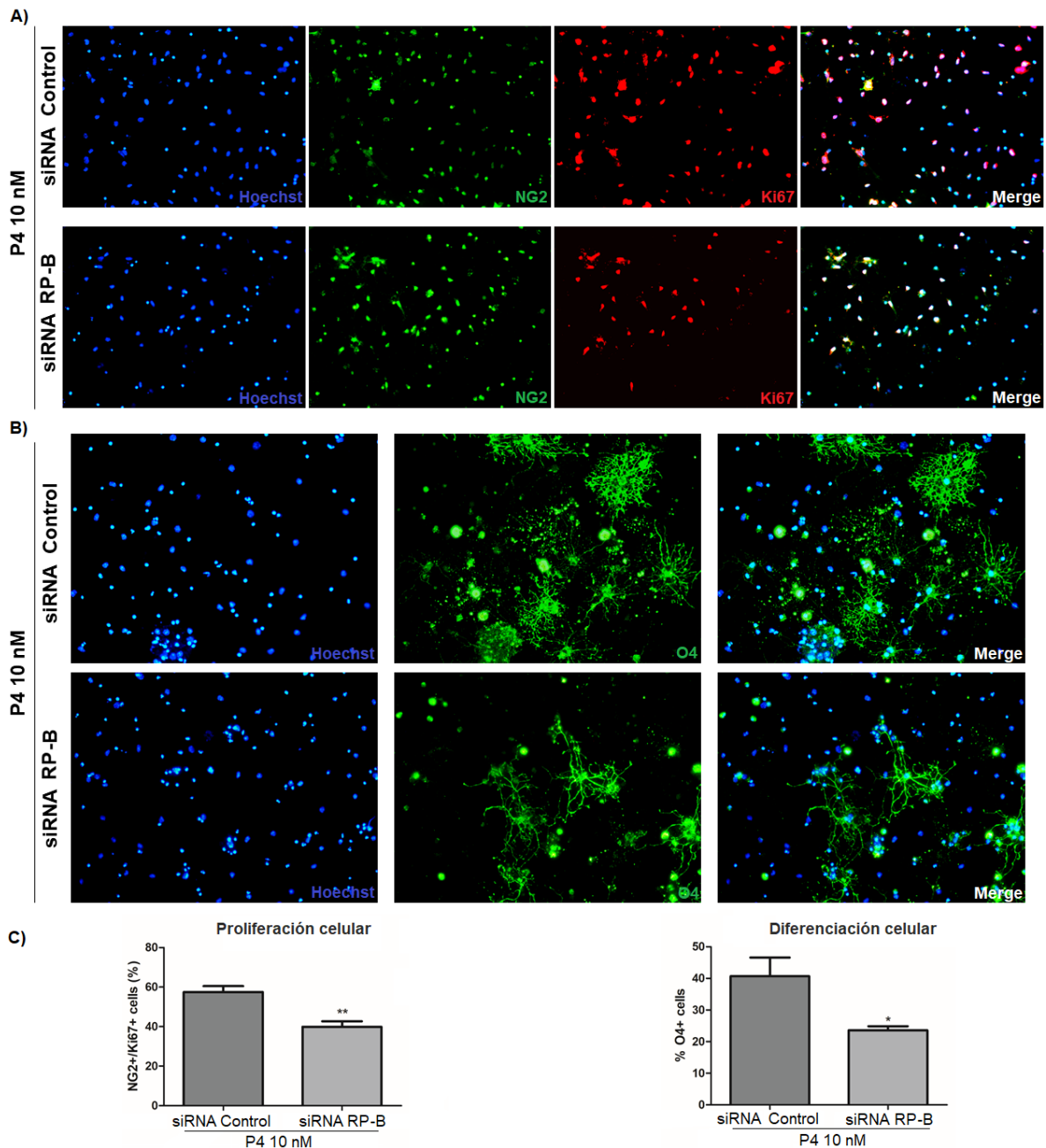


Figura 15. El silenciamiento de la isoforma RP-B bloquea los efectos oligodendrogénicos de la progesterona. A) Inmunofluorescencia para marcar células NG2+/Ki67+ y B) O4+ en CPO transfectadas con un siRNA control o un siRNA RP-B y tratadas durante 3 días con progesterona (P4) (10 nM). C) Gráficas derivadas del porcentaje de células NG2+/Ki67+ y O4+ observadas en el ensayo de inmunofluorescencia. Los resultados están expresados como la media \pm E.E.M.; $n = 3$; * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs siRNA control.

8. Discusión

La progesterona es una hormona ampliamente asociada a diversos procesos de la fisiología reproductiva femenina. Sin embargo, sus funciones no se limitan solo al aspecto reproductivo, sino que también es un importante neuroesteroide que se sintetiza y metaboliza en diversas regiones del SNC de vertebrados, tanto en hembras como machos, donde regula diversas funciones neurales (93). Aunado a esto, existe amplia evidencia de que la progesterona también participa en varios eventos que suceden durante el desarrollo temprano del SNC, como por ejemplo la oligodendrogénesis y la mielinización (43).

Los efectos de la progesterona sobre la mielinización fueron estudiados por primera vez en nervios periféricos de roedores adultos, donde se ha observado que esta hormona regula la diferenciación de las células de Schwann (las células mielinizantes del SNP) a la vez que acelera la remielinización de los nervios después de haberse sufrido una lesión traumática. De igual modo, a través de cocultivos de células de Schwann y neuronas, se ha demostrado que la administración de progesterona, a una concentración de 10 nM, aumenta la mielinización de los axones de las neuronas (48, 80). Similar a estos hallazgos, ya se ha documentado en el SNC que la progesterona ejerce funciones neuroprotectoras y favorece la remielinización en individuos adultos con lesión en médula espinal, esto a través de la activación del RP en las células oligodendrogiales (81, 94), motivos por los cuales se ha sugerido y evaluado el uso de la progesterona como un posible agente terapéutico para tratar lesiones o enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple, las leucodistrofias o la encefalomiелitis (83).

Con respecto a los efectos oligodendrogénicos de la progesterona durante el desarrollo, se ha reportado que las CPO del cerebro de roedores recién nacidos sintetizan progesterona (84). Además, se ha observado también que la progesterona, a través de su interacción con el RP, promueve la proliferación y posterior diferenciación de las CPO hacia oligodendrocitos, así como también aumenta la capacidad de mielinización de estos últimos en cerebelo de ratas y ratones en su primera semana de vida postnatal (85, 86).

A pesar de los hallazgos ya mencionados, hasta el momento se desconocía si la progesterona también ejerce sus efectos oligodendrogénicos en CPO embrionarias y por lo tanto en el desarrollo prenatal del SNC, así como también se desconocía a través de qué isoforma del RP la progesterona induce dichos efectos, lo cual resulta importante de estudiar para comprender de mejor manera los mecanismos moleculares que regulan la oligodendrogénesis embrionaria y así generar conocimientos que puedan contribuir, por ejemplo, a la elaboración de estrategias terapéuticas más eficientes para tratar las enfermedades y lesiones desmielinizantes que pueden afectar al SNC. Dado lo anterior, en el presente trabajo se estudiaron los efectos de la progesterona y el rol específico de la isoforma RP-B en cultivos primarios de CPO derivados a partir de la médula espinal embrionaria de ratones en etapa de desarrollo E14.5.

La médula espinal embrionaria del ratón es un excelente modelo para estudiar los diversos eventos que acontecen durante el neurodesarrollo prenatal debido a múltiples ventajas. Por ejemplo, es un tejido embrionario que se puede aislar relativamente fácil y del cual a su vez se pueden aislar los diferentes tipos de células progenitoras que dan lugar a los linajes celulares observados en el SNC adulto (95).

Los diferentes eventos espacio-temporales que subyacen a los procesos de neurogénesis y gliogénesis en la médula espinal embrionaria se encuentran ya muy bien caracterizados en la literatura (96). De este modo, se sabe por ejemplo que la especificación de las CTN hacia CPO durante el desarrollo embrionario del ratón ocurre en la etapa E12.5, teniendo como sitio primario de origen la prospectiva región cervical de la médula espinal (16).

Previamente ya se ha reportado que las CTN de la médula espinal embrionaria del ratón son mucho más oligodendrogénicas que aquéllas troncales neurales aisladas de cerebro embrionario (97). Dado esto, en este estudio fue posible generar cultivos primarios con una alta cantidad de CPO puras (aproximadamente 90% de pureza) a partir de neuroesferas derivadas de CTN Sox2 positivas aisladas del segmento cervical de la médula espinal de ratones en etapa embrionaria E14.5, siendo un resultado esperado debido también al hecho de que ya anteriormente otros estudios habían demostrado la eficacia de la metodología

aplicada en este trabajo para generar cultivos altamente puros de CPO a partir de neuroesferas derivadas de tejido neural embrionario (90).

Utilizando los cultivos primarios ya mencionados, en este estudio se observó que la progesterona incrementa la tasa de proliferación de las CPO embrionarias NG2 positivas, así como también aumenta su diferenciación hacia oligodendrocitos O4 positivos, resultados que previamente habían sido documentados solamente en CPO de cerebelo de roedores postnatales y en CPO de médula espinal de ratas adultas con daño desmielinizante (81, 85). De este modo, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la progesterona podría expandir el número de las CPO durante el desarrollo embrionario, y posteriormente facilitar su diferenciación una vez que estas células hayan abandonado el ciclo celular, por lo cual valdría la pena realizar estudios posteriores para ahondar más en los mecanismos moleculares por los cuales la progesterona induciría la proliferación y diferenciación de las CPO durante el desarrollo embrionario del SNC.

Por otro lado, se detectó también que la progesterona puede incrementar la capacidad de mielinización de las CPO embrionarias de ratón, tal y como se observó por un aumento en la expresión de la proteína de mielina MBP. Cabe mencionar que, al contrario de los oligodendrocitos humanos cultivados, en el trabajo aquí descrito fue posible evaluar la capacidad de mielinización ya que las células oligodendrogiales de ratón no necesitan la presencia de axones para comenzar a expresar componentes de la mielina en condiciones *in vitro* (98), sin embargo, no por ello dejaría de ser importante corroborar aún más dichos hallazgos en modelos más cercanos al *in vivo*. Por ejemplo, a través de cultivos organotípicos de médula espinal prenatal de ratón expuestos y no expuestos a progesterona exógena, se podría observar a mejor detalle (e.g. por inmunocitoquímica) como dicha hormona podría influir en el patrón de mielinización de las neuronas presentes en tal tejido, y así poder aportar más evidencia sobre la posible participación de la progesterona en el proceso de mielinización del SNC durante etapas tempranas del desarrollo.

Para determinar el papel del RP en la proliferación, diferenciación y maduración de las CPO embrionarias, en este estudio se utilizaron fármacos antagonistas y agonistas a los receptores intracelulares y membranales de la progesterona. El

fármaco RU486 es un compuesto cuya fórmula desarrollada es similar a la de la progesterona, pero con una cadena lateral adicional en el carbono 11 de la molécula. Este compuesto es un antagonista que compite con la progesterona por el sitio de unión del RP, sin embargo, no induce los cambios conformacionales que conllevan la activación de dicho receptor. Mientras tanto, el fármaco R5020, es un compuesto análogo a la progesterona agonista del RP. Ambos, RU486 y R5020, se unen con la misma afinidad que la progesterona a ambas isoformas del RP, además de que, el compuesto R5020, también se puede unir a los mRPs pero con una afinidad muy baja en comparación con la progesterona, mientras que RU486 no tiene afinidad alguna a estos últimos receptores. Por último, el compuesto Org OD 02-0 es también un análogo de la progesterona, pero con adiciones de grupos alquilo en los carbonos 10 y 17 de la molécula; dichas modificaciones dotan al compuesto de una mayor afinidad hacia los mRPs y una afinidad casi nula hacia el RP (99). Así, con el uso de los fármacos ya mencionados, se demostró que los efectos oligodendrogénicos y pro-mielinizantes de la progesterona en las CPO cultivadas fueron mediados únicamente por el RP, pues se observó que el antagonista RU486 bloqueaba dichos efectos, mientras que, el agonista R5020, inducía efectos similares a la progesterona. Además, es importante también referir que el agonista de los mRPs, el fármaco Org OD 02-0, tampoco promovió cambio alguno en las CPO, sugiriendo por lo tanto que la progesterona, a través de la activación del RP, podría tener un rol importante en la oligodendrogénesis embrionaria.

Posteriormente se evaluaron en las CPO cultivadas los efectos de la progesterona en la expresión de varios genes asociados a la especificación y mantenimiento del fenotipo oligodendroglial. Particularmente, se observó que la progesterona promovió la expresión de los genes *Cnp1* y *Nkx 6.1* en las CPO después de haber sido tratadas por 24 horas, mientras que, después de 48 horas, la expresión de los genes *Ng2*, *Sox9* y *Mbp* fue promovida sin inducir cambios significativos en la expresión de *Cnp1* y *Nkx 6.1*, lo cual sugiere que la progesterona regula la expresión de genes oligodendrogliales de una manera dependiente del tiempo de exposición a la hormona al menos en condiciones *in vitro*, pues en el contexto del neurodesarrollo prenatal se observa que la expresión de *Sox9*, *Nkx 6.1* y *Ng2* en

las CPO recién especificadas antecede a la expresión de *Cnp1* y *Mbp* en los oligodendrocitos ya diferenciados y que han comenzado a sintetizar componentes de la mielina (16, 19). Si bien los resultados mostrados parecieran contrastar con lo observado durante el neurodesarrollo temprano, en este trabajo se demuestra que la progesterona puede regular la expresión de genes importantes para los procesos de oligodendrogénesis y mielinización, sugiriendo entonces que en el contexto normal del desarrollo, en conjunto con las demás citocinas y hormonas a las que está expuesto el tejido neural, la progesterona pudiera estar contribuyendo a la adecuada formación de las células mielinizantes a través de regular la expresión génica en las mismas. Más a favor de esto último, en este estudio se logró visualizar a través de un análisis *in silico* que los genes regulados positivamente por la progesterona en los experimentos de RT-qPCR contienen potenciales sitios de unión al RP en sus regiones promotoras, sugiriendo por lo tanto que la progesterona podría regular la expresión de dichos genes directamente a través del RP, lo cual ameritaría de ser confirmado por medio de experimentos de *ChIP-seq*.

Previamente se había reportado que la progesterona regula positivamente la expresión de genes oligodendrogiales como *Olig1/2*, *Nkx 2.2*, *Mbp*, *Plp* y *Mog* en médula espinal de ratas adultas con lesión desmielinizante a la par de que incrementa la tasa de mielinización en la zona afectada debido a que promueve la proliferación y diferenciación de las CPO remanentes adultas (81, 94). También, se ha demostrado en modelos murinos de esclerosis múltiple que la progesterona incrementa la expresión de los genes *Olig1*, *Nkx 2.2*, *Plp* y *Mbp* en médula espinal a la vez que induce efectos neuroprotectores y pro-mielinizantes en dichos animales (82).

Tomando en cuenta las evidencias anteriores, y en conjunto con los resultados obtenidos en este estudio, se demuestra por lo tanto que la progesterona cumpliría un papel importante en la oligodendrogénesis y mielinización durante el desarrollo, así como también durante un estado patológico del SNC a través de regular la expresión de genes oligodendrogiales. Más aún, el hecho de que las CPO remanentes adultas respondan a la progesterona, en especial durante un estado patológico, deja en manifiesto que estas células retienen su competencia a esta

hormona desde la etapa prenatal y hasta la vida adulta, noción que resulta relevante tomar en cuenta, por ejemplo, para comprender mejor los mecanismos de regeneración de la mielina en casos de daño desmielinizante en SNC.

Respecto a la expresión RP, anteriormente ya se había demostrado que tanto astrocitos como oligodendrocitos aislados del cerebro de ratas recién nacidas expresan la forma total (i. e. sin discernir entre alguna de las isoformas) de este receptor nuclear (100). Mientras tanto, en otro estudio se reportó que las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos de la médula espinal de la rata expresan la isoforma RP-B sin diferencias sexuales entre los niveles de expresión (101).

En el trabajo aquí realizado, se detectó por primera vez mediante *Western Blot* que las CPO embrionarias de ratón expresan ambas isoformas del RP, lo cual es un hallazgo importante, pues el hecho de que el RP sea expresado por las CPO embrionarias aporta evidencia a favor de la posible participación de la progesterona en la oligodendrogénesis embrionaria.

Adicionalmente, en este trabajo se analizó la expresión del RP en células oligodendrogiales de embriones de ratón E9.5-E13.5 en la base de datos MOCA (92). De acuerdo con esta base construida a través de *single-cell RNA-seq* (secuenciación de ARN de una única célula), las CPO expresan constitutivamente el RP total desde estadios tempranos del neurodesarrollo embrionario; más aún, la expresión del RP aumenta una vez que las células de la glía radial se han especificado al linaje CPO y decrece levemente una vez que estas células se han diferenciado a oligodendrocitos, sugiriendo entonces que el RP debe cumplir un rol relevante en las CPO embrionarias.

Puesto a que en este trabajo se encontró que las CPO embrionarias derivadas de la médula espinal del ratón expresan en mayor cantidad el RP-B con respecto al RP-A, y apelando al hecho de que esta isoforma es un activador de la transcripción más potente, se procedió a silenciar su expresión a través de la transfección de un siRNA específico. De este modo, se apreció que los efectos oligodendrogénicos de la progesterona fueron significativamente bloqueados, indicando por lo tanto que el RP-B es el mediador activo de la progesterona en las células oligodendrogiales.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren por tanto que la progesterona podría participar en la oligodendrogénesis prenatal, lo cual es completamente plausible tomando en cuenta que el RP se expresa en tejido neural desde etapas muy tempranas del desarrollo, así como también se expresan funcionalmente las enzimas que se encuentran involucradas en la síntesis y metabolismo de la progesterona (43, 55).

Asimismo, la gestación es un evento caracterizado por un incremento en los niveles maternos de progesterona; de hecho, la función clásica de esta hormona es la del mantenimiento de la gestación, lo cual es importante de remarcar ya que existe evidencia de que, al menos en roedores, la progesterona de circulación materna ingresa a la circulación embrio-fetal lográndose unir al RP en las regiones del SNC en desarrollo donde éste se exprese (57, 102). De esto mismo, es también importante señalar que los niveles de progesterona, tanto en la circulación fetal, como en el SNC en desarrollo prenatal, aumentan progresivamente conforme avanza la gestación, alcanzando así sus niveles más altos en etapas previas al parto, mismas etapas en las que ocurren eventos críticos del neurodesarrollo como lo son la consolidación de los circuitos neurales y el inicio de la mielinización (53, 103).

Por último, y retomando lo mencionado previamente, el uso de la progesterona como agente terapéutico para el tratamiento de lesiones en el SNC y daño desmielinizante ya ha sido propuesto (81, 83), y no solo eso, sino que incluso ya se han conducido estudios clínicos en humanos (104). A pesar de ello, estudios clínicos de fase III diseñados para estudiar la eficacia neuroprotectora de la progesterona en pacientes con lesión cerebral traumática han fallado en replicar los mismos resultados positivos observados anteriormente tanto en modelos animales como en estudios clínicos de fase II, donde ya se había demostrado que la progesterona incrementa significativamente la supervivencia neuronal en SNC después de haber sufrido algún tipo de lesión física, así como también se había reportado que mejora la evolución de los signos clínicos asociados a dichas lesiones (105).

Sobre lo anterior, es importante mencionar qué en todos estos estudios clínicos, así como en los ya realizados en modelos animales, no se contempló el perfil de

expresión o la función específica de las isoformas del RP. Dado que en este trabajo se demostró que el RP-B se expresa predominantemente en las CPO embrionarias, y que además es el mediador activo de los efectos oligodendrogénicos de la progesterona, se sugiere que la expresión y la regulación de las isoformas del RP podría determinar las acciones oligodendrogénicas y promielinizantes de la progesterona de manera dependiente de la región del SNC y etapa del desarrollo que se observe, por lo que una selectiva modulación de las isoformas del RP podría rendir mejores resultados en el tratamiento de las diferentes lesiones a las que el SNC es susceptible, incluyendo aquellas que generan daño desmielinizante.

9. Conclusiones

Las funciones de la progesterona no se limitan sólo a cuestiones reproductivas, sino que también pueden extenderse a otros aspectos en el organismo como aquéllos relacionados al funcionamiento del sistema nervioso.

Si bien ya se había demostrado que algunas de las funciones no reproductivas de la progesterona eran regular la oligodendrogénesis y mielinización después del nacimiento y en la vida adulta, en este trabajo se demuestra por primera vez que la progesterona puede promover la proliferación, diferenciación y maduración de las CPO embrionarias del ratón a través de un mecanismo de acción clásico mediado por la isoforma RP-B, indicando que la progesterona podría también regular el proceso de oligodendrogénesis durante el desarrollo prenatal del SNC.

10. Perspectivas

El hecho de que en este trabajo se aporte evidencia sobre la posible participación de la progesterona en la oligodendrogénesis embrionaria pone de manifiesto la importancia de seguir realizando estudios sobre las acciones de esta hormona en el neurodesarrollo y en específico sobre el proceso de mielinización en la vida temprana.

Puesto a que todos los resultados presentados en este trabajo fueron obtenidos a través de un modelo *in vitro*, sería necesario corroborar en modelos más cercanos al *in vivo* la evidencia de que la progesterona podría tener un rol en la oligodendrogénesis embrionaria, problema que podría ser abordado experimentalmente utilizando por ejemplo cultivos de embriones de ratón completos y privados del aporte materno de progesterona, para así evaluar en ellos el efecto del aporte exógeno de progesterona en el proceso de formación de los oligodendrocitos y la subsecuente mielinización del SNC.

De igual modo, resulta importante dilucidar que tantos genes (aparte de los mostrados en este estudio) y que posibles vías de señalización son reguladas por la progesterona en las CPO durante la etapa embrionaria, para así, comprender mejor los mecanismos moleculares por los cuales esta hormona pudiera contribuir al proceso de oligodendrogénesis y mielinización en el desarrollo, así como en la remielinización del SNC en caso de alguna lesión o enfermedad. Experimentos como microarreglos o secuenciación de ARN podrían ofrecer una visión más global de todos los genes que pueden ser regulados por la progesterona en dichas células.

Por último, sería relevante evaluar el posible rol de la isoforma RP-A en las células oligodendrogiales embrionarias, pues los resultados expuestos en el presente trabajo no descartan que la progesterona pudiese mediar sus acciones en dichas células a través de la modulación de ambas isoformas del RP, activando por ejemplo, a través del RP-B, la expresión de genes oligodendrogiales a la vez que, a través del RP-A, podría reprimir la expresión de genes que a su vez reprimen genes o vías de señalización asociadas a la oligodendrogénesis y mielinización.

Referencias

1. Simons, M., & Nave, K. A. (2016). Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020479>
2. Barateiro, A., Brites, D., & Fernandes, A. (2016). Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Current Pharmaceutical Design*. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151204000636>
3. Snaidero, N., & Simons, M. (2014). Myelination at a glance. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.151043>
4. Rasband, M. N., & Peles, E. (2016). The nodes of Ranvier: Molecular assembly and maintenance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020495>
5. Domingues, H. S., Portugal, C. C., Socodato, R., & Relvas, J. B. (2016). Oligodendrocyte, astrocyte, and microglia crosstalk in myelin development, damage, and repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00071>
6. Waly, B. El, Macchi, M., Cayre, M., & Durbec, P. (2014). Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00145>
7. Kageyama, R., Shimojo, H., & Ohtsuka, T. (2019). Dynamic control of neural stem cells by bHLH factors. *Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.09.005>
8. Namba, T., & Huttner, W. B. (2017). Neural progenitor cells and their role in the development and evolutionary expansion of the neocortex. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1002/wdev.256>
9. Zhang, X., Huang, C. T., Chen, J., Pankratz, M. T., Xi, J., Li, J., ... Zhang, S. C. (2010). Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.017>
10. Yamashita, M. (2013). From neuroepithelial cells to neurons: Changes in the physiological properties of neuroepithelial stem cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.07.016>
11. Subramanian, L., Bershteyn, M., Paredes, M. F., & Kriegstein, A. R. (2017). Dynamic behaviour of human neuroepithelial cells in the developing forebrain. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms14167>

12. Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R. L., & Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08845>
13. Ohtsuka, T., & Kageyama, R. (2019). Regulation of temporal properties of neural stem cells and transition timing of neurogenesis and gliogenesis during mammalian neocortical development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.01.007>
14. Homem, C. C. F., Repic, M., & Knoblich, J. A. (2015). Proliferation control in neural stem and progenitor cells. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn4021>
15. Glasgow, S. M., Carlson, J. C., Zhu, W., Chaboub, L. S., Kang, P., Lee, H. K., ... Deneen, B. (2017). Glia-specific enhancers and chromatin structure regulate NFIA expression and glioma tumorigenesis. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.4638>
16. Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature09611>
17. Sim, F. J., McClain, C. R., Schanz, S. J., Protack, T. L., Windrem, M. S., & Goldman, S. A. (2011). CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1972>
18. Orentas, D. M., Hayes, J. E., Dyer, K. L., & Miller, R. H. (1999). Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development*.
19. Goldman, S. A., & Kuypers, N. J. (2015). How to make an oligodendrocyte. *Development (Cambridge)*. <https://doi.org/10.1242/dev.126409>
20. Davis-Dusenbery, B. N., Williams, L. A., Klim, J. R., & Eggan, K. (2014). How to make spinal motor neurons. *Development (Cambridge)*. <https://doi.org/10.1242/dev.097410>
21. Vallstedt, A., Klos, J. M., & Ericson, J. (2005). Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.026>
22. Finzsch, M., Stolt, C. C., Lommes, P., & Wegner, M. (2008). Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor α expression. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.010454>

23. Rowitch, D. H. (2004). Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn1389>
24. Nasrabady, S. E., Rizvi, B., Goldman, J. E., & Brickman, A. M. (2018). White matter changes in Alzheimer's disease: a focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica Communications*. <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0515-3>
25. Fernandez-Castaneda, A., & Gaultier, A. (2016). Adult oligodendrocyte progenitor cells – Multifaceted regulators of the CNS in health and disease. *Brain, Behavior, and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.01.005>
26. Bergles, D. E., & Richardson, W. D. (2016). Oligodendrocyte development and plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020453>
27. Kinney, H.C.; Volpe, J.J. (2018). Volpe's Neurology of the Newborn. *Elsevier*. Amsterdam, The Netherlands, pp. 176–188.
28. Almeida, R. G., & Lyons, D. A. (2017). On myelinated axon plasticity and neuronal circuit formation and function. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3185-16.2017>
29. Baron, W., Metz, B., Bansal, R., Hoekstra, D., & De Vries, H. (2000). PDGF and FGF-2 signaling in oligodendrocyte progenitor cells: Regulation of proliferation and differentiation by multiple intracellular signaling pathways. *Molecular and Cellular Neurosciences*. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0827>
30. Lee, J. Y., & Petratos, S. (2016). Thyroid Hormone Signaling in Oligodendrocytes: from Extracellular Transport to Intracellular Signal. *Molecular Neurobiology*. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0013-1>
31. Barres, B. A., Burne, J. F., Holtmann, B., Thoenen, H., Sendtner, M., & Raff, M. C. (1996). Ciliary neurotrophic factor enhances the rate of oligodendrocyte generation. *Molecular and Cellular Neurosciences*. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0053>
32. Buttery, P. C., & Ffrench-Constant, C. (1999). Laminin-2/integrin interactions enhance myelin membrane formation by oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neurosciences*. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0781>
33. Lourenço, T., Paes De Faria, J., Bippes, C. A., Maia, J., Lopes-Da-Silva, J. A., Relvas, J. B., & Graões, M. (2016). Modulation of oligodendrocyte differentiation and maturation by combined biochemical and mechanical cues. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep21563>

34. Jure, I., De Nicola, A., & Labombarda, F. (2019). Progesterone effects on the oligodendrocyte lineage: all roads lead to the progesterone receptor. *Neural Regeneration Research*. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.262570>
35. Morel, Y., Roucher, F., Plotton, I., Goursaud, C., Tardy, V., & Mallet, D. (2016). Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis. *Annales d'Endocrinologie*. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2016.04.023>
36. Do Rego, J. L., Seong, J. Y., Burel, D., Leprince, J., Luu-The, V., Tsutsui, K., ... Vaudry, H. (2009). Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.006>
37. Tuckey, R. C. (2005). Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta*. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.06.012>
38. Wu, S. P., Li, R., & DeMayo, F. J. (2018). Progesterone Receptor Regulation of Uterine Adaptation for Pregnancy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.04.001>
39. Mensah-Nyagan, A. G., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G., & Vaudry, H. (1999). Neurosteroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacological Reviews*.
40. Gutai, J. P., Meyer, W. J., Avinoam Kowarski, A., & Migeon, C. J. (1977). Twenty-four hour integrated concentrations of progesterone, 17-hydroxyprogesterone and cortisol in normal male subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jcem-44-1-116>
41. Snyder, A. M., & Hull, E. M. (1980). Perinatal progesterone affects learning in rats. *Psychoneuroendocrinology*. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(80\)90014-1](https://doi.org/10.1016/0306-4530(80)90014-1)
42. Schumacher, M., Guennoun, R., Robert, F., Carelli, C., Gago, N., Ghomari, A., ... De Nicola, A. F. (2004). Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: Neuroprotection and myelination. *Growth Hormone and IGF Research*. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2004.03.007>
43. González-Orozco, J. C., & Camacho-Arroyo, I. (2019). Progesterone actions during central nervous system development. *Frontiers in Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00503>

44. Vickery L.E. (1993). Cytochrome P450. Handbook of Experimental Pharmacology, 105. Springer: Berlin, Heidelberg, pp 651-665.
45. Saher, G., Brügger, B., Lappe-Siefke, C., Möbius, W., Tozawa, R. I., Wehr, M. C., ... Nave, K. A. (2005). High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn1426>
46. Sierra, A. (2004). Neurosteroids: The StAR protein in the brain. *Journal of Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01226.x>
47. Liu, G. J., Middleton, R. J., Hatty, C. R., Kam, W. W. Y., Chan, R., Pham, T., ... Banati, R. B. (2014). The 18 kDa translocator protein, microglia and neuroinflammation. *Brain Pathology*. <https://doi.org/10.1111/bpa.12196>
48. Schumacher, M., Guennoun, R., Mercier, G., Désarnaud, F., Lacor, P., Bénavides, J., ... Baulieu, E. E. (2001). Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. In *Brain Research Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00139-4](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00139-4)
49. Pluchino, N., Russo, M., & Genazzani, A. R. (2016). The fetal brain: Role of progesterone and allopregnanolone. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2016-0020>
50. Hosie, A. M., Wilkins, M. E., Da Silva, H. M. A., & Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature05324>
51. Milewich, L., Shaw, C. E., Doody, K. M., Rainey, W. E., Mason, J. I., & Carr, B. R. (1991). 3 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in glandular and extraglandular human fetal tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1210/jcem-73-5-1134>
52. Compagnone, N. A., Bulfone, A., Rubenstein, J. L. R., & Mellon, S. H. (1995). Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo.136.6.7750493>
53. Nguyen, P. N., Billiards, S. S., Walker, D. W., & Hirst, J. J. (2003). Changes in 5 α -pregnane steroids and neurosteroidogenic enzyme expression in the perinatal sheep. *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000064905.64688.10>
54. Ukena, K., Kohchi, C., & Tsutsui, K. (1999). Expression and activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4- isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo.140.2.6516>

55. Compagnone, N. A., & Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1006/frne.1999.0188>
56. Kelleher, M. A., Palliser, H. K., Walker, D. W., & Hirst, J. J. (2011). Sex-dependent effect of a low neurosteroid environment and intrauterine growth restriction on foetal guinea pig brain development. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0248>
57. Hirst, J. J., Kelleher, M. A., Walker, D. W., & Palliser, H. K. (2014). Neuroactive steroids in pregnancy: Key regulatory and protective roles in the foetal brain. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.04.002>
58. Liu, T., & Ogle, T. F. (2002). Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Is Expressed in the Decidualized Mesometrium of Pregnancy and Associates with the Progesterone Receptor Through Protein-Protein Interactions1. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.114>
59. Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Vázquez-Martínez, E.R., Cerbón, M. (2017). Mechanism of progesterone action in the brain. *Hormones, Brain and Behavior*, 3rd ed. *Academic Press, Elsevier*. Oxford, UK, pp 181-214.
60. Cato, L., Neeb, A., Brown, M., & Cato, A. C. B. (2014). Control of steroid receptor dynamics and function by genomic actions of the cochaperones p23 and Bag-1L. *Nuclear Receptor Signaling*. <https://doi.org/10.1621/nrs.12005>
61. Lieberman, B. A., Bona, B. J., Edwards, D. P., & Nordeen, S. K. (1993). The constitution of a progesterone response element. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/mend.7.4.8388996>
62. Garg, D., Ng, S. S. M., Baig, K. M., Driggers, P., & Segars, J. (2017). Progesterone-Mediated Non-Classical Signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.05.006>
63. Valadez-Cosmes, P., Vázquez-Martínez, E. R., Cerbón, M., & Camacho-Arroyo, I. (2016). Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.027>
64. Boonyaratanakornkit, V., Bi, Y., Rudd, M., & Edwards, D. P. (2008). The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.01.010>

65. 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. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08280.x>
66. Jacobsen, B. M., & Horwitz, K. B. (2012). Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.016>
67. Mesiano, S., Wang, Y., & Norwitz, E. R. (2011). Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: Do they hold the key to birth timing? *Reproductive Sciences*. <https://doi.org/10.1177/19337191110382922>
68. Edwards, D. P., Wardell, S. E., & Boonyaratanakornkit, V. (2002). Progesterone receptor interacting coregulatory proteins and cross talk with cell signaling pathways. In *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(02\)00265-0](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(02)00265-0)
69. 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 oestradiol and progesterone treatments. *Journal of Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01088.x>
70. Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Gutiérrez-Rodríguez, A., Chávez-Jiménez, J., & González-Morán, M. G. (2018). Expression of sex hormone receptors in the brain of male and female newly hatched chicks. *Animal Reproduction Science*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.11.016>
71. Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., & Cerbón, M. A. (1998). Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *NeuroReport*. <https://doi.org/10.1097/00001756-199812210-00001>
72. Bellance, C., Khan, J. A., Meduri, G., Guiochon-Mantel, A., Lombès, M., & Loosfelt, H. (2013). Progesterone receptor isoforms PRA and PRB differentially contribute to breast cancer cell migration through interaction with focal adhesion kinase complexes. *Molecular Biology of the Cell*. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-11-0807>
73. Patel, B., Elguero, S., Thakore, S., Dahoud, W., Bedaiwy, M., & Mesiano, S. (2015). Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu056>

74. Lamb, C. A., Fabris, V. T., Jacobsen, B. M., Molinolo, A., & Lanari, C. (2018). Biological and clinical impact of imbalanced progesterone receptor isoform ratios in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0179>
75. Ilicic, M., Zakar, T., & Paul, J. W. (2017). Modulation of Progesterone Receptor Isoform Expression in Pregnant Human Myometrium. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2017/4589214>
76. Richer, J. K., Jacobsen, B. M., Manning, N. G., Abel, M. G., Wolf, D. M., & Horwitz, K. B. (2002). Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110090200>
77. Tung, L., Abdel-Hafiz, H., Shen, T., Harvell, D. M. E., Nitao, L. K., Richer, J. K., ... Horwitz, K. B. (2006). Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0105>
78. Leslie, K. K., Stein, M. P., Kumar, N. S., Dai, D., Stephens, J., Wandinger-Ness, A., & Glueck, D. H. (2005). Progesterone receptor isoform identification and subcellular localization in endometrial cancer. *Gynecologic Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.09.057>
79. Singhal, H., Greene, M. E., Zarnke, A. L., Laine, M., Abosy, R. Al, Chang, Y. F., ... Greene, G. L. (2018). Progesterone receptor isoforms, agonists and antagonists differentially reprogram estrogen signaling. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21378>
80. Koenig, H., Schumacher, M., Ferzaz, B., Thi, A., Ressouches, A., Guennoun, R., ... Baulieu, E. (1995). Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.7770777>
81. Labombarda, F., González, S. L., Lima, A., Roig, P., Guennoun, R., Schumacher, M., & De Nicola, A. F. (2009). Effects of Progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20814>
82. Garay, L. I., González Deniselle, M. C., Brocca, M. E., Lima, A., Roig, P., & De Nicola, A. F. (2012). Progesterone down-regulates spinal cord inflammatory mediators and increases myelination in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.09.032>

83. Labombarda, F., & Garcia-Ovejero, D. (2014). Give progesterone a chance. *Neural Regeneration Research*. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.139456>
84. Gago, N., Akwa, Y., Sananès, N., Guennoun, R., Baulieu, E. E., El-Etr, M., & Schumacher, M. (2001). Progesterone and the oligodendroglial lineage: Stage-dependent biosynthesis and metabolism. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.1117>
85. Ghomari, A. M., Baulieu, E. E., & Schumacher, M. (2005). Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.023>
86. Ghomari, A. M., Ibanez, C., El-Etr, M., Leclerc, P., Eychenne, B., O'Malley, B. W., ... Schumacher, M. (2003). Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01881.x>
87. Khan, A., Fornes, O., Stigliani, A., Gheorghe, M., Castro-Mondragon, J. A., Van Der Lee, R., ... Mathelier, A. (2018). JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1126>
88. Wingender, E., Schoeps, T., Haubrock, M., Krull, M., & Dönitz, J. (2018). TFClass: Expanding the classification of human transcription factors to their mammalian orthologs. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx987>
89. Podvinec, M., Kaufmann, M. R., Handschin, C., & Meyer, U. A. (2002). NUBIScan, an in Silico approach for prediction of nuclear receptor response elements. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/mend.16.6.0851>
90. Pedraza, C. E., Monk, R., Lei, J., Hao, Q., & Macklin, W. B. (2008). Production, characterization, and efficient transfection of highly pure oligodendrocyte precursor cultures from mouse embryonic neural progenitors. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.20702>
91. Nayak, T., Trotter, J., & Sakry, D. (2018). The intracellular cleavage product of the NG2 proteoglycan modulates translation and cell-cycle kinetics via effects on mTORC1/FMRP signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00231>
92. Cao, J., Spielmann, M., Qiu, X., Huang, X., Ibrahim, D. M., Hill, A. J., ... Shendure, J. (2019). The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0969-x>

93. Schumacher, M., Mattern, C., Ghomari, A., Oudinet, J. P., Liere, P., Labombarda, F., ... Guennoun, R. (2014). Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: Resurgence of the progesterone receptors. *Progress in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.09.004>
94. Jure, I., De Nicola, A. F., & Labombarda, F. (2019). Progesterone effects on oligodendrocyte differentiation in injured spinal cord. *Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.005>
95. Tanabe, Y., & Jessell, T. M. (1996). Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.274.5290.1115>
96. Glasgow, S. M., Carlson, J. C., Zhu, W., Chaboub, L. S., Kang, P., Lee, H. K., ... Deneen, B. (2017). Glia-specific enhancers and chromatin structure regulate NFIA expression and glioma tumorigenesis. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.4638>
97. Kelly, T. K., Karsten, S. L., Geschwind, D. H., & Kornblum, H. I. (2009). Cell lineage and regional identity of cultured spinal cord neural stem cells and comparison to brain-derived neural stem cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004213>
98. Temple, S., & Raff, M. C. (1986). Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: Evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90843-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90843-3)
99. Kelder, J., Azevedo, R., Pang, Y., Vlieg, J., Dong, J., & Thomas, P. (2010). Comparison between Steroid Binding to Progesterone Membrane Receptor α (mPR α) and to Progesterone Nuclear Receptor: Correlation with Physicochemical Properties Assessed by Comparative Molecular Field Analysis and Identification of mPR α -specific Agonists. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.01.010>
100. Jung-Testas, I., Renoir, J. M., Gasc, J. M., & Baulieu, E. E. (1991). Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. *Experimental Cell Research*. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(91\)90532-Y](https://doi.org/10.1016/0014-4827(91)90532-Y)
101. Labombarda, F., Guennoun, R., Gonzalez, S., Roig, P., Lima, A., Schumacher, M., & De Nicola, A. F. (2000). Immunocytochemical evidence for a progesterone receptor in neurons and glial cells of the rat spinal cord. *Neuroscience Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01191-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01191-5)
102. Wagner, C. K., & Quadros-Mennella, P. (2017). Progesterone from maternal circulation binds to progestin receptors in fetal brain. *Developmental Neurobiology*. <https://doi.org/10.1002/dneu.22462>

103. Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychology Review*. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
104. Shakeri, M., Boustani, M. R., Pak, N., Panahi, F., Salehpour, F., Lotfinia, I., ... Taghiloo, D. (2013). Effect of progesterone administration on prognosis of patients with diffuse axonal injury due to severe head trauma. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.06.013>
105. Schumacher, M., Denier, C., Oudinet, J. P., Adams, D., & Guennoun, R. (2016). Progesterone neuroprotection: The background of clinical trial failure. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.11.010>

ANEXOS

PUBLICACIONES EN REVISTAS INDIZADAS



Progesterone Actions During Central Nervous System Development

Juan Carlos González-Orozco and Ignacio Camacho-Arroyo*

Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología–Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Although progesterone is a steroid hormone mainly associated with female reproductive functions, such as uterine receptivity and maintenance of pregnancy, accumulating data have shown its physiological actions to extend to several non-reproductive functions in the central nervous system (CNS) both in males and females. In fact, progesterone is *de novo* synthesized in specific brain regions by neurons and glial cells and is involved in the regulation of various molecular and cellular processes underlying myelination, neuroprotection, neuromodulation, learning and memory, and mood. Furthermore, progesterone has been reported to be implicated in critical developmental events, such as cell differentiation and neural circuits formation. This view is supported by the increase in progesterone synthesis observed during pregnancy in both the placenta and the fetal brain. In the present review, we will focus on progesterone actions during CNS development.

OPEN ACCESS

Edited by:

Stanko S. Stojilkovic,
National Institutes of Health (NIH),
United States

Reviewed by:

Carol F. Elias,
University of Michigan, United States
Ivana Bjelobaba,
University of Belgrade, Serbia

*Correspondence:

Ignacio Camacho-Arroyo
camachoarroyo@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 15 October 2018

Accepted: 30 April 2019

Published: 17 May 2019

Citation:

González-Orozco JC and
Camacho-Arroyo I (2019)
Progesterone Actions During Central
Nervous System Development.
Front. Neurosci. 13:503.
doi: 10.3389/fnins.2019.00503

Keywords: progesterone, progesterone receptor, neurodevelopment, neuroprotection, myelination, brain sex differentiation, brain tumors

INTRODUCTION

Progesterone (Pregn-4-ene-3,20-dione) is a sex steroid hormone classically associated with female reproductive functions, including sexual behavior, uterus preparation for embryo implantation and maintenance of pregnancy (Wu et al., 2018). Although this hormone is mainly synthesized in the ovaries and placenta, it is also produced by the adrenal cortex as well as the central nervous system (CNS) of both male and female mammals (Gutai et al., 1977; Mensah-Nyagan et al., 1999; Tuckey, 2005). In addition, females of several species present higher progesterone levels in their circulating plasma than males (Tuckey, 2005; Lauretta et al., 2018). However, the fact that both males and females synthesize this hormone indicates that its functions are not limited to the female reproductive physiology. For example, progesterone regulates various non-reproductive functions in the CNS related to neuroprotection, neuromodulation, myelination, neurogenesis, neuronal plasticity, and mood (Snyder and Hull, 1980; Schumacher et al., 2004). Therefore, given that progesterone is synthesized, metabolized and exerts its actions in the CNS, it is referred to as a neurosteroid.

Progesterone synthesis and actions in the CNS are reported in several vertebrate species. Specifically, neurons and glial cells in the brain can synthesize it *de novo* from cholesterol as they express the enzymes responsible for its synthesis and metabolism (Testas et al., 1989; Mellon and Deschepper, 1993; Schumacher et al., 2004). Thereafter, the progesterone resulting from either circulating plasma or CNS local synthesis binds to its specific intracellular and membrane receptors to regulate the molecular and cellular processes underlying the brain functions. Furthermore, accumulating data suggest the progesterone actions in the CNS not to be restricted

to the adult life and to be present since fetal life during neural development in both genders (Schumacher et al., 2014).

Existing evidence indicates the participation of progesterone in some key events, such as neurogenesis, neuroprotection, neural circuit organization, oligodendrogenesis, myelination, and brain sex differentiation. Remarkably, pregnancy is characterized by an increase in progesterone levels both in the maternal plasma and the fetal circulation. In fact, the enzymes responsible for progesterone synthesis and the progesterone receptors were observed to be expressed early in the fetal life in several species, including chicks, rodents, sheep and humans (Milewich et al., 1991; Ukena et al., 1999; Camacho-Arroyo et al., 2003; Nguyen et al., 2003). Therefore, progesterone was suggested to have a fundamental role in the maternal and fetal brain adaptation during pregnancy, as well as later during critical CNS developmental events (Pluchino et al., 2016).

In this review, we summarize the implications of progesterone in the molecular and cellular processes underlying CNS development. In addition, given that the carcinogenesis processes often recapitulate developmental programs, some insights into the possible participation of progesterone in CNS tumors development are provided at the end of the review.

PROGESTERONE SYNTHESIS AND ITS MECHANISMS OF ACTION

Synthesis and Sources of Progesterone in the Developing CNS

In vertebrates, cholesterol is the common precursor for progesterone biosynthesis. Specifically, it is taken up by steroidogenic cells in the endocrine tissues (mainly the ovaries in females and the adrenal glands in males) from the blood plasma, where it is transported as low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and is internalized by receptor-mediated endocytosis in vesicles. These are then fused to lysosomes to allow the release of the free cholesterol form present in the cytoplasm (Vickery, 1993; Schumacher et al., 2004) and start the process of steroidogenesis.

Importantly, cholesterol is also synthesized *de novo* by steroidogenic cells through the condensation of two molecules of acetyl-CoA, forming acetoacetyl-CoA which is successively converted into 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Thereafter, the HMG-CoA reductase enzyme converts HMG-CoA to mevalonate, which is used to produce the two cholesterol precursors, i.e., squalene and lanosterol, by the squalene synthase and lanosterol synthase enzymes, respectively (Pasqualini and Chetrite, 2016).

Similarly, the CNS is an active site of cholesterol synthesis, given that the blood-brain barrier is not permeable to LDL cholesterol. Therefore, all the cholesterol present in the CNS derives from its local synthesis by neurons and glial cells (astrocytes and oligodendrocytes) (Schumacher et al., 2004). This capacity of the CNS to synthesize cholesterol is preserved from prenatal development in various mammalian species, including the mouse, guinea pig, sheep and humans (Dietschy, 2009).

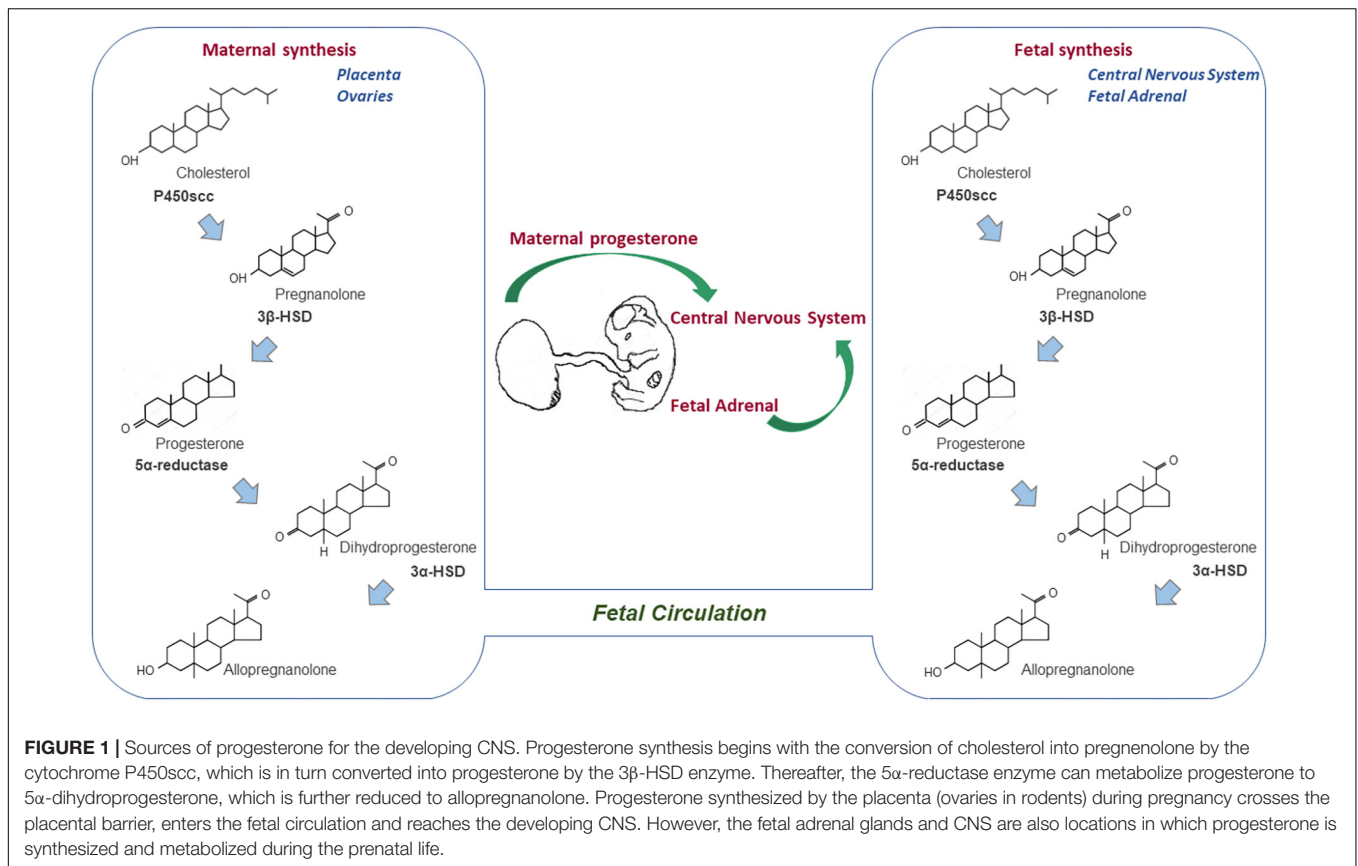
The progesterone synthesis presents a conserved pathway in the vertebrate species, which begins with the transport of accumulated cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membranes by transporter proteins, such as the 18 kDa translocator protein (TSPO) and the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) (Sierra, 2004; Papadopoulos et al., 2006). Thereafter, cholesterol is converted to pregnenolone in the inner mitochondrial membrane by the cytochrome P450_{scc}, which is then converted to progesterone in both the mitochondria and cytoplasm by 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD). The newly synthesized progesterone can either exert its physiological effects in an autocrine and paracrine manner (Chaffkin et al., 1992; Schumacher et al., 2001), or can be metabolized by the 5 α -reductase enzyme to 5 α -dihydroprogesterone (5 α -DHP), which is further reduced to allopregnanolone (3 α ,5 α -THP) by 3 α -hydroxysteroid oxidoreductase (3 α -HSD) (Figure 1) (Melcangi et al., 1998). Finally, both metabolites, the 5 α -DHP and allopregnanolone are active neurosteroids, with the latter having a relevant role also during CNS development (Schumacher et al., 2014; Pluchino et al., 2016).

Given its lipophilic structure, the progesterone produced from steroidogenic tissues, including the gonads and the adrenal glands, can cross the blood-brain barrier to reach the CNS. Importantly, the enzymes necessary for the synthesis and metabolism of progesterone are also expressed in neuronal and glial lineages in the adult CNS, in a region and cell-dependent manner (Testas et al., 1989; Mellon and Deschepper, 1993; Schumacher et al., 2004). However, the presence of these enzymes is not restricted to the adult life, as both their expression and activity are also found during the early ages of the mammalian neural development (Compagnone and Mellon, 2000).

Progesterone's potential actions throughout development are supported by the high concentrations of the hormone during mammalian pregnancy in both the maternal and fetal circulation (Morel et al., 2016). For example, the female and male fetal plasma concentrations of progesterone and its metabolite allopregnanolone were found to increase throughout pregnancy in the ungulate species (e.g., sheep), together with their fetal brain concentrations, especially during late pregnancy (Nguyen et al., 2003). This indicates that both progesterone and allopregnanolone play a significant role during CNS development in mammals.

The developing mammalian fetus is continuously exposed to progesterone during pregnancy. While the fetal ovary does not actively synthesize steroid hormones until birth in rodents (Greco and Payne, 1994), the circulating progesterone levels in developing male and female rodents and sheep are found at equal levels (Weisz and Ward, 1980; Nguyen et al., 2003). Therefore, the potential sources of progesterone for the developing fetus were suggested to be the placenta, maternal ovary (specifically in rodents), fetal adrenal gland, and *de novo* synthesis of progesterone within the developing CNS (Figure 1) (Compagnone and Mellon, 2000; Tuckey, 2005; Morel et al., 2016).

The conversion of cholesterol into pregnanolone by P450_{scc} is the first rate-limiting step in progesterone synthesis. In fact, the



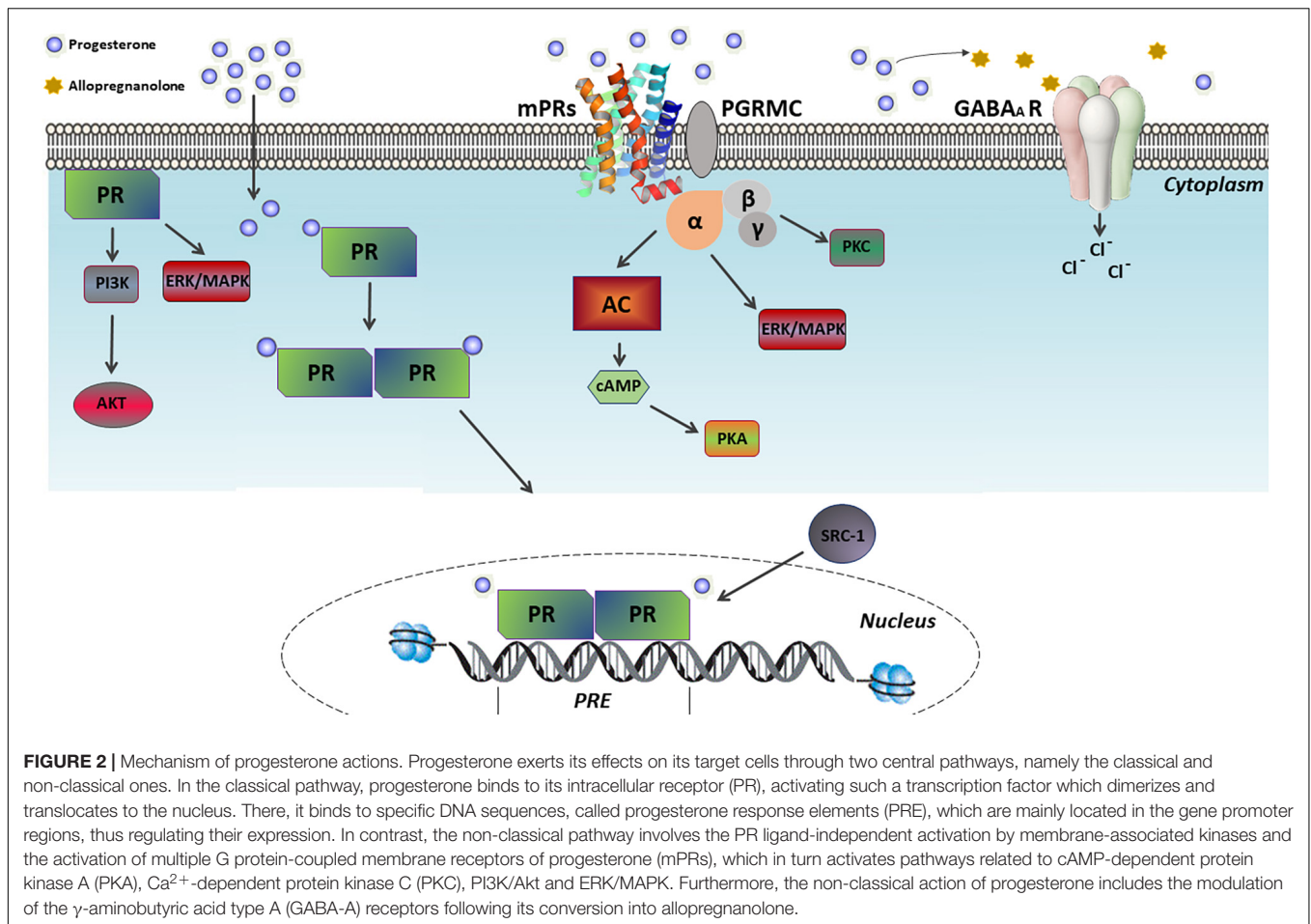
P450scc protein expression is detected by immunohistochemistry in the neural crest cells since embryonic day 9.5 (E9.5) in mice and at E10.5 in rats (Compagnone et al., 1995). This expression is maintained throughout fetal development and continues to be detected before birth in structures of the peripheral nervous system (PNS) derived from the neural crest, including the dorsal root ganglia, trigeminal ganglion and retina. Furthermore, mice and rats present P450scc expression in the neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of various brain regions (e.g., the cortex, thalamus, hypothalamus, hippocampus and spinal cord) during prenatal life, after birth, and adulthood (Mellon and Deschepper, 1993; Compagnone et al., 1995). In contrast, cerebellar P450scc is only expressed in early postnatal male rats (Ukena et al., 1998).

Similarly, 3β-HSD expression was detected in the CNS during prenatal and early postnatal development in several vertebrates, and particularly, in the mammal species. Interestingly, while 3β-HSD expression and activity were found to significantly increase throughout the brain right before birth and during the first postnatal days in rodents and sheep, without a marked sexual dimorphism, the cerebellum exhibits the highest production of progesterone within the CNS during neonatal life in rats (Ukena et al., 1999; Compagnone and Mellon, 2000; Sakamoto et al., 2001; Nguyen et al., 2003). In this developmental period, the CNS undergoes indispensable developmental processes, such as synaptogenesis, myelination, organization, and remodeling of the neural circuits (Stiles and Jernigan, 2010). Although the expression and activity

of 3β-HSD are relevant during postnatal CNS development, enzymatic activity of 3β-HSD was observed as early as the second trimester of pregnancy in the human fetal brain, indicating the progesterone synthesis to be present from prenatal development (Milewich et al., 1991).

With regards to the enzymes involved in progesterone metabolism, the expression and activity of both the 5α-reductase and 3α-HSD were detected in the female and male fetal brain of guinea pig and sheep from the second half of the pregnancy and in late pregnancy in rodents. This leads to high concentrations of allopregnanolone in different brain regions in all the mentioned species during prenatal and the first postnatal days (Compagnone and Mellon, 2000; Nguyen et al., 2003; Kelleher et al., 2011; Hirst et al., 2014). Moreover, both the levels of P450scc and 5α-reductase increase in the CNS in late pregnancy, suggesting that the CNS has its highest capacity for progesterone and allopregnanolone synthesis around the time of birth (Nguyen et al., 2003; Kelleher et al., 2011).

Progesterone is essential for the maintenance of pregnancy and its circulating levels in pregnant women increase between sixfold and eightfold when compared with non-pregnant subjects due to placental secretion (Lee et al., 2017). Existing evidence from pregnant rats indicates that progesterone from the maternal circulation enters the fetal bloodstream and reaches the developing CNS, binding to its intracellular receptors (Wagner and Quadros-Mennella, 2017). Additionally, progesterone from the human placenta was proposed to contribute to adequate



neurodevelopment, having specific roles in neuroprotection and the development of neural circuits. This view is supported by the impaired neurodevelopment observed in preterm birth possibly resulting from the premature disruption of the supply of progesterone and another steroid hormone (Trotter et al., 2001), however, more in-depth studies are still needed to confirm it.

Mechanisms Underlying the Progesterone Action During CNS Development

Progesterone regulates several reproductive and non-reproductive functions in vertebrates. Specifically, its action in its target cells is promoted by two central pathways, namely the classical and non-classical ones. The classical signaling pathway (also known as the genomic pathway) involves progesterone crossing the plasma membrane due to its lipophilic structure and binding to its intracellular receptor (PR). This leads to the activation of the transcription factor, which dimerizes and translocates to the nucleus. There, it binds to specific DNA sequences [i.e., the progesterone response elements (PRE)] that are mainly located in the gene promoter regions, thus regulating their expression (Figure 2) (Camacho-Arroyo et al., 2002; Liu and Ogle, 2002).

Although two PR isoforms (i.e., PR-A and PR-B) are encoded in the same gene, they have different transcription start sites, resulting in the PR-A being the N-terminal truncated form of the complete PR-B isoform (Kastner et al., 1990; Mesiano et al., 2011). Both isoforms are found in the brain and spinal cord of vertebrate species (Kato and Onouchi, 1997; Kastrup et al., 1999; Labombarda et al., 2002; Guerra-Araiza et al., 2003; Camacho-Arroyo et al., 2018) and, although being structurally very similar, they present a different expression pattern, regulation, and function. In general, given that the PR-B is a more potent transcription activator than the PR-A, they differentially regulate gene expression (Horwitz et al., 1996). Transcriptional functions of the ligand-bound PR isoforms include the recruitment of coactivators (e.g., SRC-1 and CBP), the transcription of corepressors (e.g., the N-CoR1), the consensus sequences PRE, the recruitment of chromatin remodeling complexes (e.g., the SWI/SNF complex), and the integration of the signaling pathways from the cytoplasm, which are in turn influenced by the cellular context and/or developmental stage (Vicent et al., 2006; Kumar et al., 2013; Tetel and Acharya, 2013; Grimm et al., 2016).

On the other hand, the non-classical (or non-genomic) signaling pathway involves several molecular processes related to rapid cellular responses, ranging from minutes to a few

hours after progesterone exposure. Examples include the PR ligand-independent activation by membrane-associated kinases, the activation of G protein-coupled membrane progesterone receptors (e.g., mPR α , mPR β , mPR γ , mPR δ , and mPR ϵ subtypes), the stimulation of the progesterone receptor membrane components (PGRMC1/2) to enhance the activity of mPRs, and the modulation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABA-A) receptors after the conversion into allopregnanolone (**Figure 2**) (Follesa et al., 2001; Boonyaratankornkit et al., 2008; Valadez-Cosmes et al., 2016). In addition, among the signaling pathways either extra-nuclearly activated through PR ligand-independent stimulation or activated by mPRs, the cAMP-dependent protein kinase A (PKA), Ca²⁺-dependent protein kinase C (PKC), PI3K/Akt and ERK/MAPK pathway can be found (**Figure 2**) (Zhu et al., 2003; Valadez-Cosmes et al., 2016; Garg et al., 2017).

While PR expression is observed in different brain regions, the expression of its isoforms is regionally and developmentally regulated (**Table 1**) (Camacho-Arroyo et al., 2003; Wagner, 2008; Palliser et al., 2012). Although both the PR isoforms are expressed in the brain of male and female chicks as early as E8 (Camacho-Arroyo et al., 2003), their developmental expression has been more widely studied in rodents during the prenatal and early postnatal stages. In fact, PR expression was detected by immunohistochemistry in the forebrain regions of E17 rats, which include the amygdala, basal ganglia, thalamus, hippocampus, subventricular zone, and the cerebral cortex. In the latter, PR was observed to be transiently expressed during perinatal rat development. While it reaches elevated levels between E17 and postnatal day 2 (P2), it decreases progressively until day P14, consistently in both genders (Quadros et al., 2007; Jahagirdar and Wagner, 2010), and its expression is maintained during adulthood (Camacho-Arroyo et al., 1998; Guerra-Araiza et al., 2001). Considering that the PR levels specifically increase during a brief period around birth in a time-window critical for brain cortex maturation in rodents, progesterone was indicated to contribute to their adequate cortical development through its classical mechanism of action (Jahagirdar and Wagner, 2010). Furthermore, PR was proposed to play a key role during brain sexual differentiation, since its expression was detected from E18 in most sexually dimorphic regions of the rat brain (e.g., the preoptic area), with a substantial higher expression in males and no detectable expression in females until postnatal day 10 (P10) (Quadros et al., 2002a). Other regions of the developing CNS expressing PR include the late prenatal and early postnatal ventral midbrain of mice and rats of both genders. Therefore, Progesterone was indicated to participate in the development of the nigrostriatal pathway connectivity (Beyer et al., 2002; Quadros et al., 2008) and the early postnatal cerebellum development of rats (Quadros et al., 2008). With regards to the action of progesterone through the non-classical mechanism in the developing CNS, a widely distributed expression of mPR β was recently observed in the female and male fetal brain and spinal cord of mice starting from E15.5 (Kasubuchi et al., 2017). Progesterone was suggested to contribute to the global development of the CNS and its actions were found to be mediated through both the classical and non-classical

pathways. Thus, multiple functions have been associated with the progesterone actions during CNS development (**Figure 3**), which will be described in the following sections.

PROGESTERONE ACTIONS DURING CNS DEVELOPMENT

Progesterone Effects on Neural Progenitor Cells Proliferation and Neuronal Differentiation

Neurogenesis refers to the generation of the distinct neurons of the nervous system from neural progenitor cells. Progesterone actions on the neural precursors (**Figure 3**) were hypothesized given that early neural progenitor cells derive from the neurogenic ventricular and subventricular zones of rats, which are known to express the polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) that can synthesize and metabolize progesterone (Gago et al., 2001). PSA-NCAM progenitor cells conserve both a neurogenic and gliogenic potential of differentiation, which mainly depends on the stimuli they receive. Progesterone and allopregnanolone were shown to promote the proliferation of PSA-NCAM progenitors isolated from the brain of newborn rats, in a concentration-dependent manner and without differences between genders (Gago et al., 2004). Moreover, allopregnanolone regulates cell proliferation in the developing cortex of rats by modulating the activity of GABA-A receptors during the early neonatal life of rodents (Grobin et al., 2006). In addition, progesterone was reported to regulate the proliferation of neural progenitor cells in the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus of sheep and rats (Yawno et al., 2009; Barha et al., 2011; Bali et al., 2012) which is, along with the subventricular zone of the lateral ventricles, the only site in the CNS to retain a neurogenic potential during adulthood.

The effects of progesterone on the neuronal differentiation were also investigated in dopaminergic neurogenesis. *In vitro* studies described progesterone to increase the number of differentiated dopaminergic neurons and the expression of the dopamine transporter in the neural progenitors to derive from mice embryonic cells. This result is consistent with additional *in vivo* studies demonstrating abnormalities in the differentiation of dopaminergic neurons in PR knockout mice (Woolley et al., 2006; Díaz et al., 2007, 2009), highlighting the role of progesterone in dopaminergic neurogenesis and the establishment of the dopaminergic pathways during development through the classical mechanism of action (**Figure 2**). Further studies should be performed to identify the mechanisms involved in neuronal differentiation which are promoted by progesterone.

The Role of Progesterone in Myelination During CNS Development

Positive effects of progesterone on nerve myelination have been documented in mammals, starting with its vital role in promoting the myelination of peripheral nerves damaged after traumatic injury in rodent models (Schumacher et al., 2001). These observations were later expanded to the CNS

TABLE 1 | Expression of the progesterone receptors during prenatal and early postnatal neurodevelopment.

Region	Structure	Detected receptor	Experimental method	Developmental stage	Species	References
Telencephalon	Cerebrum	PR-A/PR-B	Western blot	E8	Chicken	Camacho-Arroyo et al., 2003
	Cerebrum	PR-A/PR-B	Western blot	E35	Guinea pig	Palliser et al., 2012
	Cerebrum	mPR β	<i>In situ</i> hybridization	E15.5	Mouse	Kasubuchi et al., 2017
	Cortex	Total PR	Immunohistochemistry	E18	Rat	Jahagirdar and Wagner, 2010
	Cortex	PR-A/PR-B	qPCR	E20	Rat	Kato et al., 1993
	Basal ganglia	Total PR	Immunohistochemistry	E17	Rat	Quadros et al., 2007
	Subventricular zone	Total PR	Immunohistochemistry	E17	Rat	Quadros et al., 2007
	Hippocampus	Total PR	Immunohistochemistry	P1	Rat	Quadros et al., 2007
Diencephalon	Amygdala	Total PR	Immunohistochemistry	E18	Rat	Quadros et al., 2007
	Thalamus	Total PR	Immunohistochemistry	E20	Rat	Quadros et al., 2007
	Hypothalamus	Total PR	Immunohistochemistry	E18	Rat	Quadros et al., 2002a
	Hypothalamus	Total PR	Immunohistochemistry	E4	Chicken	Guenoun et al., 1987
	Hypothalamus	PR-A/PR-B	Western blot	P1	Chicken	Camacho-Arroyo et al., 2018
Mesencephalon	Pituitary gland	Total PR	Radiolabeling	P1	Rat	MacLusky and McEwen, 1980
	Midbrain	Total PR	Immunofluorescence	P1	Rat	Willing and Wagner, 2016
	Midbrain	PR-A/PR-B	Western blot	P1	Chicken	Camacho-Arroyo et al., 2018
Metencephalon	Cerebellum	Total PR	Immunohistochemistry	P1	Rat	Quadros et al., 2008
	Cerebellum	PR-A/PR-B	Western blot	P1	Chicken	Camacho-Arroyo et al., 2018
Spinal cord	Spinal cord	mPR β	<i>In situ</i> hybridization	E15.5	Mouse	Kasubuchi et al., 2017

(Ghoumari et al., 2003), leading to the proposal of the therapeutic use of progesterone for the treatment of demyelinating lesions and diseases in humans (Schumacher et al., 2012). Moreover, progesterone was suggested to be necessary for nerve myelination during the mammalian development. While myelination begins in the CNS during the fetal life at late gestation in humans, it mainly occurs just before birth in rodents (**Figure 3**) (Barateiro and Fernandes, 2014). Using organotypic cerebellum cultures obtained from postnatal rats and mice, progesterone was demonstrated to stimulate myelination by inducing the proliferation of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), promoting their differentiation into oligodendrocytes (the myelinating cells of the CNS), and finally by accelerating myelin synthesis within these cells, as evidenced by the increase in myelin basic protein (MBP) expression. These actions are known to be mediated by PR activation (**Figure 2**), given that they were inhibited by mifepristone and promoted by the PR selective agonist R5020, similarly to progesterone uniformly between genders (Ghoumari et al., 2003, 2005).

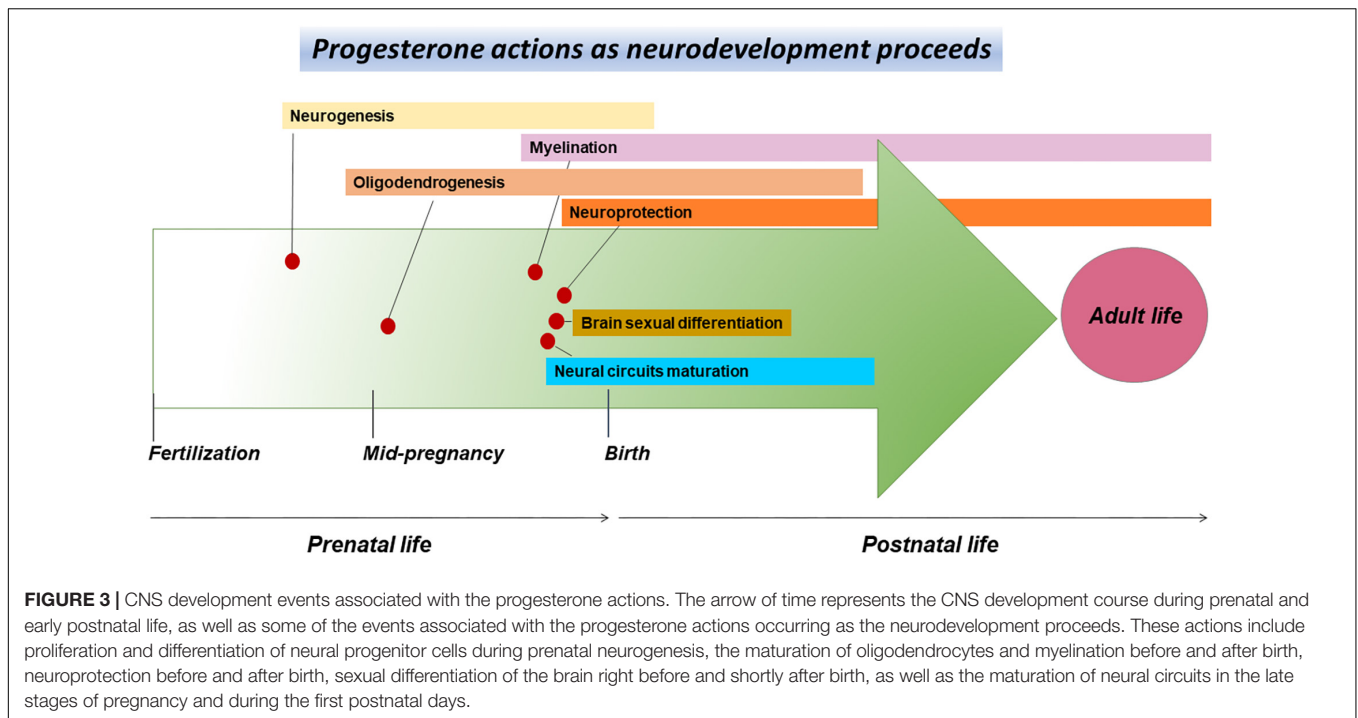
Furthermore, progesterone may promote myelination through its conversion into allopregnanolone, as the administration of finasteride to pregnant guinea pigs reduces myelination (measured by MBP expression) in the subcortical white matter of the offspring. Moreover, the blockage of progesterone and other steroid hormones flow from the maternal placenta to the fetus at mid-pregnancy decreases MBP expression in their fetal brain. In these experiments, PR expression is upregulated due to a reduction in progesterone levels, an effect which was found to be higher in females (Palliser et al., 2012). Observations of progesterone actions in myelination are also corroborated by *in vitro* studies using organotypic cerebellum cultures

from postnatal male mice exposed to lysophosphatidylcholine (LPC) as a model of demyelination. Progesterone treatment significantly enhanced myelination of axons (seen by MBP immunostaining) when compared to the non-treated cerebellar cultures and the PR *knockout* mice-derived cerebellar cultures (Hussain et al., 2011). The importance of progesterone and its metabolites in oligodendrocyte differentiation and myelination is also supported by the fact that rodents' OPC and mature oligodendrocytes actively synthesize and metabolize progesterone throughout the myelin formation process (Gago et al., 2001).

Finally, progesterone was described to stimulate both OPC proliferation and oligodendrocyte differentiation in the adult CNS of rats, especially after demyelinating damage (Labombarda et al., 2009). This is relevant given that the remnant OPC found in the adult CNS are produced early in life during the CNS development, indicating that these cells retain their ability to respond to progesterone throughout life.

Organizational Actions of Progesterone During Neurodevelopment

Neurons and glial cells form complex functional networks implicated in several functions carried out by the CNS. Although the arrangement of these networks, usually referred to as neural circuits, varies according to the related function of each CNS region (LoTurco, 2000), the processes that contribute to the formation of such neural circuits are similar throughout. The general mechanisms that shape the neural circuitry occur late in neurodevelopment (**Figure 3**) and include neuronal maturation, axons and dendrites arborization, axon guidance supported by glial cells, the establishment of synaptic connections between neurons and the elimination of improper



connections (Weiner et al., 2013). Progesterone contributes to the organization and the establishment of neural circuits during mammal development by promoting cell maturation, dendrites formation, synaptogenesis and axonal myelination, as documented in rats and guinea pigs (Sakamoto et al., 2001; Tsutsui, 2008; Palliser et al., 2012).

The organizational effects of progesterone were mainly investigated in the developing cerebellum of rats. In fact, the expression of the cytochrome P450_{sc} enzyme is immediately detected in this region after Purkinje neuron differentiation, whereas the expression of the β -HSD enzyme progressively increases after birth, accompanied with an enhancement of progesterone synthesis by Purkinje neurons (Ukena et al., 1998, 1999) in a critical period for the neural circuit formation in the cerebellar cortex. Using cerebellar slice cultures from newborn male rats, progesterone was identified to increase the dendritic growth and dendritic spine formation, in a dose-dependent manner, through its interaction with the PR (Figure 2). In contrast, the synaptic density of Purkinje neurons is enhanced *in vivo* when male newborn rats are treated with exogenous progesterone, as observed by electron microscopy (Sakamoto et al., 2001, 2002). This suggests that endogenous progesterone synthesized *de novo* by rat Purkinje neurons actively contributes to the formation of the cerebellar neural circuit after birth (Sakamoto et al., 2002), promoting Purkinje dendritic growth and synaptogenesis by upregulating the expression of neurotrophic factors involved in such processes [i.e., brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NTF3)] (Tsutsui et al., 2011).

Furthermore, progesterone was also proposed to influence the formation of cortical neural circuits. PR expression is

developmentally regulated in the cerebral cortex and has been detected as early as E18 in the rats' subplate, a layer of cortical neurons indispensable for cerebral cortex maturation and circuitry organization. PR expression within the postnatal cortex peaks at age P2, after which it progressively declines until P14. This period of high PR expression coincides with a critical period of cortical development and connectivity establishment in rats (Jahagirdar and Wagner, 2010). In addition, while PR expression is detected in pyramidal neurons of the cortical layer V as well as in cortical layers II and III of P3 and P6 rats, respectively, reaching a peak of expression between P7 and P10, it later declines until P27 (Quadros et al., 2007; Lopez and Wagner, 2009). These observations indicate that PR expression is relevant for normal cortical development, as supported by a study with PR *knockout* mice model, in which males and females reported abnormalities in their somatosensory-dependent motor reflexes due to incorrect sensorimotor cortex development (Willing and Wagner, 2014). Similarly, another study indicated that the administration of exogenous progesterone to pregnant rats increases dendritic branching and the number of dendritic spines in the pyramidal neurons of the somatosensory cortex of the offspring (Menzies et al., 1982), highlighting the crucial role of PR activation by progesterone in the formation of cortical neural circuits.

A similar pattern of PR expression is also observed in the developing mesocortical (dopaminergic) pathway of mice and rats, which projects from the midbrain ventral tegmental area (VTA) to the prefrontal cortex. In both species, PR expression is high during the first postnatal week and then declines in both genders. Administration of mifepristone during this postnatal period decreases both the tyrosine hydroxylase expression in

the VTA and the dopaminergic innervation of the prefrontal cortex (especially in male rats), impairing cognitive behaviors later in adulthood (Beyer et al., 2002; Quadros et al., 2008; Willing and Wagner, 2016). These data suggest that progesterone also participates in the adequate establishment of the neural circuits of the mesocortical dopaminergic pathway.

Progesterone Effects on Brain Sexual Differentiation

Given the significant differences in PR expression in several brain regions between male and female vertebrates at critical stages of neurodevelopment progesterone was proposed to be involved in brain sexual differentiation.

Differences in prenatal and postnatal PR expression between male and female rats are observed in sex dimorphic brain regions, such as the medial preoptic nucleus (MPN) of the preoptic area, the arcuate nucleus, and the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. While the PR expression in these regions is detectable at the mRNA and protein levels in males from E18, it is only observed in females from P10 (Quadros et al., 2002a, 2007). Sex differences in dimorphic regions are also noticed in PR isoforms expression in the brain of newborn chicks. In fact, females' hypothalamus presents a higher content of PR-A when compared to that of males at postnatal age P1 (Camacho-Arroyo et al., 2018).

The observed differences in PR expression indicate the existence of a period during neurodevelopment (**Figure 3**) in which the male brain is more sensitive than that of females to the progesterone actions, more specifically in the structures related to reproductive functions and sexual behavior in adulthood. Interestingly, the increase in the brain PR expression coincides with the period of masculinization induced by androgens during prenatal development in mice (Desroziers et al., 2017). Furthermore, PR expression in the preoptic area and the hypothalamus of developing male rats increases at E18, simultaneously to the beginning of testosterone secretion by testes. Considering that testosterone is metabolized to estradiol by the aromatase enzyme and that the ligand-bound nuclear receptor of estradiol (i.e., ER α) directly upregulates the PR expression (Weisz and Ward, 1980; Petz et al., 2004), testosterone is thought to regulate PR expression in these brain regions during rat development after its conversion into estradiol (Quadros et al., 2002c). This is supported by the decrease in PR expression levels seen in the hypothalamus of newborn male rats that were either exposed to the androstatrienedione aromatase inhibitor or whose aromatase gene expression was silenced (Quadros et al., 2002c; Brock et al., 2010). This induces an abnormal sexual male behavior during adulthood.

These studies indicate that progesterone actions and indirect PR upregulation by testosterone in sex dimorphic brain regions contribute to brain masculinization in developing males. Similarly, a study utilizing a model of masculinized female rats (following the exogenous administration of testosterone) reported that mifepristone treatment at birth blocks the masculinization effect of testosterone in the total volume of the MPN, which is larger in males than in females (Quadros et al.,

2002b). Consistently, PR *knockout* male mice exhibit an impaired adult male sexual behavior (Phelps et al., 1998). Interestingly, neonatal male mice treated with the ZK137316 PR antagonist during the critical period of brain masculinization (P0–P10) display minor abnormalities related to male sexual behavior in adulthood. This is in contrast with the prepubertal treated females (P15–P25) that present an impaired lordosis behavior in adulthood (Desroziers et al., 2017), suggesting that the effects of PR activation (**Figure 2**) on sexual differentiation are time-dependent and sex-regulated during development.

Neuromodulatory Actions of Progesterone During Neurodevelopment

Glutamate and GABA are the most abundant neurotransmitters in the CNS. Specifically, while glutamate is the major excitatory neurotransmitter, GABA is the main inhibitory one. Given that the CNS functionality relies on a crucial balance of neural excitation and inhibition (Petroff, 2002), progesterone can exert neuromodulatory effects through its metabolites, that can in turn interact with the specific neurotransmitter receptors coupled to the ion channels. For example, allopregnanolone is a recognized positive allosteric modulator of the ionotropic GABA-A receptors activity, which potentiates the GABA-induced chloride conductance (**Figure 2**) (Dorota et al., 1986; Hosie et al., 2006).

During neurodevelopment, fetal CNS progesterone and allopregnanolone levels was mainly found to increase at late stages of pregnancy in sheep (Nguyen et al., 2003; Pluchino et al., 2016). This finding was associated with the maintenance of a suppressive neural activity in the immature CNS by the GABA-A receptor modulation, thus preventing excitotoxic processes. This is consistent with the fact that the expression of GABA-A receptors in the fetal brain increases as gestation proceeds (Crossley et al., 2003; Hirst et al., 2014) and that the neurosteroid modulators of GABA-A receptors (e.g., allopregnanolone) suppress CNS activity at late gestation in fetal sheep. While GABA exerts an inhibitory activity during the fetal life in this species, it exerts an excitatory activity in the fetal brain of other species (e.g., rodents) (Bregestovski and Bernard, 2012). This indicates that allopregnanolone maintains the characteristic sleep-like behavior of the sheep fetus before birth, which is important for protecting the brain from early excitatory activity (Nicol et al., 1999). Moreover, inhibition of progesterone conversion into allopregnanolone through the administration of finasteride in the sheep fetus increases both the excitatory CNS activity and the arousal-like behavior, as found through electrocorticography, muscle electromyography and electrooculography measurements (Nicol et al., 2001). This reinforces the idea of the neuromodulatory actions of allopregnanolone in the fetal brain, which contributes to the maintenance of adequate physiological states during the prenatal life for CNS development (Crossley et al., 2003; Yawno et al., 2007).

With regards to allopregnanolone, it is relevant to mention its effects as an anxiolytic and antidepressant drug for postpartum women and rodents (Bitran et al., 1995; Osborne et al., 2017),

which are mediated by the GABA-stimulated chloride ion influx (**Figure 2**) in the maternal brain cortex (Bitran et al., 1995). The mammalian pregnancy is characterized by an increase in the levels of progesterone and allopregnanolone present in the maternal plasma as well as in the maternal and fetal brain (Milewich et al., 1991; Osborne et al., 2017). Maternal progesterone levels begin to fall dramatically shortly before birth in most mammals to allow delivery. Indeed, the elevated levels of both progesterone and its metabolite allopregnanolone present during pregnancy progressively decay to baseline levels after delivery in humans (Tuckey, 2005). This event is related to the development of a neuropsychiatric disorder referred to as postpartum depression, which is developed by 15–20% of postpartum women (Yonkers et al., 2011; Osborne et al., 2017) and indirectly affects the healthy emotional, behavioral and cognitive development of the newborn (Kanes et al., 2017). Furthermore, women in late pregnancy with significant depression were found to have significantly lower levels of allopregnanolone than those without depressive symptoms (Hellgren et al., 2014). Interestingly, alleviation of depressive symptoms in postpartum women has been successfully achieved in phase 3 clinical trials using the drug brexanolone, an allopregnanolone analog (Meltzer-Brody et al., 2018). Overall, these studies indicate that the neuromodulatory effects of both progesterone and its metabolite allopregnanolone are relevant not only for the developing CNS but also for the adaptation of the maternal CNS to pregnancy, which in turn impacts the healthy development of the offspring.

Neuroprotective Actions of Progesterone During Development

Protective actions of progesterone in the male and female adult brain have been widely observed both *in vitro* and *in vivo* studies. For example, progesterone has a significant role in the neurological recovery following brain and spinal cord traumatic or hypoxic-ischemic injury by reducing the oxidative damage, preserving mitochondrial functions and attenuating cell death (Deutsch et al., 2013; Andrabi et al., 2017). This supports clinical trials proposing progesterone as a therapeutic agent for the treatment of patients with traumatic brain injury (Wright et al., 2007).

The mammal neonatal CNS is still undergoing active development and exhibits processes that are essential for the establishment of the neural circuits after birth, including synaptogenesis and axon myelination (**Figure 3**). However, the early CNS is very susceptible to damage, such as intrauterine complications, neonatal hypoxic-ischemia derived from birth asphyxia, and acute excitotoxicity resulting from overactivation of the NMDA and AMPA receptors in neurons by the excitatory neurotransmitter glutamate. These causes of damage contribute to neuronal death and impaired neurodevelopment, which in turn induce permanent neurological deficits and neonatal death (Peterson et al., 2015; Atif et al., 2016).

As observed in the adult CNS of rats and sheep, progesterone and its metabolite allopregnanolone attenuate CNS damage when it is induced during development by regulating cell proliferation,

and by reducing inflammation and apoptosis (Yawno et al., 2007, 2009; Barha et al., 2011; Peterson et al., 2015).

Treatment with progesterone for 5 days reduces the inflammation, resulting in only a few activated microglia cells in the cortex and hippocampus of neonatal rats with brain injury induced by hypoxia exposure (Peterson et al., 2015). In addition, this study indicated that progesterone-treated pups exhibited an improved motor and cognition recovery at 20 days post-injury in both genders when compared to the non-treated animals. Furthermore, this positive effect was higher in males than in females. In a similar study with neonatal mice, progesterone effects on inflammation and neuronal recovery in neonates were observed to occur without significant differences between males and females. This investigation shows that the progesterone effects can be mediated through the regulation of the secretion of pro-inflammatory cytokines as well as the upregulation of the expression of the neurotrophic factor BDNF and its specific receptor TrkB, involved in neuronal differentiation and survival (Dixon and Sherrard, 2006; Atif et al., 2016).

Using organotypic hippocampal slice cultures obtained from postnatal day 7 (P7) female and male rats, progesterone treatment was demonstrated to reduce neuronal cell death caused by oxygen/glucose deprivation. These protective effects were attenuated when the slice cultures were co-treated with mifepristone and finasteride, indicating that either progesterone itself or its metabolites exert neuroprotective effects during development (Ishihara et al., 2016). Interestingly, the disruption of allopregnanolone synthesis by finasteride administration in sheep fetuses of both genders at day 125 of gestation increased apoptosis in the CA3 and CA1 hippocampal regions, as well as in the cerebellar gray matter, accompanied by an increase in the proliferation of reactive astrocytes. These effects were reverted with the co-infusion of finasteride plus the alfaxalone allopregnanolone analog (Belelli and Lambert, 2005; Yawno et al., 2009).

The Role of Progesterone in CNS Tumors Development

Tumorigenic processes are often observed from the developmental biology perspective, given that they frequently recapitulate molecular and cellular events carried out by stem cells that shape the organism during development. Cancer is considered as an abnormal reactivation of a developmental program, in which the tumor, and all its intracellular heterogeneity, can be visualized as a developing organ (Wechsler-Reya and Scott, 2001; Laug et al., 2018).

Gliomas are the most prevalent and malignant type of tumors occurring in the human CNS and they arise from the uncontrolled proliferation of glia, progenitor glial cells or cancer stem cells (Louis et al., 2016). Astrocytomas are the most frequent type of glioma (Ostrom et al., 2017), which are classified by the World Health Organization (WHO) from grade I to IV, according to their histopathological and malignant characteristics. Specifically, grade IV, which is also referred to as glioblastoma multiforme (GBM), is the most malignant type of astrocytoma (Louis et al., 2016; Ostrom

et al., 2017) due to its high capacity to proliferate and invade the normal brain tissue (Stupp et al., 2005). Several factors within the CNS contribute to GBM tumorigenesis and, in recent years, sex hormones, particularly progesterone, were proposed as the factors involved in GBM tumor progression. The first insights into the involvement of progesterone in the development of GBM emerged from the observation that human glioblastoma cells express the two PR isoforms (González-Agüero et al., 2007), suggesting a function for these receptors in this type of cancer. Furthermore, studies *in vitro* demonstrated that progesterone present at the physiological levels (10 nM) increases the content of many proteins, including SRC-1/3, p-Akt, and p-Src (Hernández-Hernández et al., 2010; González-Orozco et al., 2018), in GBM cells. In addition, the same concentration of progesterone was found to upregulate the expression of key genes for cell proliferation, neovascularization, and tumor growth (e.g., the vascular endothelial growth factor, the receptor for the epidermal growth factor and cyclin D1) (Hernández-Hernández et al., 2012). Similarly, progesterone and allopregnanolone increase cell proliferation, migration and invasion of GBM cells *in vitro* (González-Agüero et al., 2007; Piña-Medina et al., 2016; Zamora-Sánchez et al., 2017). Moreover, progesterone also promotes GBM tumor growth and infiltration in rats' cerebral cortex in a xenograft model (Germán-Castelán et al., 2014, 2016), effects which are mainly mediated by the PR, given that they are partially blocked in GBM cells following the administration of mifepristone (González-Agüero et al., 2007; Germán-Castelán et al., 2014; Piña-Medina et al., 2016). This partial inhibition indicated the implication of the non-classical progesterone mechanisms of action. Recent studies describe that GBM cells express both mPR α and mPR β , and that the specific activation of mPR α by the selective agonist Org OD 02-0 induces cell proliferation and invasion (Valadez-Cosmes et al., 2015; González-Orozco et al., 2018). Similar effects are seen when the PR is activated via ligand-independent activation by protein kinase C (González-Arenas et al., 2015; Marquina-Sánchez et al., 2017), suggesting an interplay between the classical and non-classical mechanisms of progesterone action in GBM tumors progression.

In contrast, high concentrations of progesterone (20–80 μ M) were reported to reduce GMB tumor growth in a xenograft mouse model by increasing apoptosis and inhibiting cell proliferation, which was accompanied by an improvement in the survival rate (Atif et al., 2015). These results suggest that progesterone promotes GBM tumor progression when present at the physiological levels, whereas it has opposite effects at high concentrations, inhibiting GBM growth.

CONCLUSION

Progesterone actions extend beyond the regulation of brain functions associated with reproduction. In fact, its physiological actions extend to several non-reproductive functions in the CNS of both male and female mammals from early prenatal life,

by regulating the fundamental molecular and cellular processes underlying its proper development.

Understanding the precise role of progesterone and other steroid hormones is relevant to the overall comprehension of the nervous system development and its subsequent normal functioning during life. Important clinical advances were made, including the implementation of progesterone treatment in pre-clinical phase 2 trials to assess its efficacy as a neuroprotector in patients with traumatic brain injury and the recent success in pre-clinical phase 3 trials to treat depression in postpartum women by using the analogous compounds of allopregnanolone (Schumacher et al., 2012; Meltzer-Brody et al., 2018).

PERSPECTIVES

The study of sex steroid hormone actions during the development of the nervous system in the prenatal and early postnatal life is yet to be widely explored. Therefore, this field implies promising research that will provide us with a better understanding of the molecular and cellular processes underlying the mechanisms that shape this system. In fact, the knowledge of the mechanisms of action of sex hormones, including progesterone, is essential to fully understand the critical processes that occur in neurodevelopment (e.g., neurogenesis, gliogenesis, myelination, neuroprotection, neural circuit maturation, and brain sexual differentiation). Once the precise involvement of sex hormones in neurodevelopment is known, this knowledge could be translated to attempting to reverse specific pathologies related to the cited processes during postnatal life. Understanding the mechanisms of progesterone and its metabolites, the types of cellular receptors that are activated, the signaling pathways involved, the regulated genes, and the cytokines secreted by the effects of these steroids in the nervous tissue, could be advantageous in clinical therapies to: (1) reduce premature infants' CNS susceptibility to injury, which could in turn allow the normal behavioral and cognitive development of the infant; (2) optimize the therapeutic strategies that are already in use to alleviate the depression and anxiety symptoms seen in postpartum women; and (3) attenuate the damage in demyelinating lesions or diseases. Finally, the understanding of progesterone actions in brain tumors development may also be useful to elaborate more effective clinical approaches aimed at stopping the progression of such neoplasms in patients.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Both authors have contributed equally to the elaboration of the manuscript.

FUNDING

This work was financially supported by “Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica” (PAPIIT), project IN213117, DGAPA-UNAM, Mexico, and FOSISS/CONACyT (Grant No. 272458).

REFERENCES

- Andrabi, S. S., Parvez, S., and Tabassum, H. (2017). Progesterone induces neuroprotection following reperfusion-promoted mitochondrial dysfunction after focal cerebral ischemia in rats. *Dis. Models Mech.* 10, 787–796. doi: 10.1242/dmm.025692
- Atif, F., Yousuf, S., and Stein, D. G. (2015). Anti-tumor effects of progesterone in human glioblastoma multiforme: role of PI3K/Akt/mTOR signaling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 146, 62–73. doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.007
- Atif, F., Yousuf, S., and Stein, D. G. (2016). Progesterone in the treatment of neonatal arterial ischemic stroke and acute seizures: role of BDNF/TrkB signaling. *Neuropharmacology* 107, 317–328. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.052
- Bali, N., Arimoto, J. M., Iwata, N., Lin, S. W., Zhao, L., Brinton, R. D., et al. (2012). Differential responses of progesterone receptor membrane component-1 (Pgrmc1) and the classical progesterone receptor (Pgr) to 17 β -estradiol and progesterone in hippocampal subregions that support synaptic remodeling and neurogenesis. *Endocrinology* 153, 759–769. doi: 10.1210/en.2011-1699
- Barateiro, A., and Fernandes, A. (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression: in vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1917–1929. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.04.018
- Barha, C. K., Ishrat, T., Epp, J. R., Galea, L. A. M., and Stein, D. G. (2011). Progesterone treatment normalizes the levels of cell proliferation and cell death in the dentate gyrus of the hippocampus after traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 231, 72–81. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.05.016
- Belelli, D., and Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA_A receptor. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 565–575. doi: 10.1038/nrn1703
- Beyer, C., Damm, N., Brito, V., and Küppers, E. (2002). Developmental expression of progesterone receptor isoforms in the mouse midbrain. *Neuroreport* 13, 877–880. doi: 10.1097/00001756-200205070-00028
- Bitran, D., Shiekh, M., and McLeod, M. (1995). Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA_A receptors. *J. Neuroendocrinol.* 7, 171–177. doi: 10.1111/j.1365-2826.1995.tb00744.x
- Boonyaratanakornkit, V., Bi, Y., Rudd, M., and Edwards, D. P. (2008). The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* 73, 922–928. doi: 10.1016/j.steroids.2008.01.010
- Bregestovski, P., and Bernard, C. (2012). Excitatory GABA: how a correct observation may turn out to be an experimental artifact. *Front. Pharmacol.* 3:65. doi: 10.3389/fphar.2012.00065
- Brock, O., Douhard, Q., Baum, M. J., and Bakker, J. (2010). Reduced prepubertal expression of progesterone receptor in the hypothalamus of female aromatase knockout mice. *Endocrinology* 151, 1814–1821. doi: 10.1210/en.2009-1379
- Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., González-Agüero, G., Guerra-Araiza, C., and González-Morán, G. (2003). Changes in the content of progesterone receptor isoforms and estrogen receptor alpha in the chick brain during embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol.* 136, 447–452. doi: 10.1016/S1095-6433(03)00204-6
- Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., and Cerbón, M. (1998). Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9, 3993–3996. doi: 10.1097/00001756-199812210-00001
- Camacho-Arroyo, I., Hansberg-Pastor, V., Gutiérrez-Rodríguez, A., Chávez-Jiménez, J., and González-Morán, M. G. (2018). Expression of sex hormone receptors in the brain of male and female newly hatched chicks. *Anim. Reprod. Sci.* 188, 123–129. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.11.016
- Camacho-Arroyo, I., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., and Guerra-Araiza, C. (2002). Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. *Neuroendocrinology* 76, 267–271. doi: 10.1159/000066623
- Chaffkin, L., Luciano, A., and Peluso, J. (1992). Progesterone as an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell proliferation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 1404–1408. doi: 10.1210/jcem.75.6.1464640
- Compagnone, N., Bulfone, A., Rubenstein, J., and Mellon, S. (1995). Expression of the steroidogenic enzyme P450scc in the central and peripheral nervous systems during rodent embryogenesis. *Endocrinology* 136, 2689–2696. doi: 10.1210/endo.136.6.7750493
- Compagnone, N. A., and Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front. Neuroendocrinol.* 21:188. doi: 10.1006/frne.1999.0188
- Crossley, K. J., Nitsos, I., Walker, D. W., Lawrence, A. J., Beart, P. M., and Hirst, J. J. (2003). Steroid-sensitive GABA_A receptors in the fetal sheep brain. *Neuropharmacology* 45, 461–472. doi: 10.1016/S0028-3908(03)00196-5
- Desroziers, E., Brock, O., and Bakker, J. (2017). Potential contribution of progesterone receptors to the development of sexual behavior in male and female mice. *Horm. Behav.* 90, 31–38. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.05.008
- Deutsch, E. R., Espinoza, T. R., Atif, F., Woodall, E., Kaylor, J., and Wright, D. W. (2013). Progesterone's role in neuroprotection, a review of the evidence. *Brain Res.* 1530, 82–105. doi: 10.1016/j.brainres.2013.07.014
- Díaz, N. F., Díaz-Martínez, N. E., Velasco, I., and Camacho-Arroyo, I. (2009). Progesterone increases dopamine neuron number in differentiating mouse embryonic stem cells. *J. Neuroendocrinol.* 21, 730–736. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01891.x
- Díaz, N. F., Guerra-Araiza, C., Díaz-Martínez, N. E., Salazar, P., Molina-Hernández, A., Camacho-Arroyo, I., et al. (2007). Changes in the content of estrogen α and progesterone receptors during differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons. *Brain Res. Bull.* 73, 75–80. doi: 10.1016/j.brainresbull.2007.02.002
- Dietschy, J. M. (2009). Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol. Chem.* 390, 287–293. doi: 10.1515/BC.2009.035
- Dixon, K. J., and Sherrard, R. M. (2006). Brain-derived neurotrophic factor induces post-lesion transcommissural growth of olivary axons that develop normal climbing fibers on mature Purkinje cells. *Exp. Neurol.* 202, 44–56. doi: 10.1016/j.expneurol.2006.05.010
- Dorota, M., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L., and Paul, S. M. (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* 232, 1004–1007. doi: 10.1126/science.2422758
- Follesa, P., Concas, A., Porcu, P., Sanna, E., Serra, M., Mostallino, M. C., et al. (2001). Role of allopregnanolone in regulation of GABA_A receptor plasticity during long-term exposure to and withdrawal from progesterone. *Brain Res. Rev.* 37, 81–90. doi: 10.1016/S0165-0173(01)00125-4
- Gago, N., Akwa, Y., Sananès, N., Guennoun, R., Baulieu, E. E., El-Etr, M., et al. (2001). Progesterone and the oligodendroglial lineage: stage-dependent biosynthesis and metabolism. *Glia* 36, 295–308. doi: 10.1002/glia.1117
- Gago, N., El-Etr, M., Sananès, N., Cadepond, F., Samuel, D., Avellana-Adalid, V., et al. (2004). 3 α ,5 α -tetrahydroprogesterone (allopregnanolone) and γ -aminobutyric acid: autocrine/paracrine interactions in the control of neonatal PSA-NCAM+ progenitor proliferation. *J. Neurosci. Res.* 78, 770–783. doi: 10.1002/jnr.20348
- Garg, D., Ng, S. S. M., Baig, K. M., Driggers, P., and Segars, J. (2017). Progesterone-mediated non-classical signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* 28, 656–668. doi: 10.1016/j.tem.2017.05.006
- Germán-Castelán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A., and Camacho-Arroyo, I. (2016). Intracellular progesterone receptor mediates the increase in glioblastoma growth induced by progesterone in the rat brain. *Arch. Med. Res.* 47, 419–426. doi: 10.1016/j.arcmed.2016.10.002
- Germán-Castelán, L., Manjarrez-Marmolejo, J., González-Arenas, A., González-Morán, M. G., and Camacho-Arroyo, I. (2014). Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed Res. Int.* 2014:393174. doi: 10.1155/2014/393174
- Ghousari, A. M., Baulieu, E. E., and Schumacher, M. (2005). Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience* 135, 47–58. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.05.023
- Ghousari, A. M., Ibanez, C., El-Etr, M., Leclerc, P., Eychenne, B., O'Malley, B. W., et al. (2003). Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J. Neurochem.* 86, 848–859. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01881.x
- González-Agüero, G., Gutiérrez, A. A., González-Espinoza, D., Solano, J. D., Morales, R., González-Arenas, A., et al. (2007). Progesterone effects on cell growth of U373 and D54 human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 32, 129–135. doi: 10.1007/s12020-007-9023-0
- González-Arenas, A., Peña-Ortiz, M. Á., Hansberg-Pastor, V., Marquina-Sánchez, B., Baranda-Ávila, N., Nava-Castro, K., et al. (2015). Pk α and pk δ activation regulates transcriptional activity and degradation of progesterone receptor in

- human astrocytoma cells. *Endocrinology* 156, 1010–1022. doi: 10.1210/en.2014-1137
- González-Orozco, J. C., Hansberg-Pastor, V., Valadez-Cosmes, P., Nicolas-Ortega, W., Bastida-Beristain, Y., and Camacho-Arroyo, I. (2018). Activation of membrane progesterone receptor- α increases proliferation, migration, and invasion of human glioblastoma cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 477, 81–89. doi: 10.1016/j.mce.2018.06.004
- Greco, T., and Payne, H. (1994). Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135, 262–268. doi: 10.1210/en.135.1.262
- Grimm, S. L., Hartig, S. M., and Edwards, D. P. (2016). Progesterone receptor signaling mechanisms. *J. Mol. Biol.* 428, 3831–3849. doi: 10.1016/j.jmb.2016.06.020
- Grobin, A. C., Gizerian, S., Lieberman, J. A., and Morrow, A. L. (2006). Perinatal allopregnanolone influences prefrontal cortex structure, connectivity and behavior in adult rats. *Neuroscience* 138, 809–819. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.12.026
- Guennoun, R., Reyss-Brion, M., and Gasc, J. M. (1987). Progesterone receptors in hypothalamus and pituitary during the embryonic development of the chick: regulation by sex steroid hormones. *Dev. Brain Res.* 37, 1–9. doi: 10.1016/0165-3806(87)90224-0
- Guerra-Araiza, C., Reyna-Neyra, A., Salazar, A. M., Cerbón, M. A., Morimoto, S., and Camacho-Arroyo, I. (2001). Progesterone receptor isoforms expression in the prepubertal and adult male rat brain. *Brain Res. Bull.* 54, 13–17. doi: 10.1016/S0361-9230(00)00410-X
- Guerra-Araiza, C., Villamar-Cruz, O., González-Arenas, A., Chavira, R., and Camacho-Arroyo, I. (2003). Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J. Neuroendocrinol.* 15, 984–990. doi: 10.1046/j.1365-2826.2003.01088.x
- Gutai, J. P., Meyer, W. J., Avinoam Kowarski, A., and Migeon, C. J. (1977). Twenty-four hour integrated concentrations of progesterone, 17-hydroxyprogesterone and cortisol in normal male subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44, 116–120. doi: 10.1210/jcem-44-1-116
- Hellgren, C., Akerud, H., Skalkidou, A., Bäckström, T., and Sundström-Poromaa, I. (2014). Low serum allopregnanolone is associated with symptoms of depression in late pregnancy. *Neuropsychobiology* 69, 147–153. doi: 10.1159/000358838
- Hernández-Hernández, O., González-García, T., and Camacho-Arroyo, I. (2012). Progesterone receptor and SRC-1 participate in the regulation of VEGF, EGFR and Cyclin D1 expression in human astrocytoma cell lines. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132, 127–134. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.04.005
- Hernández-Hernández, O. T., Rodríguez-Dorantes, M., González-Arenas, A., and Camacho-Arroyo, I. (2010). Progesterone and estradiol effects on SRC-1 and SRC-3 expression in human astrocytoma cell lines. *Endocrine* 37, 194–200. doi: 10.1007/s12020-009-9288-6
- Hirst, J. J., Kelleher, M. A., Walker, D. W., and Palliser, H. K. (2014). Neuroactive steroids in pregnancy: key regulatory and protective roles in the foetal brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 139, 144–153. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.04.002
- Horwitz, K. B., Tung, L., and Takimoto, G. S. (1996). Novel mechanisms of antiprogesterin action. *Acta Oncol.* 35, 129–140. doi: 10.3109/02841869609098493
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., Da Silva, H. M. A., and Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABA_A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444, 486–489. doi: 10.1038/nature05324
- Hussain, R., El-Etr, M., Gaci, O., Rakotomamonjy, J., Macklin, W. B., Kumar, N., et al. (2011). Progesterone and nestorone facilitate axon remyelination: a role for progesterone receptors. *Endocrinology* 152, 3820–3831. doi: 10.1210/en.2011-1219
- Ishihara, Y., Fujitani, N., Sakurai, H., Takemoto, T., Ikeda-Ishihara, N., Mori-Yasumoto, K., et al. (2016). Effects of sex steroid hormones and their metabolites on neuronal injury caused by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation in organotypic hippocampal slice cultures. *Steroids* 113, 71–77. doi: 10.1016/j.steroids.2016.06.004
- Jahagirdar, V., and Wagner, C. K. (2010). Ontogeny of progesterone receptor expression in the subplate of fetal and neonatal rat cortex. *Cereb. Cortex* 20, 1046–1052. doi: 10.1093/cercor/bhp165
- Kanes, S., Colquhoun, H., Gunduz-Bruce, H., Raines, S., Arnold, R., Schacterle, A., et al. (2017). Brexanolone (SAGE-547 injection) in post-partum depression: a randomised controlled trial. *Lancet* 390, 480–489. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31264-3
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., et al. (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. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08280.x
- Kastrup, Y., Hallbeck, M., Amandusson, A., Hirata, S., Hermanson, O., and Blomqvist, A. (1999). Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. *Neurosci. Lett.* 275, 85–88. doi: 10.1016/S0304-3940(99)00753-3
- Kasubuchi, M., Watanabe, K., Hirano, K., Inoue, D., Li, X., Terasawa, K., et al. (2017). Membrane progesterone receptor beta (mPR β /Paqr8) promotes progesterone-dependent neurite outgrowth in PC12 neuronal cells via non-G protein-coupled receptor (GPCR) signaling. *Sci. Rep.* 7:5168. doi: 10.1038/s41598-017-05423-9
- Kato, J., Hirata, S., Nozawa, A., and Mouri, N. (1993). The ontogeny of gene expression of progesterin receptors in the female rat brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 47, 173–182. doi: 10.1016/0960-0760(93)90072-5
- Kato, J., and Onouchi, T. (1997). Specific progesterone receptors in the hypothalamus and anterior hypophysis of the rat. *Endocrinology* 101, 920–928. doi: 10.1210/endo-101-3-920
- Kelleher, M. A., Palliser, H. K., Walker, D. W., and Hirst, J. J. (2011). Sex-dependent effect of a low neurosteroid environment and intrauterine growth restriction on foetal guinea pig brain development. *J. Endocrinol.* 208, 301–309. doi: 10.1677/JOE-10-0248
- Kumar, R., Moure, C. M., Khan, S. H., Callaway, C., Grimm, S. L., Goswami, D., et al. (2013). Regulation of the structurally dynamic N-terminal domain of progesterone receptor by protein-induced folding. *J. Biol. Chem.* 288, 30285–30299. doi: 10.1074/jbc.M113.491787
- Labombarda, F., Gonzalez, S., Gonzalez, M., Guennoun, R., Schumacher, M., and de Nicola, A. F. (2002). Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *J. Neurotrauma* 19, 343–355. doi: 10.1089/089771502753594918
- Labombarda, F., González, S. L., Lima, A., Roig, P., Guennoun, R., Schumacher, M., et al. (2009). Effects of Progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury. *Glia* 57, 884–897. doi: 10.1002/glia.20814
- Laug, D., Glasgow, S., and Deneen, B. (2018). A glial blueprint for gliomagenesis. *Nat. Rev.* 19, 393–403. doi: 10.1038/s41583-018-0014-3
- Lauretta, R., Sansone, M., Romanelli, F., and Appetecchia, M. (2018). Gender in endocrine diseases: role of sex gonadal hormones. *Int. J. Endocrinol.* 2018:4847376. doi: 10.1155/2018/4847376
- Lee, J., Eklund, E. E., Lambert-Messerlian, G., Palomaki, G. E., Butterfield, K., Curran, P., et al. (2017). Serum progesterone levels in pregnant women with obstructive sleep apnea: a case control study. *J. Womens Health* 26, 259–265. doi: 10.1089/jwh.2016.5917
- Liu, T., and Ogle, T. (2002). Signal transducer and activator of transcription 3 is expressed in the decidualized mesometrium of pregnancy and associates with the progesterone receptor through protein-protein interactions. *Biol. Reprod.* 67, 114–118. doi: 10.1095/biolreprod67.1.114
- Lopez, V., and Wagner, C. K. (2009). Progesterin receptor is transiently expressed perinatally in neurons of the rat isocortex. *J. Comp. Neurol.* 512, 124–139. doi: 10.1002/cne.21883
- LoTurco, J. J. (2000). Neural circuits in the 21st century: synaptic networks of neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8196–8197. doi: 10.1073/pnas.97.15.8196
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., et al. (2016). The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* 131, 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1
- MacLusky, N., and McEwen, B. (1980). Progesterin receptors in the developing rat brain and pituitary. *Brain Res.* 189, 262–268. doi: 10.1016/0006-8993(80)90026-8
- Marquina-Sánchez, B., González-Jorge, J., Hansberg-Pastor, V., Wegman-Ostrosky, T., Baranda-Ávila, N., Mejía-Pérez, S., et al. (2017). The interplay between intracellular progesterone receptor and PKC plays a key role in

- migration and invasion of human glioblastoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 172, 198–206. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.10.001
- Melcangi, R. C., Poletti, A., Cavarretta, L., Celotti, F., Colciago, A., Magnaghi, V., et al. (1998). The 5 α -reductase in the central nervous system: expression and modes of control. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65, 295–299. doi: 10.1016/S0960-0760(98)00030-2
- Mellon, S. H., and Descheppe, C. F. (1993). Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res.* 629, 283–292. doi: 10.1016/0006-8993(93)91332-M
- Meltzer-Brody, S., Colquhoun, H., Riesenberger, R., Epperson, P., Deligiannidis, K., Rubinow, D., et al. (2018). Brexanolone injection in post-partum depression: two multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. *Lancet* 392, 1058–1070. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31551-4
- Mensah-Nyagan, G., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Luu-The, V., Pelletier, G., and Vaudry, H. (1999). Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* 51, 63–81.
- Menzies, K. D., Drysdale, D. B., and Waite, P. M. E. (1982). Effects of prenatal progesterone on the development of pyramidal cells in rat cerebral cortex. *Exp. Neurol.* 77, 654–667. doi: 10.1016/0014-4886(82)90236-9
- Mesiano, S., Wang, Y., and Norwitz, E. R. (2011). Progesterone receptors in the human pregnancy uterus. *Reprod. Sci.* 18, 6–19. doi: 10.1177/1933719110382922
- Milewich, L., Shaw, C. E., Doody, K. M., Rainey, W. E., Mason, J. I., and Carr, B. R. (1991). 3 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in glandular and extraglandular human fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73, 1134–1140. doi: 10.1210/jcem-73-5-1134
- Morel, Y., Roucher, F., Plotton, I., Goursaud, C., Tardy, V., and Mallet, D. (2016). Evolution of steroids during pregnancy: maternal, placental and fetal synthesis. *Ann. Endocrinol.* 77, 82–89. doi: 10.1016/j.ando.2016.04.023
- Nguyen, P. N., Billiards, S. S., Walker, D. W., and Hirst, J. J. (2003). Changes in 5 α -pregnane steroids and neurosteroidogenic enzyme expression in the perinatal sheep. *Pediatr. Res.* 53, 956–964. doi: 10.1203/01.PDR.0000088066.47755.36
- Nicol, M. B., Hirst, J. J., and Walker, D. (1999). Effects of pregnanolone on behavioural parameters and the responses to GABA(A) receptor antagonists in the late gestation fetal sheep. *Neuropharmacology* 38, 49–63. doi: 10.1016/S0028-3908(98)00166-X
- Nicol, M. B., Hirst, J. J., and Walker, D. W. (2001). Effect of finasteride on behavioural arousal and somatosensory evoked potentials in fetal sheep. *Neurosci. Lett.* 306, 13–16. doi: 10.1016/S0304-3940(01)01861-4
- Osborne, L., Gispén, F., Sanyal, A., Yenokyan, G., Meilman, S., and Payne, S. (2017). Lower allopregnanolone during pregnancy predicts postpartum depression: an exploratory study. *Psychoneuroendocrinology* 79, 116–121. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.02.012
- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y., Kruchko, C., et al. (2017). CBTRUS Statistical Report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro Oncol.* 19(Suppl. 5), v1–v88. doi: 10.1093/neuonc/nox158
- Palliser, H. K., Yates, D. M., and Hirst, J. J. (2012). Progesterone receptor isoform expression in response to in utero growth restriction in the fetal guinea pig brain. *Neuroendocrinology* 96, 60–67. doi: 10.1159/000335138
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R., Knudsen, T. B., Lacapère, J. J., Lindemann, P., et al. (2006). Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 402–409. doi: 10.1016/j.tips.2006.06.005
- Pasqualini, J. R., and Chetrite, G. S. (2016). The formation and transformation of hormones in maternal, placental and fetal compartments: biological implications. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 27, 11–28. doi: 10.1515/hmbci-2016-0036
- Peterson, B. L., Won, S., Geddes, R. I., Sayeed, I., and Stein, D. G. (2015). Sex-related differences in effects of progesterone following neonatal hypoxic brain injury. *Behav. Brain Res.* 286, 152–165. doi: 10.1016/j.bbr.2015.03.005
- Petroff, O. A. C. (2002). Book review: GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* 8, 562–573. doi: 10.1177/1073858402238515
- Petz, L. N., Ziegler, Y. S., Schultz, J. R., Kim, H., Kemper, J. K., and Nardulli, A. M. (2004). Differential regulation of the human progesterone receptor gene through an estrogen response element half site and Sp1 sites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 88, 113–122. doi: 10.1016/j.jsbmb.2003.11.008
- Phelps, S. M., Lydon, J. P., and Crews, D. (1998). Regulation of male sexual behavior by progesterone receptor, sexual experience, and androgen. *Horm. Behav.* 34, 294–302. doi: 10.1006/hbeh.1998.1485
- Piña-Medina, A. G., Hansberg-Pastor, V., González-Arenas, A., Cerbón, M., and Camacho-Arroyo, I. (2016). Progesterone promotes cell migration, invasion and cofilin activation in human astrocytoma cells. *Steroids* 105, 19–25. doi: 10.1016/j.steroids.2015.11.008
- Pluchino, N., Russo, M., and Genazzani, A. R. (2016). The fetal brain: role of progesterone and allopregnanolone. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 27, 29–34. doi: 10.1515/hmbci-2016-0020
- Quadros, P. S., Goldstein, A. Y. N., De Vries, G. J., and Wagner, C. K. (2002a). Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats. *J. Neuroendocrinol.* 14, 761–767. doi: 10.1046/j.1365-2826.2002.00827.x
- Quadros, P. S., Lopez, V., De Vries, G. J., Chung, W. C. J., and Wagner, C. K. (2002b). Progesterone receptors and the sexual differentiation of the medial preoptic nucleus. *J. Neurobiol.* 51, 24–32. doi: 10.1002/neu.10040
- Quadros, P. S., Pfau, J. L., Goldstein, A. Y. N., De Vries, G. J., and Wagner, C. K. (2002c). Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology* 143, 3727–3739. doi: 10.1210/en.2002-211438
- Quadros, P. S., Pfau, J. L., and Wagner, C. K. (2007). Distribution of progesterone receptor immunoreactivity in the fetal and neonatal rat forebrain. *J. Comp. Neurol.* 504, 42–56. doi: 10.1002/cne.21427
- Quadros, P. S., Schlueter, L. J., and Wagner, C. K. (2008). Distribution of progesterone receptor immunoreactivity in the midbrain and hindbrain of postnatal rats. *Dev. Neurobiol.* 68, 1378–1390. doi: 10.1002/dneu.20664
- Sakamoto, H., Ukena, K., and Tsutsui, K. (2001). Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J. Neurosci.* 21, 6221–6232. doi: 10.1523/jneurosci.21-16-06221.2001
- Sakamoto, H., Ukena, K., and Tsutsui, K. (2002). Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats. *Neurosci. Lett.* 332, 111–115. doi: 10.1016/S0304-3940(02)00077-0
- Schumacher, M., Guennoun, R., Mercier, G., Désarnaud, F., Lacor, P., Bénavides, J., et al. (2001). Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res. Rev.* 37, 343–359. doi: 10.1016/S0165-0173(01)00139-4
- Schumacher, M., Guennoun, R., Robert, F., Carelli, C., Gago, N., Ghomari, A., et al. (2004). Local synthesis and dual actions of progesterone in the nervous system: neuroprotection and myelination. *Growth Horm. IGF Res.* 14, 18–33. doi: 10.1016/j.ghir.2004.03.007
- Schumacher, M., Hussain, R., Gago, N., Oudinet, J. P., Mattern, C., and Ghomari, A. M. (2012). Progesterone synthesis in the nervous system: implications for myelination and myelin repair. *Front. Neurosci.* 6:10. doi: 10.3389/fnins.2012.0010
- Schumacher, M., Mattern, C., Ghomari, A., Oudinet, J. P., Liere, P., Labombarda, F., et al. (2014). Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: resurgence of the progesterone receptors. *Prog. Neurobiol.* 113, 6–39. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.09.004
- Sierra, A. (2004). Neurosteroids: the StAR protein in the brain. *J. Neuroendocrinol.* 16, 787–793. doi: 10.1111/j.1365-2826.2004.01226.x
- Snyder, A. M., and Hull, E. M. (1980). Perinatal progesterone affects learning in rats. *Psychoneuroendocrinology* 5, 113–119. doi: 10.1016/0306-4530(80)90014-1
- Stiles, J., and Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol. Rev.* 20, 327–348. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330
- Testas, I. J., Hu, Z. Y., Baulieu, E. E., and Robel, A. P. (1989). Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology* 125, 2083–2091. doi: 10.1210/endo-125-4-2083
- Tetel, M. J., and Acharya, K. D. (2013). Nuclear receptor coactivators: regulators of steroid action in brain and behaviour. *J. Neuroendocrinol.* 25, 1209–1218. doi: 10.1111/jne.12065

- Trotter, A., Bokelmann, B., Sorgo, W., Bechinger-Kornhuber, D., Heinemann, H., Schmücker, G., et al. (2001). Follow-up examination at the age of 15 months of extremely preterm infants after postnatal estradiol and progesterone replacement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 601–603. doi: 10.1210/jc.86.2.601
- Tsutsui, K. (2008). Minireview: progesterone biosynthesis and action in the developing neuron. *Endocrinology* 149, 2757–2761. doi: 10.1210/en.2007-1592
- Tsutsui, K., Ukena, K., Sakamoto, H., Okuyama, S. I., and Haraguchi, S. (2011). Biosynthesis, mode of action, and functional significance of neurosteroids in the purkinje cell. *Front. Endocrinol.* 2:61. doi: 10.3389/fendo.2011.00061
- Tuckey, R. C. (2005). Progesterone synthesis by the human placenta. *Placenta* 26, 273–281. doi: 10.1016/j.placenta.2004.06.012
- Ukena, K., Kohchi, C., and Tsutsui, K. (1999). Expression and activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-isomerase in the rat purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology* 140, 805–813. doi: 10.1210/endo.140.2.6516
- Ukena, K., Usui, M., Kohchi, C., and Tsutsui, K. (1998). Cytochrome p450 side-chain cleavage enzyme in the cerebellar purkinje neuron and its neonatal change in rats. *Endocrinology* 139, 137–147. doi: 10.1210/endo.139.1.5672
- Valadez-Cosmes, P., Germán-Castelán, L., González-Arenas, A., Velasco-Velázquez, M. A., Hansberg-Pastor, V., and Camacho-Arroyo, I. (2015). Expression and hormonal regulation of membrane progesterone receptors in human astrocytoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 154, 176–185. doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.08.006
- Valadez-Cosmes, P., Vázquez-Martínez, E. R., Cerbón, M., and Camacho-Arroyo, I. (2016). Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 434, 166–175. doi: 10.1016/j.mce.2016.06.027
- Vicent, G. P., Ballaré, C., Zaurin, R., Saragüeta, P., and Beato, M. (2006). Chromatin remodeling and control of cell proliferation by progestins via cross talk of progesterone receptor with the estrogen receptors and kinase signaling pathways. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1089, 59–72. doi: 10.1196/annals.1386.025
- Vickery, L. E. (1993). “Cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 (P450_{sc})” in *Cytochrome P450. Handbook of Experimental Pharmacology*, eds J. B. Schenkman and H. Greim (Berlin: Springer), 105.
- Wagner, C. K. (2008). Minireview: progesterone receptors and neural development: a gap between bench and bedside? *Endocrinology* 149, 2743–2749. doi: 10.1210/en.2008-0049
- Wagner, C. K., and Quadros-Mennella, P. (2017). Progesterone from maternal circulation binds to progesterone receptors in fetal brain. *Dev. Neurobiol.* 77, 767–774. doi: 10.1002/dneu.22462
- Wechsler-Reya, R., and Scott, M. (2001). The developmental biology of brain tumors. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 385–428. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.385
- Weiner, J. A., Jontes, J. D., and Burgess, R. W. (2013). Introduction to mechanisms of neural circuit formation. *Front. Mol. Neurosci.* 6:12. doi: 10.3389/fnmol.2013.00012
- Weisz, J., and Ward, I. L. (1980). Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106, 306–316. doi: 10.1210/endo-106-1-306
- Willing, J., and Wagner, C. K. (2014). Sensorimotor development in neonatal progesterone receptor knockout mice. *Dev. Neurobiol.* 74, 16–24. doi: 10.1002/dneu.22124
- Willing, J., and Wagner, C. K. (2016). Progesterone Receptor expression in the developing mesocortical dopamine pathway: importance for complex cognitive behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 103, 207–222. doi: 10.1159/000434725
- Woolley, S. C., O'Malley, B., Lydon, J., and Crews, D. (2006). Genotype differences in behavior and tyrosine hydroxylase expression between wild-type and progesterone receptor knockout mice. *Behav. Brain Res.* 167, 197–204. doi: 10.1016/j.bbr.2005.07.035
- Wright, D. W., Kellermann, A. L., Hertzberg, V. S., Clark, P. L., Frankel, M., Goldstein, F. C., et al. (2007). PROTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Ann. Emerg. Med.* 49, 391–402. doi: 10.1016/j.annemergmed.2006.07.932
- Wu, S. P., Li, R., and DeMayo, F. J. (2018). Progesterone receptor regulation of uterine adaptation for pregnancy. *Trends Endocrinol. Metab.* 29, 481–491. doi: 10.1016/j.tem.2018.04.001
- Yawno, T., Hirst, J. J., Castillo-Melendez, M., and Walker, D. W. (2009). Role of neurosteroids in regulating cell death and proliferation in the late gestation fetal brain. *Neuroscience* 163, 838–847. doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.07.009
- Yawno, T., Yan, E. B., Walker, D. W., and Hirst, J. J. (2007). Inhibition of neurosteroid synthesis increases asphyxia-induced brain injury in the late gestation fetal sheep. *Neuroscience* 146, 1726–1733. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.03.023
- Yonkers, K., Vigod, S., and Ross, L. (2011). Diagnosis, pathophysiology, and management of mood disorders in pregnant and postpartum women. *Obstet. Gynecol.* 117, 961–977. doi: 10.1097/AOG.0b013e31821187a7
- Zamora-Sánchez, C. J., Hansberg-Pastor, V., Salido-Guadarrama, I., Rodríguez-Dorantes, M., and Camacho-Arroyo, I. (2017). Allopregnanolone promotes proliferation and differential gene expression in human glioblastoma cells. *Steroids* 119, 36–42. doi: 10.1016/j.steroids.2017.01.004
- Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M., and Thomas, P. (2003). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterone receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2231–2236. doi: 10.1073/pnas.0336132100

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 González-Orozco and Camacho-Arroyo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article

Progesterone through Progesterone Receptor B Isoform Promotes Rodent Embryonic Oligodendrogenesis

Juan Carlos González-Orozco, Aylin Del Moral-Morales  and Ignacio Camacho-Arroyo *

Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de Mexico 04510, Mexico; g.orozco221@gmail.com (J.C.G.-O.); ayvindmm@gmail.com (A.D.M.-M.)

* Correspondence: camachorroyo@gmail.com

Received: 12 March 2020; Accepted: 28 March 2020; Published: 14 April 2020



Abstract: Oligodendrocytes are the myelinating cells of the central nervous system (CNS). These cells arise during the embryonic development by the specification of the neural stem cells to oligodendroglial progenitor cells (OPC); newly formed OPC proliferate, migrate, differentiate, and mature to myelinating oligodendrocytes in the perinatal period. It is known that progesterone promotes the proliferation and differentiation of OPC in early postnatal life through the activation of the intracellular progesterone receptor (PR). Progesterone supports nerve myelination after spinal cord injury in adults. However, the role of progesterone in embryonic OPC differentiation as well as the specific PR isoform involved in progesterone actions in these cells is unknown. By using primary cultures obtained from the embryonic mouse spinal cord, we showed that embryonic OPC expresses both PR-A and PR-B isoforms. We found that progesterone increases the proliferation, differentiation, and myelination potential of embryonic OPC through its PR by upregulating the expression of oligodendroglial genes such as neuron/glia antigen 2 (NG2), sex determining region Y-box9 (SOX9), myelin basic protein (MBP), 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP1), and NK6 homeobox 1 (NKX 6.1). These effects are likely mediated by PR-B, as they are blocked by the silencing of this isoform. The results suggest that progesterone contributes to the process of oligodendrogenesis during prenatal life through specific activation of PR-B.

Keywords: oligodendrocyte progenitor cells; oligodendrogenesis; myelination; progesterone; progesterone receptor

1. Introduction

Central nervous system (CNS) myelination is a process that begins in late stages of mammalian prenatal life and extends to adulthood [1,2]; however, the oligodendrocytes responsible of this process arise earlier in embryonic neurodevelopment by the specification of neural stem cells (NSC) into oligodendroglial progenitor cells (OPC) after the neurogenic phase [3], which occurs approximately on day 12.5 of the mouse embryonic development and between gestational weeks 16–18 in the human [4,5].

The first site of OPC specification during mammalian neurodevelopment has been identified in the ventral region of the neural tube, in the prospective cervical portion of the spinal cord [4,6,7]. In this region, after the first wave of generation of the motoneurons of the spinal cord, the morphogen sonic hedgehog (Shh) promotes the induction of the NSC into OPC by upregulating the expression of a transcriptional program associated to the oligodendroglial lineage [6,8]; among the upregulated genes in this early specification stage are the transcription factors sex determining region Y-box9/10 (Sox9/10), oligodendrocyte transcription factor 1/2 (Olig1/2), NK6 homeobox 1/2 (Nkx 6.1/6.2) and the receptor α for the platelet-derived growth factor (PDGFRa) [8–10]. Then, newly specified OPC actively proliferate and migrate to establish a homogenous distribution [4,7,11].

The proliferation and migratory phenotype of early OPC is maintained by the platelet-derived growth factor (PDGF) and the fibroblast growth factor 2 (FGF2) [7,12], whereas mitotic arrest and subsequent oligodendrocyte differentiation is promoted by several elements such as thyroid hormones [13,14], the ciliary neurotrophic factor (CNTF), the extracellular matrix component laminin α 2 (merosin), and the presence of neuronal activity [15–17]; final maturation to myelinating oligodendrocytes is induced by the upregulation of promyelinating genes such as the myelin basic protein (MBP), myelin proteolipid protein (PLP), and 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP1) [17,18].

Along with these elements, some studies have shown that progesterone also has a role in developmental oligodendrogenesis and the myelination process [19]; in fact, because the main role of this hormone lies in the maintenance of pregnancy, progesterone is constitutively present in the maternal and embryo-fetal circulation throughout development [20], and continues to be synthesized in the CNS of both females and males after birth [21]. In the adult, it regulates different functions such as neuroprotection, neurogenesis, neuronal plasticity, sexual behavior, mood, learning, and memory [22,23].

Progesterone exerts its effects mainly through two pathways: a directly genomic pathway and a non-genomic pathway. Through the genomic pathway, it interacts with its intracellular receptor (PR), a transcription factor that, once activated, binds to specific DNA sequences named progesterone response elements (PRE) that are mainly located in gene promoter regions, thus regulating their expression [24,25]. Meanwhile, the non-genomic pathway is related to rapid cellular responses triggered by the activation of different G protein-coupled membrane receptors to progesterone (mPRs) or PR ligand-independent activation [26,27].

There are two PR isoforms, PR-A and PR-B, which are encoded in the same gene but from different transcription start sites [28], which makes the PR-A isoform an N-terminally truncated form of the complete PR-B isoform [29,30]. In the brain and the spinal cord, they present a different expression pattern, regulation, and function [31–35]. Generally, given that the PR-B is a more potent transcription activator than the PR-A, the former is the positive regulator of the genomic effects of progesterone, whereas PR-A is mainly a transcriptional repressor [36–38].

The effects of progesterone on developmental oligodendrogenesis and myelination have been documented in cerebellar organotypic cultures obtained from postnatal rats and mice. It was demonstrated that the addition of progesterone to the culture medium immediately increases OPC proliferation, and after 1 week it increases the number of differentiated oligodendrocytes and its potential of nerve myelination, as seen by an increasing in MBP expression, effects that were found to be mediated by a genomic mechanism of action because the use of the PR antagonist mifepristone blocked them [39,40]. In addition, it was reported that OPC from the brain of newborn rats actively synthesizes and metabolizes progesterone during its proliferative phase prior to its differentiation into oligodendrocytes, suggesting that autocrine and paracrine actions of progesterone contribute to oligodendrocyte development and nerve myelination [41].

Moreover, progesterone also has effects on CNS remyelination in adulthood because it increases the number of differentiated oligodendrocytes and upregulates the expression of genes involved in myelin repair in adult rats with spinal cord injury. Therefore, progesterone has been proposed to treat demyelinating lesions [42,43].

Despite these studies, it is unknown if progesterone also promotes differentiation of OPC during embryonic life, as well as the specific PR isoform involved in progesterone actions in these glial cells, which is relevant to understand the mechanisms underlying the developmental oligodendrogenesis and thus elaborate therapeutic strategies to treat demyelinating lesions in postnatal life. In this work, we studied the effects of progesterone and the role of PR in the proliferation, differentiation, and myelination potential of OPC, as well the effects of progesterone on the regulation of genes associated with developmental oligodendrogenesis by using isolated OPC from the embryonic mouse spinal cord. Finally, we studied the specific role of PR-B in the embryonic OPC.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Female CD-1 mice with 14.5 days of pregnancy were used in this study. For this purpose, female mice purchased from the animal facility of Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM, México) were mated with expert male mice for 12 h, and then maintained in individual cages with free access to food and water until the day of use. Day 0 of pregnancy was defined as the day on which the vaginal plug was observed. Animals were euthanized by cervical dislocation and embryos were extracted and transferred to a cold sterile phosphate-buffered saline (PBS) solution. All animals used in this study were handled following the bioethical guidelines approved by the internal committee for the care and use of laboratory animals (CICUAL) of Facultad de Química (UNAM, México).

2.2. OPC Culture

The cervical segments of the spinal cord of E14.5 mouse embryos were dissected and disaggregated in 0.1% trypsin (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) during 20 min at 37 °C. Cellular suspension was centrifuged at 1000× *g* for 3 min and then resuspended in DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) with HEPES buffer, no phenol red culture medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with B-27 (ThermoFisher Scientific). Then, 10 µL per 1 mL of disaggregated cells were mixed with 10 µL of trypan blue (ThermoFisher Scientific) and manually counted on a hemocytometer. Approximately 5×10^5 cells were plated per well in 12-well plates, with the addition of FGF2 (20 ng/mL) and the epidermal growth factor (EGF; 20 ng/mL) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), which were added every 2 days. After 1 week, the formation of cell spheroid aggregates (neurospheres) was observed. Then, neurospheres were disaggregated with 0.025% trypsin during 10 min at 37 °C; cells were counted as described before and 1.5×10^5 cells were plated under the same conditions; however, from the second day on culture, the growth factor PDGF (10 ng/mL) (Peprotech) was added in replacement of EGF. OPC selective expansion was obtained by plating 8×10^4 cells (derived from the disintegration of second passage neurospheres) per well in 12-well plates pretreated with 0.01% poly-L-lysine (Merck, Kenilworth, NJ, USA) with the addition of the growth factors FGF2 (10 ng/mL) and PDGF (10 ng/mL). Approximately 1 week later, cell confluence was observed; then, OPC were detached with 0.025% trypsin during 10 min at 37 °C and subcultured under the same conditions for approximately 1 week. Cells from the 3rd to 10th passage were used to perform the experiments. To perform the cell proliferation and differentiation experiments, the following pharmacological agents were used: triiodo-L-thyronine (T3; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), progesterone (P4; Sigma-Aldrich), RU486 (mifepristone; Sigma-Aldrich), R5020 (promegestone; PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA), and Org OD 02-0 (10-ethenyl-19-norprogesterone; Sigma-Aldrich).

2.3. Immunofluorescence

Cells were fixed using 4% paraformaldehyde solution (Sigma-Aldrich) at room temperature for 20 min followed by three washes in PBS. Then, cells were permeabilized and blocked in a PBS solution with 1% bovine serum albumin (BSA; In Vitro, MEX), 1% glycine (Sigma-Aldrich), and 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) at room temperature for 30 min. Cells were incubated at 4 °C for 12 h with primary antibodies at the following dilutions: 1:500 mouse anti-sex determining region Y-box2 (Sox2) (Santa Cruz, Dallas, TX, USA; sc-365964), 1:200 mouse anti-neuron/glia antigen 2 (NG2) (Millipore, Burlington, MA, USA; mab5384), 1:300 mouse anti-oligodendrocyte marker O4 (Millipore; mab345), 1:500 mouse anti-myelin basic protein (MBP) (Millipore; 05-675), 1:100 rabbit anti-microtubule-associated protein 2 (MAP2) (Invitrogen, Waltham, MA, USA; pa5-17646), 1:200 rabbit anti-Ki67 antigen (Millipore; ab9260), and 1:500 rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Abcam, Cambridge, UK; ab7260). Cells were rinsed three times in PBS and then incubated with secondary antibodies goat anti-mouse Alexa Fluor 488 or goat anti-rabbit Alexa Fluor 568, both at dilution 1:500 (ThermoFisher Scientific) at room temperature for 60 min. Nuclei were stained for 5 min

with 1 mg/mL Hoechst 33,342 solution (ThermoFisher Scientific). Finally, cells were coverslipped with fluorescence mounting medium (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) and visualized in an Olympus Bx43 microscope (JPN). All immunofluorescence images were captured with a 400X magnification from three random fields per coverslip in each independent experiment. All images were captured under the same gain, exposure time and light intensity conditions. The percentage of immunopositive cells was calculated considering the nuclei stained with Hoechst as the total (100%) number of cells using the “Cell counter” plugin in the ImageJ software ver. 1.51 (NIH, Bethesda, MD, USA). Fluorescence density was measured as “Integrated density” from the Analyze menu of ImageJ, whereas oligodendrocyte branching was measured as “Area” from the same menu options.

2.4. RNA Isolation and PCR Experiments

Total RNA was extracted using TRIzol LS reagent (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer’s instructions. One microgram of total RNA was used to synthesize the first strand of complementary DNA using the Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer’s protocol. Two microliters from the previous reaction was used to perform RT-PCR or RT-qPCR experiments using the Platinum Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) and the FastStart DNA Master SYBR Green I reagent kit (Roche, Basel, Switzerland), respectively. RT-PCR results were visualized in a 1.5% agarose (Sigma-Aldrich) gel electrophoresis. RT-qPCR experiments were performed on a LightCycler 1.5 (Roche) and relative expression levels were calculated by the Δ Ct method. The used primers were: NG2: FW 5'-GCCCGTGCCCTCAGC-3' RV 5'-CAAGTCTGACCTGGAGGCAT-3'; PDGF α : FW 5'-GGAAGAGGATGACTCTGCCAT-3' RV 5'-CGAAGCCTTCTCGTGGACA-3'; OLIG1: FW 5'-GCAGCCACCTATCTCCTCAT-3' RV 5'-GTGGCAATCTTGGAGAGCTT-3'; SOX9: FW 5'-GAGCTGGAAGTCGGAGAGC-3' RV 5'-CTCTCGTTCAGCAGCCTCCA-3'; SOX10: FW 5'-AGCCCAGGTGAAGACAGAGA-3' RV 5'-AGTCAAACCTGGGTCGTGAG-3'; MBP: FW 5'-TCACAGAAGAGACCCTCACA-3' RV 5'-GCCGTAGTGGGTAGTTCTTG-3'; CNP1: FW 5'-TCCACGAGTGCAAGACGCTATTCA-3' RV 5'-TGTAAGCATCAGCGGACACCATCT-3'; NKX 6.1: FW 5'-CTTCTGGCCCCGGAGTGATG-3' RV 5'-GGGTCTGGTGTGTTTTCTCTTC-3'; NKX 6.2: FW 5'-CTTCTGGCCCCGGAGTGATG-3' RV 5'-CGGTTGTATTCGTCATCGTC-3'; PR-B: FW 5'-ACCTGAGGCCAGATTCAGAAG-3' RV 5'-GTATCCCCACATGCACGTAT-3' and 18S ribosomal RNA: FW 5'-AGTGAACTGCAATGGCTC-3' RV 5'-CTGACCGGGTTGGTTTTGAT-3'.

2.5. Analysis of Potential Progesterone Response Elements

The promoter sequences and transcription start sites were obtained from the Eukaryotic Promoter Database (EPD) (<https://epd.epfl.ch/index.php>); potential binding sites for PR were searched using the algorithms contained in JASPAR [44], TRANSFAC [45], and NUBIscan [46] databases. The binding sites predicted by two or more databases with a matrix similarity score higher than 0.8 were established as potential PRE.

2.6. Western Blot

OPC were detached from culture plates using PBS-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; Sigma-Aldrich) and cell scraper (Corning, New York, NY, USA). Cells were centrifuged and obtained pellets were lysed with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer and protease inhibitors (1 mM EDTA, 2 μ g/mL leupeptin, 2 μ g/mL aprotinin, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF); Sigma-Aldrich). Total protein was extracted by centrifugation at 20,817 \times g at 4 °C for 15 min. The protein concentration of each sample was measured using the Pierce 660 nm Protein Assay reagent (ThermoFisher Scientific) and NanoDrop-2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). A total of 100 μ g of total protein was separated on 10% SDS-PAGE at 80 V for 2 h and then transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Merck) for 1 h at 25 V in semi-dry conditions at room temperature. Membranes were blocked overnight with 5% BSA (In Vitro) and then incubated at 4 °C

with primary antibodies mouse anti-PR in dilution 1:300 (Abcam; ab58568) or rabbit anti- α tubulin in dilution 1:1000 (Santa Cruz; sc-5286) for 48 h. Blots were incubated with goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) in dilution 1:4500 (Santa Cruz; sc-2004) or mouse IgG kappa binding protein (mIgG κ BP) conjugated to HRP in dilution 1:5000 (Santa Cruz; sc516102) at room temperature for 45 min. Immunoreactive species were detected by chemiluminescence exposing blots to Kodak Biomax Light Film (Sigma-Aldrich) after incubation with Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate reagent (ThermoFisher Scientific). Blot images were captured with a digital camera (Sony, Tokyo, Japan); the densitometric analysis was performed using the ImageJ software ver. 1.51 (NIH).

2.7. siRNA-Mediated PR-B Silencing

Cultured OPC at 60–80% confluence were subjected to siRNA (small interfering RNA) transfection. The day of transfection, the cell medium was replaced with DMEM/F-12, HEPES phenol-red free without B27, antibiotics, and growth factors. Then, the cells were transfected with a PR-B siRNA duplex (150 nM) or with a control siRNA (150 nM) without any specific mRNA target sequence (Sigma-Aldrich) using the reagent Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher Scientific) and following the manufacturer's instructions. Then, 24 h later, the transfection medium was exchanged with DMEM/F-12 and HEPES phenol-red free supplemented with B27 and growth factors. PR-B silencing was corroborated 48 h after transfection by RT-qPCR. The sequence of the employed mouse PR-B siRNA duplex was sense 5'-AUGACUGAGCUGCAGGCAA-3', antisense 5'-UUGCCUGCAGCUCAGUCAU-3'.

2.8. Statistical Analysis

All data were analyzed and plotted with the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Plotted data are representative of three independent experiments (i.e., from three different and independent cell cultures). Statistical analysis between comparable groups was performed using a one-way ANOVA with a Bonferroni post-test. RT-qPCR, Western blot, and siRNA silencing data were analyzed with a two-tail unpaired Student's *t*-test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Oligodendrocyte Progenitor Cultures Derived from the Mouse Embryonic Spinal Cord

The cervical segments of the spinal cord of E14.5 mouse embryos (Figure S1A) were isolated to prepare primary neurosphere cultures (Figure 1A), as previously described [47]. The obtained neurospheres were mainly composed of cells positive for the stem cells marker Sox2 (Figure S1B,C). Then, OPC were selectively expanded by disaggregation of the neurospheres and plating the cells in adherent conditions supplemented with the growth factors FGF2 and PDGF (each one at 10 ng/mL); the effectiveness of obtaining cells from the oligodendroglial lineage by following this procedure has been previously demonstrated [48,49]. Highly proliferative cells with bipolar morphology were observed shortly after plating (Figure 1B and Figure S1D), which is the morphology associated with the OPC phenotype [49]. To confirm the oligodendroglial lineage, cells were immunostained with the typical OPC marker NG2 (Figure 1C); as shown, most of the cells were NG2 positive, and the signal was mainly detected in their nuclei and processes. Furthermore, the expression of oligodendroglial lineage genes was detected in OPC by RT-PCR experiments (Figure 1D). To determine whether the cultured OPC responded to well-known differentiation stimuli, cells were cultured without growth factors and treated for 3 days with the thyroid hormone T3 (40 ng/mL). After treatment, morphological changes were observed; additionally, the cells were immunostained positively for O4, a typical marker of differentiated oligodendrocytes. Some MBP (myelin marker)-positive cells were spotted (Figure 1E). Additionally, immunofluorescence to detect MAP2- or GFAP-positive cells after culturing the cells for 3 days without growth factors showed the presence of a low number of neurons or astrocytes, respectively (Figure S1E). With these results, the efficacy to obtain a large amount of highly pure

functional OPC from the spinal cord of E14.5 mouse embryos was demonstrated by following the described procedure.

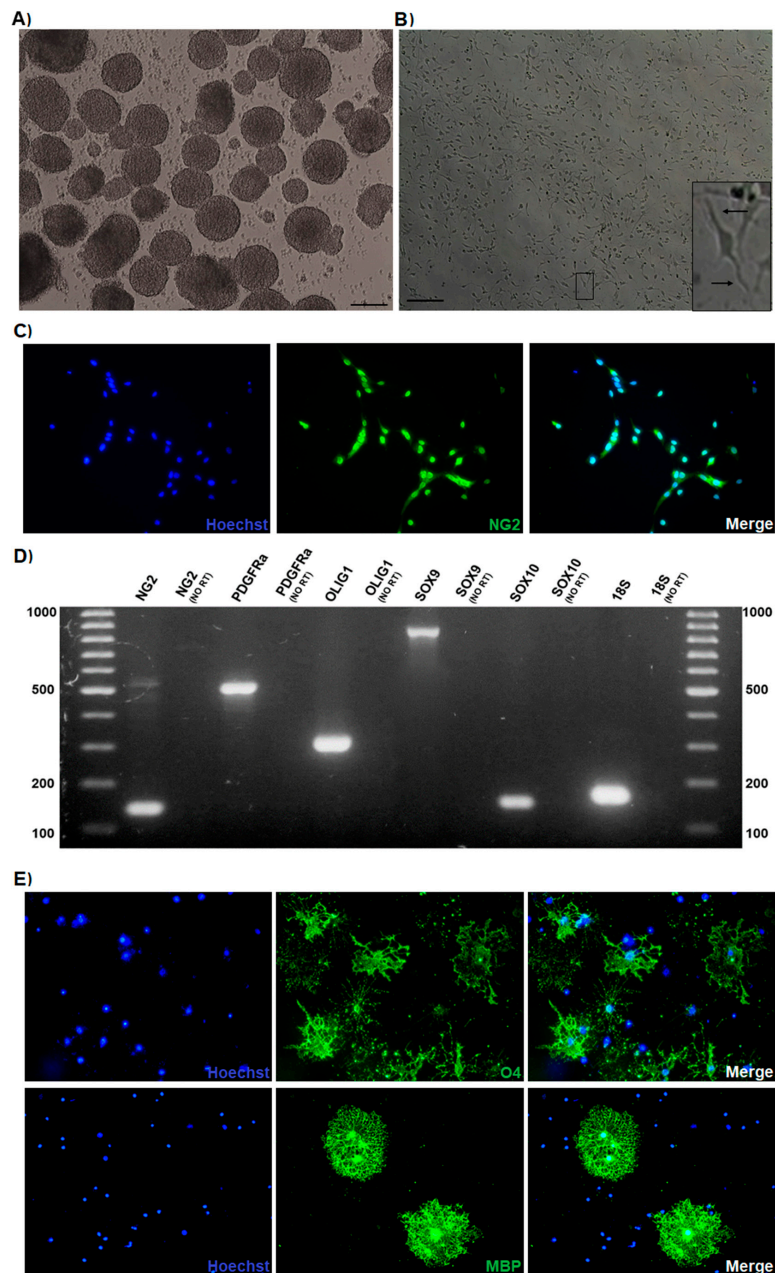


Figure 1. Oligodendroglial progenitor cells (OPC) cultures derived from the spinal cord of E14.5 mouse embryos. (A) Primary neurosphere cultures generated from the mouse embryonic spinal cord. (B) Selective OPC expansion from the neurospheres. The arrows in the zoomed area shows the bipolar processes. Scale bars: 100 μ m. (C) Immunodetection of the typical OPC marker NG2 in the cultured cells. Nuclei stained with Hoechst are shown in blue, anti-NG2 primary antibody is shown in green, and merge panel shows the combination of blue and green colors. (D) The expression of the oligodendroglial genes NG2 (143 bp), PDGFR α (524 bp), OLIG1 (309 bp), SOX9 (820 bp), and SOX10 (146 bp) was detected in the cultured cells by RT-PCR. (E) The OPC were cultured without growth factors and treated for 3 days with T3 hormone (40 ng/mL); differentiation was evaluated by immunodetection of the oligodendrocyte marker O4 and the myelin marker myelin basic protein (MBP). All immunofluorescence images were captured with 400 \times magnification.

3.2. Progesterone Promotes the Proliferation and Differentiation of Mouse Embryonic OPC and Increases Its Potential of Myelination through the PR

Once the protocol for obtaining OPC from the mouse embryonic cord was established, the effects of progesterone on cell proliferation were evaluated. For this purpose, OPC were cultured with the addition of growth factors (FGF2 and PDGF at 10 ng/mL each one) and treated for 3 days with progesterone (10 nM), the competitive PR antagonist RU486 (1 μ M), or progesterone and RU486. As shown in Figure 2, progesterone increased the percentage of Ki67/NG2-positive cells as compared with the vehicle control, whereas the treatment with only RU486 did not induce any change. RU486 blocked progesterone effect, suggesting that progesterone promotes OPC proliferation through its PR. To further confirm this statement, cell proliferation was assessed treating the OPC with the PR agonist R5020 (10 nM), or with the mPRs-specific agonist Org OD 02-0 (100 nM). As observed with progesterone, the agonist R5020 increased the number of proliferating Ki67/NG2 cells, whereas the mPRs agonist did not increase it (Figure S2).

Progesterone also promoted the differentiation of OPC that were cultured without growth factors and treated for 3 days, as seen by a striking increase in the number of O4-positive cells in immunofluorescence preparations (Figure 3A,B). With this approach, it was also observed that progesterone significantly increased the branching area of the differentiated oligodendrocytes (Figure 3C), and all these effects were mediated by the PR because the treatments with RU486 blocked them (Figure 3). Moreover, R5020 induced similar results as compared with progesterone, whereas Org OD 02-0 did not induce any effect (Figure S3).

Regarding the potential of myelination, progesterone increased the expression of the myelin marker MBP in the differentiated OPC, and RU486 blocked this effect (Figure 4). Moreover, the PR agonist R5020 exerted similar effects to those of progesterone. In contrast, Org OD 02-0 did not produce any significant change in MBP expression (Figure S4). These results suggest that progesterone through a genomic mechanism of action regulates the proliferation and differentiation of mouse embryonic OPC, also increasing their myelinating function.

3.3. Progesterone Upregulates the Expression of Oligodendroglial Genes

Considering that progesterone promoted the proliferation and differentiation of the cultured OPC through the specific activation of the PR (i.e., by a genomic mechanism of action), the effects of progesterone on the regulation of the expression of various genes associated with the embryonic oligodendrogenesis were studied. After 24 h of exposure, progesterone upregulated the expression of the transcription factor Nkx 6.1, as well as the expression of the myelin marker Cnp1 in the OPC, whereas after 48 h, the upregulated genes by progesterone were NG2; the transcription factor Sox9; and, as expected, the myelin marker MBP. Although it was not observed that progesterone significantly increased the expression of the genes of PDGFR α , Sox10, and Nkx 6.2, an increasing trend was observed in cells exposed to the hormone (Figure 5). The PR works as a transcription factor that binds to DNA sequences known as PRE, which are usually located in promoter regions of target genes. In order to detect potential PRE sequences in the promoter regions of the progesterone-upregulated genes, an *in silico* analysis was performed. The promoter sequences of the NG2, Sox9, Nkx 6.1, Cnp1, and MBP genes were obtained from the EPD and confirmed by a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analysis (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). By using the algorithms from the JASPAR, TRANSFAC, and NUBIscan databases, it was identified that all genes have potential PRE in their promoter regions (Figure S5). Based on these results, it was confirmed that the effects of progesterone on embryonic OPC were mediated by a genomic mechanism of action, and that in addition, progesterone can differentially regulate the expression of genes associated with oligodendrogenesis throughout embryogenesis.

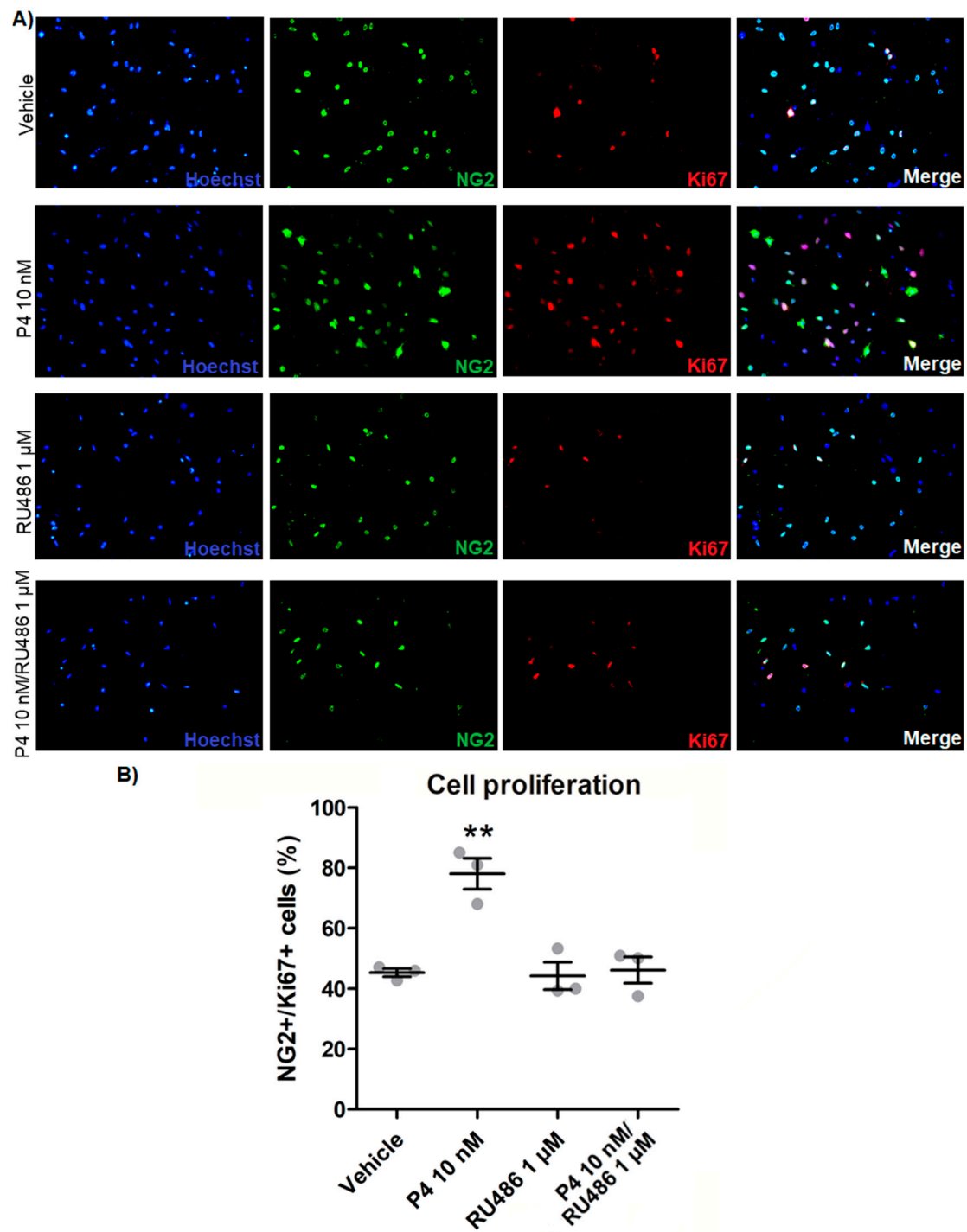


Figure 2. Progesterone increases embryonic OPC proliferation. (A) NG2/Ki67 immunostaining in OPC cultured with growth factors and treated with progesterone (P4; 10 nM), RU486 (1 μM), P4 (10 nM) and RU486 (1 μM), and vehicle (DMSO 0.01%), for 3 days. (B) Graph derived from the percentage of NG2/Ki67-positive cells observed in the immunofluorescence experiments. The percentage of NG2+/Ki67+ cells was determined as a percentage of the total number of cells stained with Hoechst. Results are expressed as the mean ± standard error of the mean (S.E.M.); $n = 3$; ** $p < 0.01$ vs. the rest of the groups.

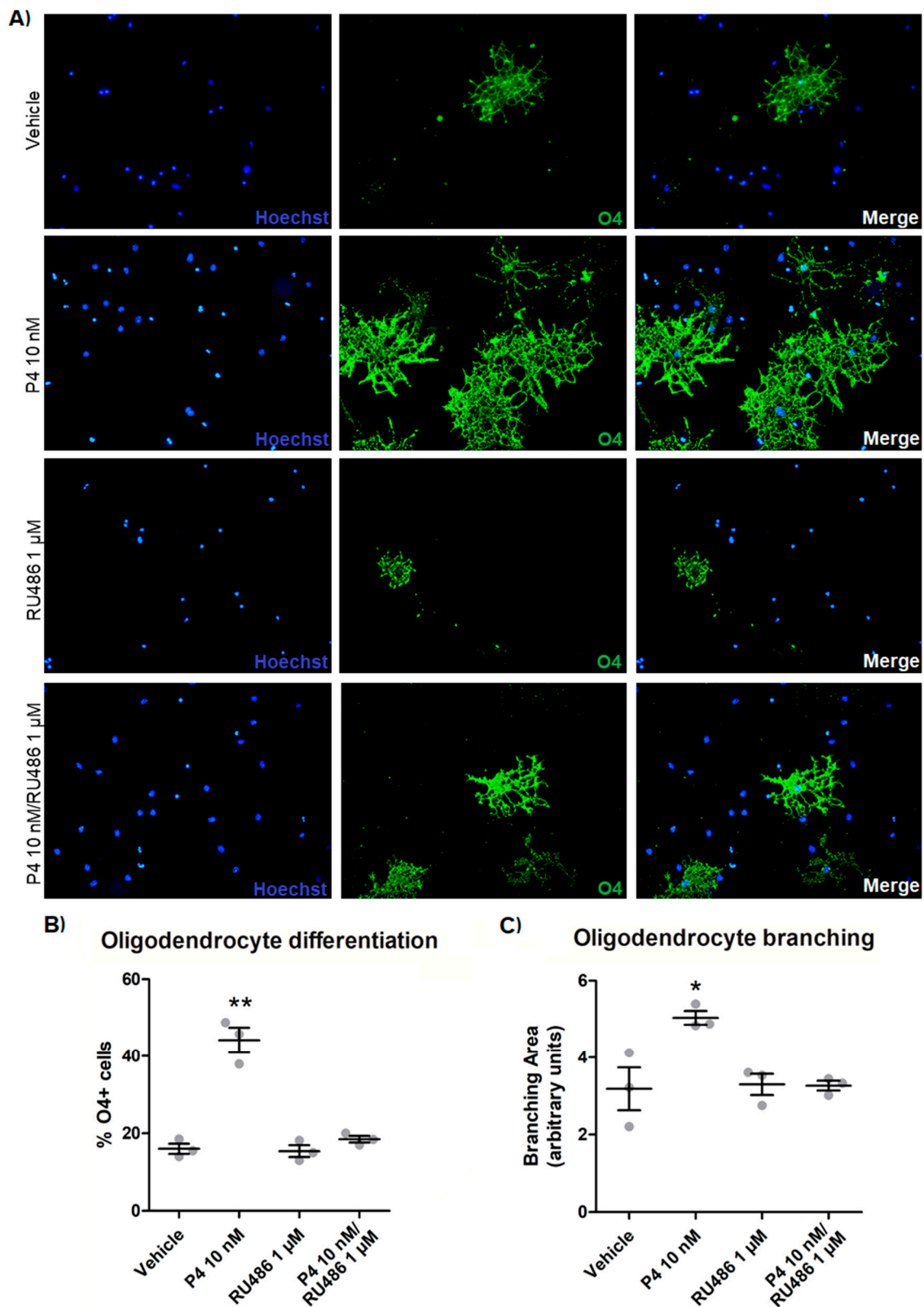


Figure 3. Progesterone promotes oligodendrocyte differentiation. (A) O4 immunofluorescence in OPC cultured without growth factors and treated for 3 days with P4 (10 nM), RU486 (1 μM), P4 (10 nM) and RU486 (1 μM), and vehicle (DMSO 0.01%). (B) Percentage of O4-positive cells observed in the immunofluorescence experiments. The percentage of O4+ cells was determined as a percentage of the total number of cells stained with Hoechst. (C) Cellular branching measured in O4-positive cells. Results are expressed as the mean ± S.E.M. $n = 3$; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. the rest of the groups.

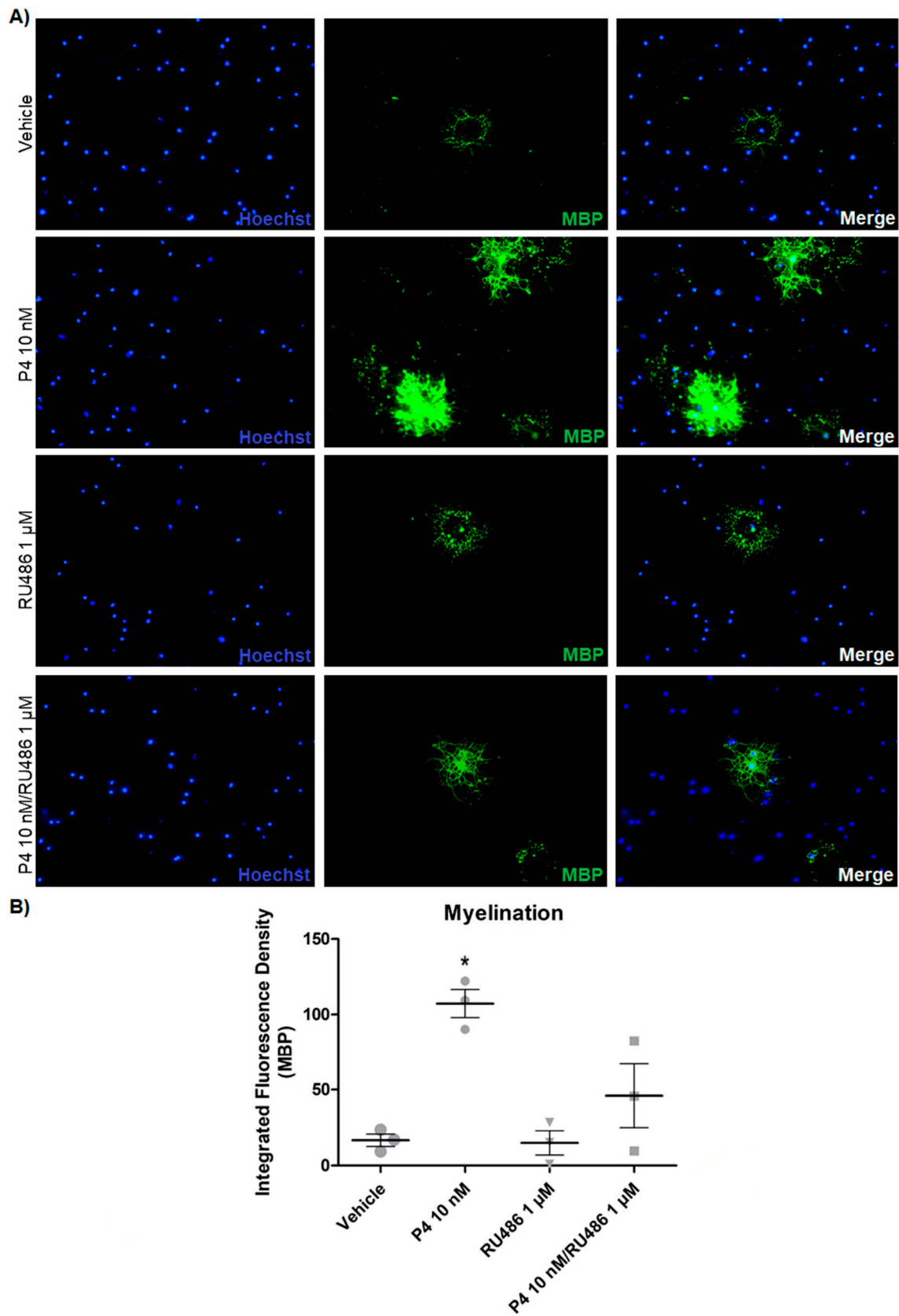


Figure 4. Progesterone increases the potential of myelination of differentiated OPC. **(A)** MBP immunofluorescence in OPC cultured without growth factors and treated for 3 days with P4 (10 nM), RU486 (1 μM), P4 (10 nM) and RU486 (1 μM), and vehicle (DMSO 0.01%). **(B)** MBP expression measured as a fluorescence density. Results are expressed as the mean ± S.E.M. $n = 3$; * $p < 0.05$ vs. vehicle and RU486.

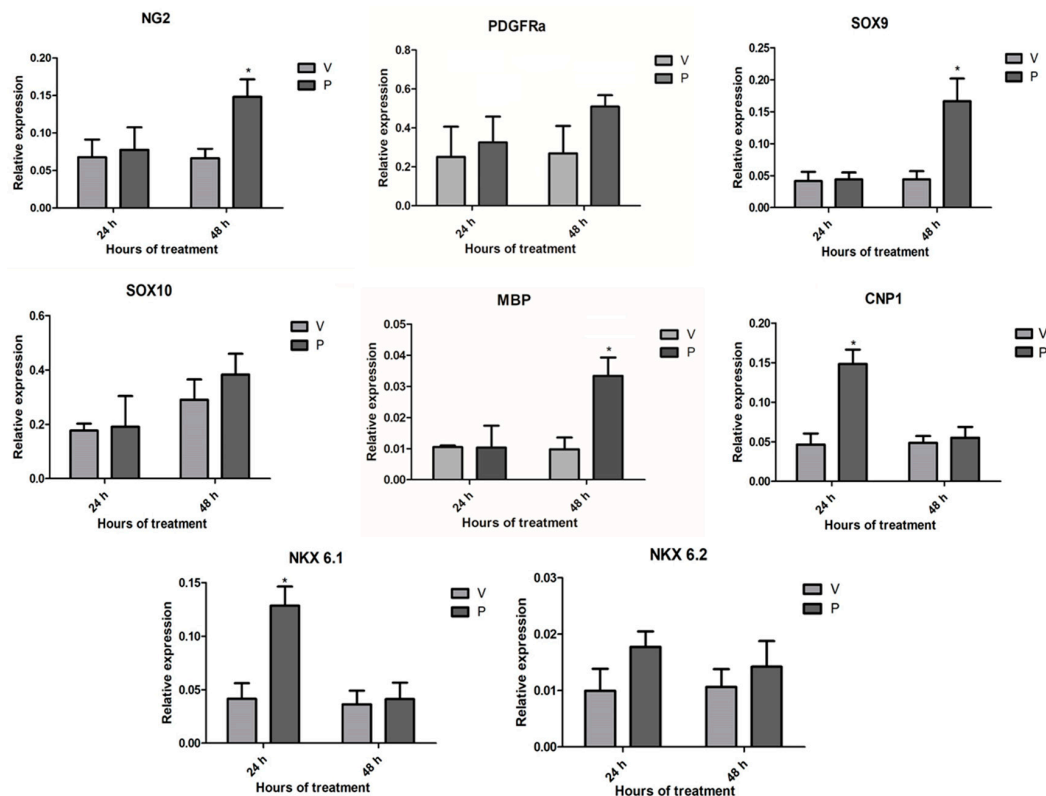


Figure 5. Progesterone upregulates the expression of oligodendroglial genes. The graphs show the relative gene expression (normalized to the 18S gene expression) of the NG2, PDGFR, SOX9, SOX10, MBP, 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP1), NKX 6.1, and NKX 6.2 genes obtained by RT-qPCR after treating OPC with P4 (10 nM) and vehicle (DMSO 0.01%) for 24 and 48 h. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. $n = 3$; * $p < 0.05$ vs. vehicle.

3.4. The Mouse Embryonic OPC Express the PR-A and PR-B Isoforms and the Oligodendrogenic Actions of Progesterone are Mediated by the PR-B

Because PR expression in embryonic OPC is not yet reported, we first searched in the “Mouse Organogenesis Cell Atlas” (MOCA), using the “Genes” tool (<https://oncoscape.v3.sttrcancer.org/atlas.gs.washington.edu.mouse.ma/landin>) [50], if PR expression in mouse embryonic oligodendroglial cells was spotted by single-cell RNA sequencing (RNA-seq) during the assembly of this database. According to this database, radial glial cells, OPC, and premature oligodendrocytes from whole mouse embryos between 9.5 and 13.5 days of gestation express the PR; moreover, the expression of the PR increases when radial glial cells are specified towards OPC, and then decreases when they differentiate into oligodendrocytes (Figure 6A), suggesting a particular role of the PR in OPC. We detected the expression of PR-A and PR-B isoforms in the cultured embryonic OPC by Western blot, noticing that PR-B is expressed in a higher proportion than PR-A (Figure 6B). Given that PR-B is a more potent transcription activator than PR-A, and because it was observed that the effects of progesterone in the proliferation and differentiation of the OPC were mediated by a genomic mechanism, the expression of PR-B was silenced by siRNA transfection in order to study the role of this isoform in the mouse OPC. PR-B silencing was corroborated by RT-qPCR, observing that the transfection with the PR-B siRNA diminished PR-B expression by more than 60% as compared with the control siRNA (Figure 6C).

Twenty-four hours after transfection, the OPC were treated for 3 days with progesterone, and then cell proliferation and differentiation were determined by immunofluorescence. We noticed a significant lower percentage of NG2/Ki67 and O4-positive cells in the PR-B siRNA-transfected cells as compared with the control siRNA-transfected cells (Figure 7). This indicates that the oligodendrogenic effects of progesterone are mediated by PR-B.

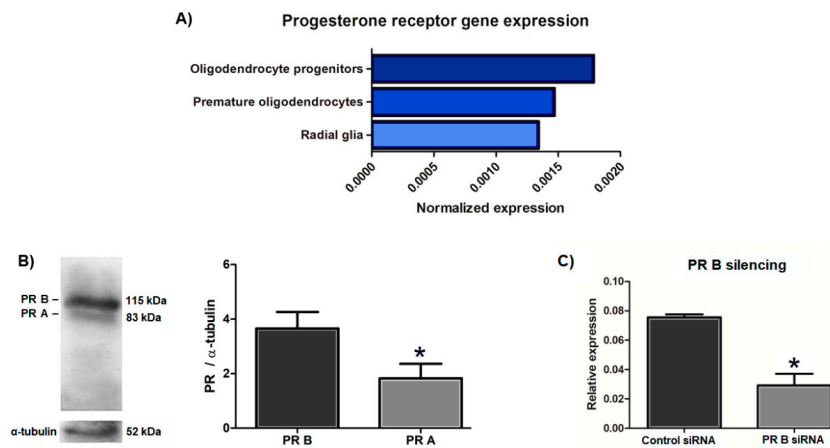


Figure 6. The OPC from the mouse embryonic spinal cord express both progesterone receptor (PR) isoforms. (A) PR gene expression analyzed by single cell RNA-seq in radial glial cells, oligodendrocyte progenitors, and premature oligodendrocytes from E9.5-E13.5 whole mouse embryos obtained from the “Mouse Organogenesis Cell Atlas” [50]. (B) PR-A and PR-B expression detected by Western blot in the cultured OPC derived from the spinal cord of E14.5 mouse embryos. (C) PR-B silencing by siRNA transfection in the cultured OPC corroborated by RT-qPCR. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. $n = 3$; * $p < 0.05$ vs. PR-B; * $p < 0.05$ vs. control siRNA.

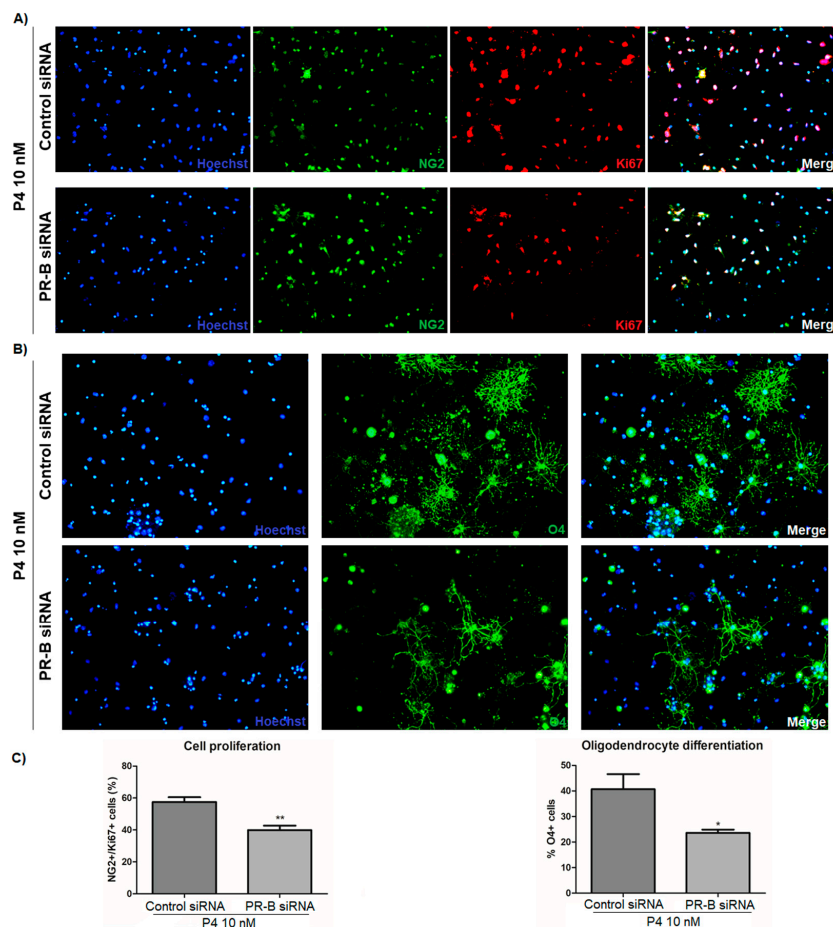


Figure 7. The silencing of PR-B blocks the oligodendrogenic effects of progesterone. (A) NG2/Ki67 and (B) O4 immunofluorescence in OPC transfected with a control siRNA or with a PR-B siRNA and treated for 3 days with P4 (10 nM). (C) Graphs derived from the percentage of NG2/Ki67 and O4-positive cells observed in the immunofluorescence. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. $n = 3$; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control siRNA.

4. Discussion

Progesterone functions extend beyond the regulation of female reproduction. In fact, because it is synthesized in the CNS of both males and females, it is referred as a neurosteroid and regulates several neural functions including neuroprotection, neuromodulation, neurogenesis, neuronal plasticity, and nerve remyelination [22,23]. Moreover, progesterone also participates in critical development events such as neuronal differentiation, neural circuit organization, brain sex differentiation, and oligodendrogenesis [51].

The effects of progesterone on nerve myelination were first documented in peripheral nerves, where progesterone promotes the remyelination after traumatic injury [52]. These observations were later expanded to the CNS. It has been reported that progesterone has neuroprotective and promyelinating effects on adult individuals with spinal cord injury [42,43], leading to the proposal of the therapeutic use of progesterone for the treatment of demyelinating lesions [43,53]. Regarding the developmental oligodendrogenesis, it is documented that OPC from the brain of newborn rats synthesizes progesterone [41], and that this hormone also promotes, through the activation of its PR, the proliferation and differentiation of the OPC, while also increasing the developmental nerve myelination, as has been observed in the cerebellum of postnatal rodents [39,40]. Nonetheless, it is unknown if progesterone also promotes the proliferation and differentiation of OPC during early oligodendrogenesis in embryonic life, as well as the PR isoform involved in progesterone effects, which is relevant in order to understand the mechanisms that underlie embryonic oligodendrogenesis, and thus develop more efficient therapies to alleviate demyelinating diseases and lesions in postnatal life. Therefore, we studied the effects of progesterone and the role of PR-B isoform in OPC primary cultures derived from the spinal cord of E14.5 mouse embryos.

The developing mouse spinal cord is an accessible embryonic tissue that contains diverse CNS progenitor cells and a reliable study model because the spatial and temporal events underlying the neurogenesis and gliogenesis in this tissue are well defined [54,55]. The specification of the NSC into OPC during mouse neurodevelopment occurs on the embryonic day 12.5 [4]; in addition, it has been reported that NSC isolated from the mouse embryonic spinal cord are more oligogenic than NSC isolated from the developing brain [56]. Thus, we were able to obtain a large amount of highly pure OPC from neurosphere cultures formed primarily of Sox2-positive NSC isolated from the spinal cord of E14.5 mouse embryos. In this study, we showed that progesterone increased the rate of proliferation of the cultured embryonic OPC and promoted its differentiation into oligodendrocytes as previously reported in OPC from the cerebellum of postnatal rodents [39,40]. In addition to this, we observed that progesterone enhanced the potential of myelination of the embryonic OPC, as seen by an increase in MBP protein expression. We were able to observe this latter expression because it has long been known that mouse oligodendrocytes do not need the presence of active neurons to start expressing myelin markers *in vitro* [57]. The oligodendrogenic effects of progesterone were mediated by the PR because PR agonist R5020 exerted similar effects to those of progesterone, whereas the PR antagonist RU486 blocked them. Likewise, the mPR agonist Org OD 02-0 did not induce any effect. This suggests that progesterone participates in the oligodendrogenesis during prenatal development through a genomic mechanism of action. The genomic effects of progesterone in the OPC were confirmed by evaluating the expression of various genes associated with the specification and maintenance of the oligodendroglial phenotype; specifically, we observed that progesterone increased the expression of Nkx 6.1 and Cnp1 genes 24 h after exposure, whereas the expression of NG2, Sox9, and MBP genes was augmented at 48 h without inducing changes in the expression of Nkx 6.1 and Cnp1, therefore suggesting that progesterone regulates the expression of oligodendroglial genes in a time dependent-manner. Previously, it was reported that progesterone upregulates the expression of the oligodendroglial genes Olig1/2, Nkx 2.2, MBP, myelin proteolipid protein (PLP), and myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in adult rats with complete spinal cord injury, whereas it also increases the number of myelinating oligodendrocytes by promoting the proliferation of the adult remnant OPC and its subsequent differentiation in these same animals [42]. In a similar study, it was also shown that progesterone upregulates the expression of MBP, PLP, Nkx 2.2, and Olig1 in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. This upregulation

was associated with the observed neuroprotective and remyelinating effects of progesterone in these animals [58]. These studies, together with ours, demonstrate that the role of progesterone in the OPC and myelination process during the development or demyelinating lesions is mediated by the upregulation of key oligodendroglial genes. Furthermore, the fact that OPC from the spinal cord of adult individuals are responsive to progesterone, especially during injury, indicates that these cells retain their sensitivity to this hormone since the prenatal state, and it then expands to adulthood.

Previously, the total expression of the PR has been detected in cultured astrocytes and oligodendrocytes isolated from the brain of newborn rats [59], and additionally the expression of the PR-B has been observed by immunohistochemistry in neurons and glial cells of the rat spinal cord with no significant sex differences [60]. In this work, we were able to detect the expression of both PR isoforms in the embryonic OPC by Western blot, with the particular observation that PR-B expression is higher than that of PR-A. Additionally, we examined in the MOCA database [50] the expression of the PR in oligodendroglial cells directly derived from E9.5-E13.5 whole mouse embryos. According to this database, the expression of the PR increases when radial glial cells are specified towards OPC, and then decreases when they differentiate into oligodendrocytes, indicating that PR plays a key role during the OPC stage. Therefore, we demonstrate that early OPC from the embryonic spinal cord of mouse constitutively express PR. Furthermore, because we noticed that the PR-B is more abundant in the OPC, and it is a more potent transcription activator than PR-A, we silenced its expression. Then, we observed that the effects of progesterone on OPC proliferation, differentiation, and myelination potential were significantly blocked, indicating that PR-B is the active mediator of progesterone and its effects on oligodendroglial cells. Nevertheless, we do not discard the possibility that the oligodendrogenic effects of progesterone could be synergistically mediated by both PR isoforms; for example, as transcriptional repressor, PR-A could inhibit the expression of genes that in turn repress the expression of the oligodendroglial genes regulated by PR-B. Thus, this issue deserves to be addressed in future studies.

Our results suggest that progesterone should participate in prenatal oligodendrogenesis. This is plausible because the expression of PR and the expression and activity of the enzymes required for progesterone synthesis have been found from the early embryo ages of the mammalian development in several regions of the developing CNS [61]. Additionally, pregnancy is characterized by an increase in maternal progesterone levels, and there is evidence that progesterone from the maternal circulation enters the embryo/fetal circulation and binds its PR in the developing rat CNS [62]. Remarkably, the levels of progesterone in fetal circulation and in the brain progressively increases throughout pregnancy, especially during late pregnancy [63], coinciding with the time in which the CNS undergoes critical processes such as neural circuits organization and myelination [64].

As mentioned above, the therapeutic use of progesterone to treat CNS injuries and demyelinating lesions has been proposed [43,53], and clinical studies have already been conducted [65]. However, phase 3 clinical trials in patients with traumatic brain injury have failed to replicate the positive outcomes observed in phase 2 trials and in animal models [66]. It is relevant to mention that these clinical trials, as well those previously performed in animal models, did not contemplate the expression or specific function of PR isoforms. Here, we showed that PR-B is predominantly expressed in the embryonic OPC and that it mediates the oligodendrogenic effects of progesterone. These results suggest that the expression and regulation of PR isoforms should determine the oligodendrogenic and promyelinating actions of progesterone in a tissue and developmentally dependent manner.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/960/s1>: Figure S1: OPC cultures generated from Sox2-positive neurospheres derived from the spinal cord of E14.5 mouse embryos. Figure S2: Effects of the PR agonist R5020 and the membrane receptors to progesterone (mPR) agonist Org OD 02-0 on OPC proliferation. Figure S3: Effects of the PR agonist R5020 and the mPR agonist Org OD 02-0 on OPC differentiation. Figure S4: Effects of the PR agonist R5020 and the mPR agonist Org OD 02-0 in the potential of myelination. Figure S5: In silico analysis to identify potential progesterone response elements (PRE) sites in the promoter sequences of NG2, SOX9, NKX 6.1, CNP1, and MBP genes.

Author Contributions: J.C.G.-O. and A.D.M.-M. contributed to carrying out the experiments and data analysis. J.C.G.-O. and I.C.-A. conceived and managed all experiments. J.C.G.-O. and I.C.-A. contributed to writing the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by “Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica” (PAPIIT), project IN213117, DGAPA-UNAM, Mexico.

Acknowledgments: We would like to thank Marisol De La Fuente-Granada and Aliesha González-Arenas (Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México) for the facilitation of the animals used in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kinney, H.C.; Volpe, J.J. *Volpe's Neurology of the Newborn*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 176–188.
2. Downes, N.J.; Mullins, P. The Development of Myelin in the Brain of the Juvenile Rat. *Toxicol. Pathol.* **2013**, *42*, 913–922. [[CrossRef](#)]
3. Bergles, D.E.; Richardson, W.D. Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *8*, a020453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Rowitch, D.H.; Kriegstein, A.R. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* **2010**, *468*, 214–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sim, F.J.; McClain, C.R.; Schanz, S.J.; Protack, T.L.; Windrem, M.S.; Goldman, S. CD140a identifies a population of highly myelinogenic, migration-competent and efficiently engrafting human oligodendrocyte progenitor cells. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 934–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Orentas, D.M.; Hayes, J.; Dyer, K.L.; Miller, R.H. Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* **1999**, *126*, 2419–2429. [[PubMed](#)]
7. Goldman, S.; Kuypers, N.J. How to make an oligodendrocyte. *Development* **2015**, *142*, 3983–3995. [[CrossRef](#)]
8. Vallstedt, A.; Klos, J.M.; Ericson, J. Multiple Dorsoventral Origins of Oligodendrocyte Generation in the Spinal Cord and Hindbrain. *Neuron* **2005**, *45*, 55–67. [[CrossRef](#)]
9. Finsch, M.; Stolt, C.C.; Lommes, P.; Wegner, M. Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor α expression. *Development* **2008**, *135*, 637–646. [[CrossRef](#)]
10. Reiprich, S.; Cantone, M.; Weider, M.; Baroti, T.; Wittstatt, J.; Schmitt, C.; Küspert, M.; Vera, J.; Wegner, M. Transcription factor Sox10 regulates oligodendroglial Sox9 levels via microRNAs. *Glia* **2017**, *65*, 1089–1102. [[CrossRef](#)]
11. Tsai, H.-H.; Niu, J.; Munji, R.; Davalos, D.; Chang, J.; Zhang, J.; Tien, A.-C.; Kuo, C.J.; Chan, J.R.; Daneman, R.; et al. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* **2016**, *351*, 379–384. [[CrossRef](#)]
12. Baron, W.; Metz, B.; Bansal, R.; Hoekstra, D.; De Vries, H. PDGF and FGF-2 Signaling in Oligodendrocyte Progenitor Cells: Regulation of Proliferation and Differentiation by Multiple Intracellular Signaling Pathways. *Mol. Cell. Neurosci.* **2000**, *15*, 314–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sarliève, L.L.; Rodriguez-Pena, A.; Langley, K. Expression of thyroid hormone receptor isoforms in the oligodendrocyte lineage. *Neurochem. Res.* **2004**, *29*, 903–922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lee, J.Y.; Petratos, S. Thyroid Hormone Signaling in Oligodendrocytes: From Extracellular Transport to Intracellular Signal. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 6568–6583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Barres, B.; Burne, J.; Höltmann, B.; Thoenen, H.; Sendtner, M.; Raff, M. Ciliary Neurotrophic Factor Enhances the Rate of Oligodendrocyte Generation. *Mol. Cell. Neurosci.* **1996**, *8*, 146–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Buttery, P.C. Laminin-2/integrin interactions enhance myelin membrane formation by oligodendrocytes. *Mol. Cell. Neurosci.* **1999**, *14*, 199–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lourenço, T.M.P.; De Faria, J.P.; Bippes, C.A.; Maia, J.; Da Silva, J.L.; Relvas, J.B.; Grãos, M. Modulation of oligodendrocyte differentiation and maturation by combined biochemical and mechanical cues. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 6. [[CrossRef](#)]
18. Snaidero, N.; Simons, M. Myelination at a glance. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 2999–3004. [[CrossRef](#)]

19. Labombarda, F.; Jure, I.; De Nicola, A.F. Progesterone effects on the oligodendrocyte lineage: All roads lead to the progesterone receptor. *Neural Regen. Res.* **2019**, *14*, 2029–2034. [[CrossRef](#)]
20. Morel, Y.; Roucher, F.; Plotton, I.; Goursaud, C.; Tardy, V.; Mallet, D. Evolution of steroids during pregnancy: Maternal, placental and fetal synthesis. *Ann. d'Endocrinol.* **2016**, *77*, 82–89. [[CrossRef](#)]
21. Rego, J.L.D.; Seong, J.Y.; Burel, D.; Leprince, J.; Luu-The, V.; Tsutsui, K.; Tonon, M.-C.; Pelletier, G.; Vaudry, H. Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front. Neuroendocr.* **2009**, *30*, 259–301. [[CrossRef](#)]
22. Snyder, A.M.; Hull, E.M. Perinatal progesterone affects learning in rats. *Psychoneuroendocrinology* **1980**, *5*, 113–119. [[CrossRef](#)]
23. Schumacher, M.; Mattern, C.; Ghoumari, A.; Oudinet, J.; Liere, P.; Labombarda, F.; Sitruk-Ware, R.; De Nicola, A.; Guennoun, R. Revisiting the roles of progesterone and allopregnanolone in the nervous system: Resurgence of the progesterone receptors. *Prog. Neurobiol.* **2014**, *113*, 6–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Liu, T.; Ogle, T.F. Signal transducer and activator of transcription 3 is expressed in the decidualized mesometrium of pregnancy and associates with the progesterone receptor through protein-protein interactions. *Boil. Reprod.* **2002**, *67*, 114–118. [[CrossRef](#)]
25. Lieberman, B.A.; Bona, B.J.; Edwards, D.P.; Nordeen, S.K. The constitution of a progesterone response element. *Mol. Endocrinol.* **1993**, *7*, 515–527.
26. Valadez-Cosmes, P.; Vázquez-Martínez, E.R.; Cerbón, M.; Camacho-Arroyo, I. Membrane progesterone receptors in reproduction and cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2016**, *434*, 166–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Boonyaratanakornkit, V.; Bi, Y.; Rudd, M.; Edwards, D. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids* **2008**, *73*, 922–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Jacobsen, B.; Horwitz, K.B. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2011**, *357*, 18–29. [[CrossRef](#)]
29. Kastner, P.; Krust, A.; Turcotte, B.; Stropp, U.; Tora, L.; Gronemeyer, H.; Chambon, P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* **1990**, *9*, 1603–1614. [[CrossRef](#)]
30. Mesiano, S.; Wang, Y.; Norwitz, E.R. Progesterone receptors in the human pregnancy uterus: Do they hold the key to birth timing? *Reprod. Sci.* **2011**, *18*, 6–19. [[CrossRef](#)]
31. Labombarda, F.; González, S.L.; Deniselle, M.C.G.; Guennoun, R.; Schumacher, M.; De Nicola, A. Cellular Basis for Progesterone Neuroprotection in the Injured Spinal Cord. *J. Neurotrauma* **2002**, *19*, 343–355. [[CrossRef](#)]
32. Guerra-Araiza, C.; Villamar-Cruz, O.; González-Arenas, A.; Chavira, R.; Camacho-Arroyo, I. Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J. Neuroendocrinol.* **2003**, *15*, 984–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Camacho-Arroyo, I.; Hansberg-Pastor, V.; Gutiérrez-Rodríguez, A.; Chávez-Jiménez, J.; González-Morán, M.G. Expression of sex hormone receptors in the brain of male and female newly hatched chicks. *Anim. Reprod. Sci.* **2018**, *188*, 123–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Camacho-Arroyo, I.; Guerra-Araiza, C.; Cerbón, M.A. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *NeuroReport* **1998**, *9*, 3993–3996. [[CrossRef](#)]
35. Bellance, C.; Khan, J.A.; Meduri, G.; Guiochon-Mantel, A.; Lombès, M.; Loosfelt, H. Progesterone receptor isoforms PRA and PRB differentially contribute to breast cancer cell migration through interaction with focal adhesion kinase complexes. *Mol. Boil. Cell* **2013**, *24*, 1363–1374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. A Lamb, C.; Fabris, V.T.; Jacobsen, B.M.; Molinolo, A.; Lanari, C. Biological and clinical impact of imbalanced progesterone receptor isoform ratios in breast cancer. *Endocr.-Relat. Cancer* **2018**, *25*, R605–R624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ilicic, M.; Zakar, T.; Paul, J. Modulation of Progesterone Receptor Isoform Expression in Pregnant Human Myometrium. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 4589214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Richer, J.K.; Jacobsen, B.; Manning, N.G.; Abel, M.G.; Wolf, D.M.; Horwitz, K.B. Differential Gene Regulation by the Two Progesterone Receptor Isoforms in Human Breast Cancer Cells. *J. Boil. Chem.* **2001**, *277*, 5209–5218. [[CrossRef](#)]
39. Ghoumari, A.M.; Baulieu, E.; Schumacher, M. Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience* **2005**, *135*, 47–58. [[CrossRef](#)]

40. Ghomari, A.M.; Ibanez, C.; El-Etr, M.; Leclerc, P.; Eychenne, B.; O'Malley, B.W.; Baulieu, E.-E.; Schumacher, M. Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *J. Neurochem.* **2003**, *86*, 848–859. [[CrossRef](#)]
41. Gago, N.; Akwa, Y.; Sananès, N.; Guennoun, R.; Baulieu, E.E.; El-Etr, M.; Schumacher, M. Progesterone and the oligodendroglial lineage: Stage-dependent biosynthesis and metabolism. *Glia* **2001**, *36*, 295–308. [[CrossRef](#)]
42. Labombarda, F.; González, S.L.; Lima, A.; Roig, P.; Guennoun, R.; Schumacher, M.; De Nicola, A. Effects of progesterone on oligodendrocyte progenitors, oligodendrocyte transcription factors, and myelin proteins following spinal cord injury. *Glia* **2009**, *57*, 884–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jure, I.; De Nicola, A.F.; Labombarda, F. Progesterone effects on oligodendrocyte differentiation in injured spinal cord. *Brain Res.* **2019**, *1708*, 36–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Khan, A.; Fornes, O.; Stigliani, A.; Gheorghe, M.; Castro-Mondragon, J.A.; Van Der Lee, R.; Bessy, A.; Chèneby, J.; Kulkarni, S.R.; Tan, G.; et al. JASPAR 2018: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles and its web framework. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D1284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wingender, E.; Schoeps, T.; Haubrock, M.; Krull, M.; Dönitz, J. TFClass: Expanding the classification of human transcription factors to their mammalian orthologs. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *46*, D343–D347. [[CrossRef](#)]
46. Podvinec, M.; Kaufmann, M.R.; Handschin, C.; Meyer, U.A. NUBIScan, an in silico approach for prediction of nuclear receptor response elements. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 1269–1279. [[CrossRef](#)]
47. Ahlenius, H.; Kokaia, Z. Isolation and Generation of Neurosphere Cultures from Embryonic and Adult Mouse Brain. In *Mouse Cell Culture*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2010; pp. 241–252.
48. Pedraza, C.E.; Monk, R.; Lei, J.; Hao, Q.; Macklin, W.B. Production, characterization, and efficient transfection of highly pure oligodendrocyte precursor cultures from mouse embryonic neural progenitors. *Glia* **2008**, *56*, 1339–1352. [[CrossRef](#)]
49. Pedraza, C.E.; Taylor, C.; Pereira, A.; Seng, M.; Tham, C.-S.; Izrael, M.; Webb, M. Induction of Oligodendrocyte Differentiation and In Vitro Myelination by Inhibition of Rho-Associated Kinase. *ASN Neuro* **2014**, *6*. [[CrossRef](#)]
50. Cao, J.; Spielmann, M.; Qiu, X.; Huang, X.; Ibrahim, D.M.; Hill, A.J.; Zhang, F.; Mundlos, S.; Christiansen, L.; Steemers, F.J.; et al. The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature* **2019**, *566*, 496–502. [[CrossRef](#)]
51. González-Orozco, J.C.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone Actions During Central Nervous System Development. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *13*, 503. [[CrossRef](#)]
52. Schumacher, M.; Guennoun, R.; Mercier, G.; Désarnaud, F.; Lacor, P.; Benavides, J.; Ferzaz, B.; Robert, F.; Baulieu, E.E. Progesterone synthesis and myelin formation in peripheral nerves. *Brain Res. Rev.* **2001**, *37*, 343–359. [[CrossRef](#)]
53. Labombarda, F.; Garcia-Ovejero, D. Give progesterone a chance. *Neural Regen. Res.* **2014**, *9*, 1422–1424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Tanabe, Y.; Jessell, T.M. Diversity and Pattern in the Developing Spinal Cord. *Science* **1996**, *274*, 1115–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Glasgow, S.M.; Carlson, J.C.; Zhu, W.; Chaboub, L.S.; Kang, P.; Lee, H.K.; Clovis, Y.M.; E Lozzi, B.; McEvelly, R.J.; Rosenfeld, M.G.; et al. Glia-specific enhancers and chromatin structure regulate NFIA expression and glioma tumorigenesis. *Nat. Neurosci.* **2017**, *20*, 1520–1528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kelly, T.K.; Karsten, S.L.; Geschwind, D.H.; Kornblum, H. Cell Lineage and Regional Identity of Cultured Spinal Cord Neural Stem Cells and Comparison to Brain-Derived Neural Stem Cells. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4213. [[CrossRef](#)]
57. Temple, S.; Raff, M.C. Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: Evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* **1986**, *44*, 773–779. [[CrossRef](#)]
58. Garay, L.; Deniselle, M.G.; Brocca, M.E.; Lima, A.; Roig, P.; De Nicola, A. Progesterone down-regulates spinal cord inflammatory mediators and increases myelination in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* **2012**, *226*, 40–50. [[CrossRef](#)]
59. Jung-Testas, I.; Renoir, J.; Gasc, J.; Baulieu, E. Estrogen-inducible progesterone receptor in primary cultures of rat glial cells. *Exp. Cell Res.* **1991**, *193*, 12–19. [[CrossRef](#)]

60. Labombarda, F.; Guennoun, R.; Gonzalez, S.; Roig, P.; Lima, A.; Schumacher, M.; De Nicola, A.F. Immunocytochemical evidence for a progesterone receptor in neurons and glial cells of the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* **2000**, *288*, 29–32. [[CrossRef](#)]
61. Compagnone, N.A.; Mellon, S.H. Neurosteroids: Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators. *Front. Neuroendocr.* **2000**, *21*, 1–56. [[CrossRef](#)]
62. Wagner, C.K.; Quadros-Mennella, P. Progesterone from maternal circulation binds to progestin receptors in fetal brain. *Dev. Neurobiol.* **2016**, *77*, 767–774. [[CrossRef](#)]
63. Nguyen, P.N.; Billiards, S.S.; Walker, D.W.; Hirst, J.J. Changes in 5 α -pregnane steroids and neurosteroidogenic enzyme expression in the perinatal sheep. *Pediatr. Res.* **2003**, *53*, 956–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Stiles, J.; Jernigan, T.L. The Basics of Brain Development. *Neuropsychol. Rev.* **2010**, *20*, 327–348. [[CrossRef](#)]
65. Shakeri, M.; Boustani, M.R.; Pak, N.; Panahi, F.; Salehpour, F.; Lotfinia, I.; Meshkini, A.; Daghighi, S.; Vahedi, P.; Khani, M.; et al. Effect of progesterone administration on prognosis of patients with diffuse axonal injury due to severe head trauma. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2013**, *115*, 2019–2022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Schumacher, M.; Denier, C.; Oudinet, J.-P.; Adams, D.; Guennoun, R. Progesterone neuroprotection: The background of clinical trial failure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *160*, 53–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Progesterone through progesterone receptor B isoform promotes rodent embryonic oligodendrogenesis

-Supplementary figures-

Juan Carlos González-Orozco, Aylin Del Moral-Morales, Ignacio Camacho-Arroyo*.

Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México

*Corresponding author:

Dr. Ignacio Camacho-Arroyo,
Unidad de Investigación en Reproducción Humana,
Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Ciudad de México, México;
Tel: (+52) 55 5520 9900/5622 3732;
E-mail address: camachoarroyo@gmail.com

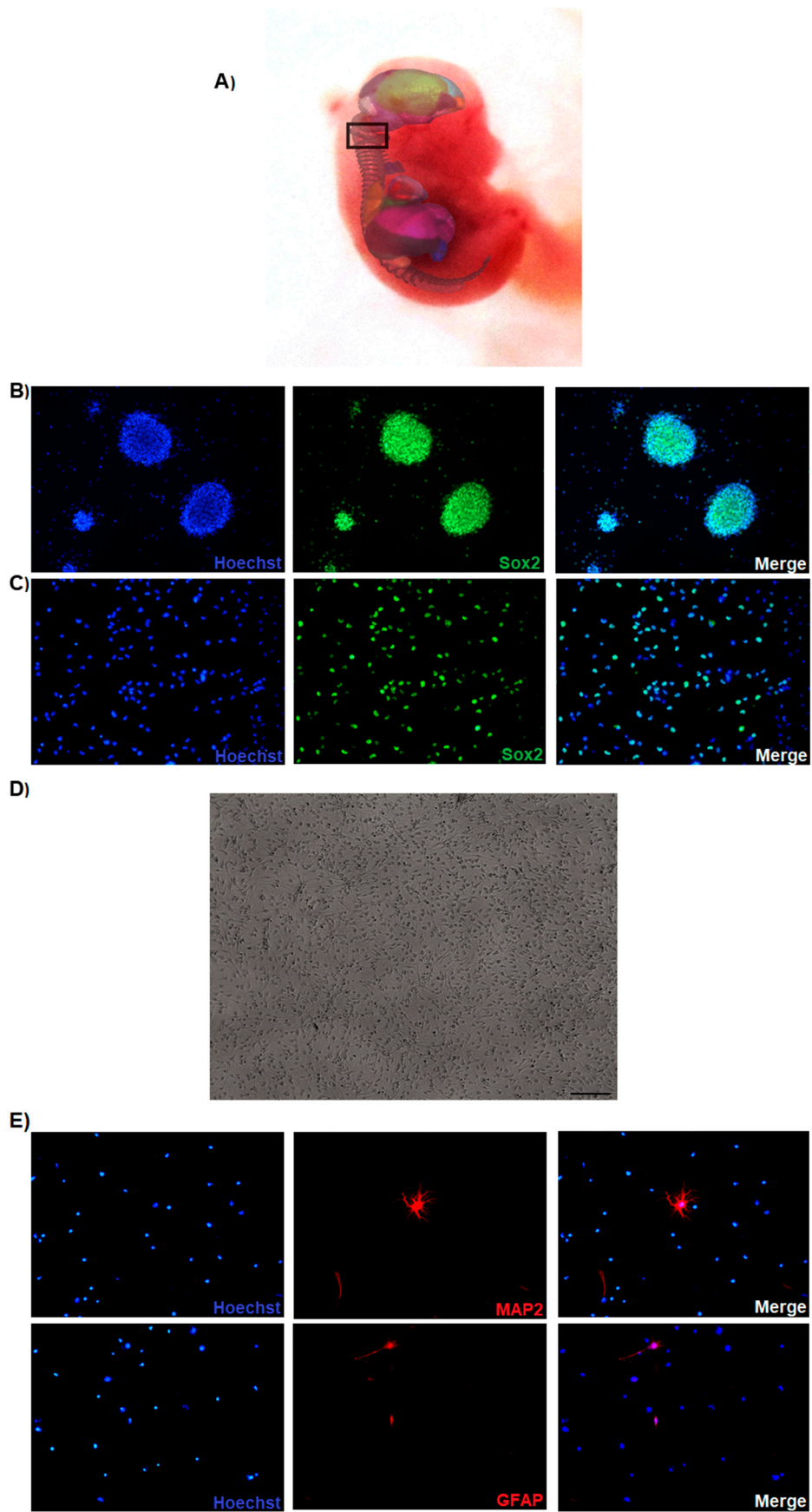


Figure S1. OPC cultures derived from the spinal cord of E14.5 mouse embryos. A) E14.5 mouse embryo; the marked box shows the tissue area that was dissected. B) The primary neurosphere

cultures generated from the mouse embryonic spinal cord express the NSC marker Sox2. C) Sox2 positive cells disaggregated from the neurospheres. D) Highly proliferative cells with bipolar morphology cultured in adherent conditions with FGF2 and PDGF. E) MAP2 and GFAP immunofluorescence show a low number of neurons and astrocytes respectively in the cultures.

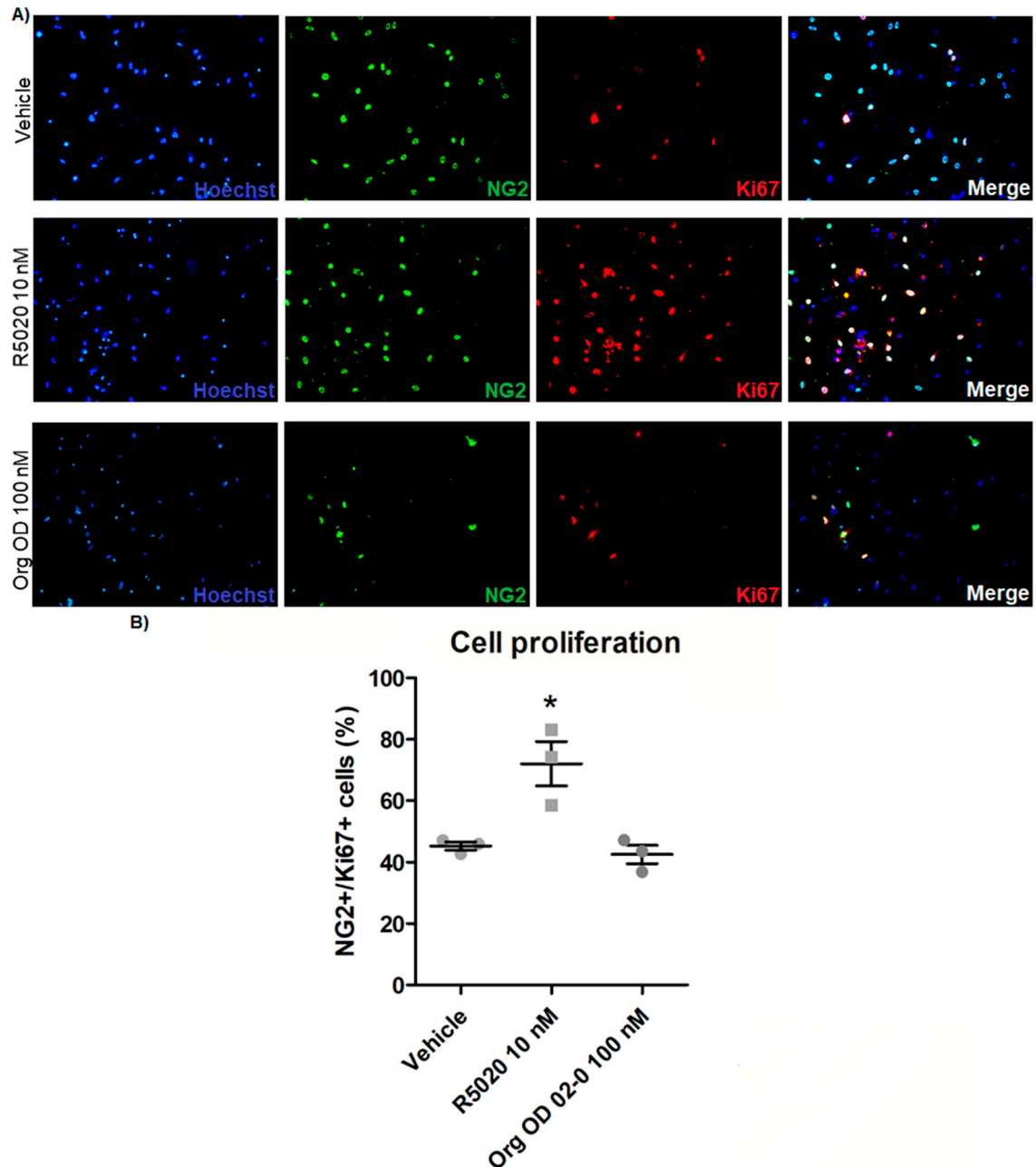


Figure S2. Progesterone increases embryonic OPC proliferation through PR. A) NG2/Ki67 immunostaining in OPC cultured with growth factors and treated for 3 days with the PR agonist R5020 (10 nM), the mPRs agonist Org OD 02-0 (100 nM) and vehicle (DMSO 0.01%). B) Graph derived from the percentage of NG2/Ki67 positive cells observed in the immunofluorescence experiments. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs the rest of the groups.

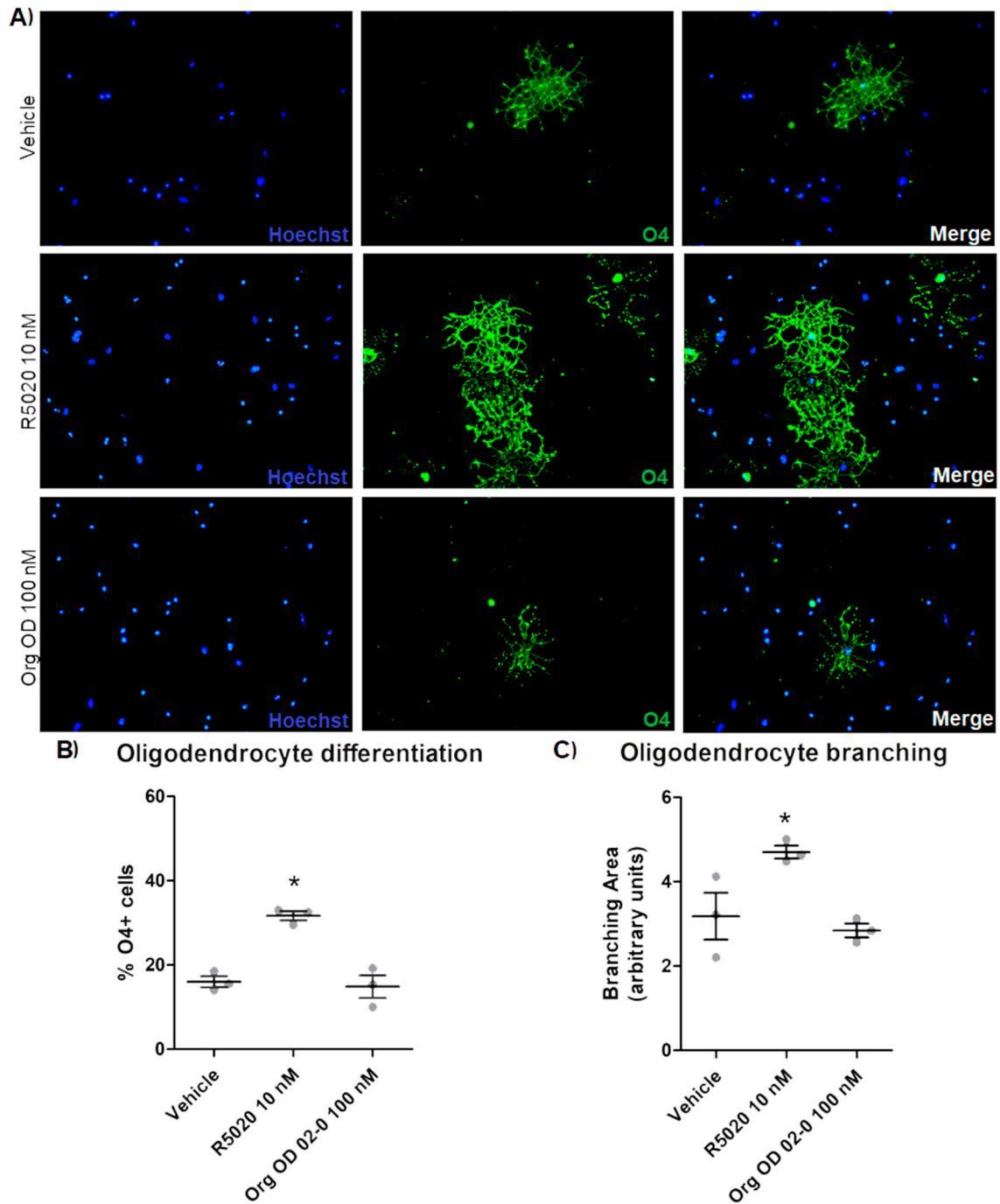
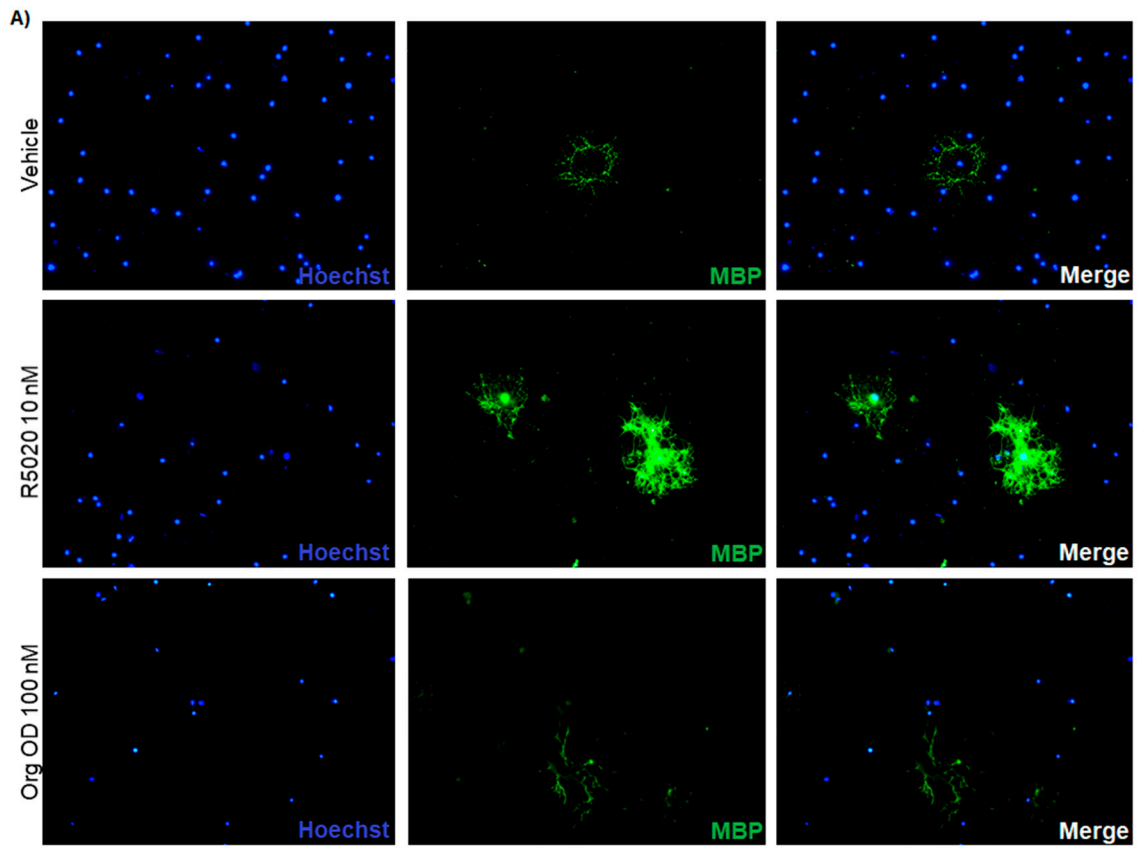


Figure S3. Progesterone promotes the oligodendrocyte differentiation through PR. A) O4 immunofluorescence in OPC cultured without growth factors and treated for 3 days with the PR agonist R5020 (10 nM), the mPRs agonist Org OD 02-0 (100 nM) and vehicle (DMSO 0.01%). B) Percentage of O4 positive cells observed in the immunofluorescence experiments. C) Cellular branching measured in O4 positive cells. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs the rest of the groups.



B)

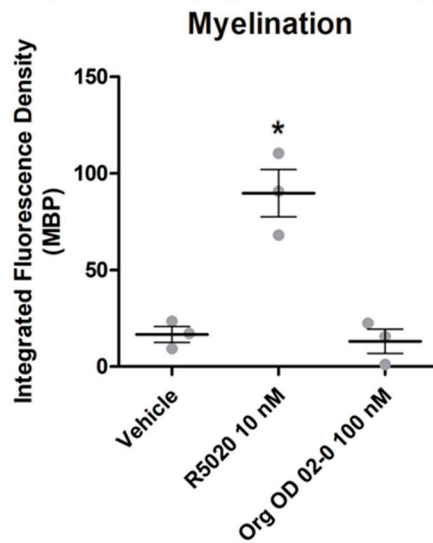


Figure S4. Progesterone increases the potential of myelination through PR. A) MBP immunofluorescence in OPC cultured without growth factors and treated for 3 days with the PR agonist R5020 (10 nM), the mPRs agonist Org OD 02-0 (100 nM) and vehicle (DMSO 0.01%). B) MBP expression measured as a fluorescence density. Results are expressed as the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$ vs the rest of the groups.

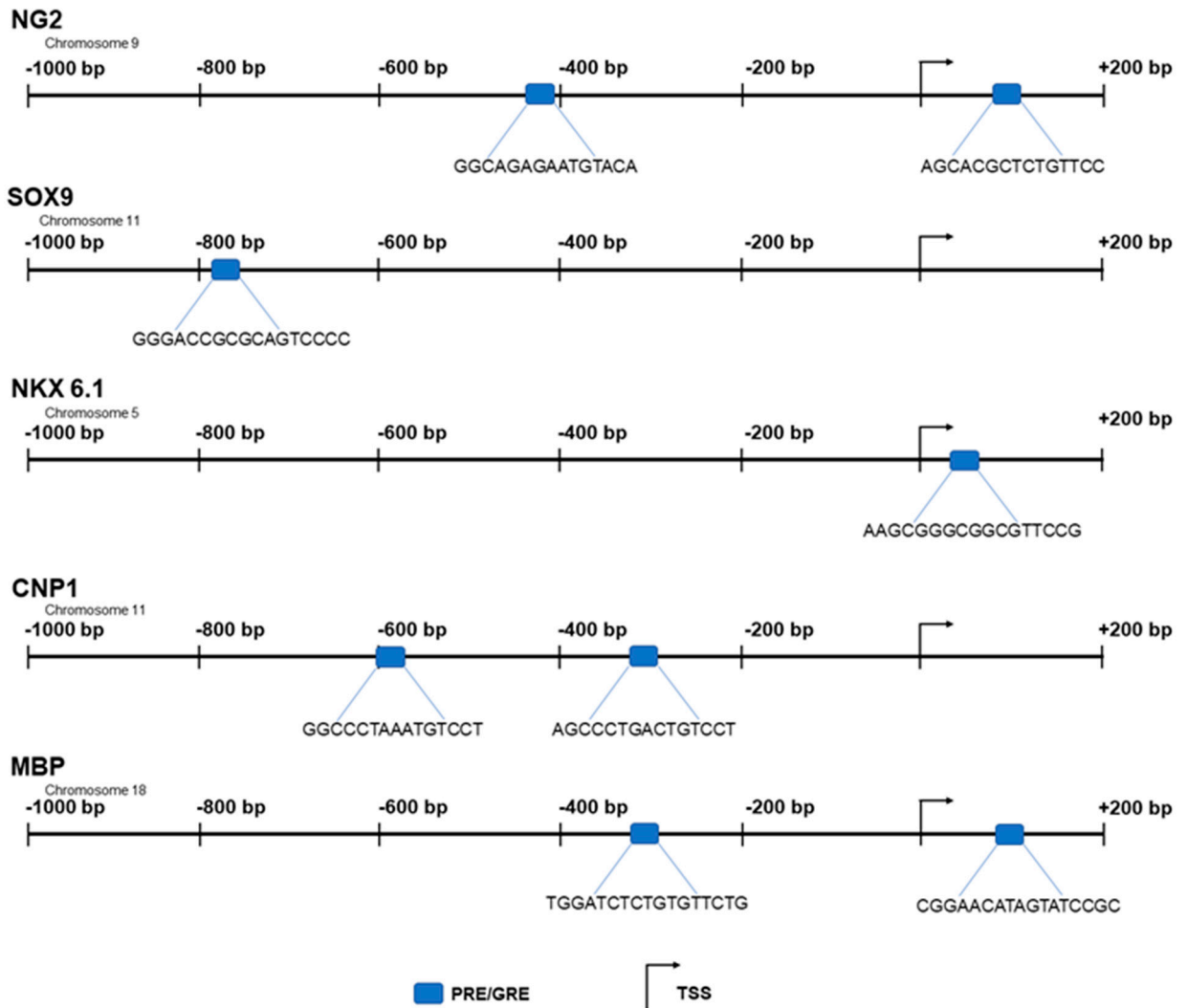


Figure S5. In silico analysis to identify potential PRE sites in the promoter sequences of NG2, SOX9, NKX 6.1, CNP1 and MBP genes. The promoter sequences were obtained from the Eukaryotic Promoter Database (EPD) and analyzed with the algorithms contained in the JASPAR, TRANSFAC and NUBIscan databases. For each sequence, black arrow indicates the transcription start site (TSS). The putative PRE are denoted with a blue square.