

00591
4



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNAM
POSGRADO

DIRECCION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUIMICA

2.972.52

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUIMICAS

REGULACION DE LA EXPRESION DE LAS
ISOFORMAS A Y B DEL RECEPTOR A
PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL DE LA RATA

T E S I S

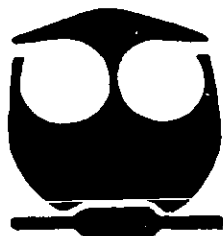
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUIMICAS)

P R E S E N T A :

BIOL. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

DIRECTOR DE TESIS: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO



MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PMDCB/425/2001

BIÓL. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA
Alumno del Doctorado en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 4 de julio del presente, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS), con la réplica de la tesis "Regulación de la expresión de las isoformas A y B del receptor a progesterona en el Sistema Nervioso Central de la rata", dirigida por el Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dra. Patricia Joseph Bravo
VOCAL	Dra. Rocío Salceda Sacanelles
VOCAL	Dra. María Teresa Tusié Luna
VOCAL	Dr. Julio Morán Andrade
SECRETARIO	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
SUPLENTE	Dra. Martha Robles Flores
SUPLENTE	Dra. Martha Menjívar Iraheta

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de julio de 2001.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA


DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS*lgg.



"El principio de la Sabiduría
es el Temor de Jehová".
Prov. 1:7

"Porque Jehová da la Sabiduría,
Y de su boca viene el conocimiento
y la inteligencia".
Prov. 2:6.

"Cuando la Sabiduría entrare en tu corazón
Y la Ciencia fuere grata a tu alma,
La discreción te guardará;
Te preservará la inteligencia,
Para librarte del mal camino..."
Prov. 2:10-12

"El corazón del entendido adquiere
sabiduría; Y el oído de los sabios
busca la ciencia".
Prov. 18:15

"Todo lo puedo en Cristo que me fortalece".
Filipenses 4:13.

A mi esposita Julia:

Por ser mi ayuda idónea, mi complemento, mi compañera; por tu apoyo incondicional en las decisiones que tomo. Por estar conmigo en los momentos de felicidad y de tristeza. Por preocuparte por el buen desarrollo de este trabajo. Por el tiempo que debimos pasar juntos y que sacrificamos por este proyecto. PERO SOBRE TODO POR EL AMOR QUE RECIBO DE TÍ DÍA CON DÍA Y POR TU HERMOSA SONRISA...

iiiiTE AMOiii

A mi hija Andrea:

Por que siempre recibo de ti una sonrisa que me quita el cansancio de un día de trabajo; porque me sorprendes y me maravillas con tus ocurrencias; por la manera en que me demuestras que me quieres. Que Dios te Bendiga!!!

iiiiTE ADORO iiiii

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por el apoyo incondicional que me brindó para el desarrollo de este trabajo, por su asesoría, por darme la oportunidad de trabajar-estudiar, por los jalones de orejas muy a tiempo, por su manera de ver la ciencia, por preocuparse siempre por el nivel y la formación de los integrantes de su grupo de investigación.

Al Dr. Marco A. Cerbón por su ayuda, apoyo, críticas y comentarios tanto para el proyecto, como para mí, los cuales aumentaron la calidad de mi trabajo y mi desarrollo personal.

A la Dra. Patricia Joseph Bravo y a la Dra. Lourdes Massieu Trigo, miembros de mi comité tutorial, que cada semestre dispusieron de su tiempo para mis exámenes y aportaron valiosos comentarios y sugerencias al trabajo, los cuales determinaron el buen rumbo de este proyecto.

Al CONACYT por la beca-crédito para estudios de Doctorado otorgada y los recursos económicos proporcionados al proyecto 35025-N gracias a los cuales pude realizar mi tesis.

Al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM por el apoyo económico de los proyectos 103322 y 103323 que ayudaron la realización de este trabajo.

A los Dres. Patricia Joseph Bravo, Rocío Salceda Sacanelles, María Teresa Tusié Luna, Javier Plasencia de la Parra, Julio Morán Andrade, Martha Robles Flores y Martha Menjívar Hiraeta, por su tiempo y disposición para la revisión de mi tesis y por las sugerencias que enriquecieron este trabajo.

A Lety García por la orientación y ayuda que siempre me brindó en los trámites que realicé durante mis estudios de posgrado.

A la Dra. Ana Salazar por la ayuda en los experimentos de Western blot y el cultivo de las células T47-D y por los reactivos y equipo que nos facilitó en su laboratorio.

A la Dra. Sumiko Morimoto por la ayuda en los radioinmunoanálisis para la determinación de la concentración de hormonas.

Al Dr. Antonio Velásquez Arellano y a la Dra. Cristina Fernández y a sus respectivos grupos de investigación por el asilo brindado durante la huelga.

A los integrantes del laboratorio 202: Dra. Quintero, Adriana, José, Margarita, Francis, Isabel, Paola, Silvia, Lupita, Dr. García Tamayo, así como a las nuevas adquisiciones: Nelly, Lety, Gaby M. y Luciano, por los ratos agradables, los pasteles, comidas y reuniones compartidos en el labo y por que en los momentos difíciles han tenido disposición para resolver los problemas comunes que se presentan entre personas que conviven 8 horas diarias y en hacinamiento.

A Mauricio por su amistad, por su incondicional y desinteresada ayuda cuando la he requerido no solo en el laboratorio sino en asuntos personales, así como por sus puntadas y ocurrencias que hacen más llevadero el tiempo en el trabajo.

A mis compañeras de trabajo (por orden de aparición): Andrea Reyna por ser mi amiga y por echarme la mano cuando lo he necesitado. Gaby González por preocuparse por mi familia y por mi. Aliesha González por su amistad y porque siempre que he requerido su ayuda nunca me la ha negado. Angélica Coyoy por su disposición por aprender y por los experimentos que me ayudó a realizar. Olga Villamar por la música y las anécdotas con las cuales morimos de risa. A Tere por las soluciones que ha hecho y que he utilizado. Gracias a todas por los pasteles y comidas de seminario, por los triunfos y derrotas que hemos compartido en este tiempo de conocernos, porque entre todos nos apoyamos para seguir adelante y, porque por ayudarme en mi trabajo, han hecho cosas que no venían en su contrato.

A la gran familia Guerra Araiza: mis papás, hermanos, sobrinos, sobrinos-nietos, cuñados y anexas por su apoyo y por las reuniones familiares. Los quiero mucho a todos.

A mis suegros por su apoyo y ayuda incondicional que nos han brindado a mi familia y mí.

A mi hermano Ramón por la música, los consejos, por escucharme y brindarme siempre su ayuda. A mi hermana Martha por su confianza y ayudarme siempre en lo que le pido.

A las familias Ontiveros-Uribe, Verdura-Uribe y Segura-Mora, por sus porras y porque siempre me han hecho sentir de la familia.

A Carlos Iván. Porque en estos momentos de incertidumbre por los cuales atraviesas, éste sea un ejemplo que trates de seguir y superar. Porque mi amor por ti sigue siendo el mismo a pesar de que, por las circunstancias, no te lo demuestre como antes.

A mi gran amigo Héctor Manuel (Chino) por nuestra gran y duradera amistad que ha ido creciendo año con año y por compartir conmigo tantos triunfos y derrotas. Este es un triunfo más que quiero compartir contigo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y su Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, por permitirme realizar mis estudios de Doctorado y por preocuparse por la formación de investigadores de alto nivel que puedan contribuir al desarrollo de México.

ESTE PROYECTO DE INVESTIGACION SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO BAJO LA DIRECCION DEL DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO Y CON EL APOYO DE LOS PROYECTOS CONACYT 35025-N Y DEL PROGRAMA DE APOYO A ESTUDIOS DE POSGRADO (PAEP), U.N.A.M. Nos. 103322 Y 103323, ASI COMO UNA BECA DE ESTUDIOS DE DOCTORADO DEL CONACYT (REG. No. 114267).

INDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCION.....	8
ANTECEDENTES.....	10
Guerra-Araiza C y Camacho-Arroyo I. Las isoformas del receptor a progesterona: regulación y función. <i>Revista de Investigacion Clínica</i> 2000;52:686-91	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
HIPOTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	21
Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. <i>Neuroreport</i> 1998; 9:3993-6.....	22
Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression pattern during the estrous cycle in the rat brain. <i>Life Sciences</i> 2000; 66:1743-52.....	23
Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Salazar AM, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain. <i>Brain Research Bulletin</i>. 2001;54:13-7.....	24
Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, Camacho-Arroyo I. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. <i>Molecular and Celular Endocrinology</i> 2001. Enviado.....	25
DISCUSION GENERAL	
Regulación diferencial de las isoformas del Receptor a Progesterona (PR) en un modelo farmacológico y en un modelo fisiológico.....	26

Posible papel de las isoformas del PR en la ovulación.....	32
Posible papel de las isoformas del PR en el despliegue de la conducta sexual.....	35
Posible papel de las isoformas del PR en la plasticidad neuronal y la neuroprotección.....	41
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS	44
REFERENCIAS	46

RESUMEN

En el Sistema Nervioso Central (SNC), la progesterona (P4) regula diversas funciones a través de la interacción con su receptor nuclear (PR). Se han descrito dos isoformas del PR en la rata, sin embargo se desconoce su distribución y regulación por hormonas esteroides en el SNC, por lo que en este trabajo estudiamos la expresión de las isoformas A y B del PR en el SNC de ratas adultas de ambos sexos gonadectomizadas y tratadas con estradiol (E2) y (P4), así como en hembras intactas durante el ciclo estral y en machos intactos prepúberes y adultos. El análisis cuantitativo de los transcritos se realizó mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

En los animales gonadectomizados observamos que en el hipotálamo de las ratas hembra el E2 indujo un aumento en la expresión de ambas isoformas mientras que la P4 disminuyó esta inducción. En el área preóptica estos cambios se observaron únicamente en PR-B, mientras que en el hipocampo y en el bulbo olfatorio solo PR-A se indujo con el E2 sin que la P4 modificara esta inducción. En contraste, en el cerebelo y en la corteza frontal no se observaron cambios en la expresión de las isoformas con estos tratamientos. En el cerebro de la rata macho no observamos cambios en la expresión de las isoformas del PR en las regiones cerebrales estudiadas con ningún tratamiento, a excepción del cerebelo en donde el E2 aumentó la expresión de PR-A.

En los animales intactos observamos que durante el ciclo estral de la rata hembra, la expresión de PR-B fue mayor que la de PR-A en el hipotálamo, encontrándose la mayor expresión de PR-B durante la etapa del proestro. En el área preóptica la expresión de PR-B también fue mayor que la de PR-A, sin embargo, la mayor expresión de PR-B se presentó en la etapa del metaestro. En la corteza frontal, PR-B también fue la isoforma predominante, observándose su expresión más alta durante la etapa del diestro, mientras que la más baja ocurrió durante el proestro. En contraste con la predominancia de la expresión de PR-B en el hipotálamo, el área preóptica y la corteza frontal, ambas isoformas fueron expresadas de manera similar en el hipocampo y sin cambios significativos durante el ciclo estral.

En la rata macho encontramos que en el hipotálamo de ratas prepúberes, la expresión de ambas isoformas fue similar mientras en las ratas adultas y al contrario de lo observado en las ratas hembra, la expresión de PR-A fue mucho mayor que la de PR-B. En el área preóptica la expresión de PR-B presentó una tendencia a ser la isoforma predominante tanto en animales prepúberes como adultos. En el hipocampo observamos que la expresión de PR-A exhibió una tendencia a ser mayor que PR-B en ratas macho prepúberes y adultas. En la corteza frontal y en el bulbo olfatorio PR-A y PR-B se expresaron de manera similar en animales prepúberes y adultos. En el cerebelo observamos que la expresión de PR-B fue predominante tanto en ratas prepúberes como adultas.

Todos estos datos nos sugieren que existe una expresión diferencial edad, tejido y sexo específica de las isoformas del PR en el cerebro de la rata y que ésta es fundamental en la regulación de las funciones mediadas por la P4 en el sistema nervioso central.

ABSTRACT

Progesterone (P4) participates in the regulation of several functions of the central nervous system (CNS). Most P4 actions are mediated by intracellular progesterone receptor (PR). Two PR isoforms are described in the rat; however, the distribution and regulation by sex hormones in the rat brain is unknown. We studied progesterone receptor (PR) isoforms expression in the CNS of adult male and female gonadectomized rats treated with estradiol (E2) and P4 as well as in intact female rats during the estrous cycle and intact adult and prepuber male rats by using reverse transcription coupled to polymerase chain reaction.

We observed that in the hypothalamus of ovariectomized female rats the expression of both PR isoforms was induced by E2 and down-regulated by P4. In the preoptic area these changes were only observed in PR-B isoform. In contrast, in the hippocampus and the olfactory bulb, PR induction by E2 was only observed in PR-A. In these regions P4 did not modify the expression of any PR isoform. Neither E2 nor P4 modified PR isoforms expression in the cerebellum and the frontal cortex of ovariectomized female rats. We observed that in the hypothalamus, preoptic area, hippocampus, frontal cortex and olfactory bulb of male rats E2 and P4 did not modify the expression of any PR isoform, whereas in the cerebellum, PR-A expression was induced by E2 treatment.

In intact female rats we found that PR-B isoform was predominant in the hypothalamus, the preoptic area and the frontal cerebral cortex. Both PR isoforms were similarly expressed in the hippocampus. The highest PR-B expression was found on proestrus day in the hypothalamus; on metestrus in the preoptic area; and on diestrus in the frontal cortex. We observed no changes in PR isoforms expression in the hippocampus during the estrous cycle.

In intact male rats, we found that in the hypothalamus of prepuber animals the expression of both PR isoforms was similar, whereas PR-A expression was higher than that of PR-B in adults. This expression pattern is in contrast with that observed in adult female rats. In both ages PR-A and PR-B exhibited a non-significant tendency to be predominant in the

hippocampus and the preoptic area respectively. In the frontal cortex and the olfactory bulb PR isoforms were expressed at a similar level. In the cerebellum PR-B expression was predominant in both prepuber and adult rats.

These results indicate the existence of a differential PR isoforms expression pattern in the male and female rat brain and suggest that the age, tissue and sex specific expression of PR-A and PR-B is important for the regulation of the functions mediated by P4 in the central nervous system.

INTRODUCCION

La progesterona (P4) participa en la regulación de diversas funciones en el cerebro de los mamíferos, entre las que se encuentran la reproducción, el despliegue de la conducta sexual, la excitabilidad neuronal (Camacho-Arroyo 1995) y la protección al daño neuronal (Stein 2001). Uno de los mecanismos por los cuales la P4 ejerce sus efectos en el Sistema Nervioso Central (SNC) es a través de su interacción con receptores específicos a P4 (PR) (Evans 1988). En roedores (Ilenchuk 1987), en aves (Kuhn 1977) y en primates (Lessey 1983) se han descrito dos isoformas del PR denominadas PR-A y PR-B. La diferencia entre estas está dada por 164 aminoácidos de la región amino-terminal de PR-B que están ausentes en PR-A (Krauss 1993). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por distintos promotores que son inducidos por el estradiol (E2) (Krauss 1993, Kastner 1990), dando origen a dos poblaciones de RNA mensajero, uno para PR-B y otro para PR-A. PR-B actúa como un fuerte activador transcripcional en diferentes contextos celulares mientras que PR-A funciona como un inhibidor de la transcripción inducida por PR-B y por otros receptores de la misma familia como el receptor a estrógenos (ER) y a andrógenos (AR) (Vegeto 1993, McDonnell 1994), por lo que la actividad de la P4 depende de la tasa de expresión de las isoformas del PR en las diferentes regiones. El contenido de las isoformas del PR, así como su regulación por hormonas esteroides se presenta de manera tejido-específica en los órganos blanco como el útero y la glándula mamaria (Ilenchuk 1987, Graham 1996).

En algunas regiones cerebrales de la rata como el hipotálamo y el área preóptica el E2 aumenta la expresión del PR a nivel del mensajero y de la proteína, mientras que la administración de la P4 disminuye esta inducción (Blaustein 1994), sin embargo, se desconoce la distribución de las isoformas del PR en el SNC de la rata, así como su regulación por E2 y P4, por lo que en este trabajo se estudió la regulación de las isoformas del PR en el cerebro de la rata en ambos sexos en diferentes condiciones hormonales mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Este trabajo está dividido en tres secciones principales. En la primera de ellas se revisan los antecedentes más relevantes sobre las isoformas del PR como son sus propiedades estructurales y funcionales, así como la regulación de su expresión en órganos blanco que están contenidos en un artículo de revisión publicado en diciembre del 2000 en la **Revista de Investigación Clínica**. Es importante señalar que en dicha revisión están incluidos los datos sobre la regulación de la expresión de las isoformas del PR en el SNC de la rata obtenidos en el transcurso de esta investigación, ya que, al principio de la misma no se conocían y la obtención de ellos formó parte de algunos de los objetivos que se plantearon para este proyecto. Esta sección también incluye el planteamiento del problema, los objetivos generales y particulares, así como la metodología empleada para cumplirlos.

En la segunda sección se presentan los cuatro artículos derivados del trabajo experimental. En ellos se detallan los materiales y métodos utilizados, los resultados obtenidos, así como la discusión de estos resultados. Tres de estos artículos están ya publicados en revistas indexadas, arbitradas y de circulación internacional, mientras que el último se envió recientemente a la revista *Molecular and Cellular Endocrinology*.

En la última sección se presenta una discusión general del trabajo, las conclusiones, las perspectivas y las referencias utilizadas en el mismo.

ANTECEDENTES

Guerra-Araiza C y Camacho-Arroyo I. Las isoformas del receptor a progesterona: regulación y función.
Revista de Investigacion Clínica 2000;52:686-91

Las isoformas del receptor a progesterona: función y regulación

Christian Guerra-Araiza,* Ignacio Camacho-Arroyo*

* Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

**Progesterone receptor isoforms:
Function and regulation**

ABSTRACT

Progesterone participates in the regulation of several physiological processes in mammals. The biological response to progesterone is mediated by two forms of the progesterone receptor (PR) denominated PR-A and PR-B. The difference between them is that 164 amino acids of N-terminal of PR-B are absent in PR-A. Both PR isoforms are derived from a single gene but are generated from either alternative transcriptional or translational start sites, and are regulated by different estrogen-induced promoters. PR-B acts as a transcriptional activator in different cellular contexts whereas PR-A functions as a strong inhibitor of transcriptional activity. PR isoforms expression and function vary among target tissues such as the uterus, the mammary gland and the brain. The knowledge of the molecular mechanisms involved in the regulation of expression and function of PR isoforms will contribute to the understanding of fundamental biological processes such as sexual behavior and reproduction, and it will open the possibility of alternative therapies in fertility control as well as in the treatment of breast, endometrial and cerebral tumors.

Key words. Progesterone receptor isoforms. Progesterone. Estradiol. Uterus. Brain. Sex steroids.

INTRODUCCIÓN

A finales de la década de 1970 y principios de la de 1980 se caracterizaron dos isoformas del receptor a progesterona (PR) en el pollo,¹ en el ser humano² y en la rata.³ Debido a que un gran número de las acciones fisiológicas de la progesterona (P4) están mediadas a través de la interacción con las isoformas del PR y éstas regulan la expresión de diferentes genes cuyos productos modulan distintas funciones, es importante conocer las características estructurales y funcionales, así como la regulación de la expresión

RESUMEN

La progesterona participa en la regulación de diversos procesos fisiológicos en los mamíferos. La respuesta biológica a la progesterona está mediada por dos isoformas del receptor a progesterona (PR) denominadas PR-A y PR-B. La diferencia entre éstas está dada por 164 aminoácidos de la región amino-terminal de PR-B que están ausentes en PR-A. Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por distintos promotores que son inducidos por los estrógenos. PR-B actúa como un fuerte activador transcripcional en diferentes contextos celulares mientras que PR-A funciona como un inhibidor. El contenido de las isoformas del PR, así como su regulación por hormonas esteroideas se presenta de manera tejido-específica en los órganos blanco como el útero, la glándula mamaria y el cerebro. El conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales se regula la expresión y función de las isoformas del PR permitirá entender procesos biológicos fundamentales como la conducta sexual y la reproducción; además contribuirá al diseño de terapias hormonales en el control de la fertilidad, así como en el tratamiento de tumores de mama, endometriales y cerebrales.

Palabras clave. Isoformas del receptor a progesterona. Progesterona. Estradiol. Útero. Cerebro. Hormonas esteroideas.

por hormonas esteroideas de estas isoformas en diversos órganos. En esta revisión se presenta un panorama general de las propiedades estructurales y funcionales de las isoformas del PR, así como de la regulación de su expresión en órganos que participan en la reproducción y el despliegue de la conducta sexual en los mamíferos.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA P4

La P4 participa en la regulación del desarrollo y el funcionamiento de los tejidos reproductivos, así

como de la excitabilidad neuronal, la reproducción y el despliegue de la conducta sexual en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos.^{4,5} La P4 ejerce sus efectos en las células blanco a través de dos mecanismos principales: genómico y no genómico.⁶ Los efectos genómicos de la P4 están mediados a través de su interacción con receptores nucleares que reconocen específicamente a la hormona (PR). El mecanismo de acción genómico de la P4 es el siguiente: la hormona se une al PR; éste se dimeriza y se une a secuencias reguladoras en el DNA (Elementos de Respuesta Hormonal) que activan la transcripción de diversos genes.⁷ La importancia del PR en diversos procesos fisiológicos se ha comprobado utilizando ratones transgénicos que presentan una disrupción en el gen del PR (ratones PRKO). Se ha observado que estos animales presentan infertilidad, deficiencias en el despliegue de la conducta sexual, malformaciones en el desarrollo de la glándula mamaria,⁸ así como cambios en las concentraciones circulantes de las hormonas luteinizante, folículo estimulante y prolactina.⁹

Las acciones no genómicas de la P4 están mediadas tanto por receptores membranales, diferentes a PR, como por sitios alostéricos presentes en los receptores a neurotransmisores como el receptor GABA_A. Los receptores membranales a la P4 se han caracterizado en el SNC de la rata,¹⁰ así como en la membrana del espermatozoide en el que participan en la regulación de la reacción acrosomal.¹¹ En el SNC, se han observado un gran número de efectos membranales de la P4, como son cambios en la excitabilidad neuronal, liberación de neuropéptidos y neurotransmisores y la modulación de canales iónicos y receptores a neurotransmisores.⁶

CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE LAS ISOFORMAS DEL PR

Se han descrito dos isoformas del PR en roedores, en el pollo y en primates incluido el ser humano designadas PR-B (110-120 KDa) y PR-A (72-86 KDa), la diferencia entre éstas es de 164 aminoácidos presentes en el extremo amino-terminal de PR-B¹² (Figura 1). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por distintos promotores. En la rata¹² y en el ser humano¹³ son originadas por distintos RNAs mensajeros mientras que en el pollo son el producto de un procesamiento alternativo del RNA mensajero.¹⁴ Las propiedades funcionales de las isoformas del PR han sido analizadas ampliamente en sistemas de transcripción *in vitro* en diferentes células de mamífero. A pesar de tener afinidad simi-

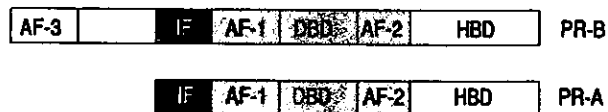


Figura 1. Organización estructural de las isoformas del PR. La organización general de las proteínas de las isoformas del PR está esquemáticamente ilustrada. Son señaladas las funciones de activación (AF-1, AF-2 y AF-3) y de inhibición (IF), el dominio de unión al DNA (DBD), así como el dominio de unión a la hormona (HBD) presentes en PR-A y PR-B. La diferencia entre estas proteínas radica en 164 aminoácidos en la región amino-terminal del PR-B en donde también se encuentra la AF-3.

lar por diversos agonistas y antagonistas,¹⁵ las isoformas del PR tienen diferente función: PR-B actúa como un activador transcripcional de genes como el del virus tumoral mamario de ratón, el gen que codifica a la tirosina aminotransferasa y el de la timidina cinasa, en diversos contextos celulares, mientras que PR-A no activa la transcripción pero funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por PR-B, como por otros receptores a hormonas esteroides como los receptores a estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos.^{16,17}

Las diferencias en la actividad transcripcional de las isoformas del PR están dadas por diferentes factores, uno de ellos es la estructura básica de cada una. El PR contiene tres funciones de activación (AF1, AF2 y AF3), las dos primeras están presentes en ambas isoformas, mientras que AF3 solamente se encuentra en PR-B.¹⁸ Por otro lado, se ha descrito una función inhibitoria (IF) localizada en la región adyacente a AF1 (Figura 1) que sólo es funcional en PR-A. Se ha observado que IF inhibe a AF1 y a AF2 pero no a AF3 presente en PR-B.^{19,20} También se ha observado que los homodímeros de PR-B tienen mayor capacidad de unirse a secuencias blanco del DNA,²¹ mientras que los heterodímeros (PR-B:PR-A) son más inestables y presentan diferentes propiedades de unión al DNA.²² Otra característica importante de las isoformas, recientemente descrita, es que éstas presentan una afinidad diferente a diversos cofactores. PR-A presenta mayor afinidad por el corepresor SMRT (silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico) que PR-B. Por otro lado, PR-A es incapaz de reclutar eficientemente a los coactivadores transcripcionales GRIP-1 (proteína que interactúa con el receptor a glucocorticoides) y SRC-1 (coactivador de los receptores a hormonas esteroides).^{23,24} Las características de las isoformas antes mencionadas juegan un papel

importante en la activación de la transcripción por PR-B y la inhibición por PR-A.²⁴

Por otro lado, se tiene evidencia de que existe una compleja intercomunicación entre los receptores a hormonas esteroides y otras vías de transducción de señales. Las hormonas esteroides pueden modular sistemas de segundos mensajeros y éstos a su vez regular la actividad transcripcional de los receptores a hormonas esteroides. La activación de proteínas cinasas puede modificar la unión de las isoformas del PR al ligando y al DNA.^{6,25} Se ha observado que el PR humano es fosforilado al menos en siete residuos de serina, tres de estos sitios sólo se encuentran en PR-B, mientras que los otros cuatro los comparten ambas isoformas.^{26,27} La diferente distribución y regulación de estos sitios de fosforilación en las isoformas del PR, puede conferirles diferentes estados conformacionales que los pueden hacer más o menos afines por las secuencias blanco y regular la transcripción de un gen de manera específica. También se ha observado que la P4 induce la fosforilación del residuo Ser294 mediada por proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Esta fosforilación es una señal para la degradación del PR por ubiquitinación con la participación del proteosoma 26S, lo cual sugiere que otra función de la fosforilación es la señalización para la regulación negativa del PR por P4 mediada por MAPKs.²⁸

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL PR EN TEJIDOS REPRODUCTIVOS

Los niveles relativos de las isoformas del PR en una célula blanco pueden determinar la naturaleza y la magnitud de la respuesta a la P4, por lo que es necesario conocer la expresión de las isoformas del PR y cómo es regulada por las hormonas esteroides en los tejidos blanco. La importancia de los niveles de expresión de las isoformas del PR se ha determinado en ratones transgénicos que adicionalmente contienen una u otra isoforma. Los animales que contienen una copia adicional de PR-A presentan malformaciones en el desarrollo de la glándula mamaria, como hiperplasia ductal y un decremento en la adhesión célula-célula,²⁹ mientras que los animales que contienen adicionalmente a PR-B presentan un crecimiento anormal de la glándula mamaria caracterizado por un crecimiento alveolar inapropiado.³⁰

Se han estudiado los efectos del estradiol (E2) y la P4 en la expresión de las isoformas del PR tanto en homogenados como en los diferentes tipos celulares del oviducto del pollo y se ha observado que el E2 induce la expresión de PR-A pero no de PR-B en el epitelio glandular y el estroma.³¹

Se ha informado que la relación de las isoformas varía en el endometrio humano durante el ciclo

Cuadro 1. Regulación de la expresión de las isoformas del PR en el útero y el cerebro de los mamíferos.

Tejido	Región	Isoforma predominante	Día del ciclo menstrual	Referencia	
Útero	Endometrio	PR-A	2-8	(32)	
		*	9-13		
		*	14-16		
		*	17-28		
	Epitelio Glandular	/	5-14	(35)	
		PR-A	16-19		
Estroma	PR-B	20-24	(35)		
	\$	25-28			
	PR-A	5-28			
Cerebro	Hipotálamo	OVX+VEH	OVX+E2	Día del ciclo estral*	(40,41)
		PR-B	(regulación a la alta)	Proestro	
	Area preóptica	PR-B	#	Metaestro	(39)
		PR-B	PR-B		
	Hipocampo	PR-B	PR-A	Sin cambios	(39)
		Corteza frontal	—	Diestro	
Hipófisis	PR-B	PR-B	Proestro	(39)	

(/) Ambas isoformas se expresaron en niveles similares. (\$) No se detectó la expresión de ninguna de las isoformas del PR. (#) Ambas isoformas fueron reguladas a la alta por el E2. (*) Día del ciclo estral de la rata de mayor expresión. (—) No se determinó.

menstrual (Cuadro 1) y que la expresión de PR-B aumenta al administrar estrógenos en forma de anticonceptivos orales en la fase folicular.³² Esta inducción de PR-B puede explicarse debido a que anticonceptivos como el gestodeno y el norgestrel poseen propiedades estrogénicas. La noretisterona por ejemplo, es capaz de inducir la expresión del PR y del protooncogen c-fos en el útero de la rata.³³ También se ha informado que la tasa de expresión de las isoformas varía en el tracto genital del mono durante la fase lutea del ciclo menstrual siendo predominante la isoforma A en el endometrio y en el tejido decidual, mientras que PR-B es predominante en el ovario.³⁴ En un estudio reciente, con el uso de la técnica de doble inmunohistoquímica inmunofluorescente, se ha reportado la colocalización de PR-A y PR-B en el endometrio humano durante el ciclo menstrual, observándose también una expresión que varía en el epitelio glandular y el estroma en las diferentes etapas del ciclo (Cuadro 1). Esta expresión fluctuante de las isoformas del PR en el endometrio humano a través de las diferentes fases del ciclo menstrual, está involucrada en los diversos procesos que se llevan a cabo en este tejido en cada fase del ciclo como son la formación vacuolar y la secreción glandular.³⁵

Por otro lado, se ha informado que en células de ovario de hámster, la transcripción mediada por PR-B inducida por diversas progestinas como Org2058, R5020 y noretisterona es mayor con respecto a PR-A. En este sistema, antiprogestinas como el RU38486 y el Org31710 tienen un mayor efecto inhibitor sobre la actividad transcripcional de PR-B.³⁶ Los efectos diferenciales de estos fármacos sobre la actividad transcripcional de las isoformas del PR deben ser consideradas en programas sobre el control de la fertilidad.

Estos datos sugieren que en el tracto reproductivo tanto de aves como de mamíferos existe un mecanismo complejo de regulación de la expresión del PR por hormonas esteroideas en condiciones farmacológicas y fisiológicas que se presenta de manera celular y tejido-específica. Este mecanismo juega un papel importante en la regulación de los procesos reproductivos mediados por la P4 en estos tejidos.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL PR EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

En 1993 Kato y col. estudiaron, por medio de la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la expresión de las isoformas del PR durante el desarrollo en la corteza cerebral de la rata, y observaron que la expresión de la

isoforma PR-B es predominante en los primeros días después del nacimiento, mientras que la isoforma PR-A predomina entre los 8 y los 12 días.³⁷ En 1998, Bethea y col. reportaron que la administración de E2 a monos rhesus ovariectomizados incrementó la expresión del PR a nivel de la proteína. El PR-A se expresó 5 veces más en el endometrio y 1.6 veces más en la hipófisis que el PR-B, mientras que en el hipotálamo la relación A/B fue 1:1.³⁸ Esta regulación de la expresión de las isoformas de PR también se ha estudiado en la hipófisis anterior de la rata³⁹ (Cuadro 1). Nuestro grupo ha estudiado los efectos del E2 y la P4 en la expresión de las isoformas del PR en el cerebro anterior de ratas ovariectomizadas y en las diferentes etapas del ciclo estral utilizando la técnica de RT-PCR y hemos observado una regulación tejido-específica de las isoformas del PR en diversas regiones del cerebro de la rata^{40,41} (Cuadro 1). Todos estos resultados indican que la expresión de las isoformas del PR está regulada diferencialmente por las hormonas esteroideas en el cerebro de los mamíferos y que esta regulación depende del tejido y del estado hormonal del animal, sugiriendo además que los niveles de expresión de PR-A y PR-B juegan un papel importante en las acciones fisiológicas de la P4 en el cerebro de los mamíferos.

EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL PR Y CÁNCER

El PR es reconocido como un importante marcador pronóstico así como una buena herramienta para predecir la respuesta positiva a la terapia hormonal en el tratamiento de tumores hormono-dependientes.⁴²⁻⁴⁴ El balance de la expresión de las isoformas del PR es crítico en la respuesta a la P4 tanto en un tejido normal como en uno cancerígeno. Se ha estudiado la expresión de las isoformas del PR en tumores de mama humano y se ha observado que predomina la expresión de PR-A. También se ha detectado una tercera banda de 78 kDa, peso que no corresponde ni a PR-A (86 kDa) ni a PR-B (116 kDa) lo que ha sugerido la existencia de una tercera isoforma denominada PR-C.⁴² Se caracterizaron las propiedades de esta proteína de 78 kDa y se observó que es una forma truncada de PR-A con capacidad de unirse a su ligando, por lo que puede tener un papel en la señalización mediada por la P4 en el cáncer de mama.⁴⁵ En el endometrio, la P4 antagoniza los efectos estimuladores del crecimiento inducidos por el E2. La P4 disminuye tanto la hiperplasia endometrial como el crecimiento de tumores endometriales que son positivos para el PR.⁴³ La expresión de las isoformas del PR se ha estudiado también en líneas celulares derivadas de cáncer de en-

dometrio. En la línea Ishikawa, cuyas células están bien diferenciadas, el E2 aumenta la expresión de ambas isoformas aunque PR-B presenta mayor incremento. Las líneas Hec50 y KLE cuyas células están pobremente diferenciadas solamente expresan PR-A. Estos resultados han llevado a sugerir que la pérdida de PR-B puede predecir el cáncer endometrial pobremente diferenciado que no responde a la terapia con P4.⁴⁶ En nuestro laboratorio se ha estudiado la expresión de las isoformas del PR en tumores cerebrales humanos. Se ha observado que tanto en cordomas como en astrocitomas grados III y IV, PR-B se expresa en mayor proporción que PR-A, tanto a nivel del mensajero como de la proteína.^{47,48} Todos estos datos sugieren que el conocimiento de la expresión de las isoformas del PR en tumores derivados de órganos blanco de hormonas esteroideas como la glándula mamaria, el endometrio y el cerebro, es fundamental para el diseño adecuado de una terapia hormonal para el tratamiento del cáncer.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La caracterización de las isoformas del PR ha ampliado y modificado el panorama del mecanismo de acción de la P4 sobre sus órganos blanco. El hecho de que por un lado las isoformas actúen como factores de transcripción y lo hagan de manera opuesta (PR-B es un fuerte transactivador, PR-A es un inhibidor de la transcripción), mientras que por otro lado la regulación de su expresión por hormonas esteroideas se presente de manera tejido y célula-específica nos indica que existe un mecanismo muy fino de regulación de la transcripción mediada por las isoformas del PR y su ligando.

La mayoría de las investigaciones se han enfocado a estudiar la regulación de la expresión de las isoformas del PR utilizando técnicas de RT-PCR o Western blot; sin embargo, a pesar de su gran resolución, estas técnicas no brindan información de la expresión en diferentes tipos celulares dentro de un mismo tejido para así poder tener un acercamiento más fisiológico de la actividad de estas proteínas en un tejido, por lo que actualmente se están utilizando técnicas como la doble inmunohistoquímica para realizar este tipo de estudios.

Otra área de interés, es el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la transcripción a través de las isoformas del PR, esto es, conocer qué genes son regulados por estas proteínas, en qué tejidos se presenta esta regulación, así como el estudio de la interacción del PR con otros factores de transcripción.

Por otro lado, es básico el estudio de las isoformas del PR en diversos tumores originados en tejidos hormono-regulados como el cáncer de mama, el cérvico-uterino y algunos tumores cerebrales, con la intención de utilizarlas tanto como marcadores pronóstico, o como herramientas para el diseño de terapias hormonales utilizadas para el tratamiento de esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. Kuhn RW, Schrader WT, Coty WA, Conn PM, O'Malley BW. Progesterone-binding components of chick oviduct. Biochemical characterization of purified oviduct progesterone receptor B subunit. *J Biol Chem* 1977; 252: 308-17.
2. Lessey BA, Alexander PS, Horwitz KB. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptor: characterization by chromatography and photoaffinity labeling. *Endocrinology* 1983; 112: 1267-74.
3. Ilenchuk T, Walters M. Rat uterine progesterone receptor analyzed by [³H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology* 1987; 120: 1449-56.
4. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA. La progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del sistema nervioso central. *Rev Inv Clin* 1995; 47: 329-40.
5. Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 1997; 18: 502-19.
6. Schumacher M, Coirini H, Robert F, Guennoun R, El-Etr M. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior. *Behav Brain Res* 1999; 105: 37-52.
7. Truss M, Beato M. Steroid hormone receptors and interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Rev* 1993; 14: 459-79.
8. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995; 9: 2266-78.
9. Chappell PE, Lydon JP, Conneely OM, O'Malley BW, Levine JE. Endocrine defects in mice carrying a null mutation for the progesterone receptor gene. *Endocrinology* 1997; 138: 4147-52.
10. Tischkau SA, Ramirez VD. A specific binding protein for progesterone in rat brain: sex differences and induction by estrogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1285-89.
11. Calogero AE, Burrello N, Palermo I, Grasso U, D'Agata R et al. Effects of progesterone on sperm function: mechanisms of action. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 1: 28-45.
12. Krauss LW, Montano M, Katzenellenbogen B. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1603-16.
13. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptors forms A and B. *EMBO J* 1990; 9: 1603-14.
14. Conneely OM, Kettelberger DM, Tsai MJ, Schrader WT, O'Malley B. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of alternate translation initiation event. *J Biol Chem* 1989; 264: 14062-64.
15. Shoonen WG, Dijkema R, de Rics RJ, Wagenaars JL, Joosten JW, de Gooyer ME et al. Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells. II Comparison of binding, transactivation and ED50 values of several synthetic (anti) progestagens *in vitro* in CHO and MCF-7 cells and *in vivo* in rabbits and rats. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1998; 64: 157-70.

16. Vegeto E, Shahbaz M, Wen X, Goldman M, O'Malley B, McDonnell D. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1244-55.
17. McDonnell D, Goldman ME. RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J Biol Chem* 1994; 269: 11945-49.
18. Giangrande P, Pollio G, McDonnell. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 32889-900.
19. Huse B, Verca S, Matthey P, Rusconi S. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1334-42.
20. Howland A, Powell R, Takimoto G, Tung L, Horwitz K. An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 1998; 273: 5455-60.
21. Prendergast P, Pan Z, Edwards DP. Progesterone receptor-induced bending of its target DNA: distinct effects of the A and B receptor forms. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 393-97.
22. Leonhard SA, Altman M, Edwards DP. Agonist and antagonist induce homodimerization and mixed ligand heterodimerization of human progesterone receptor *in vivo* by a mammalian two-hybrid assay. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 1914-30.
23. Giangrande HP, McDonnell DP. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Prog Horm Res* 1999; 54: 291-314.
24. Giangrande HP, Kimbrel EA, Edwards DP, McDonnell DP. The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 3102-15.
25. Power RF, Conneely OM, O'Malley BW. New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 318-23.
26. Takimoto GS, Howland AR, Tasset DM, McIvillie MY, Tung L, Horwitz K. Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 1996; 271: 13308-16.
27. Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement IV JP, Prendergast P, Yip T et al. Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites *in vivo*. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 823-32.
28. Lange CA, Shen T, Horwitz KB. Phosphorylation of human progesterone receptor at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1032-37.
29. Shyamala G, Yang X, Silberstein GB, Barcellos-Hoff MH, Dale E. Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 696-701.
30. Shyamala G, Yang X, Dale E. Impact of progesterone receptor on cell-fate decisions during mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3044-9.
31. Syvala H, Vienonen A, Ylikomi T, Blauer M, Zhuang Y, Tuohimaa P. Expression of the chicken progesterone receptor forms A and B is differentially regulated by estrogen *in vivo*. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 231: 573-6.
32. Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, Weigel LN. Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1997; 63: 195-202.
33. Mendoza-Rodríguez A, Camacho-Arroyo I, García GA, Cerbón MA. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception* 1999; 59: 339-43.
34. Duffy MD, Wells TR, Haluska JG, Stouffer RL. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol Reprod* 1997; 57: 693-99.
35. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL. Colocalization of progesterone receptors A and B by dual immunofluorescent histochemistry in human endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2963-71.
36. Dijkema R, Schoonen GEJ, Teuwen R, van der Struik E, de Ries RJH et al. Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells I. Stable transfection of receptor and receptor-responsive reporter genes: transcription modulation by (anti)progesteragens. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1998; 64: 147-56.
37. Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N. The ontogeny of gene expression of progesterone receptor in the female rat brain. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 47: 173-82.
38. Bethea C, Widman A. Differential expression of progesterone receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques. *Endocrinology* 1998; 139: 677-87.
39. Szabo M, Kilen MS, Nho SJ, Schwartz NB. Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. *Biol Reprod* 2000; 62: 95-102.
40. Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 1998; 9: 3993-6.
41. Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. Progesterone receptor isoforms expression pattern during the estrous cycle in the rat brain. *Life Sci* 2000; 66: 1743-52.
42. Graham DJ, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS et al. Progesterone receptor A and B protein expression in human breast cancer. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 56: 93-8.
43. Ace CI, Okulicz WC. Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 115: 95-103.
44. Markwalder TM, Zava DT, Goldhirsch A, Markwalder RV. Estrogen and progesterone receptors in meningiomas in relation to clinical and pathologic features. *Surg Neurol* 1983; 20: 42-7.
45. Yeates C, Hunt SM, Balleine RL, Clarke CL. Characterization of a truncated progesterone receptor protein in breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 460-7.
46. Kumar NS, Richer J, Owen G, Litman E, Horwitz KB, Leslie KK. Selective down-regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed estrogen action. *Cancer Res* 1998; 58: 1860-5.
47. Camacho-Arroyo I, González-Agüero G, Gamboa-Domínguez A, Cerbón MA, Ondarza R. Progesterone receptor isoforms expression pattern in human chordomas. *J Neuro-oncol*; 2000; 49:1-7.
48. Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, González-Agüero G, Reyna Neyra A, Cerbón MA. Progesterone receptor isoforms expression in the mammalian brain during physiological and pathological conditions. *Keystone Symposia, Nuclear Receptors 2000. Colorado, USA*; P210.

Reimpresos:

Dr. Ignacio Camacho-Arroyo
 Facultad de Química
 Ciudad Universitaria
 04510 Coyoacán, México D.F.
 Tel: (525) 622 30 98
 Fax: (525) 616 20 10
 E-mail: igcar@servidor.unam.mx

Recibido el 2 de junio de 2000.
 Aceptado el 3 de octubre de 2000.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se señala en el artículo de revisión "**Las isoformas del receptor a progesterona: función y regulación**", el papel de las isoformas del PR en la regulación de las acciones de la P4 es fundamental, por lo que el conocimiento tanto de las características de las isoformas del PR, como de los mecanismos involucrados en su regulación, es básico para comprender los diversos procesos fisiológicos en los que participa la P4 en el SNC.

Existen diversos informes sobre el papel funcional del PR en el SNC de los mamíferos, entre los que destacan la ovulación y el despliegue de la conducta sexual; por otro lado, se conoce el papel del E2 en la regulación positiva de la expresión del PR, así como el de la P4 que regula negativamente la expresión del PR tanto a nivel del RNA mensajero como de la proteína en algunas regiones del SNC como el hipotálamo y el área preóptica. Sin embargo, se desconoce la distribución de las isoformas del PR en el SNC de ratas de ambos sexos, así como su regulación por E2 y P4 y en condiciones donde fisiológicamente hay cambios en los niveles de E2 y P4 como es el caso del ciclo estral.

Esta información es fundamental para llegar a establecer los mecanismos por los cuales la P4 ejerce múltiples efectos en el SNC ya que las isoformas del PR regulan diferentes genes y por lo tanto distintas funciones. Por lo que en este proyecto se estudiará:

- 1) La regulación de la expresión de las isoformas del PR en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, la corteza frontal, el bulbo olfatorio y el cerebelo a nivel del gen en ratas gonadectomizadas de ambos sexos después de la administración de E2 y P4.
- 2) El patrón de expresión a nivel del gen en un modelo fisiológico utilizando ratas hembras intactas en los diferentes días del ciclo estral y en machos intactos prepúberes y adultos. Los niveles de RNA mensajero se cuantificarán mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR):

HIPOTESIS

Si un gran número de efectos de la P4 en el SNC de la rata depende de la expresión diferencial de las isoformas A y B de su receptor entonces:

La regulación de la expresión de las isoformas del PR por E2 y P4 será diferente dependiendo de la región analizada en el Sistema Nervioso Central de la rata hembra y macho.

La regulación de la expresión de las isoformas del PR por E2 y P4 será diferente en el Sistema Nervioso Central de la rata hembra con respecto a la del macho.

La mayor diferencia en el patrón de expresión de las isoformas del PR en el Sistema Nervioso Central de la rata hembra durante el ciclo estral se presentará durante las etapas del proestro y el metaestro, que es cuando se presenta el mayor aumento en la concentración sérica de E2 y P4 respectivamente.

El patrón de expresión de las isoformas del PR en las diferentes regiones del Sistema Nervioso Central de la rata macho será diferente en los animales prepúberes y en los adultos.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Estudiar la regulación de la expresión de las isoformas del PR por hormonas esteroides en el SNC de la rata.

Objetivos Particulares.

1. Estudiar la regulación de la expresión de las isoformas del PR a nivel del RNA mensajero en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, la corteza cerebral, el bulbo olfatorio y el cerebelo de ratas hembra y macho gonadectomizadas y tratadas con E2 y P4.
2. Determinar el patrón de expresión de las isoformas del PR a nivel del RNA mensajero en las regiones antes mencionadas durante el ciclo estral de ratas hembra intactas.
3. Caracterizar el patrón de expresión de las isoformas del PR en las regiones antes mencionadas en ratas macho intactas adultas y prepúberes.

MATERIALES Y METODOS

Animales de experimentación.

A lo largo de este estudio se utilizaron ratas adultas de ambos sexos de 200-250 g de peso, así como machos prepúberes de la cepa Wistar de 100-150 g que se mantuvieron con agua y comida *ad libitum*.

Para cumplir con el primer objetivo particular se gonadectomizaron ratas de ambos sexos bajo anestesia general que diez días después de la cirugía fueron tratadas por vía subcutánea con: a) vehículo que representó al lote testigo (aceite de maíz/etanol 10%); b) 17- β E2 en una dosis de 5 μ g/100 g de peso corporal durante dos días consecutivos; c) 17- β E2 durante dos días seguido por P4 al tercer día en una dosis de 400 μ g/100 g y sólo en el caso de los machos d) testosterona en una dosis de 100 μ g/100 g durante dos días consecutivos. Las ratas se sacrificaron 24 h después de la administración de los compuestos, y se disecaron en fresco el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, la corteza frontal, el cerebelo y el bulbo olfatorio.

Para estudiar la expresión de las isoformas del PR en el SNC durante el ciclo estral se utilizaron ratas hembra adultas intactas que se mantuvieron en un ciclo luz:oscuridad 14:10, con inicio del período de luz a las 6:00 A.M.

La etapa del ciclo en la cual se encontraban las ratas se determinó por medio del análisis citológico de frotis vaginales. Las ratas que presentaron 3 ciclos consecutivos se sacrificaron a las 12:00 h en las etapas de proestro, estro, metaestro y diestro. Posteriormente se disecaron en fresco el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo y la corteza frontal.

Para lograr el tercer objetivo particular de este trabajo, el de estudiar la expresión de las isoformas del PR en el SNC de la rata macho, se utilizaron machos prepúberes (3 semanas de edad) y animales adultos (12 semanas de edad).

Las ratas fueron decapitadas a las 12:00 h del día y se disecaron el cerebelo, el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, la corteza frontal y el bulbo olfatorio. Todas las regiones fueron inmediatamente procesadas para la extracción del RNA total.

Obtención del RNA total.

Se realizó la extracción del RNA total de las diferentes regiones del SNC de las ratas en las condiciones antes mencionadas utilizando la técnica del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol (Chomczynski 1987). Para conocer las condiciones del RNA extraído, éste se analizó en geles de agarosa al 1.1% en condiciones desnaturizantes. Solamente se utilizaron las muestras en las que el RNA estuviera íntegro, es decir donde se observaran claramente las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 18S y 28S y no se encontrara RNA degradado, ni presencia de DNA.

Diseño de oligonucleótidos.

Debido a las características estructurales de las isoformas del PR cuya única diferencia son 164 aminoácidos de la región amino terminal (Fig 1), no se pueden diseñar oligonucleótidos específicos para cada una de las isoformas. Por lo tanto, nuestra estrategia para poder distinguir entre la expresión de una y otra isoforma fue el diseño de oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 517 pb del Dominio de Unión a la Hormona (HBD) que comparten ambas isoformas y un fragmento de 244 pb de la región amino terminal que únicamente está presente en PR-B (Fig 1).

También se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por RT-PCR un fragmento de 480 pb del gen que codifica para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las secuencias para los tres fragmentos fueron analizadas con el programa OLIGO 4.1 para determinar la presencia de secuencias homologas internas que formaran asas o se sobrelaparan, así como para que la temperatura de unión de los oligonucleótidos con el cDNA fuera la misma (60°C) y poder realizar la RT-PCR en las mismas condiciones para los tres genes. Estas secuencias se muestran en el Cuadro I.

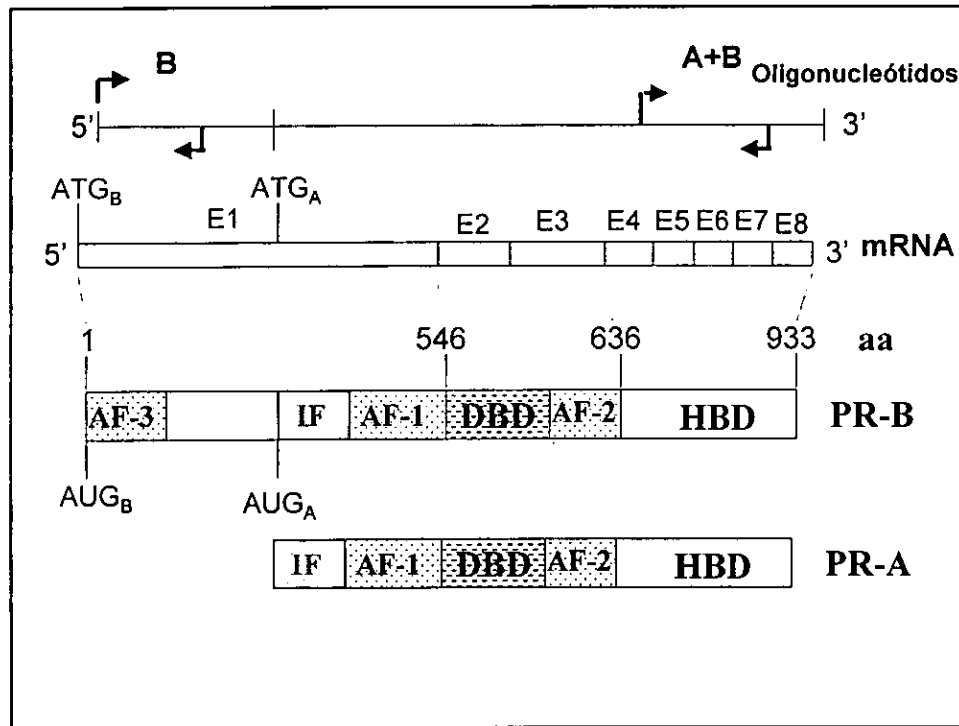


Figura 1 Organización estructural de las isoformas del PR. La organización general de los transcritos y de las proteínas de las isoformas del PR están esquemáticamente ilustradas. El gen del PR está constituido por 8 Exones (E1-E8). El E1 constituye la parte amino-terminal de la proteína, E2 y E3 forman el dominio de unión al DNA (DBD), mientras que el dominio de unión a la hormona (HBD) está formado por los cinco exones restantes (E4-E8). En el esquema de las proteínas son señaladas las funciones de activación (AF-1, AF-2, y AF-3) y de inhibición (IF). En la parte superior de la figura se señalan los sitios en la secuencia del mensajero de donde se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar por PCR los genes del PR

CUADRO I.

Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de PR y GAPDH

GENES	SECUENCIAS
PR-A+B	Sentido 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT G]-3' Antisentido 5'-[CCC GAA TAT AGC TTG ACC TC]-3'
PR-B	Sentido 5'-[ACT GAG CTG CAG GCA AAG]-3' Antisentido 5'-[CGG ACA GCG ACT GCT GA]-3'
GAPDH	Sentido 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' Antisentido 5'-[CAATCG CAG CCC CAG CA]-3'

Amplificación de las isoformas del PR por RT-PCR.

Una vez que se comprobó que el RNA se encontraba íntegro, se procedió a determinar las condiciones óptimas para realizar las amplificaciones por RT-PCR de un fragmento de la región HBD que comparten ambas isoformas; de la región N-terminal que solo está presente en PR-B y de un fragmento del gen que codifica a la enzima Glicer aldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que se utilizó como un control interno (Cuadro I).

Para determinar el número de ciclos que se utilizaró para realizar las amplificaciones, éstas se llevaron a cabo a 20, 25, 30, y 35 ciclos. Se determinó realizar la técnica de PCR a 25 ciclos ya que las amplificaciones obtenidas se encuentran en la fase exponencial de la curva (Fig 2). Para determinar la concentración de RNA que se utilizó para amplificar estos genes se realizó una calibración realizando la técnica de PCR con diferente concentración de RNA.

En la figura 3 se observa una relación directamente proporcional entre la concentración de RNA y la señal de amplificación y a partir de estos datos se determinó utilizar 2 µg de RNA por reacción para estudiar la expresión de los genes. Las condiciones de PCR utilizadas en todos los experimentos fueron las siguientes:

Concentración Final

Buffer PCR 10 X	20 mM Tris-HCl pH=8.4
	50 mM KCl
MgCl ₂ (50 mM)	1.0 mM
dNTPs (10 mM)	0.2 mM
Oligo sentido	0.5 μM
Oligo antisentido	0.5 μM
TAQ DNA polimerasa	2.5 unidades

El perfil de los ciclos para amplificar los genes de PR y GAPDH fue el siguiente: Una etapa de desnaturalización a 95°C por 5 min; 25 ciclos de: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min. Un paso de extensión final fue realizado a 72°C por 5 min. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos sin RNA y con RNA sin reacción de RT (Fig 4).

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Se observaron en un transiluminador de rayos UV y se fotografiaron e imprimieron con una película Polaroid 665. La intensidad de las bandas de PR-A+B, PR-B y GAPDH fue cuantificada mediante un análisis densitométrico usando un digitalizador Scan Jet 3C. El nivel de expresión de las isoformas del PR fue normalizado con el de GAPDH. El nivel de expresión de PR-A se obtuvo sustrayendo la intensidad del producto de amplificación común para PR-A y PR-B menos la intensidad de la señal de amplificación para PR-B. Los datos fueron analizados utilizando un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de t-Student. El programa Prism 2.01 fue utilizado para calcular las diferencias significativas de los datos obtenidos.

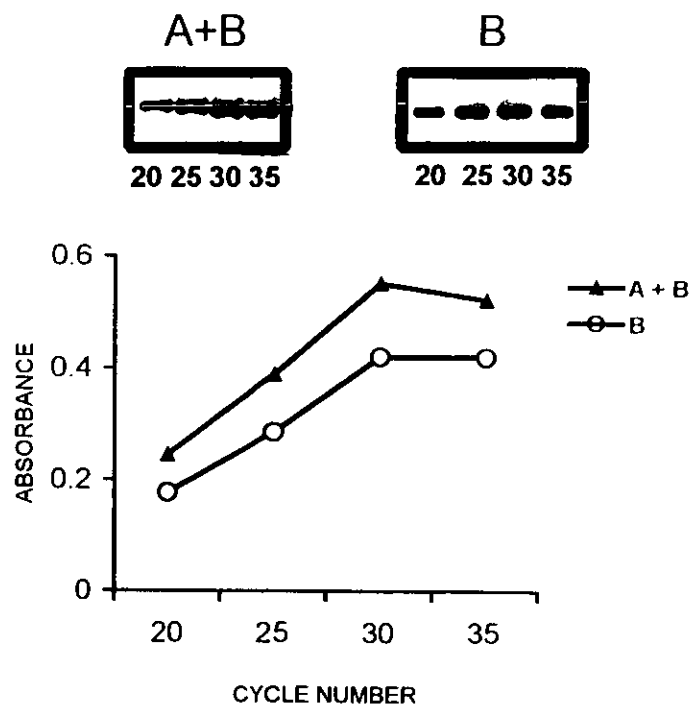


Figura 2. Determinación del número de ciclos de amplificación para los genes del PR. Se realizó la técnica de RT-PCR de PR-A+B y PR-B a partir del RNA total de la corteza frontal de ratas hembra adultas intactas durante el diestro. La reacción de PCR se realizó a diferente número de ciclos (20-35) y la intensidad de las bandas del PR fue cuantificada por un análisis densitométrico.

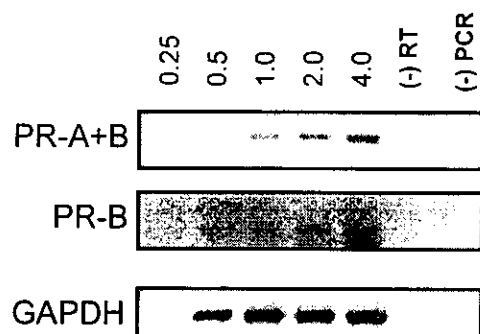


Figura 3. Efecto de la concentración de RNA total sobre el producto amplificado por RT-PCR. Se realizó la técnica de RT-PCR a partir del RNA total del hipotálamo de ratas ovariectomizadas tratadas con E2. La reacción de PCR se realizó utilizando diferentes concentraciones de RNA total (0.25-4.0 μ g) y los productos de amplificación se separaron en geles de agarosa al 2%. Se incluyeron controles negativos para cada gen sin RNA (- RNA) y RNA sin reacción de RT (-PCR).

RESULTADOS

A continuación se presentan cuatro artículos derivados del trabajo experimental, tres han sido ya publicados en revistas indexadas con arbitraje y de circulación internacional y uno más ha sido enviado para su publicación a la revista *Molecular and Cellular Endocrinology*; en ellos se encuentran descritos más detalladamente los procedimientos experimentales utilizados para lograr los objetivos de este trabajo, así como los resultados obtenidos en el desarrollo de este proyecto.

PROGESTERONE RECEPTOR ISOFORMS ARE DIFFERENTIALLY REGULATED BY SEX STEROIDS IN THE RAT FOREBRAIN

Ignacio Camacho-Arroyo, **Christian Guerra-Araiza** and Marco Antonio

Cerbón.

Neuroreport 1998; 9:3993-6

WE studied the effects of estradiol (E2) and progesterone (P4) on expression of genes coding for PR isoforms in the forebrain of ovariectomized rats by RT-PCR analysis. In the hypothalamus the expression of both PR isoforms was induced by E2 and down-regulated by P4. In the preoptic area these changes were only observed in the PR-B isoform. In contrast, in the hippocampus PR induction by E2 was only observed for PR-A. In this region P4 did not modify the expression of any PR isoform. These results indicate that PR isoforms expression is differentially regulated by sex steroid hormones in distinct forebrain regions and suggest that the tissue-specific regulation of either PR-A or PR-B may be involved in the physiological actions of P4 upon the rat brain. *NeuroReport* 9: 3993–3996 © 1998 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: Estradiol; Hippocampus; Hypothalamus; Preoptic area; Progesterone; Progesterone receptor

Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain

Ignacio Camacho-Arroyo,^{CA}
Christian Guerra-Araiza and
Marco Antonio Cerbón

Departamento de Biología, Facultad de
Química, Universidad Nacional Autónoma de
México, Coyoacán 04510, México DF, Mexico

^{CA}Corresponding Author

Introduction

Progesterone (P4) participates in the regulation of several functions of the central nervous system of mammals.^{1,2} Most P4 actions are mediated by intracellular progesterone receptors (PR).^{2,3} Two PR isoforms have been described in the rat: a larger form (PR-B) and the N-terminally truncated one (PR-A).⁴ Both PR isoforms are derived from a single gene and are generated from either alternative transcriptional or translational start sites.^{5,6} The ratio of PR isoform varies among target tissues⁷ and under different hormonal conditions such as those presented during the menstrual cycle,⁸ suggesting that the differential expression of PR isoforms is critical for appropriate cellular response to P4.⁹ Indeed, in the same cell PR isoforms can regulate different genes and exert distinct functions.¹⁰

In rats during diestrus the PR-A isoform is more abundant than PR-B in the hypothalamus-preoptic area, amygdala and cerebellum, whereas the latter is more abundant in the cerebral cortex.¹¹ Interestingly, PR isoform expression varies during rat brain development. In the hypothalamus-preoptic area PR-B is predominant during the first week of life.¹² However, the hormonal regulation of PR expression in the brain is unknown. Therefore, we studied the effects of 17 β -estradiol (E2) and P4 on PR isoform expression in the rat forebrain using the sensitive combined method of reverse transcription (RT) coupled to polymerase chain reaction (PCR).

Materials and Methods

Reagents: All reagents were purchased from Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO) and Gibco-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD). Taq polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Branchburg, New Jersey).

Animals: Adult female Wistar rats (230–260 g) maintained under a 12:12 h light:dark cycle (lights on 06:00–18:00 h), with food and water *ad lib* were ovariectomized under ketamine (Galen, S. A. México) anesthesia (80 mg/kg). Two weeks later they were randomly assigned to the following s.c. treatments: (1) daily administration of vehicle (corn oil) alone for 2 days, (2) E2 (5 μ g/100 g) for 2 days, (3) E2 administered as above followed by P4 (1 mg/250 g) on day 3, and (4) E2 followed by vehicle on day 3. Twenty-four hours after the last dose hypothalamus, preoptic area and hippocampus were excised according to the Atlas of Paxinos and Watson.¹³ The entire dorsal and ventral hippocampal formation (subiculum, Ammon's horn and the dentate gyrus) was analyzed as a whole. All regions were immediately processed for total RNA extraction. All experiments were performed in quadruplicate.

Total RNA extraction and RT-PCR: Total RNA was isolated from each region with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent

(Gibco-BRL, Inc).¹⁴ RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA as described previously.¹⁵ Ten microlitres of RT reaction were subjected to PCR to amplify two PR gene fragments, and the other 10 μ l of the cDNA were used to amplify simultaneously a fragment of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene which was used as a constitutive expression control. The sequences of the specific primers unique for PR-B amplification segment were 5'-ACTGAGCTGCAGGCAAAG-3' (sense) and 5'-CGGACAGCGACTGCTGA-3' (antisense). The primers used for amplification of the common PR-A and PR-B region corresponding to the hormone binding domain were 5'-CTGCTGGA-TGAGCCTGATGGTG-3' (sense) and 5'-CACCA-TCCCTGCCAGGATCTTG-3' (antisense).¹⁶ The 50 μ l PCR reaction included 10 μ l previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μ M of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, the PCR reaction was performed for 25 cycles. The cycle profile for PR and GAPDH genes amplification was: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min. A final extension cycle was performed at 72°C. The number of performed cycles, previously determined was within the exponential phase of the amplification process. All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. PCR products (25 μ l) were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The image was captured under a u.v. transilluminator with a Type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA). The intensity of PR or GAPDH bands was quantified by densitometry using a Scan jet 3C apparatus (Hewlett Packard). PR isoforms expression level was normalized to that of GAPDH. PR-A expression level was obtained by subtracting the intensity of the common signal of PR-A/B amplification product minus the intensity of PR-B amplification signal. The data were analyzed by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's *t*-test. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values.

Results

In all amplifications single bands of 504, 250 and 480 bp corresponding to the expected size fragments of PR-A/B, PR-B and GAPDH respectively were

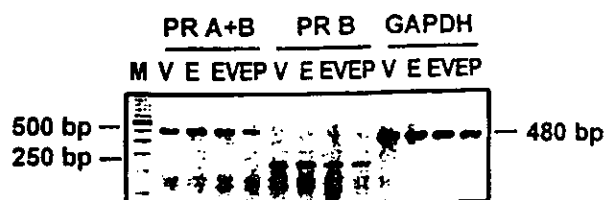


FIG. 1. PR isoforms expression in the hypothalamus of the rat. A representative assay of a simultaneous PR(A/B), PR-B and GAPDH RT-PCR from total RNA of the hypothalamus of ovariectomized adult rats treated with vehicle (V), 17 β -estradiol (E), E + vehicle (EV) and E + progesterone (EP). Mol. wt marker of 100 bp DNA ladder (M).

obtained (Fig. 1). No bands were observed in the negative controls. The identity of each PCR product was previously confirmed by nucleotide sequencing and Southern blot analyses (data not shown). The results obtained by Southern blot were similar to those observed in the analyzed films obtained from the gels stained with ethidium bromide.

Both PR isoforms were expressed in the hypothalamus, the preoptic area and the hippocampus. In ovariectomized animals treated with vehicle the PR-B isoform was expressed to a greater degree than PR-A in all regions studied (Fig. 2). A differential PR isoform regulation by sex steroid hormones was observed in the rat forebrain. In the hypothalamus the expression of both PR isoforms was induced by E2 and down-regulated by P4 (Fig. 2A). In the preoptic area these changes were observed in PR-B isoform but not in PR-A (Fig. 2B). In contrast, in the hippocampus the induction of PR gene expression by E2 was only observed in PR-A. The administration of P4 after E2 priming did not down-regulate any PR-isoform in this region (Fig. 2C). The administration of vehicle after E2 treatment did not have any effect upon the changes induced by E2 in PR gene expression (data not shown).

Discussion

Our results demonstrate that PR isoforms are differentially regulated by E2 and P4 in three regions of the rat forebrain. Although the PR gene has been reported to be sensitive to regulation by these steroid hormones in the hypothalamus and the preoptic area of the rat,^{17,18} this is the first evidence concerning the regulation of each isoform in the rat brain. We found that both PR isoforms are expressed in the hypothalamus, preoptic area and hippocampus of the rat. This result is in agreement with a previous report which indicates the presence of both isoforms in the hypothalamus-preoptic area of the rat.¹¹ PR isoform expression in the hippocampus had not been assessed previously. In ovariectomized animals PR-B isoform showed higher levels of expression than PR-A in the

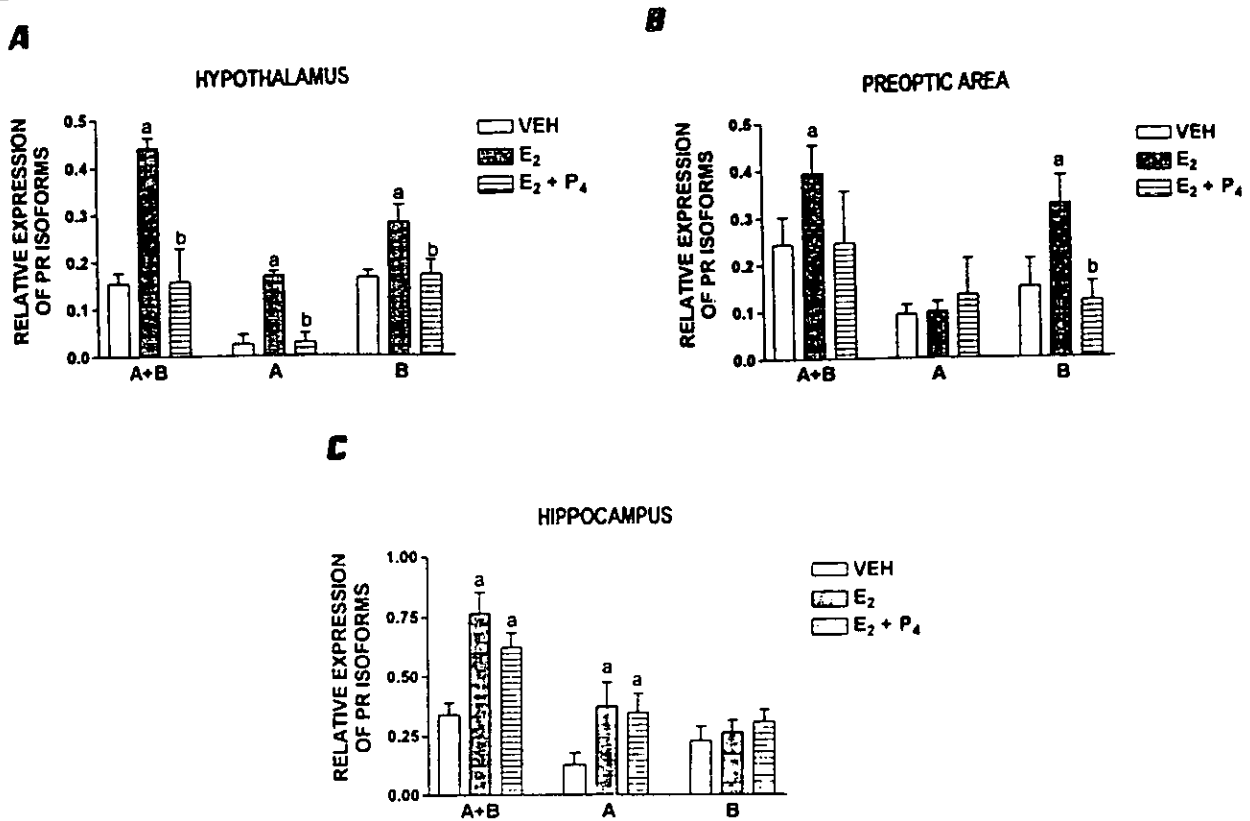


FIG. 2. Densitometric analysis of PR isoforms gene expression in the rat forebrain. RT-PCR was performed using total RNA isolated from (A) hypothalamus, (B) preoptic area and (C) hippocampus of ovariectomized adult rats treated with vehicle (VEH), 17 β -estradiol (E₂), and E₂ + progesterone (P₄). PR isoforms gene expression was corrected for that of GAPDH. Results are expressed as the mean \pm s.e.m. ($n = 4$). * $p < 0.05$ compared with VEH. ^a $p < 0.05$ vs E₂.

hypothalamus (Fig. 2). Interestingly, expression of PR-B protein quantified by Western blot was also greater than that of PR-A in the hypothalamus of ovariectomized rhesus monkey treated with E₂.⁷

We observed that both PR isoforms were up- and down-regulated by E₂ and P₄, respectively, in the hypothalamus of the rat. The induction of both PR isoforms expression by E₂ also agrees with the marked increase in both PR isoforms protein content recently observed in the hypothalamus of rhesus monkey after a chronic treatment with E₂.⁷ In contrast with our study, no down-regulation in PR isoforms expression by P₄ was found in monkey hypothalamus.⁷ This could reflect differences between species since the insensitivity of hypothalamic PR gene to P₄ in monkeys has already been reported.¹⁷ Since both PR isoforms are regulated by E₂ and P₄ in the hypothalamus of the rat, it should be important to know the specific hypothalamic nuclei in which either PR-A or PR-B is regulated by steroid hormones.

We found that only the PR-B isoform was regulated by steroid hormones in the preoptic area of the rat. This result suggests that the changes observed in PR gene expression in this structure by *in situ*

hybridization after E₂ administration¹⁸ are due to the induction of the PR-B isoform. Although PR insensitivity to steroid hormone regulation in other regions such as the cerebral cortex of the rat has been associated to an imperfect estrogen responsive element located around ATG site of the rat PR-B isoform which has a higher expression than PR-A,¹¹ our data clearly demonstrate that PR-B can be regulated by steroid hormones in the rat brain. As in the case of the preoptic area in human endometrial normal and cancer cells (Ishikawa) the unique isoform which is regulated by E₂ and P₄ is PR-B.^{8,19}

In contrast to the preoptic area, PR-A was the only isoform regulated by E₂ in the hippocampus. PR-A sensitivity to estrogen regulation has been previously reported at the protein level in other tissues such as the chicken oviduct.²⁰ All these results indicate that both PR isoforms can be regulated by steroid hormones depending on the cell context. Thus, our results suggest that cell-specific transcription factors are involved in the regulation of PR isoforms gene expression. Whether specifically α or β estrogen receptor isoforms are involved in the differential regulation of PR isoforms in the rat forebrain deserves further investigation. The effects of E₂ and

P4 upon PR mRNA isoforms content in all brain regions could be due to changes in the rate of PR transcription or in the PR mRNA stability of each isoform.²¹

Our data suggest that the differential regulation of PR isoform gene expression by steroid hormones in the rat brain is critical for the adequate response of each brain region to P4.

Conclusion

P4 regulates several functions of the central nervous system of mammals through the interaction with PR which presents two isoforms: a larger form (PR-B) and the N-terminally truncated form (PR-A).⁴ In this study we demonstrated that PR isoform gene expression is differentially regulated by E2 and P4 in three regions of the rat forebrain. In the hypothalamus the expression of both PR isoforms was regulated by E2 and P4, in the preoptic area the regulation was only observed in PR-B isoform, whereas in the hippocampus PR-A was the only PR isoform regulated by E2. This differential PR isoforms gene expression could be due to the presence of cell-specific transcription factors in the different forebrain regions. Our results suggest that the differential regulation of PR isoform gene expression by steroid hormones in the rat forebrain is critical for the physiological actions of P4 upon each brain region.

References

1. Beyer C and González-Mariscal G. Effects of progesterone and natural progestins in brain. In: Negro-Vilar A and Pérez-Palacios G, eds. *Hormones, Reproduction, Growth and Development*. New York: Raven Press, 1991: 199-208.
2. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G and Cerbón MA. *Rev Invest Clin* 47, 329-340 (1995).
3. Graham JD and Clarke CL. *Endocr Rev* 18, 502-519 (1997).
4. Ilenchuk TT and Walters MR. *Endocrinology* 120, 1449-1456 (1987).
5. Kastner P, Krust A, Turcotte B et al. *EMBO J* 9, 1603-1614 (1990).
6. Conneely OM, Maxwell BL, Toft DO et al. *Biochem Biophys Res Commun* 149, 493-501 (1987).
7. Bethae CL and Widmann AA. *Endocrinology* 139, 677-687 (1998).
8. Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter III AN and Wiegel NL. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63, 195-202 (1997).
9. McDonnell DP. *Trends Endocrinol Metab* 6, 133-138 (1995).
10. Tori L, Gronemeyer H, Turcotte B et al. *Nature* 333, 185-188 (1988).
11. Kato J, Hirata S, Nozawa A and Yamada-Mouri N. *Horm Behav* 28, 454-463 (1994).
12. Kato J, Hirata S, Nozawa A and Yamada-Mouri N. *J Steroid Biochem Molec Biol* 47, 173-182 (1993).
13. Paxinos G and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press, 1986.
14. Chomczynski P and Sacchi N. *Anal Biochem* 162, 156-159 (1987).
15. Camacho-Arroyo I, Pasapera AM and Cerbón MA. *Neurosci Lett* 214, 25-28 (1996).
16. Park-Sarge OK and Mayo KE. *Endocrinology* 134, 709-718 (1994).
17. Bethae CL, Brown NA and Kohama SG. *Endocrinology* 137, 4372-4383 (1996).
18. Shughrue P, Scrimo P, Lane M et al. *Endocrinology* 138, 5649-5652 (1997).
19. Kumar NS, Richer J, Owen G et al. *Cancer Res* 58, 1860-1865 (1998).
20. Syyvälä H, Viononen A, Ylikomi T et al. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 573-576 (1997).
21. Turcotte B, Meyer MC, Bellard M et al. *J Biol Chem* 266, 2582-2589 (1991).

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by The Third World Academy of Sciences (Grant No. 97-181 RG/BIO/LA). We thank Flora Garcia-Formenti of CELE, Universidad Nacional Autónoma de México for revision of the English.

Received 19 August 1998;
accepted 13 October 1998

**PROGESTERONE RECEPTOR ISOFORMS EXPRESSION
PATTERN IN THE RAT BRAIN DURING THE ESTROUS CYCLE**

**Christian Guerra-Araiza, Marco A. Cerbón, Sumiko Morimoto and Ignacio
Camacho-Arroyo.**

Life Sciences 2000; 66:1743-52

**PROGESTERONE RECEPTOR ISOFORMS EXPRESSION PATTERN IN THE RAT
BRAIN DURING THE ESTROUS CYCLE**

Christian Guerra-Araiza, Marco A. Cerbón, Sumiko Morimoto* and
Ignacio Camacho-Arroyo

Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad
Nacional Autónoma de México and *Departamento de Biología de la
Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición.

(Received in final form December 3, 1999)

Summary

Progesterone receptor (PR) isoforms expression was determined in the hypothalamus, the preoptic area, the hippocampus and the frontal cerebral cortex of the rat at 12:00 h on each day of the estrous cycle by using reverse transcription coupled to polymerase chain reaction. Rats under a 14:10 h light-dark cycle, with lights on at 06:00 h were used. We found that PR-B isoform was predominant in the hypothalamus, the preoptic area and the frontal cerebral cortex. Both PR isoforms were similarly expressed in the hippocampus. The highest PR-B expression was found on proestrus day in the hypothalamus; on metestrus in the preoptic area; and on diestrus in the frontal cortex. We observed no changes in PR isoforms expression in the hippocampus during the estrous cycle. These results indicate that PR isoforms expression is differentially regulated during the estrous cycle in distinct brain regions and that PR-B may be involved in progesterone actions upon the hypothalamus, the preoptic area and the frontal cortex of the rat.

Key Words: progesterone receptor isoforms, estrous cycle, hypothalamus, preoptic area, hippocampus

Progesterone (P4) is involved in the control of several functions of the central nervous system of mammals (1, 2). Most P4 actions are mediated by intracellular progesterone receptors (PR) (2, 3). Two PR isoforms have been described in the rat: a full-length form (PR-B, 110 KDa) and the N-terminally truncated one (PR-A, 86 KDa) (4). Both PR isoforms are derived from a single gene and are generated from either alternative transcriptional or translational start sites (5, 6).

Correspondence to: Dr. Ignacio Camacho-Arroyo, Departamento de Biología, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D. F. MEXICO. Tel: (525) 622 30 98; Fax: (525) 616 20 10/606 34 89. e-mail: igcar@servidor.unam.mx

PR isoforms expression ratio varies among target tissues (7) and under different hormonal conditions such as those presented during the menstrual cycle (8) suggesting that the differential expression of PR isoforms is critical for appropriate cellular response to P4 (9). Indeed, it has been shown that PR isoforms are functionally distinct in terms of their ability to activate different target genes in the same cell and regulate distinct processes (10). We have recently reported a differential regulation of PR isoforms in the rat forebrain by estradiol (E2) and P4. In the hypothalamus the expression of both PR isoforms was induced by E2 and down-regulated by P4. In the preoptic area these changes were only observed in PR-B isoform. In contrast, in the hippocampus PR induction by E2 was only observed in PR-A (11).

Different groups have studied changes in the expression pattern of several genes using the rat estrous cycle as an excellent physiological model of hormone regulation (12-14). It has been reported that during the estrous cycle, PR at the protein level is more abundant in the hypothalamus-preoptic area and the pituitary during proestrus (15-17). PR isoforms expression in intact adult female rats has been only studied during diestrus. In this day, PR-A isoform is more abundant in the hypothalamus-preoptic area, whereas PR-B expression is higher in the cerebral cortex (18). However, the expression pattern of PR isoforms in the brain during the estrous cycle is unknown. Therefore, we studied PR isoforms gene expression in several regions of the rat brain in each day of the estrous cycle by using the sensitive combined method of reverse transcription (RT) coupled to polymerase chain reaction (PCR).

Materials and Methods

Reagents: All reagents were purchased from Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO) and Gibco-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD). Taq DNA polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Branchburg, New Jersey).

Animals: 20 Adult female Wistar rats (200-230 g) maintained under a 14:10 h light:dark cycle, lights on from 06:00 to 20:00, with food and water available *ad libitum* which presented at least 4 regular 4-day estrous cycle, as determined by daily vaginal smears, were used. Rats (5/each day) were killed at 12:00 h on each day of the estrous cycle. The hypothalamus, the preoptic area, the hippocampus (subiculum, Ammon's horn and the dentate gyrus) and the frontal cortex were excised according to the Atlas of Paxinos and Watson (19). All regions were immediately processed for total RNA extraction.

Total RNA extraction and RT-PCR: Total RNA was isolated from each region with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent (Gibco-BRL, Inc) (20). RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to

synthesize single strand cDNA as previously described (21). Ten μ l of RT reaction were subjected to PCR in order to simultaneously amplify PR gene isoforms, and the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. This was used as an internal control. The sequences of the specific primers unique for PR-B amplification segment (from +4 to +247) were 5'-[ACT GAG CTG CAG GCA AAG]-3' in the sense primer and 5'-[CGG ACA GCG ACT GCT GA]-3' in the antisense (22). The primers used for common PR-A and PR-B amplification region (from +2229 to +2745) corresponding to the hormone binding domain were 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT GGT G]-3' in the sense and 5'-[CAC CAT GCC CGC CAG GAT CTT G]-3' in the antisense (22). The 50 μ l PCR reaction included: 10 μ l of previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μ M of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, PCR reaction was performed for 25 cycles. The cycle profile for PR and GAPDH genes amplification was: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; and 72°C, 1 min. A final extension cycle was performed at 72°C for 5 min. The number of performed cycles was within the exponential phase of the amplification process (Fig 1). All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. 25 μ l of PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The image was captured under a UV transilluminator with a Type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA). The intensity of PR or GAPDH bands was quantified by densitometry using a Scan jet 3C apparatus (Hewlett Packard). PR isoforms expression level was normalized to that of GAPDH.

Radioimmunoassay for E2 and P4: Seric E2 and P4 levels were measured as previously described (23). The intra- and inter-assay coefficients of variations were 7.8 and 11.3% for E2; and 7.6 and 6.5% for P4, respectively.

Statistical analysis: Data were analyzed by using a one way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's t-test. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values.

Results and Discussion

We assessed PR isoforms gene expression in the hypothalamus, the preoptic area, the hippocampus and the frontal cortex of intact rats during estrous cycle by using RT-PCR. In all amplifications single bands of 517, 244 and 480 bp corresponding to the expected size fragments of PR-A+B, PR-B and GAPDH were obtained (Fig 2). No bands were observed in the negative controls. The identity of each PCR product was confirmed by nucleotide sequencing and Southern blot analyses (data not shown). The results obtained by Southern blot were very similar to those observed in the analyzed films obtained from the gels stained with ethidium bromide.

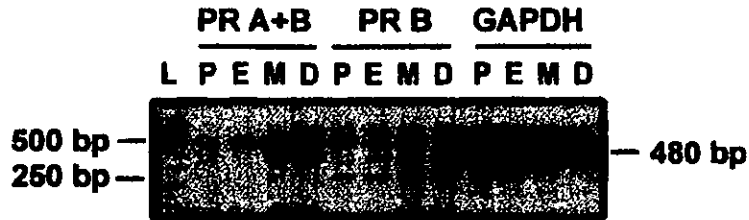


Fig. 2

PR isoforms expression in the preoptic area of the rat during the estrous cycle. A representative assay of a simultaneous PR(A+B), PR-B and GAPDH RT-PCR from total RNA of the preoptic area of adult rats is shown. Proestrus (P), estrus (E), metestrus (M) and diestrus (D); molecular weight marker of 100 bp DNA ladder (L).

The increase in both PR mRNA and protein levels during proestrus could participate in the changes of GnRH expression observed during this day. These results suggest that PR-B participates in the reproductive processes regulated by the hypothalamus during proestrus and the estrous morning such as ovulation and sexual behaviour (25).

Western blot analysis of PR isoforms in the hypothalamus of ovariectomized rhesus monkey treated with E2 has shown a higher expression of PR-B protein than PR-A. These results also suggest the fundamental role that PR-B plays in the regulation of the functions mediated by P4 in this brain region (7).

We also found a higher expression of PR-B in the preoptic area (Figs 2 and 3B). This agrees with the observation that PR-B was the predominant expressed isoform in ovariectomized rats (11).

The highest expression of PR-B in the preoptic area was observed during metestrus (Fig 3B). In other reports the highest expression of PR protein levels was observed during proestrus in the preoptic area (16).

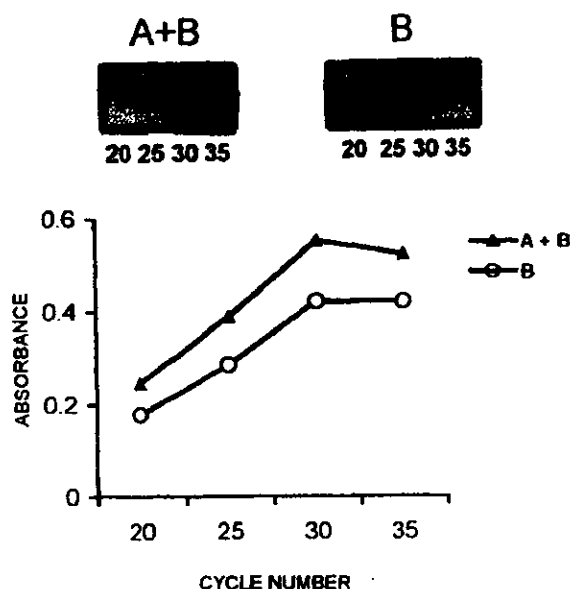


Fig 1

Amplification of PR(A+B) and PR-B at different cycle number. A RT-PCR assay of PR(A+B) and PR-B from total RNA of the frontal cortex during diestrus of adult rats is shown. PCR reaction was performed at different cycle number (20-35). PCR products were separated as previously described in Materials and Methods and the intensity of PR bands was quantified by densitometry.

In the hypothalamus, PR-B expression was markedly higher than that of PR-A (Fig 3A). This result is in agreement with our previous observation that PR-B expression prevailed over PR-A in the hypothalamus of ovariectomized rats (11). Our results showed that in the hypothalamus, the highest levels of PR-B expression were observed during proestrus.

Interestingly, it has been observed that PR protein levels are increased during this day of the cycle (15, 16), suggesting that this increase is a result of the induction of PR-B expression. This induction could be related with the increase of E2 serum levels observed during proestrus day (Table I), since we have previously observed an increase in the expression of PR-B in the hypothalamus of ovariectomized rats treated with E2 (11).

Interestingly, it has been reported that in the hypothalamus, the nuclear content of estrogen receptor (ER) was also maximal on proestrus (24). This result suggests that the increase on the expression of PR-B is related to the increase in ER content observed on proestrus day.

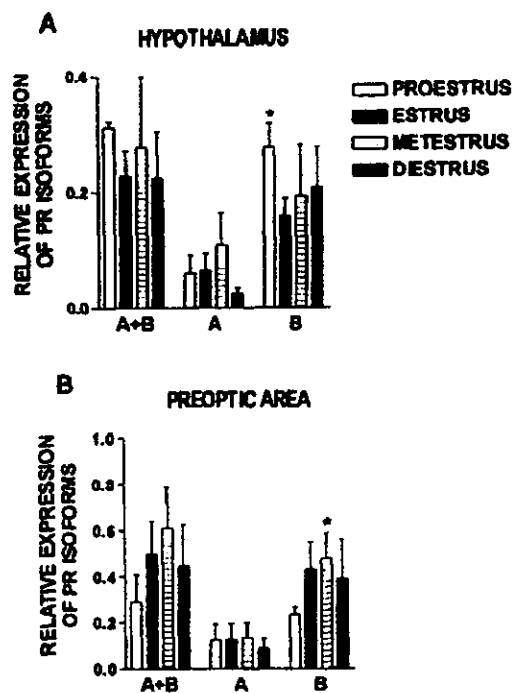


Fig. 3

Densitometric analysis of PR isoforms gene expression in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during the estrous cycle. RT-PCR was performed using total RNA isolated from (A) hypothalamus and (B) preoptic area of adult rats. Each rat was killed at 12:00 h on each day of the estrous cycle. PCR products were quantified by densitometry and corrected for GAPDH values. Results are expressed as the mean \pm SEM (n=5). (A) * p <0.05 compared with estrus. (B) * p <0.05 vs proestrus.

This difference could be due to the fact that the hypothalamus-preoptic area region in that study was taken as a whole, while we analyzed each region individually. Interestingly, it has been reported that both ER mRNA and protein levels were higher in the preoptic area of intact rats during metestrus day of the estrous cycle (12,26). This result suggests that the increase in the expression of PR-B is also related to that of ER during this day.

The lowest expression of PR-B in the preoptic area was observed during proestrus, when there is a rise in E2 serum levels (Table I). This indicates that PR-B regulation in this tissue during the estrous cycle is different from that of the hypothalamus

TABLE I
Estradiol and Progesterone Levels During the Estrous Cycle

	Estradiol (pg/ml)	Progesterone (ng/ml)
PROESTRUS	58.56 ± 12.4*	7.5 ± 0.8
ESTRUS	32.90 ± 3.4	8.7 ± 1.8
METESTRUS	37.98 ± 2.7	15.9 ± 4.4*
DIESTRUS	33.33 ± 2.1	4.4 ± 0.3

Steroid levels were determined by radioimmunoassay. Data are expressed as the mean ± SEM of 5 animals/group. * p<0.05 as compared to the other days of the cycle.

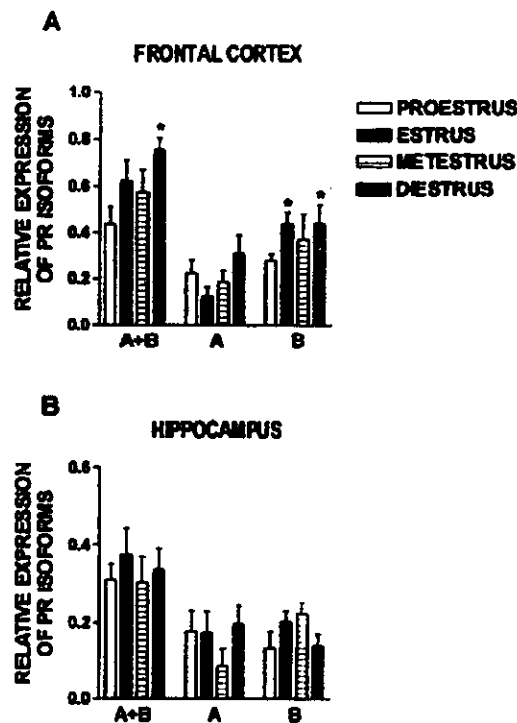


Fig. 4

Densitometric analysis of PR isoforms gene expression in the frontal cortex and the hippocampus of the rat during the estrous cycle. RT-PCR was performed using total RNA isolated from (A) frontal cortex and (B) hippocampus of adult rats at 12:00 h of each day of the estrous cycle. PCR products were quantified by densitometry and corrected for GAPDH values. Results are expressed as the mean ± SEM (n=5). *p<0.05 compared with proestrus.

It is important to mention that a PR expression pattern similar to that of whole preoptic area during the estrous cycle has also been found in the anteroventral periventricular nucleus of this region (27). The reason of this particular pattern of regulation is unknown.

The increase in PR-B expression in the preoptic area during metestrus day could be related to the increase in mRNA expression of opioid peptides, such as proenkephalin, since it has been reported that this peptide presents a similar expression pattern during the estrous cycle in specific regions of the preoptic area such as the anteroventral periventricular nucleus (28) although this deserves further investigations.

In the frontal cortex we observed that PR-B was also the predominant isoform. Its highest expression was found during diestrus (Fig 4A) while the lowest one occurred during proestrus. These data agree with those reported by Kato et al (18), who found that PR-B is more abundant than PR-A in the cortex of intact rats during diestrus.

Binding assays have shown that there are no protein level changes in the brain cortex during the estrous cycle (17). Another report has shown an insensitivity of PR-B to steroid hormone regulation in the brain cortex (18). However, we have shown that PR-B expression is regulated by E2 and P4 in the rat and the rabbit cerebral cortex (11,21). The role of PR-B in the frontal cortex during diestrus deserves further research.

In contrast to the predominance of PR-B expression in the hypothalamus, the preoptic area and the frontal cortex, both PR isoforms were similarly expressed in the hippocampus. Besides, we observed no changes in PR isoforms expression in the hippocampus during the estrous cycle (Fig 4B). It has been previously reported that E2 only induces PR-A expression in the hippocampus of ovariectomized rats (11).

However, we did not find any changes during the estrous cycle despite the clear changes in E2 levels observed during the estrous cycle (Table I). We have also reported that in the hippocampus the expression of *c-fos*, an estrogen regulated gene (29), is not modified during proestrus day (23). Hitherto it is unknown which other factors, apart from E2 and P4, are involved in the regulation of PR gene expression in the hippocampus.

The overall results indicate that PR isoforms are regulated in a tissue-specific manner in the rat brain during the estrous cycle. This regulation could involve different cell-specific transcription factors such as ER isoforms α and β (30).

It would be important to assess PR isoforms expression by Western blot and immunohistochemistry in order to know if the changes observed at mRNA level are reflected at the protein level. Our data suggest that the differential regulation of PR isoforms gene expression during the estrous cycle is important for the appropriate response of each cerebral region to P4.

Acknowledgments

This work was supported by The Third World Academy of Sciences (Grant No. 97-181 RG/BIO/LA). We thank Andrea Reyna for her technical assistance, Julia Segura for her assistance in the manuscript and Flora García-Formentí from CELE, UNAM for the revision of the English manuscript.

References

1. C. BEYER and G. GONZALEZ-MARISCAL, *Hormones, Reproduction, Growth and Development*, 199-208, Raven Press, New York (1991).
2. I. CAMACHO-ARROYO, A.M. PASAPERA, G. PEREZ-PALACIOS and M.A. CERBON, *Rev. Invest. Clin.* **47** 329-340 (1995).
3. J.D. GRAHAM and C.L. CLARKE, *Endocr. Rev.* **18** 502-519 (1997).
4. T.T. ILLENCHUK and M.R. WALTERS, *Endocrinology* **120** 1449-1456 (1987).
5. P. KASTNER, A. KRUST, B. TURCOTTE, U. STROPP, L. TORA, H. GRONEMEYER and P. CHAMBON, *EMBO J.* **9** 1603-1614 (1990).
6. O.M. CONNEELY, B.L. MAXWELL, D.O. TOFT, W.T. SCHRADER and B.W. O'MALLEY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149** 493-501 (1987).
7. C.L. BETHEA and A.A. WIDMANN, *Endocrinology* **139** 677-687 (1998).
8. R.K. MANGAL, R.D. WIEHLE, A.N. POINDEXTER III and N.L. WIEGEL, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **63** 195-202 (1997).
9. D.P. MCDONNELL, *Trends Endocrinol. Metab.* **6** 133-138 (1995).
10. L. TORA, H. GRONEMEYER, B. TURCOTTE, M.P. GAUB and P. CHAMBON, *Nature* **333** 185-188 (1988).
11. I. CAMACHO-ARROYO, C. GUERRA-ARAIZA and M.A. CERBON, *Neuroreport* **9** 3993-3996 (1998).
12. Y. ZHOU, P.J. SHUGHRUB and D.M. DORSA, *Neuroendocrinology* **61** 276-283 (1995).
13. T. FUNABASHI, P.J. BROOKS, S.T. KLEOPOULOS, L. GRANDISON, C.V. MOOBS and D.W. PFAFF, *Mol. Brain Res.* **28** 129-134 (1995).
14. R.B. SIMERLY, B.J. YOUNG and A.M. CARR, *Mol. Brain Res.* **40** 275-284 (1996).
15. M.A. CERBON, M. MARTINEZ and G. PEREZ-PALACIOS, *J. Neuroendocrinol.* **1** 291-298 (1989).
16. M.Y. MCGINNIS, L.C. KREY, N.J. MACLUSKY and B.S. MCEWEN, *Neuroendocrinology* **33** 158-165 (1981).
17. S. THROWER and L. LIM, *Biochem. J.* **190** 691-695 (1980).
18. J. KATO, S. HIRATA, A. NOZAWA and N. YAMADA-MOURI, *Horm. Behav.* **28** 454-463 (1994).
19. G. PAXINOS and C. WATSON. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York (1986).
20. P. CHOMCZYNSKI and N. SACCHI, *Anal. Biochem.* **162** 156-159 (1987).
21. I. CAMACHO-ARROYO, A.M. PASAPERA and M.A. CERBON, *Neurosci. Lett.* **214** 25-28 (1996).

22. O.K. PARK-SARGE and K.E. MAYO, *Endocrinology* **134** 709-718 (1994).
23. I. CAMACHO-ARROYO, C. GUERRA-ARAIZA, R. DOMINGUEZ, C. MENDOZA-RODRIGUEZ, M.E. CRUZ and M.A. CERBON, *Life Sci.* **62** 1153-1159 (1998).
24. J.O. WHITE, S. THROWER and L. LIM, *Biochem. J.* **172** 37-47 (1978).
25. M. SUZUKI, M. NISHIHARA and M. TAKAHASHI, *Endocr. J.* **42** 789-796 (1995).
26. P.J. SHUGHRUE, C.D. BUSHNELL and D.M. DORSA, *Endocrinology* **131** 381-388 (1992).
27. R.B. SIMERLY, A.M. CARR, M.C. ZEE and D. LORANG, *J. Neuroendocrinol.* **8** 45-56 (1996).
28. R.B. SIMERLY, B.J. YOUNG and A.M. CARR, *Mol. Brain Res.* **40** 275-284 (1996).
29. E. CATTANEO and A. MAGGI, *Eur. J. Pharmacol.* **188** 153-159 (1990).
30. G.J. KUIPER, B. CARLSSON, K. GRANDIEN, E. ENMARK, J. HAGBLAD, S. NILSSON and J.A. GUSTAFSSON, *Endocrinology* **138** 863-870 (1997).

PROGESTERONE RECEPTOR ISOFORMS EXPRESSION IN THE PREPUBERAL AND ADULT MALE RAT BRAIN

**Christian Guerra-Araiza, Andrea Reyna-Neyra, Ana María Salazar, Marco
Antonio Cerbón, Sumiko Morimoto and Ignacio Camacho-Arroyo.**

Brain Research Bulletin. 2001;54:13-7.

Progesterone receptor isoforms expression in the prepuberal and adult male rat brain

Christian Guerra-Araiza,¹ Andrea Reyna-Neyra,¹ Ana María Salazar,² Marco Antonio Cerbón,¹ Sumiko Morimoto³ and Ignacio Camacho-Arroyo^{1*}

¹Departamento de Biología, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Mexico; ²Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; and ³Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición, Mexico City, México

[Received 20 June 2000; Revised 4 September 2000; Accepted 12 September 2000]

ABSTRACT: Progesterone receptor (PR) isoforms expression was determined in several regions of the prepuberal and adult male rat brain by using reverse transcription coupled to polymerase chain reaction. Rats under a 14:10-h light-dark cycle, with lights on at 0600 h were used. We found that in the hypothalamus of prepuberal animals the expression of both PR isoforms was similar, whereas PR-A expression was higher than that of PR-B in adults. In the cerebellum PR-B expression was predominant in both prepuberal and adult rats. In both ages PR-A and PR-B exhibited a non-significant tendency to be predominant in the hippocampus and the preoptic area respectively. In the frontal cortex and the olfactory bulb PR isoforms were expressed at a similar level. These results indicate a differential expression pattern of PR isoforms in the male rat brain and suggest that the tissue-specific expression of PR-A and PR-B is important for the appropriate response of each cerebral region to progesterone. © 2001 Elsevier Science Inc.

KEY WORDS: Progesterone receptor isoforms, Male rat brain, Hypothalamus, Preoptic area, Hippocampus, Olfactory bulb.

INTRODUCTION

Progesterone (P4) exerts a number of effects on the central nervous system of mammals [2,4]. Most P4 actions are mediated by intracellular progesterone receptors (PR) [4,12]. The rat PR is expressed as two isoforms: a full-length form (PR-B, 110 KDa) and the N-terminally truncated one (PR-A, 86 KDa) [16]. Both PR isoforms are derived from a single gene and are generated from either alternative transcriptional or translational start sites [10,18]. PR isoforms expression ratio varies among target tissues [1] and under different hormonal conditions such as those presented during the menstrual cycle [22], suggesting that the differential expression of PR isoforms is critical for appropriate cellular responses to P4 [23]. It has also been shown that PR isoforms are functionally distinct in terms of their ability to activate different target genes in the same cell [31].

Sex differences in rodent brain have been reported in relation to the actions regulated by P4 such as: sexual behavior display [3,27],

anxiolytic effects [26], somatostatin distribution [11] and oxytocin [9] receptors content. Indeed, both the expression and regulation of PR in the brain of fetuses [35] and adults [20,21,30] is sexually dimorphic.

We have recently reported a differential regulation of PR isoforms in the forebrain of ovariectomized rats treated with estradiol (E2) and P4 [7] and in intact females during the estrous cycle [13]. However, the expression pattern of PR isoforms in the brain of males is unknown. Therefore, we studied PR isoforms gene expression in several regions of the prepuberal and adult male rat brain by using the sensitive combined method of reverse transcription coupled to polymerase chain reaction (PCR).

MATERIALS AND METHODS

Reagents

All reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and Gibco-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD, USA). Taq DNA polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Branchburg, NJ, USA).

Animals

Five prepuberal (3 weeks old) and 5 adult male (12 weeks old) Wistar rats maintained under a 14:10-h light-dark cycle, lights on from 0600 to 2000 h, with food and water available *ad libitum*, were used. Rats were sacrificed by decapitation at 1200 h and the cerebellum, the hypothalamus, the preoptic area, the hippocampus (subiculum, Ammon's horn and the dentate gyrus), the frontal cortex and the olfactory bulb were excised according to the atlas of Paxinos and Watson [25]. All regions were immediately processed for total RNA extraction.

Total RNA Extraction and Reverse Transcriptase PCR

Total RNA was isolated from each region with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent (Gibco-BRL, Inc) [8]. RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity

* Address for correspondence: Dr. Ignacio Camacho-Arroyo, Facultad de Química, Departamento de Biología, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D. F. Mexico. Fax: +525-616-20-10; E-mail: igcar@servidor.unam.mx

was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA as previously described [5]. Ten microliters of reverse transcriptase (RT) reaction were subjected to PCR in order to simultaneously amplify PR gene isoforms, and the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. This was used as an internal control. The sequences of the specific primers unique for PR-B amplification segment (from +4 to +247) were 5'-[ACT GAG CTG CAG GCA AAG]-3' in the sense primer and 5'-[CGG ACA GCG ACT GCT GA]-3' in the antisense [24]. The primers used for common PR-A and PR-B amplification region (from +2229 to +2521) corresponding to the hormone binding domain were 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT G]-3' in the sense and 5'-[COC GAA TAT AGC TTG ACC TC]-3' in the antisense [24]. The 50 μ l PCR reaction included: 10 μ l of previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μ M of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. After the initial denaturation step at 95°C for 5 min, PCR reaction was performed for 25 cycles. The cycle profile for PR and GAPDH genes amplification was: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; and 72°C, 1 min. A final extension cycle was performed at 72°C for 5 min. The number of performed cycles was within the exponential phase of the amplification process. All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. 25 μ l of PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The image was captured under an ultraviolet transilluminator with a Type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA, USA). The intensity of PR or GAPDH bands was quantified by densitometry using a Scan jet 3C apparatus (Hewlett Packard). PR isoforms expression level was normalized to that of GAPDH. PR-A expression level was obtained by subtracting the intensity of the common signal of PR-A/B amplification product minus the intensity of PR-B amplification signal.

Radioimmunoassay for E2 and P4 and Testosterone

Serum E2, P4 and testosterone (T) levels were measured as previously described [6]. The intra- and inter-assay coefficients of variations were 7.8 and 11.3% for E2; 7.6 and 6.5% for P4; and 4.88 and 10.17% for T, respectively.

Statistical Analysis

Data were analyzed by using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's *t*-test. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA, USA) was used for calculating probability values.

RESULTS

In all amplifications single bands of 293, 244 and 453 bp corresponding to the expected size fragments of PR-A+B, PR-B and GAPDH were obtained (Fig. 1). No bands were observed in the negative controls. The identity of each PCR product was confirmed by nucleotide sequencing (data not shown).

In the olfactory bulb, the frontal cortex, the preoptic area, the hippocampus and the cerebellum, PR total expression was similar in both prepuberal and adult rats, whereas in the hypothalamus of adult rats PR total expression was significantly higher than that of prepuberal animals (Figs. 2 and 3).

A differential expression pattern of PR isoforms was observed in the male rat brain. In the hypothalamus of prepuberal animals the expression of PR isoforms was similar, whereas PR-A expression was higher than that of PR-B in adults (Fig. 2A). PR-B

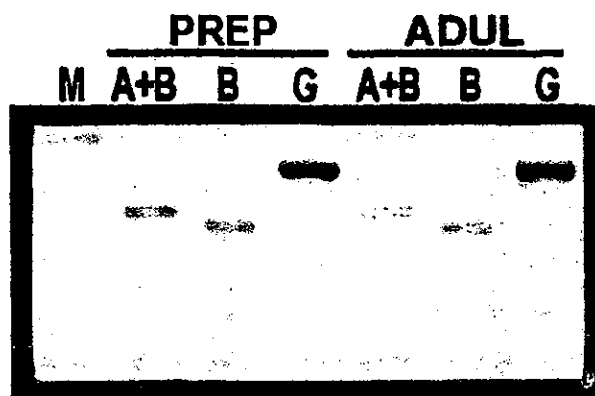


FIG. 1. Progesterone receptor isoforms expression in the cerebellum of the prepuberal and adult male rat. A representative assay of a simultaneous PR A+B (A+B), PR-B (B) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G) reverse transcriptase-polymerase chain reaction from total RNA of the cerebellum of prepuberal (PREP) and adult (ADUL) rats is shown. (M) Molecular weight marker of 100 bp DNA ladder.

presented a tendency to be predominant in the preoptic area of both prepuberal and adult rats (Fig. 2B). In the cerebellum PR-B expression was markedly higher than that of PR-A in both ages (Fig. 2C). In contrast, in the hippocampus PR-A expression was slightly higher than that of PR-B (Fig. 3A). In the frontal cortex (Fig. 3B) and the olfactory bulb (Fig. 3C) PR isoforms were expressed at a similar level in both prepuberal and adult rats. Serum E2 and T levels of adult male rats were higher than that of prepuberal rats (Table 1).

DISCUSSION

Our results demonstrate that PR isoforms are differentially expressed in several regions of the male rat brain. Although PR gene expression has been reported in the hypothalamus and the preoptic area of male rats [20,21,27], this is the first evidence concerning the expression of each PR isoform in the male rat brain. We found that both isoforms are expressed in the cerebellum, the hippocampus, the hypothalamus, the preoptic area, the frontal cortex and the olfactory bulb in both prepuberal and adult rats.

These results are in agreement with our previous results which indicate the presence of both isoforms in most of these regions in female rats [7,13]. PR isoforms expression in the cerebellum and the olfactory bulb had not been previously assessed. In the hypothalamus of prepuberal rats, the expression of both PR isoforms was similar whereas PR-A expression was markedly higher than that of PR-B in adult rats (Fig. 2A).

These results are in contrast with our previous observation that PR-B expression prevailed over PR-A in the hypothalamus of both ovariectomized [7] and intact female adult rats during the estrus cycle [13]. Interestingly, it has been demonstrated that E2 increases the expression of both PR isoforms in female hypothalamus [7], whereas no significant changes have been observed in PR expression in the hypothalamus of male rats [20,21].

These sex differences in the regulation of PR expression by E2, could be caused by the different distribution and regulation of PR isoforms expression in this tissue between female and male rats. PR-A expression could be induced by high E2 levels present in adults and not in prepuberal rats (Table 1) through the interaction with its nuclear receptor (ER) [7]. Whether PR-A isoform exerts a

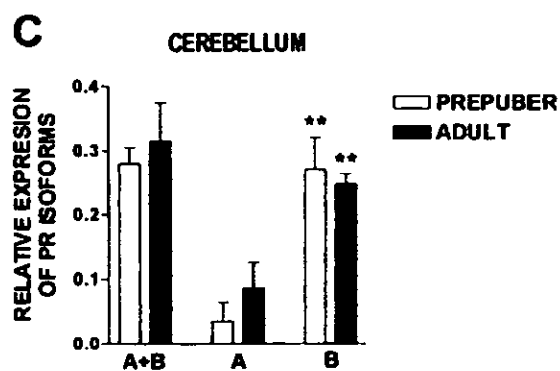
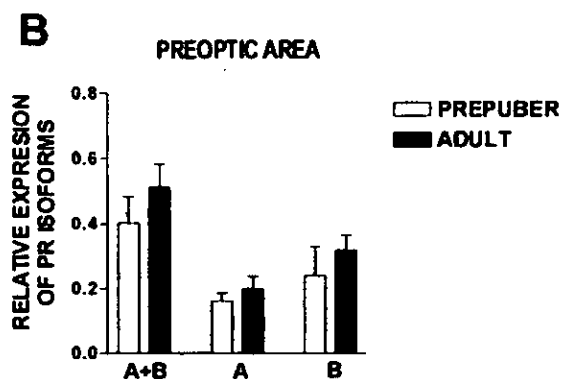
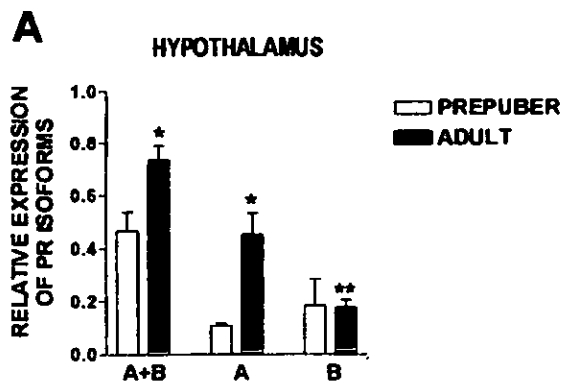


FIG. 2. Densitometric analysis of progesterone receptor (PR) isoforms gene expression in the hypothalamus, the preoptic area and the cerebellum of the prepuber and adult male rat. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using total RNA isolated from (A) hypothalamus, (B) preoptic area and (C) cerebellum of prepuber and adult rats. PCR products were quantified by densitometry and corrected for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase values. Results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 5$). * $p < 0.05$ compared with prepuber animals. ** $p < 0.05$ vs. PR-A.

repressor role upon ER and PR-B transcriptional activity in the rat hypothalamus as it has been observed in other systems [34] deserves further investigation.

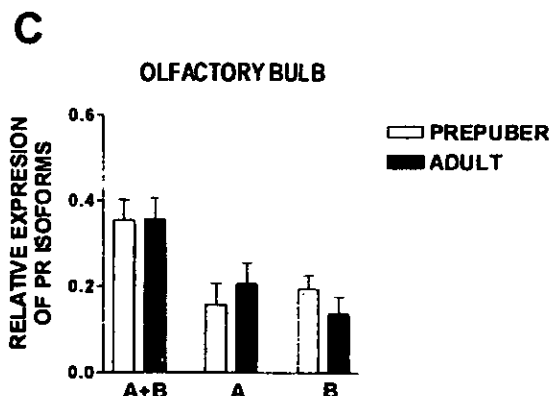
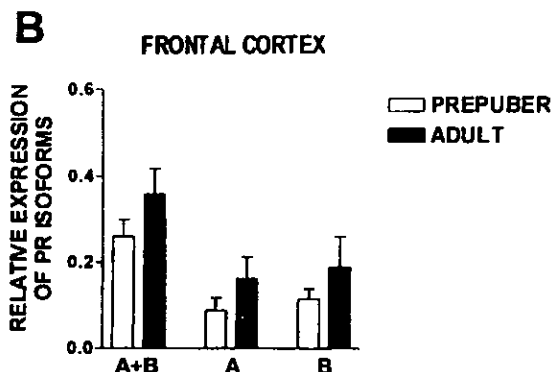
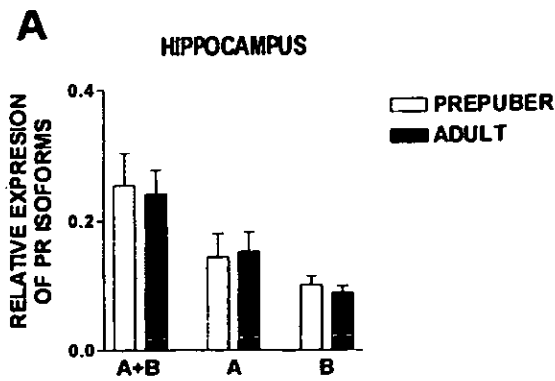


FIG. 3. Densitometric analysis of progesterone receptor isoforms gene expression in the hippocampus, the frontal cortex and the olfactory bulb of the prepuber and adult male rat. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using total RNA isolated from (A) hippocampus, (B) frontal cortex and (C) olfactory bulb of prepuber and adult rats. PCR products were quantified by densitometry and corrected for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase values. Results are expressed as the mean \pm SEM ($n = 5$).

We found that in the preoptic area PR-B expression presented a tendency to be predominant in both prepuber and adult rats (Fig. 2B). This is similar to our result that PR-B expression was higher than that of PR-A in both ovariectomized and intact adult

TABLE 1
SEX STEROIDS LEVELS IN PREPUBERAL AND ADULT MALE RATS

Steroid	Prepuberal	Adult
Testosterone (ng/ml)	0.20 ± 0.01	0.71 ± 0.15*
Estradiol (pg/ml)	38.31 ± 0.81	56.33 ± 5.84*
Progesterone (ng/ml)	0.32 ± 0.08	0.50 ± 0.10

Steroid levels were determined by radioimmunoassay. Data are expressed as the mean ± SEM of five animals/group. **p* < 0.05 as compared to prepuberal rats.

rats during the estrous cycle [7,13]. In this tissue, sex steroid levels may not have influence on the expression of PR-B in males, since this expression is similar in both prepuberal and adult rats in spite of the higher levels of E2 found in adult animals (Table 1).

Kato et al. have reported that in the hypothalamus-preoptic area of female rats during the first week of birth PR-B expression prevails over PR-A, but after this period (days 8–12) PR-A expression prevails [19]. We found that in the preoptic area of 3-week-old prepuberal rats PR-B expression was slightly higher than that of PR-A and this ratio continues until adulthood. This result suggests that there is an age and sex-dependent fluctuation of PR isoforms expression in the preoptic area of the rat.

The different distribution and regulation of PR isoforms in the hypothalamus and the preoptic area of female and male rats play an important role in sex differences observed in relation to the actions regulated by P4 such as sexual behavior display [3,27], anxiolytic effects [26], somatostatin distribution [11] and oxytocin receptors content [9].

In the hippocampus, we observed that PR-A expression exhibited a tendency to be higher than PR-B in both prepuberal and adult rats (Fig. 3A). Interestingly, in ovariectomized rats treated with E2 only PR-A expression was increased in this tissue [7]. It has been reported that P4 down-regulates gonadotropin release hormone receptor gene (GnRHR) in CA1 and CA3 regions as well as in the dentate gyrus of hippocampal formation in ovariectomized rats [17]. The prevailing expression of PR-A isoform in male rat hippocampus and the fact that in ovariectomized female rats E2 induces only PR-A expression [7] suggests that GnRHR regulation by P4 should be mediated by PR-A.

In the frontal cortex (Fig. 3B) PR-A and PR-B were expressed at similar levels in both prepuberal and adult rats. This expression pattern was different from the one that we observed in intact female rats during the estrus cycle, where PR-B isoform expression was higher than that of PR-A [13].

We observed that in the cerebellum (Fig. 2C) PR-B expression was predominant in both prepuberal and adult rats. This is in contrast with PR-A predominance observed in adult female rats during diestrus day [19]. PR-B expression in the cerebellum of male rats could be regulated by ER β isoform since it is the only ER isoform expressed in this tissue [28]. The expression and activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, an enzyme that synthesizes P4 from pregnenolone, as well as high levels of P4 have been found in the cerebellum of adult rats and during neonatal development [33]. Thus, it is possible that PR mediate actions in the same cells that produce P4 in the cerebellum. In this tissue, P4 through its interaction with PR-B could participate in mediating N-methyl-D-aspartate responses and in the regulation of learning and memory [29,32].

We observed that in the olfactory bulb (Fig. 3C) PR isoforms were expressed at a similar level in both prepuberal and adult rats. This is the first known evidence of PR isoforms expression in this

tissue. This expression pattern is similar to that observed in the male cerebral cortex (Fig. 3B). It has been reported that the olfactory bulb plays an important role in male sexual behaviour display [15] and that is a key tissue in the sexual response mediated by pheromones in both males and females [14]. Thus, P4 could mediate male sexual behavior by interacting with both PR isoforms located in the olfactory bulb.

In conclusion, the expression of PR isoforms in the male rat brain exhibits a differential pattern suggesting that the tissue-specific expression of PR-A and PR-B is important for the appropriate response of each cerebral region to P4. Besides, PR isoforms expression pattern in several regions of the male rat brain is different to that previously reported in females suggesting that this difference contributes to the sexually dimorphic effects of progesterone in the rat brain.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (grant no. 103322). Christian Guerra-Araiza and Andrea Reyna-Neyra received financial support from Conacyt. We thank Julia Segura for her assistance in the manuscript and Flora Garcia-Formenti from Centro de Estudio de Lenguas Extranjeras, UNAM for the revision of the English manuscript.

REFERENCES

- Bethza, C. L.; Widmann, A. A. Differential expression of progesterone receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques. *Endocrinology* 139:677–687; 1998.
- Beyer, C.; González-Mariscal, G. Hormones, reproduction, growth and development. New York: Raven Press; 1991:199–208.
- Blaustein, D. J.; Ryer, L. H.; Feder, H. A sex difference in the progesterone receptor system of guinea pig brain. *Neuroendocrinology* 31:403–409; 1980.
- Camacho-Arroyo, I.; Pasapera, A. M.; Perez-Palacios, G.; Cerbón, M. A. Progesterone and its metabolites in the functions of the central nervous system. *Rev. Invest. Clin.* 47:329–340; 1995.
- Camacho-Arroyo, I.; Pasapera, A. M.; Cerbón, M. A. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci. Lett.* 214:25–28; 1996.
- Camacho-Arroyo, I.; Guerra-Araiza, C.; Domínguez, R.; Mendoza-Rodríguez, C. A.; Cruz, M. E.; Cerbón, M. A. *c-fos* expression pattern in the hypothalamus and the preoptic area of the rat during proestrus. *Life Sci.* 62:1153–1159; 1998.
- Camacho-Arroyo, I.; Guerra-Araiza, C.; Cerbón, M. A. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9:3993–3996; 1998.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156–159; 1987.
- Coirini, H.; Johnson, A. E.; Schumacher, M.; McEwen, B. S. Sex differences in the regulation of oxytocin receptors by ovarian steroids in the ventromedial hypothalamus of the rat. *Neuroendocrinology* 55:269–275; 1992.
- Conneely, O. M.; Maxwell, B. L.; Toft, D. O.; Schrader, W. L.; O'Malley, B. W. The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149:493–501; 1987.
- Dufourmy, L.; Warenbourg, M. Colocalization of progesterone receptor and somatostatin immunoreactivities in the hypothalamus of the male and female guinea pig. *Neuroendocrinology* 64:215–224; 1996.
- Graham, J. D.; Clarke, C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18:502–519; 1997.
- Guerra-Araiza, C.; Cerbón, M. A.; Morimoto, S.; Camacho-Arroyo, I. Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci.* 66:1743–1752; 2000.
- Haltem, H. A.; Cherry, J. A.; Baum, M. J. Vomeronasal neuroepithe-

- lium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J. Neurobiol.* 39:249-263; 1999.
15. Hart, B. L.; Leedy, M. G. Reproduction neurological bases of male sexual behavior. A comparative analysis. In: Alder, N.; Paff, D.; Goy, R., eds. *Handbook of behavioral neurobiology*, vol. 7. New York: Plenum Press; 1985:373-422.
 16. Illenckuk, T. T.; Walters, M. R. Rat uterine progesterone receptor analyzed by [³H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology* 120:1449-1456; 1997.
 17. Jenmes, L.; Brane, B.; Centers, A.; Janovick, J. A.; Conn, P. M. Regulation of hippocampal gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor mRNA and GnRH-stimulated inositol phosphate production by gonadal steroid hormones. *Mol. Brain Res.* 33:104-110; 1995.
 18. 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 receptors forms A and B. *EMBO J.* 9:1603-1614; 1990.
 19. Kato, J.; Hirata, S.; Nozawa, A.; Yamada-Mouri, N. Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm. Behav.* 28:454-463; 1994.
 20. Lauber, A. H.; Romano, G. J.; Pfaff, D. W. Gene expression for estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat brain and possible relations to sexually dimorphic functions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40:53-62; 1991.
 21. Lauber, A. H.; Romano, G. J.; Pfaff, D. W. Sex difference in estradiol regulation of progesterone receptor mRNA in rat mediobasal hypothalamus as demonstrated by in situ hybridization. *Neuroendocrinology* 53: 608-613; 1991.
 22. Mangal, R. K.; Wiehle, R. D.; Poindexter, A. N. III; Wiegel, N. L. Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 63:195-202; 1997.
 23. McDonnell, D. P. Unraveling the human progesterone receptor signal transduction pathway: Insights into anti-progesterone action. *Trends Endocrinol. Metab.* 6:133-138; 1995.
 24. Park-Sarge, O. K.; Mayo, K. E. Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134:709-718; 1994.
 25. Paxinos, G.; Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press; 1986.
 26. Rodriguez-Sierra, F. J.; Hagley, T. M.; Hendricks, E. S. Anxiolytic effects of progesterone are sexually dimorphic. *Life Sci.* 38:1841-1845; 1986.
 27. Samama, B.; Aron, C. L. Induction of progesterone receptor in the mediobasal hypothalamus of gonadally intact male rats primed with estrogen in relation to display of lordosis behaviour. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39:215-220; 1991.
 28. Shughrue, P. J.; Lane, M.; Merchenthaler, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388:507-525; 1997.
 29. Smith, S. S. Progesterone administration attenuates excitatory aminoacid responses of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 42:309-320; 1991.
 30. Thornton, J. E.; Nock, B.; Feder, H.; McEwen, B. Sex differences in cytosolic progesterone receptors in the microdissected regions of the hypothalamus/preoptic area of guinea pigs. *Brain Res.* 503:253-257; 1989.
 31. Tora, L.; Gronemeyer, H.; Turcotte, B.; Gaub, M. P.; Chambon, P. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333:185-188; 1988.
 32. Tsutsui, K.; Ukena, K.; Usui, M.; Sakamoto, H.; Takase, M. Novel brain function: Biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci. Res.* 36:261-273; 2000.
 33. Ukena, K.; Kohchi, C.; Tsutsui, K. Expression and activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology* 140:805-813; 1999.
 34. Vegeto, E.; Shahbaz, M.; Wen, X.; Goldman, M.; O'Malley, B.; McDonnell, D. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7:1244-1255; 1993.
 35. Wagner, C. K.; Nakayama, Y. A.; De Vries, J. G. Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology* 139:3658-3661; 1998.

SEX DIFFERENCES IN THE REGULATION OF PROGESTERONE RECEPTOR ISOFORMS EXPRESSION IN THE RAT BRAIN

Christian Guerra-Araiza, Angélica Coyoy-Salgado and Ignacio Camacho-Arroyo.

Molecular and Cellular Endocrinology. Enviado.

SEX DIFFERENCES IN THE REGULATION OF PROGESTERONE RECEPTOR
ISOFORMS EXPRESSION IN THE RAT BRAIN

Christian Guerra-Araiza, Angélica Coyoy-Salgado and Ignacio Camacho-Arroyo.

Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de
México, México, D. F. MEXICO

Running head: progesterone receptor isoforms expression

Corresponding author:

Dr. Ignacio Camacho-Arroyo
Facultad de Química,
Ciudad Universitaria,
Coyoacán 04510, México D. F. MEXICO

Tel: (525) 622 30 98

Fax: (525) 616 20 10

e-mail: neurobiol@correo.unam.mx

ABSTRACT

We studied the effects of estradiol (E2) and progesterone (P4) on progesterone receptor (PR) isoforms gene expression in the brain of ovariectomized female and gonadectomized male rats by RT-PCR analysis. In female rats the expression of both PR isoforms was induced by E2 and down-regulated by P4 in the hypothalamus, whereas in the preoptic area these changes were only observed in PR-B isoform. On the contrary, in the hippocampus and the olfactory bulb, PR-A was the isoform induced by E2. In these regions P4 did not modify the expression of any PR isoform. In the cerebellum and the frontal cortex of female rats no treatment modified PR isoforms expression. In contrast with female rats, in the male rat brain, PR isoforms expression after steroids treatment was only modified in the cerebellum where PR-A was induced by E2. These results demonstrate a clear sexual dimorphism in the regulation of PR isoforms expression by sex steroid hormones in the rat brain, suggesting that this sex difference contributes to the sexually dimorphic effects of P4 in the rat brain.

Key Words: progesterone receptor; progesterone, estradiol, hypothalamus, preoptic area, hippocampus

1. Introduction

Progesterone (P4) regulates several functions of the central nervous system (CNS) of mammals (Levine et al. 2001, Camacho-Arroyo et al. 1995) through the interaction with its nuclear progesterone receptors (PR) (Levine et al. 2001, Schumacher et al. 1999). The rat PR is expressed as two isoforms: a full-length form (PR-B, 110 KDa) and the N-terminally truncated one (PR-A, 86 KDa) (Illenchuk and Walters 1997). Both PR isoforms are derived from a single gene and are generated from either alternative transcriptional or translational start sites (Conneely et al. 1987, Kastner et al. 1990).

PR isoforms expression ratio varies in different brain regions (Kato et al. 1994, Camacho-Arroyo et al. 1998) and under different hormonal conditions such as those presented during the estrous cycle or after sexual maturity (Guerra-Araiza et al. 2000, Guerra-Araiza et al. 2001). It has also been shown that PR isoforms are functionally distinct in terms of their ability to activate different target genes in the same cell (Conneely et al. 2001, Mulac-Jericevic et al. 2000).

Sex differences have been reported in relation to the actions regulated by P4 in the CNS such as: sexual behaviour display (Blaustein et al. 1980, Samama and Aron 1991), anxiolytic effects (Rodriguez-Sierra et al. 1986) somatostatin distribution (Dufourny and Warenbourg 1996) and oxytocin (Coirini et al. 1992) receptors content. Interestingly, the expression and regulation of PR in the rodent brain of fetuses (Wagner et al. 1998, Wagner et al. 2001) and adults (Lauber et al. 1991) are sexually dimorphic.

We have recently reported a differential PR isoforms expression pattern in the male rat brain in comparison to that observed in the female rat brain (Guerra-Araiza et al. 2000, Guerra-Araiza et al. 2001). However, it is unknown if a differential hormonal regulation of PR isoforms exists between the male and the female rat brain. Therefore, we studied PR isoforms gene expression in several regions of the ovariectomized female and the gonadectomized male rat brain by using the sensitive combined method of reverse transcription (RT) coupled to polymerase chain reaction (PCR).

2. Materials and methods

2.1. Reagents

All reagents were purchased from Sigma Chemical Corp. (St. Louis, MO) and Gibco-BRL, Inc. (Gaithersburg, MD). Taq DNA polymerase was purchased from Perkin-Elmer (Branchburg, New Jersey).

2.2. Animals

Adult female and male Wistar rats (230-260 g) maintained under a 12:12 h light:dark cycle, lights on from 06:00 to 18:00, with food and water available ad libitum were used. All the animals were castrated under ketamine (Galen, S. A. Mexico) anesthesia (80 mg/kg). Two weeks later male and female rats were randomly assigned to the following s.c. treatments: (1) daily administration of vehicle (corn oil) alone for 2 days, (2) E2 (5 µg/100 g) for 2 days, (3) the above described administration of E2 followed by P4 (400 µg/100 g) on day 3, and only in

male rats (4) testosterone (T) (100 µg/100 g) for 2 days. Twenty-four hours after the last dose the olfactory bulb, the frontal cortex, the hypothalamus, the preoptic area, the hippocampus and the cerebellum were excised according to the Atlas of Paxinos and Watson (Paxinos and Watson 1986). The entire dorsal and ventral hippocampal formation (subiculum, Ammon's horn and the dentate gyrus) was analyzed as a whole. All regions were immediately processed for total RNA extraction. All experiments were performed in quintuplicate.

2.3. Total RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated from each region with the single-step method based on guanidine isothiocyanate/phenol/chloroform extraction using TRIzol reagent (Gibco-BRL, Inc) (Chomczynski and Sacchi 1987). RNA concentration was determined by absorbance at 260 nm and its integrity was verified by electrophoresis on 1.1% denaturing agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde. Total RNA was reverse transcribed to synthesize single strand cDNA as previously described (Camacho-Arroyo et al. 1996). Ten µl of RT reaction were subjected to PCR in order to simultaneously amplify PR gene isoforms, and the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene. This was used as an internal control. The sequences of the specific primers unique for PR-B amplification segment (from +4 to +247) were 5'-[ACT GAG CTG CAG GCA AAG]-3' in the sense primer and 5'-[CGG ACA GCG ACT GCT GA]-3' in the antisense (Park-Sarge and Mayo 1994). The primers used for common PR-A and PR-B amplification region (from +2229 to +2521) corresponding to the hormone binding domain were 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT G]-3' in the sense and 5'-[CCC

GAA TAT AGC TTG ACC TC]-3' in the antisense (Park-Sarge and Mayo 1994). The 50 μ l PCR reaction included: 10 μ l of previously synthesized cDNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 μ M of each primer, and 2.5 units of Taq DNA polymerase. Negative controls without RNA and with non-retrotranscribed RNA were included in all the experiments. After the initial denaturation step at 95°C for 5 min, PCR reaction was performed for 25 cycles. The cycle profile for PR and GAPDH genes amplification was: 95°C, 1 min; 60°C, 1 min; and 72°C, 1 min. A final extension cycle was performed at 72°C for 5 min. The number of performed cycles was within the exponential phase of the amplification process. All PCR products were always studied and analyzed together throughout the experiments. 25 μ l of PCR products were separated on 2% agarose gel and stained with ethidium bromide. The image was captured under a UV transilluminator with a Type 665 negative film (Polaroid Co., Cambridge, MA). The intensity of PR or GAPDH bands was quantified by densitometry using a Scan jet 3C apparatus (Hewlett Packard). PR isoforms expression level was normalized to that of GAPDH. PR-A expression level was obtained by subtracting the intensity of the common signal of PR-A/B amplification product minus the intensity of PR-B amplification signal.

2.4. Statistical analysis

Data were analyzed by using a one way analysis of variance (ANOVA) followed by a Student's t-test. Prism 2.01 program (Graph Pad, CA) was used for calculating probability values.

3.Results

3.1 RT-PCR.

In all amplifications single bands of 293, 244 and 453 bp corresponding to the expected size fragments of PR-A+B, PR-B and GAPDH were obtained (Fig 1). No bands were observed in the negative controls. The identity of each PCR product was confirmed by nucleotide sequencing (data not shown).

In the hypothalamus, the preoptic area, the hippocampus and the olfactory bulb of the female rat total PR expression was induced by E2 treatment whereas in these brain regions of the male rat PR expression was not induced by E2 (Figs. 2 and 3). In the frontal cortex of both sexes there were no E2 effects. In the cerebellum of the male rat, total PR expression was induced by E2 and T treatments (Fig. 3D), whereas no induction was observed in the cerebellum of the female rat after E2 treatment (Fig. 3C).

We observed that in the hypothalamus of the female rat the expression of both PR isoforms was induced by E2 and down-regulated by P4 (Fig. 2A). In the preoptic area these changes were only observed in PR-B isoform (Fig. 2C). In contrast, in the hippocampus and the olfactory bulb PR induction by E2 was only observed in PR-A (Fig. 3A and 3E). In these regions P4 did not modify the expression of any PR isoform, whereas in the frontal cortex and the cerebellum of the female rat no treatment modified PR isoforms expression (Figs. 2E and 3C). In contrast with the observations made in the female rat brain, in the hypothalamus, the preoptic area, the hippocampus, the frontal cortex and the olfactory bulb of male rats E2 and P4 did not modify the expression of any isoform (Figs 2 and 3).

Interestingly, in the cerebellum of the male rat PR induction by E2 was only observed in PR-A (Fig. 3D).

4. Discussion

Our results demonstrate that PR isoforms expression is differentially regulated by E2 and P4 in several regions of the male and female rat brain. Although the regulation of PR isoforms expression has been reported in the hypothalamus, the preoptic area and the hippocampus of ovariectomized female rats (Camacho-Arroyo et al. 1998), as well as the expression pattern in intact prepuberal and adult male rat brain (Guerra-Araiza et al. 2001), this is the first evidence concerning the regulation of expression of each PR isoform by E2 and P4 in the gonadectomized male rat brain as well as in the frontal cortex, the olfactory bulb and the cerebellum of the ovariectomized female rat. We found that both isoforms are expressed in the cerebellum, the hippocampus, the hypothalamus, the preoptic area, the frontal cortex and the olfactory bulb in both male and female rats (Figs 2 and 3).

These results are in agreement with our previous results which indicate the presence of both PR isoforms in most of these regions in both male and female rats (Camacho-Arroyo et al. 1998, Guerra-Araiza et al 2000, Guerra-Araiza et al. 2001). Regulation of PR isoforms expression by E2 and P4 in the cerebellum, the olfactory bulb and the frontal cortex of female rats had not been previously assessed.

PR isoforms regulation by sex steroid hormones in the olfactory bulb was similar to that of the hippocampus: only PR-A expression was induced by E2 and

the treatment with P4 did not modify this induction (Fig 3E). These results suggest that the regulatory system of PR-A by E2 and P4 in both tissues is similar, and that this isoform should participate in the olfactory mechanism needed in the female sexual behaviour display (Dudley and Moss 1994).

In contrast with these tissues, in the frontal cortex and the cerebellum of ovariectomized female rats, the treatment with E2 and P4 did not modify the expression of any PR isoform (Figs 2E and 3C respectively). Interestingly, we observed the same regulation pattern in the frontal cortex of gonadectomized male rats (Fig 2F). These results are in agreement with a previous work by Kato et al., who have reported a PR insensitivity to steroid hormone regulation in some regions such as the cerebral cortex of the female rat. This has been associated to an imperfect estrogen responsive element located around ATG site of the rat PR-B isoform (Kato et al. 1994).

The different distribution and regulation of PR isoforms in the hypothalamus and the preoptic area of female and male rat play an important role in sex differences observed in relation to the actions regulated by P4 such as sexual behaviour display (Blaustein et al. 1980, Samama and Aron 1991), anxiolytic effects (Rodriguez-Sierra et al. 1986) somatostatin distribution (Dufourny and Warenbourg 1996) and oxytocin (Coirini et al. 1992) receptors content.

In the cerebellum of the male rat, total PR expression was induced by E2 and T treatment (Fig 3D). It has been reported that T regulates PR expression in the CNS of lizards (Godwin et al. 2000). This result suggests that T should directly regulate PR expression or indirectly through its conversion to E2 by aromatase enzyme (Auger et al. 2000). PR-A was the isoform induced by E2 in the male rat

cerebellum (Fig 3D). The expression and activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, an enzyme that synthesizes P4 from pregnenolone, as well as the high levels of P4 found in the cerebellum of adult rats and during neonatal development (Ukena et al. 1999) suggest that PR-A should be participate in diverse functions in this tissue such as the development of Purkinje cells, dendritic growth and synaptogenesis (Sakamoto et al. 2001)). It has been reported that this tissue is a sensorimotor major area of the CNS that has inputs to the spinal cord, participating together in motor coordination. P4 can increase serotonin release (Lu et al. 1999) and the expression of its receptor (Gundlah et al. 1999) in the CNS. This neurotransmitter participates in cerebellum functionality (Dieudonné 2001). These results suggest that PR-A should increase serotonin release and thus participates in the motor coordination required by male during coitus.

The tissue and sex-specific differences observed in PR isoforms regulation by E2 and P4 could be related to different distribution and regulation of several transcription factors that play an important role in the regulation of PR isoforms expression. One of these factors is the estrogen receptor (ER), which binds to E2 and induces PR isoforms expression (Kastner et al 1993). The rat ER is expressed, like PR, as two isoforms denominated ER α and ER β . It also shows a tissue-specific distribution in the CNS of the rat (Shughrue 1997), as well as different gene-specific transcriptional activity (Cowley 1999). It has been reported that ER isoforms are differentially regulated by E2 in the rat hypothalamus in acute or chronic administration (Tena-Sampere 2001). These data suggest that the different distribution, transcriptional activity and regulation of ER isoforms by E2

should have an influence on the different regulation of PR isoforms by E2 and P4 between male and female rats.

Other important transcription factors that could participate in the differential regulation of PR isoforms are the specific co-activators and co-repressors of steroid receptor hormones (McKenna et al 1999). These proteins have a different distribution in the CNS of the rat (Meijer et al 2000) and one of them, the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1), is expressed as two isoforms, each with different ability to modulate the transcription induced by ER (Misiti et al.1998). It has been reported that the SRC-1 mediates the development of sex-specific brain morphology and behaviour regulated by E2 in the rat, (Auger et al 2000). All this data suggest that the different distribution, transcriptional ability and sex-specific effects should have an influence on the tissue and sex-specific regulation of PR isoforms by E2 and P4

Another mechanism involved in the regulation of PR isoforms is the methylation process in CpG islets present in the promoter region of PR gene (Kastner et al. 1990). It has been previously reported that the hypermethylation of cytosines in the promoter region of PR-B inactivates the expression of this isoform in uterine endometrium cancers (Sasaki et al. 2001). These results suggest that the different methylation pattern should modulate PR isoforms expression regulation by sex steroid hormones, although this deserves further investigation.

In conclusion, PR isoforms expression regulation by E2 and P4 in several brain regions is different between male and female rats. Our results suggest that the tissue and sex-specific expression of PR-A and PR-B is important for the

appropriate response of each cerebral region to P4 and that these differences contribute to the sexually dimorphic effects of P4 in the rat brain.

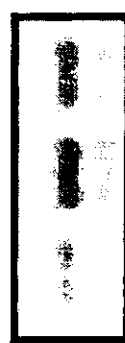
Fig. 1. PR isoforms expression in the hypothalamus of male and female rats. A representative assay of a simultaneous PR(A/B), PR-B and GAPDH RT-PCR from total RNA of the hypothalamus of ovariectomized female and gonadectomized male adult rats treated with vehicle (V), 17 β estradiol (E), E + progesterone (E+P) and only in male rats, testosterone (T). Molecular weight marker of 100 bp DNA ladder (M).

Fig. 2. Densitometric analysis of PR isoforms gene expression in the hypothalamus, the preoptic area and the frontal cortex of ovariectomized females and gonadectomized males rats. RT-PCR was performed using total RNA isolated from (A and B) hypothalamus, (C and D) preoptic area and (E and F) frontal cortex of female and male rats respectively. PCR products were quantified by densitometry and corrected for GAPDH values. Results are expressed as the mean \pm SEM (n=5). *p<0.05 compared with VEH. **p<0.05 compared with E2.

Fig. 3. Densitometric analysis of PR isoforms gene expression in the hippocampus, the cerebellum and the olfactory bulb of ovariectomized females and gonadectomized male rats. RT-PCR was performed using total RNA isolated from (A and B) hippocampus, (C and D) cerebellum (E and F) olfactory bulb of female and male rats respectively. PCR products were quantified by densitometry and corrected for GAPDH values. Results are expressed as the mean \pm SEM (n=5). *p<0.05 compared with vehicle. **p<0.05 vs PR-A.



V E EP



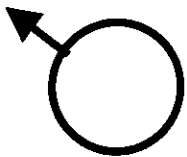
PR-A+B



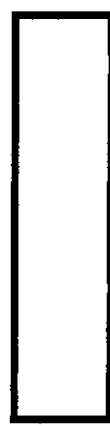
PR-B



GAPDH

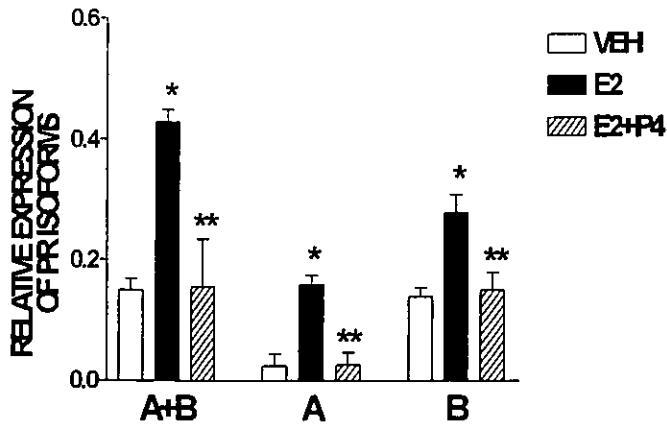


V E EP T

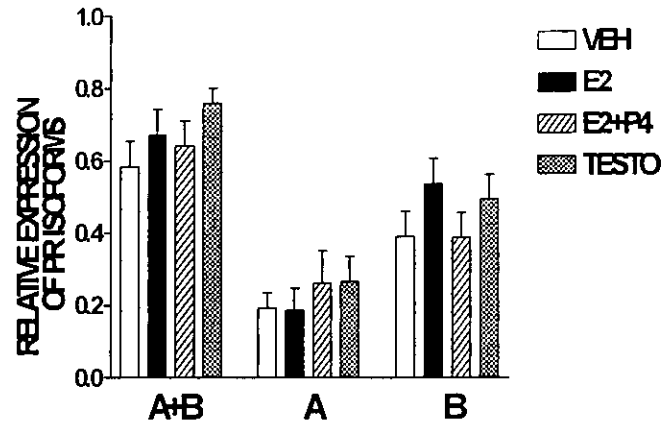




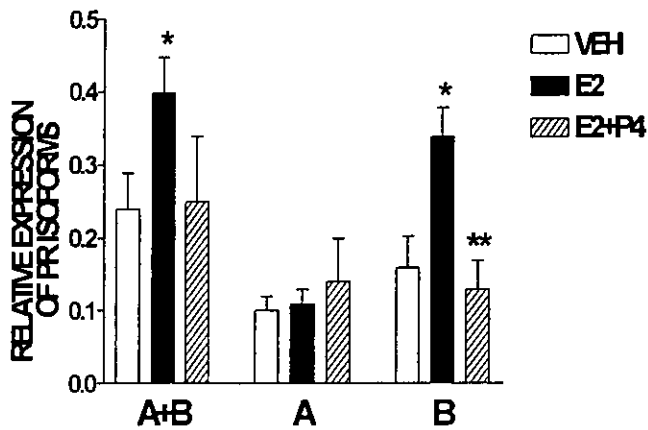
A HYPOTHALAMUS



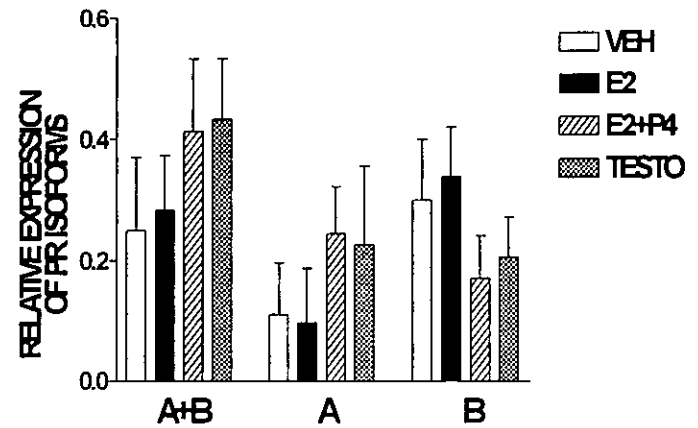
B HYPOTHALAMUS



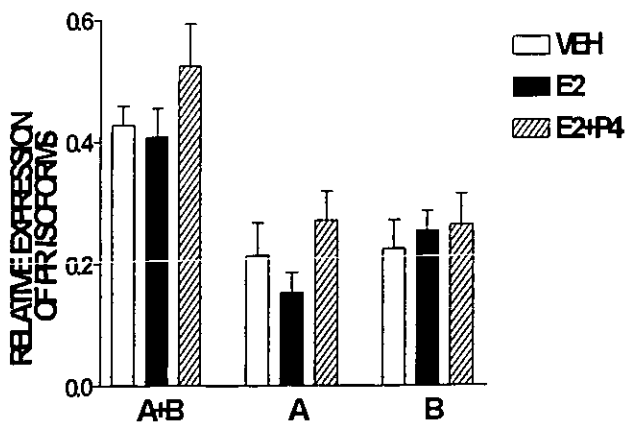
C PREOPTIC AREA



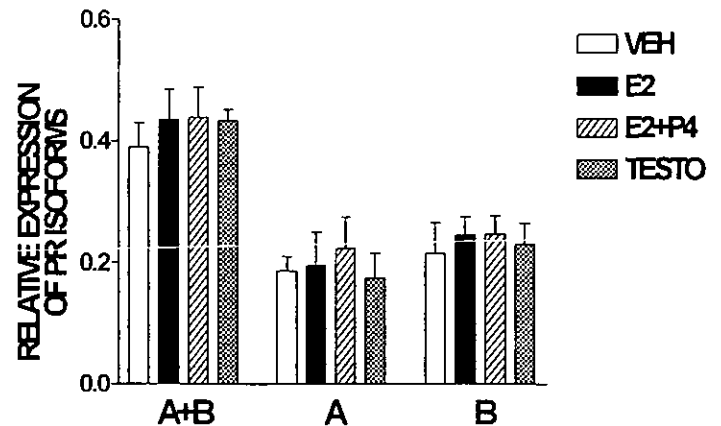
D PREOPTIC AREA

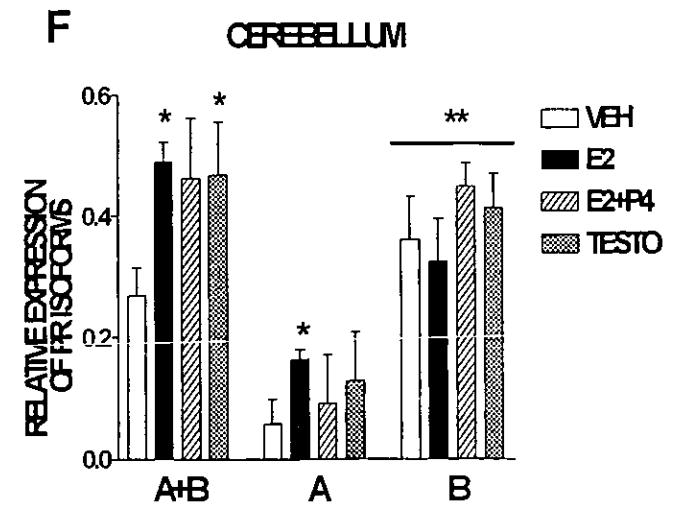
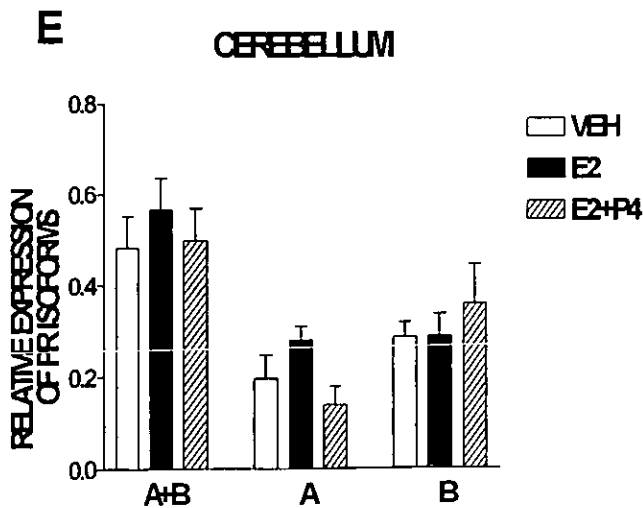
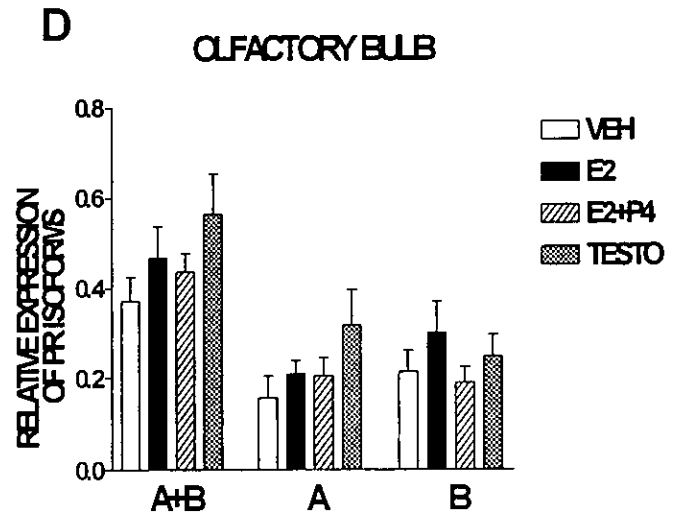
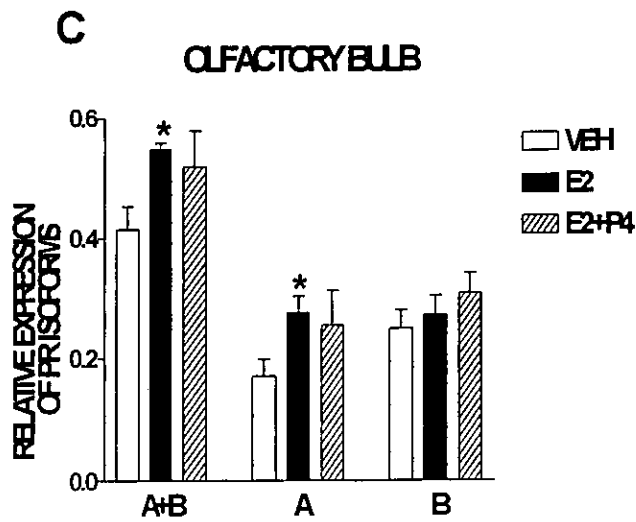
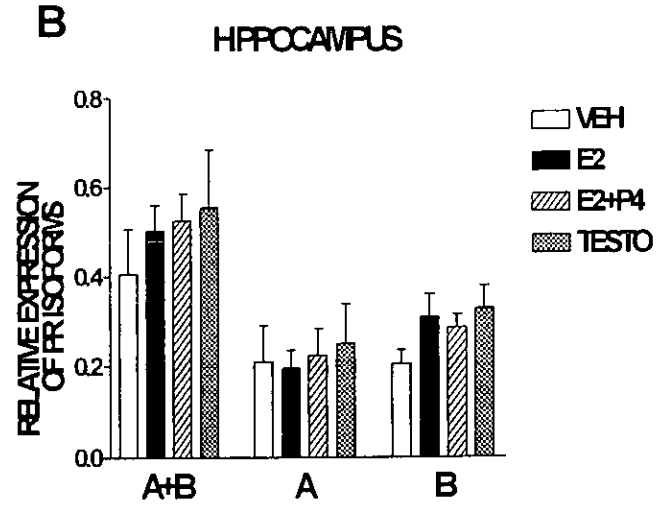
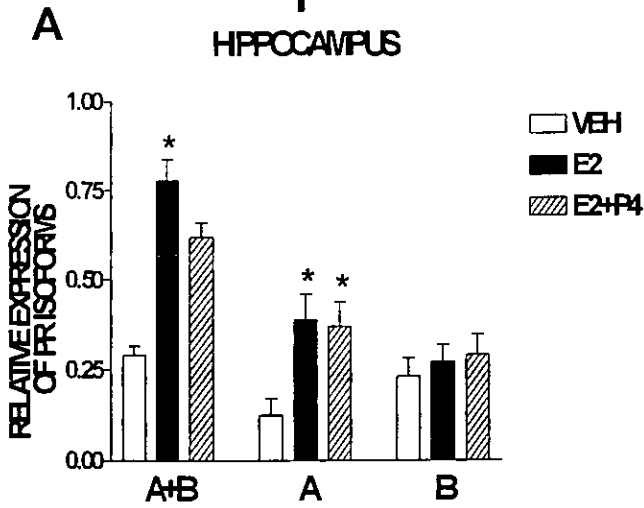


E FRONTAL CORTEX



F FRONTAL CORTEX





ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CONACyT (Grant No. 35025-N). Christian Guerra-Araiza received financial support from Conacyt. We thank Julia Segura for her assistance in the manuscript and Flora García-Formentí from CELE, UNAM for the revision of the English manuscript.

References

1. Auger A.P., Tetel M.J., McCarthy M.M., 2000. Steroid receptor coactivator –1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behaviour. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:7551-7555.
2. Blaustein, D.J., Ryer, I.H., Feder, H. A., 1980. Sex difference in the progesterin receptor system of guinea pig brain. *Neuroendocrinology.* 31:403-409.
3. Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M., Perez-Palacios, G., Cerbón, M.A., 1995. Progesterone and its metabolites in the functions of the central nervous system. *Rev. Invest. Clin.* 47:329-340.
4. Camacho-Arroyo, I., Pasapera, A.M., Cerbón, M.A., 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci. Lett.* 214:25-28.
5. Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C., Cerbon, M.A., 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport.* 9:3993-3996.
6. Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chlorophorm extraction. *Anal. Biochem.*162:156-159.
7. Coirini, H., Johnson, A.E., Schumacher, M., McEwen, B.S., 1992. Sex differences in the regulation of oxytocin receptors by ovarian steroids in the ventromedial hypothalamus of the rat. *Neuroendocrinology.* 55:269-275.
8. Conneely, O.M., Maxwell, B.L., Toft, D.O., Schrader, W.L., O'Malley, B.W., 1987. The A and B forms of the chicken progesterone receptor arise by alternate initiation of translation of a unique mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149:493-501.
9. Conneely, O.M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J.P., De Mayo, F.J., 2000. Reproductive functions of the progesterone receptors isoforms: lessons from knock-out mice. *Moll. Cell. Endocrinol.* 179:97-103. 65:571-577.
10. Cowley S.M., Parker M.G., 1999. A comparison of transcriptional activation by $E\alpha$ and $E\beta$. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 69:165-175.

11. Dieudonné S., 2001. Serotonergic neuromodulation in the cerebellar cortex: cellular, synaptic, and molecular basis. *Neuroscientist* 7:207-219.
12. Dudley C.A., Moss R.L., 1994. Lesions of the accessory olfactory bulb decrease lordotic responsiveness and reduce mating-induced c-fos expression in the accessory olfactory system. *Brain Res.* 642:29-37;
13. Dufourny, L., Warenbourg, M., 1996. Colocalization of progesterone receptor and somatostatin immunoreactivities in the hypothalamus of the male and female guinea pig. *Neuroendocrinology.* 64:215-224.
14. Guerra-Araiza, C., Cerbón, M.A., Morimoto, S., Camacho-Arroyo, I., 2000. Progesterone receptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci.* 66:1743-1752;
15. Guerra-Araiza C, Reyna-Neyra A, Morimoto, S, Salazar A.M., Cerbón M.A., Camacho-Arroyo I., 2001. Progesterone receptor isoforms expression in the male rat brain. *Brain Res. Bull.* 54:13-17;.
16. Godwin J., Hartman V., Nag P., Crews D., 2000. Androgenic regulation of steroid hormone receptor mRNAs in the brain of whiptail lizards. *J. Neuroendocrinol.* 12:599-606.
17. Gundla C., Pecins-Thompson H., Schutzer W.E., Bethea C.L., 1999. Ovarian steroids effects on serotonin 1A, 2A and 2C receptor mRNA in macaque hypothalamus. *Mol. Brain Res.* 63:325-339.
18. Illenchuk, T.T., Walters, M.R., 1987. Rat uterine Progesterone receptor analyzed by [3H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology.* 120:1449-1456.
19. 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 receptors forms A and B. *EMBO J.* 9:1603-1614.
20. Kato, J., Hirata, S., Nozawa, A., Yamada-Mouri, N., 1994. Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm. Behav.* 28:454-463.

21. Lauber, A.H., Romano, G.J., Pfaff, D.W., 1991. Gene expression for estrogen and progesterone receptor mRNAs in rat brain and possible relations to sexually dimorphic functions. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40:53-62.
22. Levine, J.E., Chappell, P.E., Schneider, J.S., Sleiter, N.C., Szabo, M., 2001. Progesterone receptor as neuroendocrine integrators. *Front. Neuroendocrinol.* 22:69-106.
23. McKenna, N.J., Xu, J., Nawaz, Z., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 69:3-12;1999.
24. Meijer, O.C., Steenberg, P.J., De Kloet, E.R., 2000. Differential expression and regional distribution of steroid receptor coactivators SRC-1 and SRC-2 in brain and pituitary. *Endocrinology* 141:2192-2199.
25. Misiti, S., Schomburg, L., Yen, P.M., Chin, W.W., 1998. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 139:2493-2500.
26. Mulan-Jericevic, B., Mullinax, R.A., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Conneely, O.M., 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289:1751-1754.
27. Park-Sarge, O.K., Mayo, K.E., 1994. Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosin 3',5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134:709-718.
28. Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Sydney: Academic Press.
29. Rodriguez-Sierra, F.J., Hagley, T.M., Hendricks, E. S., 1986. Anxiolytic effects of progesterone are sexually dimorphic. *Life Sci.* 38:1841-18145.
30. Sakamoto, H., Ukena, K., Tsuitsui, K., 2001. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing purkinge cell on its dendritic grwth and synaptogenesis. *J. Neurosci.* 21:6221-6232.

31. Samama, B., Aron, C.L., 1991. Induction of progesterin receptor in the mediobasal hypothalamus of gonadally intact male rats primed with estrogen in relation to display of lordosis behaviour. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 39:215-220.
32. Sasaki, M., Dharia, A., Oh, B., Tanaka, Y., Fujimoto, S., Dahiya, R., 2001. Progesterone receptor B gene activation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer Res.* 61:97-102.
33. Shughrue, P. J.; Lane, M., Merchenthaler, I., 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 388:507-525.
34. Schumacher, M., Coirini, H., Robert, F., Guennoun, R., El-Etr, M., 1999. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behaviour. *Behav. Brain Res.* 105:37-52.
35. Tena-Sempere, M., Gonzalez, L.C., Pinilla, L., Huhtaniemi, I., Aguilar, E., 2001. Neonatal imprinting and regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNA expresión by estrogen in the pituitary and hypothalamus of the male rat. *Neuroendocrinology* 73:12-25.
36. Ukena, K., Kohchi, C., Tsutsui, K., 1999. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology* 140:805-813.
37. Wagner, C.K., Nakayama, Y.A., De Vries J.G., 1998. Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology* 139:3658-3661.
38. Wagner, C.K, Pfau J.L., De Vries G.J, Merchenthaler I.J., 2001. Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression. *J. Neurobiol.* 47:176-82;

DISCUSION GENERAL

REGULACION DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR A PROGESTERONA (PR) EN UN MODELO FARMACOLOGICO Y EN UN MODELO FISIOLÓGICO.

En este trabajo estudiamos la expresión de las isoformas A y B del PR en el SNC de ratas adultas de ambos sexos gonadectomizadas y tratadas con E2 y P4; en hembras intactas durante el ciclo estral y en machos intactos prepúberes y adultos, mediante el uso de la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los resultados obtenidos con esta técnica son de gran relevancia en el conocimiento de las acciones mediadas por la P4 en el SNC. Sin embargo, cabe señalar que a pesar de que esta técnica es una herramienta poderosa para estudiar genes de baja expresión en una limitada cantidad de tejido, el hecho de hacer homogenados de todo el tejido, no nos permite hacer un estudio a nivel celular para conocer las diferencias que pudieran existir en la expresión de las isoformas del PR en los diferentes núcleos del hipotálamo o el área preóptica, o en los diferentes regiones del hipocampo o el cerebelo por ejemplo; y poder tener un panorama más amplio de las implicaciones fisiológicas de la P4 en una región específica del SNC.

Nuestros resultados muestran que las isoformas del PR se regulan de manera diferente en el SNC de ratas ovariectomizadas tratadas con E2 y P4 y en ratas intactas durante el ciclo estral (Ver Cuadro II). Para tratar de explicar estas diferencias en la regulación de las isoformas del PR debemos de tener en cuenta varios factores. El primero de ellos se refiere a las diferencias en cuanto a los niveles séricos de E2 y P4. A pesar de que en ambos modelos se alcanzan niveles similares en los picos de estas hormonas (Cuadro III), el cambio entre los niveles basales y los picos alcanzados son claramente diferentes en ambos modelos. La diferencia en los niveles séricos en las ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo y las tratadas con E2 y E2+P4 fue 10 veces mayor, mientras que la diferencia en las ratas intactas entre el proestro y los demás días del ciclo fue de solo 2 veces. Esta diferencia en la magnitud de cambio en los niveles séricos de E2 y P4 puede influir en los otros elementos que regulan la expresión de las isoformas del PR. Entre

CUADRO II. RESUMEN DE RESULTADOS
EXPRESION DE LA ISOFORMAS DEL PR A NIVEL DEL GEN EN EL SNC DE
LA RATA

MODELO FARMACOLOGICO

REGION	ISOFORMA REGULADA (+) EN HEMBRAS OVX+E2	ISOFORMA REGULADA (-) EN HEMBRAS OVX+E2+P4	ISOFORMA REGULADA (+) EN MACHOS GDX+E2	ISOFORMA REGULADA (-) EN MACHOS GDX+E2+P4	ISOFORMA REGULADA (-) EN MACHOS GDX+TESTO
HIPOTALAMO	AMBAS	AMBAS	-----	-----	-----
AREA PREOPTICA	PR-B	PR-B	-----	-----	-----
HIPOCAMPO	PR-A	-----	-----	-----	-----
BULBO OLFATORIO	PR-A	-----	-----	-----	-----
CEREBELO	-----	-----	PR-A	-----	-----
CORTEZA FRONTAL	-----	-----	-----	-----	-----

MODELO FISIOLÓGICO

REGION	DIA DEL CICLO ESTRAL DE MAYOR EXPRESIÓN DE PR-B	ISOFORMA PREDOMINANTE EN EL MACHO PREPUBER	ISOFORMA PREDOMINANTE EN EL MACHO ADULTO
HIPOTALAMO	PROESTRO	-----	PR-A
AREA PREOPTICA	METAESTRO	-----	-----
HIPOCAMPO	-----	-----	-----
BULBO OLFATORIO	ND	-----	-----
CEREBELO	ND	PR-B	PR-B
CORTEZA FRONTAL	DIESTRO	-----	-----

OVX: OVARIECTOMIZADAS; GDX: GONADECTOMIZADAS; TESTO: TESTOSTERONA; -----: NINGUNA; ND: NO DETERMINADO; (+): POSITIVAMENTE, (-): NEGATIVAMENTE.

éstos, se encuentra el receptor a estrógenos (ER) el cual se une a su ligando, se dimeriza y se une a los promotores de las isoformas del PR para regular su expresión (Kastner 1993).

DIFERENCIAS EN LAS CONCENTRACIONES DE HORMONAS ESTEROIDES EN EL MODELO FARMACOLOGICO Y EL MODELO FISIOLÓGICO.

CONDICION HORMONAL	ESTRADIOL pg/ml	PROGESTERONA ng/ml
ESTRO	32.9±3.4	8.7 ± 1.8
PROESTRO	58.5±12.4	7.5 ± 0.8
METAESTRO	37.9±2.7	15.9±4.4
DIESTRO	33.3±2.1	4.4±0.3
OVX+VEH	6.5±3.2	4.1±2.3
OVX+E2	60.3±6.8	7.3±3.4
OVX+E2+P4	63.5±5.3	39.3±7.4

Los datos son de 5 animales/grupo expresados como la media ± el error estándar.

Otra característica importante del ER es que, al igual que el PR, presenta isoformas denominadas ER α y ER β las cuales presentan una distribución diferencial tejido-específica en el SNC de la rata (Shughrue 1997) así como una diferente actividad transcripcional gen-específica (Cowley 1999). Por otro lado, se ha reportado que las isoformas del ER pueden ser reguladas diferencialmente por el E2 en el hipotálamo de la rata dependiendo si la administración del E2 es aguda (aumenta la expresión e ambas isoformas) o crónica (disminuye la expresión de ambas isoformas) (Tena-Sampere 2001). Estos datos nos sugieren que la diferente distribución, actividad transcripcional y regulación por E2 de las isoformas del ER pueden estar influyendo en las diferencias observadas en la regulación de las isoformas del PR en el SNC de la rata entre el modelo farmacológico y el fisiológico analizados en este trabajo.

Otro factor importante a tomar en cuenta es la participación de otras proteínas involucradas en la regulación de las isoformas del PR por parte del ER como son los coactivadores y corepresores específicos de los receptores a hormonas esteroides (McKenna 1999). Se ha reportado que estas proteínas presentan una diferente distribución en el SNC de la rata (Meijer 2000) y algunas de éstas como el coactivador del receptor a esteroides-1 (SRC-1), también presentan isoformas que difieren en su capacidad de potenciar la transcripción del ER (Kalkhoven 1998). Estas proteínas también se regulan diferencialmente por E2 en la hipófisis de la rata (Misiti 1998) lo cual nos sugiere que probablemente pudieran regularse diferencialmente por hormonas esteroides en las diferentes regiones del SNC.

La diferencia entre los niveles séricos basales y los picos de E2 y P4 observados entre las ratas ovariectomizadas tratadas con hormonas esteroides y las ratas intactas durante el ciclo estral pueden influir en la regulación de la expresión tanto de las isoformas del ER como de los coactivadores y corepresores de este receptor teniendo como consecuencia diferencias en la regulación de la expresión de las isoformas del PR en el SNC de la rata en los dos modelos utilizados.

Observamos también diferencias en la regulación de los mensajeros del PR por E2 y P4 en las distintas regiones del SNC de las ratas ovariectomizadas tratadas con estas hormonas, así como entre ambos sexos. Estas diferencias pueden deberse a mecanismos específicos de regulación que afectan la expresión de las isoformas del PR. Entre estos mecanismos se encuentran la diferente distribución y regulación por E2 de los coactivadores y corepresores de las hormonas esteroides.

Otro mecanismo involucrado en las diferencias en la regulación de las isoformas del PR, puede ser el de los diferentes patrones de metilación que pudieran tener los promotores de las isoformas del PR ya que se ha reportado que estas regiones promotoras contiene dominios CpG en la región 5' (Kastner 1990), así como también que la hipermetilación de

citocinas en la región promotora del PR inactiva la expresión de PR-B en cánceres de endometrio uterino (Sasaki 2001). Estos datos sugieren que las diferencias en la expresión de las isoformas del PR pueden estar dadas también por diferentes patrones de metilación en los promotores que regulan la expresión de estos mensajeros.

Otro posible mecanismo de regulación de la expresión de las isoformas del PR está enfocado a la estabilidad del RNAm, esto es, que el E2 y la P4 pudieran regular de diferente manera la estabilidad del mensajero dependiendo del tejido. A este respecto solo hay un reporte en donde se informa que el E2 aumenta la síntesis del mensajero del PR total sin modificar su degradación (Nardulli 1988), sin embargo no se tienen aún datos de como la P4 pudiera regular la estabilidad de estos mensajeros.

La expresión de las isoformas del PR, principalmente en el hipotálamo, fue distinta entre los machos adultos y prepúberes,. En los adultos PR-A se expresa en mayor proporción que PR-B, mientras en los animales prepúberes ambas isoformas se expresan de manera similar. Se ha reportado que existe cambios de la expresión del PR en las diferente etapas del desarrollo. En el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) de fetos macho el PR se expresa en mayor proporción que en las hembras (Wagner 1998). Kato et al han reportado cambios de la expresión de las isoformas del PR en el hipotálamo-área preóptica en las primeras semanas de vida en las ratas hembras. Durante la primera semana la expresión de PR-B prevalece sobre PR-A, pero en la segunda semana la expresión de PR-A prevalece sobre PR-B (Kato 1993). Nuestros resultados muestran que en los machos prepúberes ambas isoformas se expresan de manera similar, mientras que en la etapa adulta la expresión de PR-A es mayor que la de PR-B. Estas diferencias en la tasa de expresión de las isoformas del PR nos indican la importancia del papel de las isoformas del PR en las diferentes etapas del desarrollo y nos sugieren que en los animales preúberes ambas isoformas pudieran participar en la maduración del SNC y ya en la etapa adulta PR-A pudiera regular las acciones de la P4 en este tejido.

Es importante mencionar que los mensajeros de PR-A y PR-B dan origen a dos proteínas de 116 y 86 KDa respectivamente. Estas proteínas son las que finalmente van a

ejercer las acciones genómicas de la P4 en las diversas regiones del SNC; por lo que es importante conocer si los cambios que observamos a nivel del RNAm se reflejan a nivel de la proteína. Hemos analizado la expresión de las isoformas del PR a nivel de la proteína mediante la técnica de Western blot y los resultados preliminares de este análisis nos indican que en el hipocampo y la corteza frontal de ratas ovariectomizadas tratadas con E2 y P4 no hay cambios en los niveles de las proteínas de PR-A y PR-B. Si se corroboran estos datos, se sugiere que en el caso de la corteza frontal la regulación de la expresión del PR es la misma tanto a nivel del mensajero como de la proteína mientras en el caso del hipocampo existe una regulación pos-transcripcional de la expresión de las isoformas del PR, lo cual se había reportado en el SNC del conejo (Camacho-Arroyo 1994, Camacho-Arroyo 1996). Esto complica más el panorama de la regulación de las acciones de la P4 mediadas por la interacción con sus receptores ya que también participarían en este sistema de control de expresión los elementos que regulan la síntesis y degradación de estas proteínas, principalmente la fosforilación y los sistemas de ubiquitinación.

A este respecto se ha reportado que la activación de proteínas cinasas puede modificar la unión de las isoformas del PR al ligando y al DNA (Schumacher 1999). Se ha observado que el PR humano es fosforilado al menos en catorce residuos de serina, seis de estos sitios solo se encuentran en PR-B, mientras que los otros ocho los comparten ambas isoformas (Takimoto 1996, Zhang 1997, Knott 2001). La diferente distribución y regulación de estos sitios de fosforilación en las isoformas del PR, puede conferirles diferentes estados conformacionales que los pueden hacer más o menos afines por las secuencias blanco y regular la transcripción de un gen de manera específica. También se ha observado que la P4 induce la fosforilación del residuo Ser294 mediada por proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Esta fosforilación es una señal para la degradación del PR por ubiquitinación con la participación del proteosoma 26S, lo cual sugiere que otra función de la fosforilación es la señalización para la regulación negativa del PR por P4 mediada por MAPKs (Lange 2000). El conocimiento de la regulación de estos sistemas por las hormonas esteroides es importante para tener un panorama global de la regulación de los mecanismos a través de los cuales la P4 ejerce sus efectos.

POSIBLE PAPEL DE LAS ISOFORMAS DEL PR EN LA OVULACION.

Es bien conocido que la P4 es un componente importante en la regulación de la retroalimentación del ovario en la secreción de gonadotropinas y acelera la pulsabilidad en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en ratas ovariectomizadas (Karsh 1987). La P4 actúa a través de la interacción con el PR ya que un antagonista de la P4, que se une al PR, como el RU486 puede bloquear los efectos de la P4 en la secreción de GnRH y de la hormona luteinizante (LH) responsable de la ovulación en los roedores (Bauer-Dantoin 1993). Por otro lado, la P4 aumenta la expresión del gen que codifica para GnRH en el hipotálamo-área preóptica de la rata (Simerly 1996); el mecanismo molecular no es muy claro ya que las neuronas GnRHérgicas carecen de PR (Shivers 1983) y en el promotor del gen de la GnRH no hay elementos de respuesta a P4 (Kepa 1992). Estos datos sugieren que en la regulación de la expresión del gen de la GnRH participan otros elementos como neurotransmisores, aminoácidos y otros factores de transcripción (Levine 2001).

Las implicaciones fisiológicas del conocimiento de la distribución y regulación por E2 y P4 de las isoformas del PR son de gran importancia ya que se ha reportado que la P4 participa en la comunicación mediada por diferentes neurotransmisores entre los que se encuentran las aminas biogénicas que son elementos importantes en las redes neuronales que regulan la reproducción. El PR se encuentra en neuronas noradrenérgicas del núcleo del tracto solitario durante el ciclo estral (Haywood 1999). La P4 aumenta tanto la expresión del RNA mensajero como la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa que participa en la síntesis de la serotonina (Lu 1999), así como de la enzima tirosina hidroxilasa la cual sintetiza dopamina y noradrenalina en el hipotálamo (Arbogast 1993).

Estos datos sugieren que en esta función en particular la P4 ejerce su efecto en neuronas adyacentes a las neuronas GnRHérgicas liberando neurotransmisores como la dopamina y la noradrenalina, los cuales permitirán la secreción de GnRH y ésta a su vez aumentará la síntesis de LH permitiendo la liberación del óvulo. Nuestros resultados muestran que en la etapa del proestro, cuando se presenta el pico de E2 durante el ciclo estral, PR-B es la isoforma que aumenta su expresión en el hipotálamo de la rata, lo cual nos sugiere que esta isoforma podría regular la expresión del gen que codifica para la enzima

tirosina hidroxilasa en este tejido y de esta manera aumentar la síntesis de dopamina y noradrenalina, las cuales actuarían sobre las neuronas GnRHérgicas y aumentarían la síntesis de GnRH para dar como resultado final la ovulación.

Otras acciones de la P4 sobre la secreción de GnRH, no son directamente mediadas por el PR. La P4 estimula in vitro la liberación de GnRH en tejido hipotalámico (Kim 1982). Estas acciones son relativamente rápidas y parecen ser mediadas por receptores unidos a la membrana distintos a PR-A o PR-B (Ke 1985, Ramírez 1996). Dicho efecto puede estar mediado por efectos alostéricos de la P4 o sus metabolitos en el receptor al ácido γ -amino butírico (GABA) (Brann 1990). Aunado a esto, en el hipotálamo de la rata la P4 aumenta la expresión del gen que codifica para el receptor a GABA_A (Fenelon 1996) así como de la descarboxilasa del ácido glutámico, enzima responsable de la producción de GABA (Frye 2000) aumentando la síntesis de GnRH. Nuestros datos sugieren que PR-B podría participar en la regulación de estos genes y contribuir indirectamente a la liberación de GnRH conjuntando las acciones genómicas y las no genómicas de la P4 en la ovulación. Resumiendo esta información, la manera en la cual la P4 lleva a cabo su posible función en la ovulación está ilustrada en la Fig. 1.

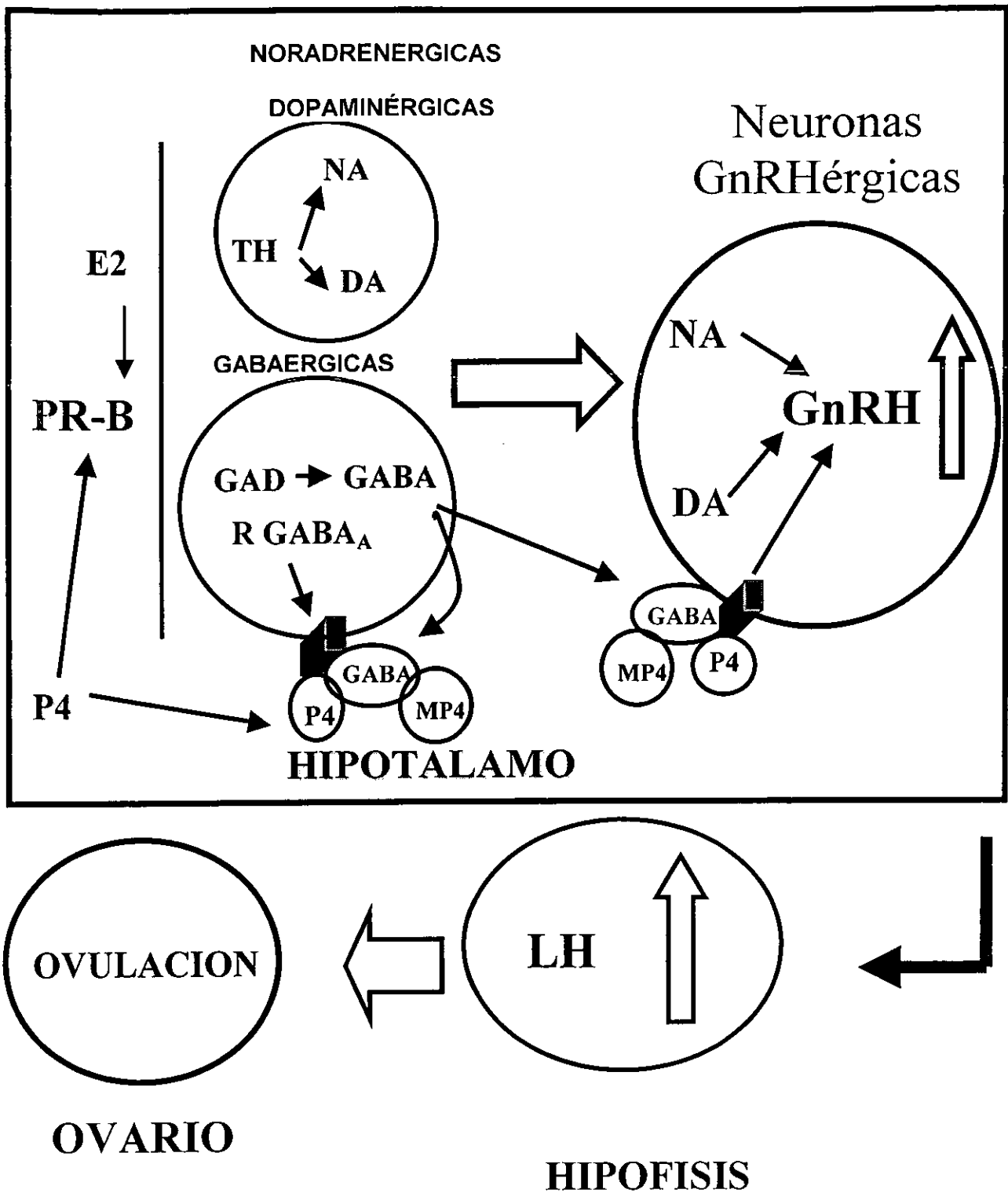


Fig. 1. Posible papel de las isoformas del PR en la Ovulación. PR-B participa en la regulación de la expresión de los genes que codifican para la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH), Acido Glutámico Descarboxilasa (GAD) y para el receptor a GABA_A aumentando la liberación de Noradrenalina (NA), Dopamina (DA) y GABA en neuronas adyacentes a las neuronas GnRHérgicas en donde aumentan la secreción de GnRH la cual a su vez aumenta la secreción de LH y FSH en la Hipófisis y estas hormonas actúan sobre el ovario para que se de la ovulación. La P4 y sus metabolitos (MP4) se unen a sitios alostéricos del receptor a GABA (RGABA) aumentando la secreción de GnRH.

POSIBLE PAPEL DE LAS ISOFORMAS DEL PR EN EL DESPLIEGUE DE LA CONDUCTA SEXUAL.

En los roedores el despliegue de la conducta sexual requiere de la actividad coordinada de diversas regiones del SNC. Sin embargo la exposición al E2 y a la P4 de algunos de estos núcleos cerebrales como el VMH y el núcleo arcuato es suficiente para que se lleve a cabo la postura receptiva femenina o conducta de lordosis (Beyer 1991). Las acciones del E2 y la P4 en poblaciones neuronales altamente interconectadas como el hipotálamo y el área preóptica aseguran que la liberación de la LH por la pituitaria, la cual dispara la ovulación, coincida con la receptividad sexual (Pffaf 1994). En el hipotálamo, las células del VMH y el área preóptica medial (MPOA) son los mayores sitios de la facilitación de la lordosis por E2 y P4 (Etgen 1999). En la rata, el circuito para activar la lordosis tiene un control inhibitorio dado por el cerebro anterior. Es importante mencionar que las hormonas no "activan" la conducta de lordosis, sino que el medio hormonal determina la probabilidad de que los animales desplieguen esta conducta en respuesta a la estimulación sensorial apropiada (Etgen 1999). De esta manera, las vías aferentes y los componentes moleculares post-sinápticos como por ejemplo los canales iónicos, receptores a neurotransmisores y las enzimas que sintetizan a los neurotransmisores son candidatos blanco sobre los cuales las hormonas pueden actuar para regular la lordosis (Pfaff 1994).

Por otro lado, el despliegue de la conducta sexual en la rata hembra requiere la activación del PR en el hipotálamo, ya que la aplicación hipotalámica (Ogawa 1994) o intraventricular (Mani 1994) de oligonucleótidos antisentido del PR reduce la conducta de lordosis así como las conductas proceptivas (Ogawa 1994) en animales tratados con E2 y P4.

La P4 puede regular la síntesis de la dopamina y la noradrenalina en el hipotálamo a través del aumento en la expresión del gen que codifica para la enzima tirosina hidroxilasa, la cual es la enzima principal en la síntesis de estos neurotransmisores (Lu 1999, Haywood 1999), mientras que se ha observado que la P4 a través de la interacción con su receptor aumenta la síntesis de dopamina en el núcleo arcuato del hipotálamo (Arbogast 1993) que

junto con el PR es necesaria para que ocurra el despliegue de conducta sexual (Mani 1994, Apostolakis 1996).

Nuestros resultados muestran que durante el ciclo estral, aumenta la expresión de PR-B durante la etapa del proestro en el hipotálamo, lo cual sugiere que esta isoforma podría estar involucrada en la regulación de la síntesis de diversos neurotransmisores como la dopamina, la noradrenalina, la somatostatina y la oxitocina, así como de sus receptores (Lu 1999, Haywood 1999, Coirini 1992, Dufuorny 1996) los cuales son necesarios para que exista una adecuada estimulación en el VMH y se pueda dar el despliegue de la conducta sexual. Como se mencionó anteriormente, el circuito de lordosis se encuentra inhibido y cuando se presentan las condiciones adecuadas de estímulos hormonales, de liberación y síntesis de neurotransmisores, así como de estímulos sensoriales, se suprime esta inhibición y se despliega la conducta sexual. Se ha descrito una proteína cuya presencia es clave en esta función: la fosfoproteína 32 regulada por AMP cíclico y dopamina (DARPP-32). En estado fosforilado, DARPP-32 inhibe la actividad de la fosfatasa 1, incrementando el estado de fosforilación de muchas proteínas, entre las cuales se encuentra el PR, con lo cual contribuye a la desinhibición del circuito de lordosis. La importancia de DARPP-32 se ha corroborado en ratones knockout, así como con la administración de oligonucleótidos antisentido para DARPP-32 en el VMH de la cepa silvestre. Ninguno de estos animales presentan lordosis (Mani 2000). Nuestros datos sugieren que PR-B podría participar en la activación de esta proteína por medio de dos mecanismos: uno en la síntesis y liberación de dopamina y otro en la liberación de AMP cíclico (Al-Dahan 1999) Fig 2.

HIPOTALAMO

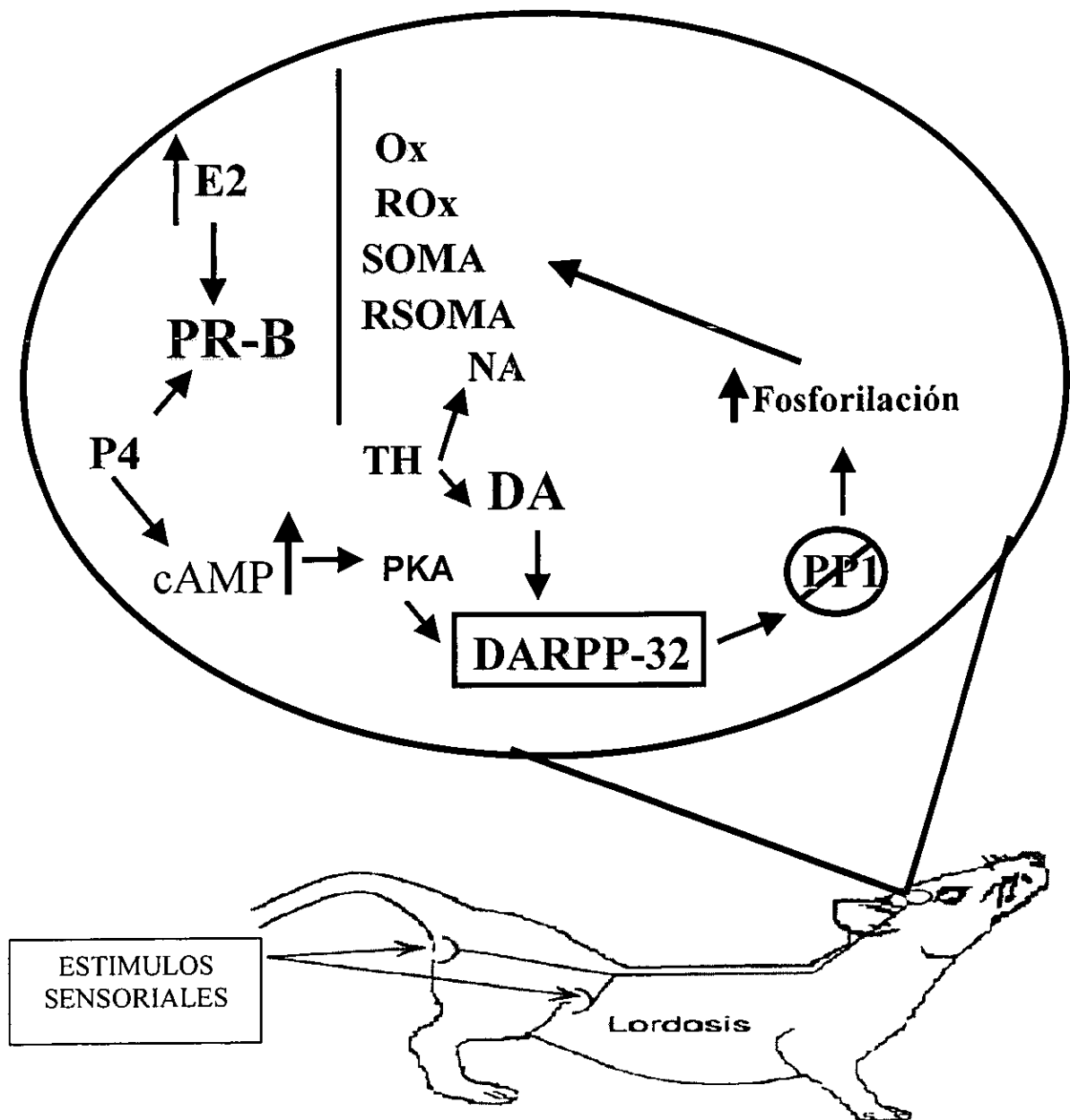


Fig. 2. Posible papel de las isoformas del PR en el despliegue de conducta sexual en la rata hembra. El aumento en los niveles de E2 durante el proestro aumenta la expresión de PR-B. Este al unirse a la P4 regula la expresión de diferentes neurotransmisores y sus receptores como la oxitocina (Ox y ROx), la somatostatina (SOMA y RSOMA), la noradrenalina (NA) y la dopamina (DA). La liberación de estos neurotransmisores activa diversas regiones motoras en el tallo cerebral y en la medula espinal que permiten la postura de lordosis. Por otro lado, la P4 aumenta la síntesis de cAMP activando a la proteína cinasa A (PKA). Esta junto con la dopamina activa a la DARPP-32 que inhibe a la fosfata 1 (PP1) y aumenta la fosforilación de diversas proteínas para activarlas, entre éstas al propio PR-B. Estas acciones en conjunto con el estímulo sensorial del macho, permiten que se presente la conducta de lordosis en la rata hembra.

Nuestros resultados muestran que durante el ciclo estral, solo PR-B modifica su expresión en el área preóptica. PR-B se expresa en mayor proporción que PR-A y la mayor expresión se presenta en la etapa del metaestro. Este patrón es similar al de los péptidos opioides proencefalina y prodinorfina en el núcleo anteroventral periventricular del área preóptica lo cual sugiere que PR-B puede ser la isoforma involucrada en la regulación de estos genes cuya función es inhibir la conducta de lordosis durante estas etapas del ciclo para que solo se despliegue durante el proestro y coincida con la ovulación (Pfaff 1994).

En la corteza frontal PR-B se expresa en mayor proporción que PR-A durante el ciclo estral, la mayor expresión de PR-B se observó durante la etapa del estro. La corteza frontal regula el despliegue de conductas que se presentan antes de la cópula como son saltos, movimiento de orejas, peleas (conductas proceptivas). El PR participa en la regulación de estas conductas ya que al administrar un antagonista del PR como el RU486, disminuye el despliegue de conductas proceptivas en la rata (Beyer 1997). Estos datos nos sugieren que PR-B podría regular el despliegue de las conductas proceptivas en la corteza frontal.

Nuestros resultados muestran que el patrón de expresión de las isoformas del PR es diferente entre hembras y machos, tanto en los animales gonadectomizados y tratados con E2 y P4, como en los animales intactos. Estas diferencias en la regulación de la expresión de las isoformas del PR pudieran ser el reflejo de las diferentes funciones que pudiera llevar a cabo la P4 en el cerebro de la rata macho y hembra.

La expresión de PR-A en el hipotálamo fue mayor en las ratas macho adultas intactas que la observada en los animales prepúberes, mientras que en el área preóptica, el cerebelo, la corteza frontal, el hipocampo y el bulbo olfatorio ambas isoformas se expresaron en niveles similares y no hubo diferencias. Por otro lado, en los machos gonadectomizados tratados con E2 y P4 no hubo cambios en la expresión de ninguna isoforma del PR con ningún tratamiento en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, la corteza frontal y el bulbo olfatorio. Solo en el cerebelo se observó un aumento en la expresión de PR-A con el tratamiento con E2.

La castración elimina el despliegue de conducta sexual masculina en los machos y ésta se recupera con un tratamiento con testosterona (T). Las acciones de la T y sus metabolitos están mediadas a través de la interacción con el receptor a andrógenos (AR) (Sachs 1988). Nuestros datos apoyan que el despliegue de conducta sexual en los machos está mediada por el AR y que el PR no participa de la misma manera que en las hembras en donde hay una clara regulación de las isoformas del PR por las hormonas esteroides. Además, existe una tasa diferencial de la expresión de PR-A/PR-B, una regulación de PR-A diferente a la de PR-B entre machos y hembras en el hipotálamo y la administración de E2 y P4 no induce el despliegue de la conducta sexual femenina ó lordosis en las ratas macho (Blaustein 1980). La mayor expresión de PR-A observada en el hipotálamo de los machos adultos puede estar relacionada con el hecho de que la P4 puede inhibir el despliegue de la conducta sexual masculina o monta (Fraile 1987) y en el hipotálamo se encuentran los centros neuronales que controlan el despliegue de esta conducta como el VMH y el núcleo arcuato (Sachs 1988). Estos datos sugieren que PR-A puede regular esta inhibición de la conducta sexual en el hipotálamo de las ratas macho.

En el cerebelo de los machos gonadectomizados se observó una inducción de la expresión del PR total con el tratamiento con E2 y T y de PR-A en particular con el tratamiento con E2. Esto nos sugiere que probablemente la T sea convertida a E2 por la enzima aromatasa (Gore-Langton 1988) y esto pudiera influenciar la expresión del PR. Por otro lado, la expresión y la actividad de la enzima que sintetiza P4 a partir de la pregnenolona, así como los altos niveles de P4 encontrados en el cerebelo de ratas adultas y durante el desarrollo neonatal (Ukena 1999) sugieren que PR-A pudiera participar en la regulación de diversas funciones como el desarrollo de las células de Purkinje, desarrollo dendrítico y el aumento en la sinaptogénesis (Sakamoto 2001).

El cerebelo es una de las mayores áreas motoras-sensoriales del SNC e inerva a la médula espinal participando así en la coordinación motora. Uno de los neurotransmisores que tienen mayores efectos en la funcionalidad de este tejido es la serotonina (Dieudonné

2001) y la P4 puede aumentar la síntesis de serotonina (Lu 1999) así como de su receptor (Gundlah 1999) en el SNC. PR-A en este tejido pudiera participar aumentando la síntesis de serotonina y de su receptor y así proveer la coordinación motora que requiere el macho durante la cópula.

POSIBLE PAPEL DE LAS ISOFORMAS DEL PR EN LA PLASTICIDAD NEURONAL Y LA NEUROPROTECCION.

Las hormonas esteroideas tienen un importante papel en la plasticidad. El E2 aumenta la formación de espinas dendríticas en el hipocampo de la rata (Wolley 1990), mientras que la P4 disminuye esta inducción (Murphy 2000). El incremento en las espinas dendríticas del hipocampo en respuesta a cambios en el ambiente que rodea a esta región se ha relacionado con los procesos de memoria a largo plazo. Nuestros resultados muestran que PR-A se regula positivamente por E2 en el hipocampo de ratas ovariectomizadas; PR-A actúa como un inhibidor de la transcripción mediada por el ER y PR-B (Kastner 1990). Estos datos sugieren que la P4 al unirse a PR-A puede inhibir la transcripción del ER que induce la formación de espinas dendríticas y ser el mecanismo a través de la cual la P4 pudiera disminuir la formación de espinas dendríticas en el hipocampo de la rata y participar modulando los procesos de memoria y aprendizaje (Fig 3).

La P4 por otro lado, disminuye la pérdida neuronal inducida por isquemia en el hipocampo del gato (González-Vidal 1998), mientras que el tratamiento combinado de E2 y P4 tiene un efecto protector en contra del daño neuronal inducido por colchicina en infusiones intrahipocámpales de rata (Vongher 1999). La P4 reduce el volumen de infarto cerebral, el daño celular y aumenta la recuperación de funciones neurológicas en daño neuronal inducido por isquemia. Por otro lado, en modelos de daño neuronal inducido por impacto cortical, las ratas tratadas con P4 presentan una menor lipoperoxidación, degeneración neuronal, menor edema post-daño y una mejor recuperación clínica e histológica en el tejido nervioso (Stein 2001). Estas funciones podrían ser reguladas por la P4 a través de PR-A.

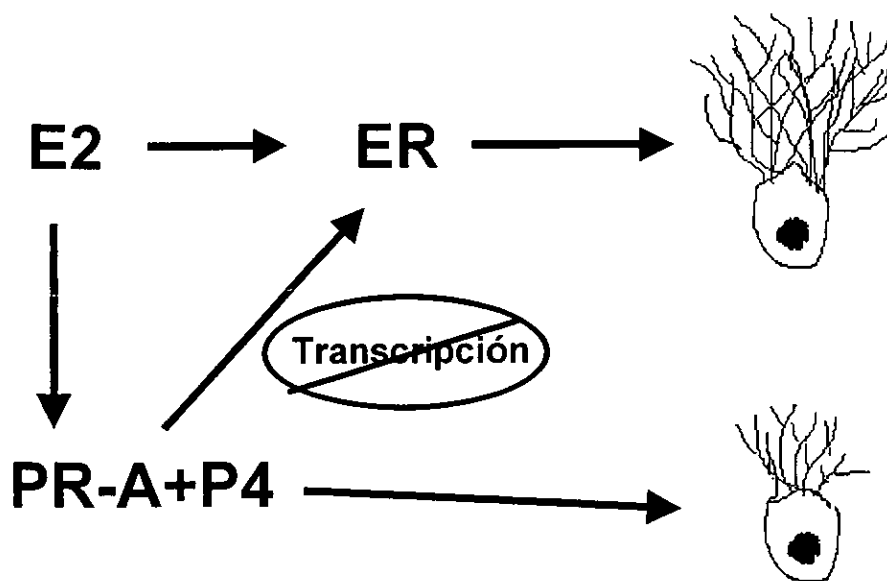


Figura 3. Posible papel de PR-A en la plasticidad neuronal en el hipocampo. El E2 a través de la interacción con su receptor (ER) induce el aumento en la formación de dendritas en el hipocampo de la rata, mientras que la P4 disminuye esta inducción. El E2 aumenta la expresión de PR-A en esta región cerebral y al unirse con la P4 inhibe la transcripción (T) de ER disminuyendo la formación de espinas dendríticas.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir lo siguiente:

1. La expresión de las isoformas del PR a nivel del RNA mensajero es regulada diferencialmente por E2 y P4 en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, el bulbo olfatorio, la corteza frontal y el cerebelo de ratas hembra ovariectomizadas.
2. La expresión de las isoformas del PR son reguladas de manera tejido-específica en el cerebro de la rata durante el ciclo estral.
3. La expresión de las isoformas del PR en el cerebro de la rata macho presentan un patrón de expresión diferencial. Este patrón es similar en el área preóptica, el hipocampo, la corteza frontal, el bulbo olfatorio y el cerebelo de ratas macho prepúberes y adultos. La expresión de PR-A es mayor que la de PR-B en el hipotálamo de los machos adultos.
4. El patrón de expresión de las isoformas del PR en el hipotálamo de la rata macho es diferente al de las hembras, por lo que esta diferencia puede contribuir a los efectos sexualmente dimórficos de la P4 en el cerebro de la rata.
5. La regulación de la expresión de las isoformas del PR por E2 y P4 es diferente en el cerebro de la rata macho con respecto al de la hembra.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionan información básica tanto de la distribución de las isoformas del PR, como de su regulación por E2 y P4. Los datos obtenidos sobre la regulación de la expresión de las isoformas del PR proporcionan las bases para estudiar diversos aspectos de los eventos transcripcionales que llevan a la síntesis de las isoformas del PR con diferentes características funcionales, sin embargo, es necesario realizar estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica para conocer por un lado, el tipo celular en el cual se expresa una u otra isoforma dentro de un mismo tejido, ya que se ha reportado que la expresión del PR es diferente dependiendo del núcleo hipotalámico analizado durante el ciclo estral en la oveja (Scott 2001), y en la rata pudiera ocurrir algo similar. Por otro lado, es importante también conocer si los cambios observados a nivel del RNA mensajero se reflejan a nivel de la proteína y de esta manera tener un conocimiento más fisiológico de las acciones mediadas por la P4 en el SNC.

En cuanto a las diferencias en la regulación de la expresión que ocurre de diferente manera dependiendo del tejido analizado, es necesario conocer cuales son los mecanismos que permiten la expresión de cada una de las isoformas. A este respecto, se ha reportado que el gen del PR contiene dominios CpG en la región 5' (Kastner 1990), así como también que la hipermetilación de citocinas en la región promotora del PR inactiva la expresión de PR-B en cánceres de endometrio uterino (Sasaki 2001). Con base en estos datos, es necesario conocer los patrones de metilación en citocinas de los promotores de las isoformas del PR en las diferentes estructuras del SNC de la rata para correlacionarlos con la expresión de las isoformas del PR.

En relación a las diferencias funcionales de las isoformas del PR, se ha reportado que existen numerosas proteínas llamadas coactivadores que son reclutadas por el complejo PR-P4 y que esta unión aumenta la transactivación dependiente del receptor (Rowan 2000). Debido a estas características de los coactivadores es importante determinar la presencia de estas proteínas en las diferentes regiones del SNC de la rata, la interacción de estas

proteínas con cada una de las isoformas del PR, así como conocer si los tratamientos hormonales utilizados pueden regular la expresión de los genes que codifican para estas proteínas y si esto puede influenciar las características funcionales de las isoformas del PR. Todo esto nos permitirá contar con un panorama más completo de cómo la P4 lleva a cabo sus funciones en el SNC a través de la interacción con sus receptores.

REFERENCIAS

- Al-Dahan MI, Jalilian Tehrani MH, Thalmann RH. Regulation of cyclic AMP level by progesterone in ovariectomized rat neocortex. *Brain Res* 1999;824:258-266.
- Apostolakis EM, Garai J, Fox C, Smith CL, Watson SJ, Clark JH, O'Malley BW. Dopaminergic regulation of progesterone receptors: brain D5 dopamine receptors mediate induction of lordosis by D1-like agonists in rats. *J Neurosci* 1996;16:4823-34.
- Arbogast LA, Vogt JL. Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 1993;58:501-10.
- Bauer-Dantoin AC, Tabesh B, Norgle JR, Levine JE. RU486 administration blocks neuropeptide Y potentiation of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone induced LH surges in proestrus rats. *Endocrinology* 1993; 133:2418-2423.
- Beyer C, Gonzalez-Mariscal G. Hormones, Reproduction, Growth and Development. Raven Press, New York 1991;199-208.
- Beyer C, Gonzalez-Flores O, Gonzalez-Mariscal G. Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LHRH, prostaglandin E₂, and cyclic AMP on lordosis and proceptive behaviours in rats. *J Neuroendocrinol* 1997;9:609-614.
- Blaustein JD, Ryer HI, Feder HH. A sex difference in the progestin receptor system of guinea pig brain. *Neuroendocrinology* 1980;31:403-409.
- Blaustein JD, Tetel MJ, Ricciardi KH, Del ville Y, Turcotte JC. Hypothalamic ovarian steroid hormone-sensitive neurons involved in female sexual behaviour. *Psychoneuroendocrinology* 1994;19:505-516.
- Brann DW, Putnam CD, Mahesh VB. γ -aminobutyric acid_A receptors mediate 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one-induced gonadotropin secretion. *Endocrinology* 1990;126:1854-1859.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbon MA. La progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del sistema nervioso central. *Rev Inv Clin* 1995. 47: 329-340.
- Camacho -Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM, Cerbón MA. Intracellular progesterone receptor are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1994;50:299-303.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Cerbón MA. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. *Neurosci Lett* 1996;214:25-28.

Chomczynski, P, Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal. Biochem.*162:156-159; 1987.

Coirini, H, Johnson, AE, Schumacher, M, McEwen, BS. Sex differences in the regulation of oxytocin receptors by ovarian steroids in the ventromedial hypothalamus of the rat. *Neuroendocrinology.* 1992;55:269-275.

Cowley SM, Parker MG. A comparison of transcriptional activation by $E\alpha$ and $E\beta$. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1999;69:165-175.

Dieudonné S. Serotonergic neuromodulation in the cerebellar cortex: cellular, synaptic, and molecular basis. *Neuroscientist* 2001;7:207-219.

Dufourny, L, Warenbourg, M. Colocalization of progesterone receptor and somatostatin immunoreactivities in the hypothalamus of the male and female guinea pig. *Neuroendocrinology.* 1996;64:215-224.

Etgen AM, Chu HP, Fiber JM, Karkanias GB, Morales JM. Hormonal integration of neurochemical and sensory signals governing female reproductive behaviour. *Behav Brain Res* 1999;105:93-103.

Evans R. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-895.

Fenelon VS, Herbison AE. Plasticity in GABAA receptor subunit mRNA expresión by hypothalamic magnocellular neurons in the adult rat. *J Neurosci* 1996;16:4872-4880.

Fraile I, McEwen BS, Pfaff DW. Progesterone inhibition of aggressive behaviors in hamsters. *Physiol Behav* 1987; 39:225-229.

Frye CA, Murphy RE, Platek SM. Anti-sense oligonucleotides , for progestin receptor in the VMH and glutamic acid decarboxilase in the VTA, attenuate progesterone-induced lordosis in hamster and rats. *Behav Brain Res* 2000;115:55-64.

González-Vidal MD, Cervera-Gaviria M, Ruelas R, Escobar A, Morali G, Cervantes M. Progesterone: Protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res* 1998; 29:117-124.

Gore-Langton RE, Armstrong DT. Follicular steroidogenesis and its control. In : Knobil E and Neill JD, Eds. *The physiology of reproduction* . New York: Raven Press, 1994: 331-335

Graham DJ, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, et al. Progesterone receptor A and B protein expression in human breast cancer. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1996; 56:93-8.

Gundla C, Pecins-Thompson H, Schutzer WE, Bethea CL. Ovarian steroids effects on serotonin 1A, 2A and 2C receptor mRNA in macaque hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;63:325-339.

Haywood SA, Simonian SX, van der Beek EM, Bicknell RJ, Herbison AE. Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. *Endocrinology* 1999;140:3255-63.

Ilenchuk T, Walters M. Rat uterine Progesterone receptor analyzed by [³H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. *Endocrinology* 1987;120:1449-56.

Kalkhoven E, Valentine JE, Heery DM, Parker MG. Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO J* 1998;17:232-243.

Karsh FJ, Cummins JT, Thomas GB, Clark IJ. Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod* 1987; 36:1207-1218.

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 receptors forms A and B. *EMBO J* 1990; 9:1603-1614.

Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N. The ontogeny of gene expression of progesterin receptor in the female rat brain. *J steroid Biochem Molec Biol* 1993; 47:173-82.

Ke FC, Ramirez VD. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinology* 1987;45:514-517.

Kepa JK, Wang C, Neeley CI, Reynolds MV, Gordon DF, Wood WM, Wierman ME. Structure of the rat gonadotropin releasing hormone (rGnRH) gene promoter and functional analysis in hypothalamic cells. *Nucleic Acids Res* 1992;20:1393-1399.

Kim K, Ramirez VD. In vitro progesterone stimulates the release of LHRH from superfused hypothalamic tissue from ovariectomized estradiol-primed prepubertal rats. *Endocrinology* 1982;111:750-756.

Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, Weigel NL. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2001;276:8475-8483.

Krauss LW, Montano M, Katzenellenbogen B. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol* 1993; 7:1603-16.

Kuhn RW, Schrader WT, Coty WA, Conn PM, O'Malley BW. Progesterone-binding components of chick oviduct. Biochemical characterization of purified oviduct progesterone receptor B subunit. *J Biol Chem* 1977; 252:308-17.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138:863-70.

Lange CA, Shen T, Horwitz KB. Phosphorylation of human progesterone receptor at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1032-37

Lessey BA, Alexander PS, Horwitz KB. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptor: characterization by chromatography and photoaffinity labeling. *Endocrinology* 1983;112:1267-74.

Levine JE, Chappell PE, Schneider JS, Sleiter NC, Szabo M. Progesterone receptor as neuroendocrine integrators. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:69-106.

Lu NZ, Shlaes TA, Gundlach C, Dziennis SE, Lyle RE, Bethea CL. Ovarian steroid action on tryptophan hydroxylase protein and serotonin compared to localization of ovarian steroid receptors in midbrain of guinea pigs. *Endocrine* 1999;11:257-67.

Mani SK, Fienberg AA, O'Callaghan JP, Snyder GL, Allen PB, Dash PK, Moore AN, Mitchell AJ, Bibb J, Greengard P, O'Malley BW. Requirement of DARPP-32 in progesterone-facilitated sexual receptivity in female rats and mice. *Science* 2000;287:1053-1056.

Mani SK, Allen JM, Clark JH, Blaustein JD, O'Malley BW. Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science* 1995;268:1833.

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

McDonnell D, Goldman ME. RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J Biol Chem* 1994; 269:11945-49.

McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1999;69:3-12.

Meijer OC, Steenberg PJ, De Kloet ER. Differential expression and regional distribution of steroid receptor coactivators SRC-1 and SRC-2 in brain and pituitary. *Endocrinology* 2000;141:2192-2199.

Misiti S, Schomburg L, Yen PM, Chin WW. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology* 1998;139:2493-2500.

Murphy DD, Segal M. Progesterone prevents estradiol-induced dendritic spine formation in cultured hippocampal neurons. *Neuroendocrinology* 2000; 72:133-143.

Nardulli AM, Greene GL, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology* 1988;122:935-944.

Ogawa S, Olazabal UE, Parhar IS, Pfaff DW. Effects on intra hypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behaviour and progesterone receptor immunoreactivity in female rat. *J Neurosci* 1994;14:1766-1774.

Pfaff D, Schwartz-Giblin S, McArthy M, Kow LM. Cellular and molecular mechanism of female reproductive behaviours. In : Knobil E and Neill JD, Eds. *The Physiology of Reproduction* . New York: Raven Press, 1994: 107-220.

Rowan BG, O'Malley BW. Progesterone receptor coactivators. *Steroids* 2000;65:545-549.

Sachs BD, Meisel RL. The physiology of male sexual behaviour. In : Knobil E and Neill JD, Eds. *The Physiology of Reproduction* . New York: Raven Press, 1994: 1393-1485.

Sakamoto H, Ukena K, Tsuitsui K. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J Neurosci* 2001;21:6221-6232.

Sasaki M, Dharia A, Oh B, Tanaka Y, Fujimoto S, Dahiya R. Progesterone receptor B gene activation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer Res* 2001; 61:97-102.

Scott J, Pereira AM, Tilbrook AJ Rawson JA, Clarke IJ. Changes in preoptic and hypothalamic levels of progesterone receptor mRNA across the oestrus cycle of the ewe. *J Neuroendocrinol* 2001;13:401-406.

Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 1983;304:345-347.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1997;388:507-525.

Schumacher M, Coirini H, Robert F, Guennoun R, El-Etr M. Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behaviour. *Behav Brain Res* 1999; 105:37-52.

Simerly RB, Carr AM, Zee MC, Lorang D. Ovarian steroids regulation of estrogens and progesterone receptors messenger ribonucleic acid in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *J Neuroendocrinol* 1996; 8:45-56.

Smith, S.S.; Progesterone administration attenuates excitatory aminoacid responses of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience*. 42:309-320; 1991.

Stein DG. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen?. *Trends Neurosci* 2001;24:386-391.

Takimoto GS, Hovland AR, Tasset DM, Melville MY, Tung L, Horwitz K. Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 1996; 271:13308-16.

Tena-Sempere M, Gonzalez LC, Pinilla L, Huhtaniemi I, Aguilar E. Neonatal imprinting and regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNA expression by estrogen in the pituitary and hypothalamus of the male rat. *Neuroendocrinology* 2001;73:12-25.

Tsutsui, K.; Ukena, K.; Usui, M.; Sakamoto, H. Takase, M. Novel brain function: Biosynthesis and actions of neurosteroids in neurons. *Neurosci Res* 36:261-273; 2000.

Vegeto E, Shahbaz M, Wen X, Goldman M, O'Malley B, McDonnell D. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter- specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993; 7:1244-55.

Vongher JM, Frye CA. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 64:777-785.

Wagner, C.K.; Nakayama, Y.A.; De Vries J.G. Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology*. 139:3658-3661; 1998.

Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Clement IV JP, Prendergast P, Yip T, et al. Phosphorylation of human progesterone receptor by cyclin-dependent kinase 2 on three sites that are authentic basal phosphorylation sites in vivo. *Mol Endocrinol* 1997;11:823-32.

Wolley CS, McEwen BS. Roles of estradiol and progesterone regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol*, 1993;336 : 293-306.