



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIFERENCIAS SEXUALES EN LA REGULACIÓN  
DE LA EXPRESIÓN 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 TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ANGÉLICA BERENICE COYOY SALGADO



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico a mi contenido de mi trabajo académico.

NOMBRE: Coyoy Salgado  
Angélica Berenice  
FECHA: 9 de Febrero de 2004  
FIRMA: [Signature]



### JURADO ASIGNADO

*Presidente:* **Profa. Raquel Ortega Muñoz**  
*Vocal:* **Profa. Adriana Camacho Villanueva**  
*Secretario:* **Prof. Ignacio Camacho Arroyo**  
*1er. Suplente:* **Prof. Enrique Moreno Saenz**  
*2do. Suplente:* **Profa. Nora Andrea Gutiérrez Najera**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

*Laboratorio 202*

*Edif. B de la Facultad de Química, UNAM*

*México, D.F.*

**ASESOR**

[Signature]  
**Dr. Ignacio Camacho Arroyo**

**SUSTENTANTE**

[Signature]  
**Angélica Berenice Coyoy Salgado**



## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

### *A mis padres,*

*Delia y Ernesto, por darme la vida. Gracias por el apoyo, el cariño, por todo lo que me han brindado incondicionalmente.*

### *A mis hermanas,*

*Bety y Delia por su compañía, por alegrar y cambiar mi vida.*

*Al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por su ayuda, tiempo, apoyo, por permitirme conocer la ciencia experimental desde mis primeros semestres de la carrera.*

*Al Dr. Christian Guerra por todo el asesoramiento técnico y teórico, por sus consejos, por el apoyo, por su paciencia, por compartir sus conocimientos y por ser una gran persona.*

*Al Dr. Julio Moran por los permisos, por su tiempo, por alentarme a titularme.*

*A mis amigos y compañeros de laboratorio 202 de la facultad y del BL-302 de fisiología:*

*Dr. Cerbón, Dra. Quintero, Adriana, Julia, José, Elizabeth, Margarita, Francis, Isabel, Paola, Silvia, Lupita, Dr. Tamayo, Nelly, Lety, Gaby M, Luciano, Mauricio, Andrea, Gaby, Aliesha, Olga, Tere, Emanulle, Alette, Silver, Sugis, Lupita, Miriam, Ari, Toño, Jaz, Paola, Armando, Bere, por los momentos agradables, por la convivencia, por que cada uno aportado un granito o un granote en lo que he aprendido, por su disposición y buen ánimo para trabajar.*

*A mis amigos y compañeros de la Facultad:*

*Jessi, Fabiola, Gus, Isaac, Magda, Blanca, Gaby, Jessica, Miguel, Miguelito, Elena, Bere, Ale, Ana, Alejandro, Homero, Héctor, Tona, Norma, Diana, Mario por todos los momentos, por luchar juntos para lograr terminar nuestra carrera.*

*A todos mis profesores, por compartir sus conocimientos y experiencias, principalmente a el Prof. Raúl Garza, Prof. Lino, Prof. Erick Cuevas, Profa. Magdalena Acosta, Prof. Homero Hernández.*

*A todos mis familiares, Abuelitos, Tíos y Primos, por su apoyo, por las ausencias a las festividades.*

*A Adrian por dejarme ver la vida de otra forma, por la comprensión, paciencia, por el cariño y por estar a mi lado.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química por los conocimientos que me permitieron adquirir y por mi formación escolar.*



**ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO BAJO LA DIRECCIÓN  
DEL DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO Y CON EL APOYO DEL PROYECTO  
CONACYT 35025-N**



## ABREVIATURAS

<b>AF</b>	Funciones de activación
<b>AR</b>	Receptor a andrógenos
<b>AVPv</b>	Núcleo periventricular anteroventral
<b>BNST</b>	Porción base de la <i>stria terminalis</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>DBD</b>	Dominio de unión al DNA
<b>E2</b>	Estradiol, 17 $\beta$ estradiol
<b>E2+P4</b>	Estradiol + progesterona
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>GAPDH</b>	Enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>HAT</b>	Histona acetiltransferasa
<b>HBD</b>	Dominio de unión a la hormona
<b>IF</b>	Funciones de inhibición
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>MPN</b>	Núcleo preóptico medial
<b>mPOA</b>	Porción medial del área preóptica
<b>NIHA</b>	Núcleo intersticial del hipotálamo anterior
<b>NSQ</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>NVM</b>	Núcleo ventromedial del hipotálamo
<b>P4</b>	Progesterona, 4-pregnen-3,20-diona
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RE</b>	Receptor a estrógenos



<b>RP</b>	Receptor a progesterona
<b>RP-A</b>	Isoforma A del receptor a progesterona
<b>RP-B</b>	Isoforma B del receptor a progesterona
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SRC</b>	Coactivadores de receptores a esteroides
<b>T</b>	Testosterona
<b>V</b>	Vehículo





## CONTENIDO

	Pag.
<b>1. Resumen.</b>	2
<b>2. Introducción.</b>	4
<b>3. Antecedentes.</b>	
3.1 Estructura y función de las hormonas esteroides.	
3.1.1 Generalidades.	7
3.1.2 La progesterona.	9
3.1.3 Acciones sexualmente dimórficas de la progesterona (P4).	15
3.2 El receptor a progesterona (RP).	
3.2.1 Características principales del RP.	19
3.2.2 Isoformas del RP.	25
3.2.3 Regulación de la expresión de las isoformas del RP.	29
<b>4. Planteamiento del Problema.</b>	32
<b>5. Hipótesis.</b>	33
<b>6. Objetivos.</b>	34
<b>7. Materiales y Métodos.</b>	
7.1 Animales de experimentación.	35
7.2 Preparación de las hormonas.	35
7.3 Extracción de RNA total.	36
7.4 Electroforesis de RNA total.	37
7.5 Transcripción Reversa (RT) acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	
7.5.1 Amplificación de las isoformas del RP por RT-PCR.	41
7.5.2 Transcripción Reversa (RT)	42
7.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	42
7.5.4 Electroforesis de los productos de RT-PCR	43
7.5.5 Análisis densitométrico y estadístico.	44
<b>8. Resultados.</b>	
8.1 Extracción y caracterización del RNA total.	45
8.2 Determinación de ciclos y concentración de RNA utilizados en la PCR	46
8.3 Expresión de las isoformas A y B del RP en el SNC de la rata hembra y macho.	49
<b>9. Discusión.</b>	54
<b>10. Conclusiones.</b>	65
<b>11. Referencias.</b>	66
<b>12. Apéndice.</b>	78



## 1. RESUMEN

La progesterona (P4) regula diferentes funciones en el sistema nervioso central (SNC) de la rata, como la excitabilidad neuronal, el sueño, la reproducción y la conducta sexual a través de su interacción con su receptor (RP), se sabe que la expresión y la regulación del RP en el cerebro de roedores adultos son sexualmente dimórficas. Éste presenta dos isoformas RP-A y RP-B, recientemente se ha reportado un patrón diferencial en la expresión de las isoformas del RP en el cerebro de ratas macho en comparación al observado en las ratas hembra. Se desconoce si existen diferencias sexuales en la regulación por hormonas esteroides de estas isoformas en el SNC de la rata. Esta información es fundamental para llegar a establecer los mecanismos por los cuales la P4 ejerce efectos dimórficos en el SNC ya que las isoformas del RP regulan diferentes genes y por lo tanto distintas funciones.

En este trabajo se estudió la expresión de las isoformas A y B del RP en diversas regiones del SNC de ratas adultas de ambos sexos gonadectomizadas y tratadas con estradiol (E2), progesterona (P4), y testosterona (T) (sólo machos), mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Se observó que en el hipotálamo de las ratas hembra, el E2 aumentó la expresión de ambas isoformas, mientras que la P4 la disminuyó. En el área preóptica estos cambios se observaron únicamente en RP-B, mientras que en el hipocampo y en el bulbo olfatorio solo RP-A se indujo con el E2 sin que la P4 modificara esta inducción. Contrario a estos resultados, en el cerebelo y en la corteza frontal no se observaron cambios en la expresión de las isoformas del RP con estos tratamientos. En el SNC de la rata macho no se observaron cambios en la expresión de las isoformas del RP en las regiones cerebrales estudiadas con



ningún tratamiento, a excepción del cerebelo en donde el E2 aumentó la expresión de RP-A.

Estos datos nos sugieren que existe una expresión diferencial tejido y sexo-específica de las isoformas del RP en el cerebro de la rata y que ésta es fundamental en la regulación de las funciones mediadas por la P4 en el SNC.



## 2. INTRODUCCIÓN

La progesterona (P4) participa en la regulación de diversas funciones en el cerebro de los mamíferos, abarca desde la regulación de los ciclos reproductivos y los diferentes patrones conductuales asociados a la reproducción, hasta procesos tan finos como la excitabilidad neuronal y la modulación de la actividad de algunos neurotransmisores (Camacho-Arroyo 1995), incluso se ha demostrado que protege a las neuronas de daños producidos por la falta de irrigación sanguínea, la carencia de oxígeno, el trauma cerebral por golpes, contusiones en la médula espinal y agentes tóxicos diversos que alteran el metabolismo y la función neuronal (Stein 2001).

La P4 ejerce muchos de estos efectos de manera diferencial en machos y hembras. La P4 regula la síntesis y liberación del péptido liberador de gonadotropinas (LHRH) a nivel hipotalámico en las hembras. En el núcleo ventromedial del hipotálamo, los receptores a oxitocina son modulados por P4 solamente en las hembras, lo cual se ha asociado con la insensibilidad de los machos a los efectos facilitadores de P4 sobre la conducta de lordosis. La administración de P4 a ratas ovariectomizadas, sin un pretratamiento con estrógenos, disminuye las respuestas de las células de Purkinje del cerebro al glutamato, e incrementa las respuestas de las mismas células a un neurotransmisor inhibitorio como el GABA. Los cambios de temperatura corporal que ocurren a lo largo de los ciclos astral, así como durante la gestación, al parecer, están regulados por P4 a nivel central. En la médula espinal, P4 también tiene efectos transcripcionales, ya que su administración posterior a la de estrógenos, incrementa la expresión del gen de dinorfina, lo cual se ha asociado al aumento en la analgesia que ocurre durante la gestación. La P4 puede inducir diferentes cambios tanto estructurales (densidad de espinas dendríticas) como funcionales (síntesis de neurotransmisores) a través de la regulación de distintos



genes (Camacho-Arroyo 1995), lo que se asocia directamente con un dimorfismo sexual.

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 (RP) (Evans 1988). En roedores (Ilenchuk 1987), en aves (Kuhn 1977) y en primates (Lessey 1983) se han descrito dos isoformas del RP denominadas RP-A y RP-B. La diferencia entre éstas está dada por 164 aminoácidos de la región amino-terminal de RP-B que están ausentes en RP-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). RP-B actúa como un fuerte activador transcripcional en diferentes contextos celulares mientras que RP-A funciona como un inhibidor (Vegeto 1993, McDonnell 1994). Por lo tanto, la actividad de la P4 depende de la tasa de expresión de las isoformas del RP en las diferentes regiones cerebrales. El contenido de las isoformas del RP, así como su regulación por hormonas esteroides se presenta de manera tejido-específica en los órganos blanco como el útero, la glándula mamaria y el SNC (Ilenchuk 1987, Graham 1996, Guerra-Araiza et al., 2001).

En algunas regiones cerebrales de la rata como el hipotálamo y el área preóptica el E2 aumenta la expresión del RP a nivel del RNA mensajero y de la proteína, mientras que la administración de la P4 disminuye esta inducción (Blaustein 1994, Camacho-Arroyo 1998). Sin embargo, se desconoce si la regulación de la expresión de las isoformas del RP por E2 y P4 es sexualmente dimórfica. Para evaluar lo anterior en este trabajo se estudió la regulación de las isoformas del RP en diferentes regiones del SNC de ratas de ambos sexos en diferentes condiciones hormonales, mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).



El conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales P4 participa en el funcionamiento del SNC, permitirá entender procesos biológicos fundamentales como la conducta sexual y la reproducción; además contribuirá al diseño de terapias alternativas en el tratamiento de diferentes trastornos neurológicos y psiquiátricos como la epilepsia, la ansiedad, el síndrome premenstrual y algunos tumores cerebrales que tienen regulación hormonal (Camacho-Arroyo 1995).



## 3. ANTECEDENTES

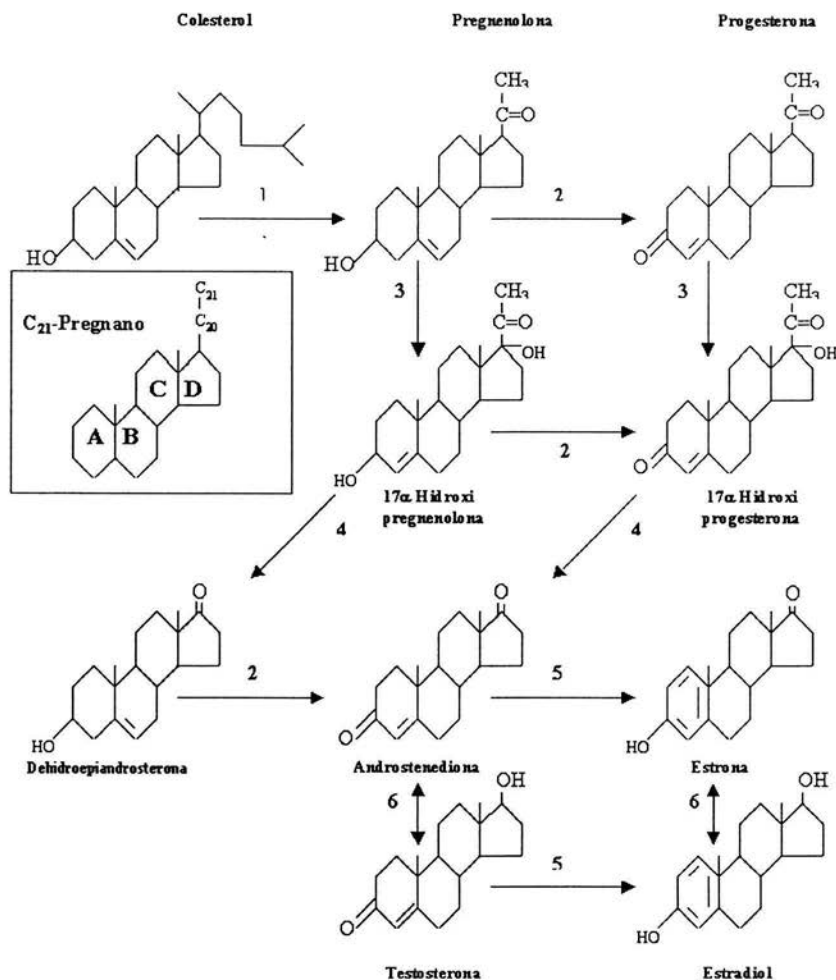
### 3.1 Estructura y función de las Hormonas Esteroides.

#### 3.1.1 Generalidades.

Las hormonas esteroideas son lípidos no saponificables hidrofóbicos, solubles en disolventes orgánicos y que estructuralmente presentan en común como núcleo químico básico, el ciclo pentanoperhidrofenantreno (hidrocarburo cíclico constituido por diecisiete átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono y un anillo de cinco átomos de carbono) (Knobil y Neill, 1988). El término "esteroide" se deriva de la palabra griega *estéreos* = sólido; la mayoría de ellos se sintetizan en el ovario, el testículo y las glándulas adrenales, utilizando al colesterol como precursor (Fig. 1).

Las hormonas esteroideas desempeñan un papel muy importante en la regulación de múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre los que destacan la homeostasis hidrolítica, el dimorfismo sexual, la función reproductiva y la respuesta al estrés. Entre las hormonas esteroideas se encuentran los estrógenos, las progestinas, los andrógenos, los glucocorticoides y los mineralocorticoides (González-Arenas *et al.*, 2001).

Estas hormonas modifican la actividad celular al interactuar con receptores específicos que tienen una alta afinidad para cada hormona esteroide. Los receptores a hormonas esteroideas son proteínas que en su mayoría se localizan en el núcleo de la célula. Estos receptores son parte de una familia de factores de transcripción que interactúan con distintas secuencias del DNA, denominadas elementos de respuesta hormonal, regulando así de manera positiva o negativa la expresión de genes específicos (Zhang *et al.*, 1996).



**Fig.1. Síntesis de los principales esteroides.** 1)20,22 desmolasa; 2) 3 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa, 3)17 $\alpha$ -hidroxilasa; 4)17, 20-esteroide liasa; 5) aromatasa; 6) 17 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa. En el recuadro se encuentra la estructura del pregnano al igual que las letras con las que se denominan a cada uno de los anillos de la estructura principal de las hormonas esteroides (Gore-Langton *et al.*, 1988). Los números representan a las diferentes enzimas que participan en la síntesis de diferentes esteroides.





### 3.1.2 La Progesterona.

La progesterona (P4) (4-pregnen-3,20-diona) pertenece al grupo de hormonas esteroides. Su nombre se deriva del latín: *pro*= a favor y *gestare*=llevar, lo que denota el efecto de llevar o sostener el producto de la concepción (Pérez-Palacios., *et al*, 1985).

La estructura química de la P4 y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (C-21; Fig. 1). La P4 se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso en las células del cuerpo lúteo en el ovario durante el ciclo menstrual (Hsueh *et al.*, 1984; Hutchison *et al.*, 1986). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona foliculo estimulante (FSH), las prostaglandinas y los agentes  $\beta$ -adrenérgicos (Graham *et al.*, 1997). Otros órganos donde también se ha demostrado la síntesis de P4 son la corteza adrenal, la placenta (Gorospe *et al.*, 1985; Perrot-Applanat *et al.*, 1982) y el testículo (Weisz *et al.*, 1980; Dalkin *et al.*, 1992). En el SNC la P<sub>4</sub> se sintetiza desde etapas embrionarias en neuronas, células gliales y en astrocitos de la corteza cerebral y del cuerpo estriado de la rata desde el día 17 de la gestación (Zwain y Yen, 1999; Ukena *et al.*, 1999).

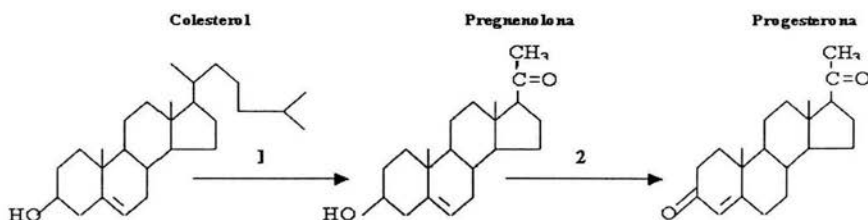
La síntesis de P4 se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a P4 (Fig. 2), mediada por distintas enzimas que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

La P4 puede reducirse para formar varios metabolitos los cuales pueden incrementar, prolongar o terminar los efectos de la P4 o bien proporcionar mecanismos alternativos que modulen las acciones de la hormona (Karavolas *et al.*, 1990) (Fig. 3). Existen dos tipos de metabolitos derivados de la P4: los reducidos en el anillo A: Dihidroprogestinas ( $5\beta$ ,  $5\alpha$ -progestinas), las cuales tienen una gran potencia anestésica y



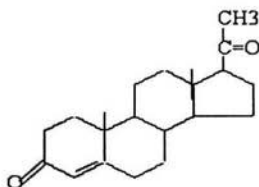
las tetrahidroprogesterinas (reducción en los carbonos 5 y 3) que modulan el funcionamiento del sistema neuronal relacionado con la producción y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH).

Existen otros metabolitos reducidos en el carbono 20 y el carbono 17, la 20  $\alpha$ -hidroxiprogesterona y la 17  $\alpha$ -hidroxiprogesterona respectivamente, los cuales presentan numerosas actividades en el organismo. Los metabolitos derivados de P4 se sintetizan en el ovario, el hígado, el riñón, la placenta y el SNC.



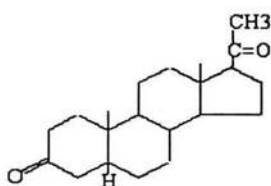
**Fig. 2. Biosíntesis de la P4.** La biotransformación de colesterol a P4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17. B) La oxidación del grupo alcohol en el C-3. C) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A. (1)=20, 22-esteroide liasa, (2) 3 $\beta$ -OH-esteroide deshidrogenasa (Gore-Langton *et al.*, 1988).

La P4 participa en un amplio rango de actividades biológicas en numerosos tejidos (Tabla 1). Sus efectos pueden ser estimuladores como en el caso de la liberación de la GnRH (Ke *et al.*, 1987), de la dopamina (Dluzen *et al.*, 1991), en la inducción de la lordosis (Schaeffer *et al.*, 1990); en la síntesis de uteroglobina (Beier *et al.*, 1968), en la reacción acrosomal y en el flujo  $\text{Ca}^{2+}$  en el espermatozoide (Meizel *et al.*, 1991; Tesarik *et al.*, 1992) y durante la diferenciación sexual (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo, 2000); o bien, inhibidores como en la contractilidad uterina (Csapo *et al.*, 1979) y en la síntesis de norepinefrina inducida por AMPc en el hipotálamo (Petitti *et al.*, 1992).

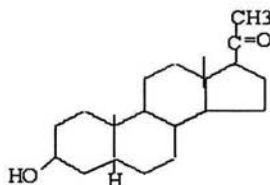


Progesterona

## A) Metabolitos reducidos en el anillo A

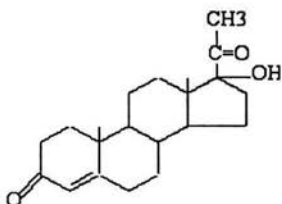
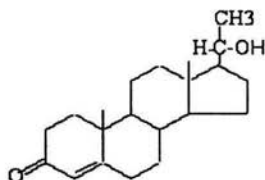


dihidroprogestinas



tetrahidroprogestinas

## B) Metabolitos modificados en C-17 y C-20

17  $\alpha$  hidroxiprogesterona20  $\alpha$  hidroxiprogesterona

**Fig. 3. Principales metabolitos derivados de la P4.** A) Metabolitos reducidos en el anillo A en C-5 y C-3 por la 5 $\alpha$ -esteroido reductasa y la 3 $\alpha$ -esteroido reductasa, respectivamente. B) metabolitos reducidos en C-17 y C-20 sintetizados por la 17 $\alpha$ -esteroido hidroxilasa y la 20 $\alpha$ -esteroido reductasa, respectivamente.



Los principales órganos blanco de la P4 son: el útero, en donde regula la proliferación y diferenciación de este órgano; el miometrio, en donde controla su contractilidad y mantiene las condiciones adecuadas para la implantación del embrión (Graham *et al.*, 1997); en el ovario, en donde interviene en la maduración y liberación del ovocito maduro; en la glándula mamaria, en donde promueve la proliferación y diferenciación del tejido alveolar de la misma, además de la secreción de leche después del nacimiento (Graham *et al.*, 1997). En el cerebro regula la excitabilidad neuronal, el sueño, la reproducción y la conducta sexual (Camacho-Arroyo *et al.*, 1994, 1995 y 1999), así como la temperatura corporal durante el ciclo menstrual (Ganong *et al.*, 1993).

Otro de los efectos estudiados de la P4, es su participación en el ciclo celular. Estos estudios han utilizado como modelo células de cultivo de cáncer de mama T47-D (las cuales son positivas para RP). Cuando estas células se tratan con P4 se observa un aumento en la progresión del ciclo celular, lo cual está relacionado con una inducción de genes asociados con la regulación del ciclo celular, como ciclinas (CD-1; Musgrove *et al.*, 1991, 1993), factores de crecimiento (EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ; Murphy *et al.*, 1986, Musgrove *et al.*, 1993) y protooncogenes asociados con la actividad proliferativa (c-myc, c-fos; Wong *et al.*, 1991; Musgrove *et al.*, 1991). La inducción del ciclo celular por progestinas se ve reflejada en un aumento del número de células que entran a la fase S. También, se ha observado que esta inducción del ciclo celular puede ser bloqueada con el antagonista de la P4, RU486.

Las progestinas pueden inhibir también la expresión de genes involucrados en la supresión de genes involucrados en la represión de la división celular como el gen p53. Se ha observado que hay un decremento en la expresión de p53 producido por P4 en las células T47-D (Hurd *et al.*, 1995) sugiriendo que la hormona puede estimular la proliferación



celular por medio de la remoción de los efectos inhibidores que esta proteína ejerce.

TABLA 1. Acciones fisiológicas demostradas para la P4.

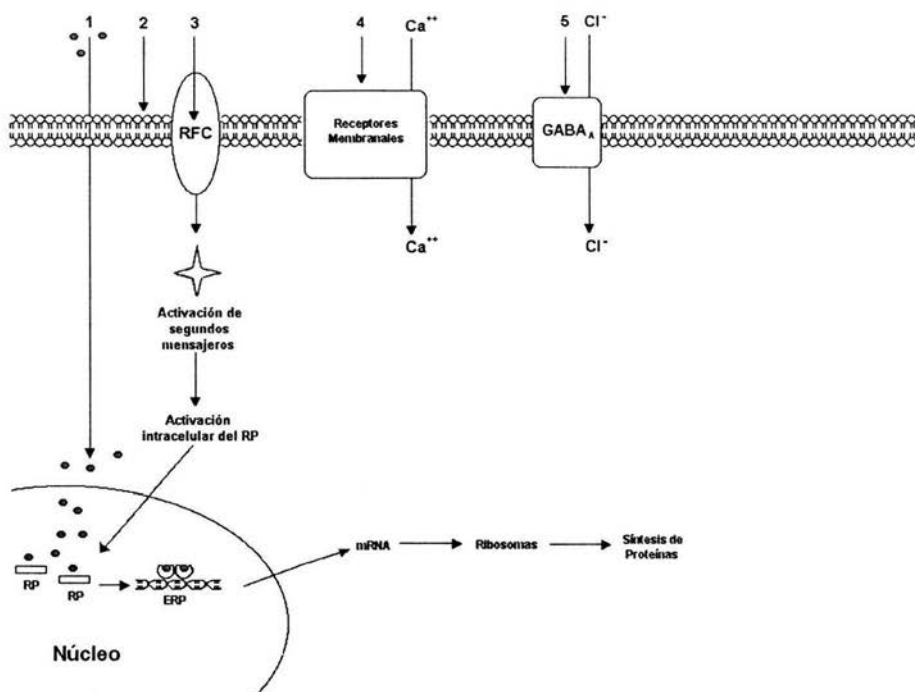
Tejido	Función
Útero/Ovario	Liberación del ovocito (1) Facilitación de la implantación (2) Mantenimiento del embarazo (3) Estimulación de la regeneración del estroma (4)
Glándula mamaria	Desarrollo alveolar (5) Regulación de la síntesis de leche durante el embarazo (6)
Cerebro	Regulación de la respuesta sexual (7) Excitabilidad neuronal, sueño (8) Ovulación (7) Neuroprotección (9, 10)
Pulmón	Incremento de la ventilación durante el ciclo menstrual y el embarazo (11)
Hueso	Regulación de la masa del hueso (12)

(1) Susuki *et al.*, 1994; (2) Graham *et al.*, 1997; (3) Rotchild *et al.*, 1983; (4) Clarke *et al.*, 1993., (5) Topper *et al.*, 1980; (6) Savourete *et al.*, 1990; (7) Camacho-Arroyo *et al.*, 1995; (8) Camacho-Arroyo *et al.*, 1999; (9) González *et al.*, 1998; (10) Vongher y Frye, 1999; (11) Brodeur *et al.*, 1986; (12) Wei *et al.*, 1993.

Se han determinado dos mecanismos de acción por los cuales la P4 actúa dentro de la célula, los cuales son conocidos como genómico y no genómico. El mecanismo genómico involucra la unión de P4 con su receptor intracelular específico (RP) para regular la transcripción de genes específicos. El mecanismo no genómico involucra la acción de la P4 sobre las bicapas fosfolipídicas de la membrana celular, sistemas de



segundos mensajeros, interacción con receptores membranales específicos e interacción con receptores a neurotransmisores como el GABA<sub>A</sub> (Mahesh *et al.*, 1996; Fig. 4).



**Fig. 4. Mecanismos de acción de la (P<sub>4</sub>).** 1) Unión con un receptor intracelular específico (RP) regulando así la transcripción de genes específicos a través de elementos de respuesta a P<sub>4</sub> (ERP). 2) La acción de la P<sub>4</sub> sobre bicapas fosfolipídicas. 3) Sistemas de receptores acoplados a segundos mensajeros como el de dopamina y los receptores de factores de crecimiento (RFC). 4) Interacción con receptores membranales a P<sub>4</sub>. 5) Interacción con receptores a neurotransmisores como el receptor GABA<sub>A</sub> (Mahesh *et al.*, 1996).

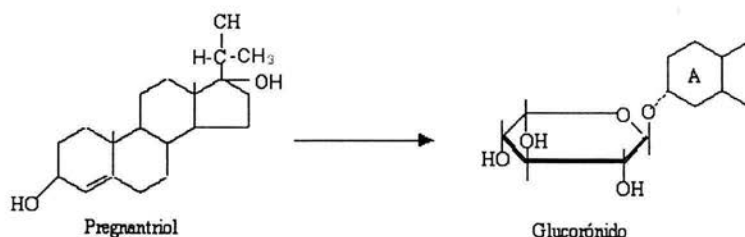
Una vez que la P<sub>4</sub> y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

1. La reducción en el carbono 20 y del anillo A en los carbonos 3 y 5.



2. La formación de los glucoronidos, donde se incrementa la polaridad de la molécula formando compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción por vía urinaria.

El proceso de reducción de la P4 ocurre inicialmente en el carbono 20 dando lugar a la formación de la  $20\alpha$  y  $20\beta$  dihidroprogesterona, ambos con actividad biológica. Posteriormente se reduce el anillo A en la formación de ocho pregnandiolos o pregnantrioles los cuales al reducirse a glucoronidos son excretados por la orina (Fig. 5).



**Fig. 5. Principales catabolitos de la P4.**

### 3.1.3 Acciones sexualmente dimórficas de la P4.

Todos los vertebrados presentan características anatómicas y endócrinas que aseguran la reproducción sexual de las especies. Durante el período prenatal las hormonas sexuales organizan la estructuración de distintos órganos de nuestro cuerpo incluyendo al cerebro. Durante la pubertad las hormonas sexuales median la aparición de las características secundarias asociadas al sexo y regulan la capacidad reproductiva (Kato y Onouchi, 1983).

El dimorfismo sexual se refiere principalmente a diferencias morfológicas, bioquímicas y moleculares entre ambos sexos. Las diferencias en el tamaño de algunas regiones cerebrales entre los sexos pueden deberse a variaciones en el



volúmen o en el área que éstas ocupan, así como a diferencias en el número de células (densidad). La mayoría de las regiones sexualmente dimórficas del cerebro pertenecen al sistema límbico (Madeira y Lieberman, 1995). El área preóptica en el diencefalo fue la primera en describirse como sexualmente dimórfica y continúa siendo uno de los ejemplos más claros de dimorfismo tanto en animales de laboratorio como en humanos (Gorski *et al.*, 1978; Swaab y Fliers, 1985).

El nombre de la región sexualmente dimórfica varía dependiendo de la especie, en el área preóptica de la rata, a esta región se le conoce como la porción medial del área preóptica (*mPOA* por sus siglas en inglés) y en humanos como el núcleo intersticial del hipotálamo anterior- (NIHA) (Allen *et al.*, 1989).

LeVay en 1991 confirmó el dimorfismo sexual en el NIHA-3 pero no en NIHA 1, 2, y 4 en seres humanos (LeVay S., 1991). En el caso del NIHA-1, sin embargo, se ha determinado que en los hombres existen dos veces más células que en las mujeres (Swaab y Hoffman, 1988). Incluso se ha determinado que tanto niños como niñas poseen el mismo número de células en NIHA-1 al nacer y que este número aumenta exponencialmente hasta los 4-5 años de edad. Esta cantidad de células permanece constante hasta la pubertad, pero en el caso de las niñas un alto porcentaje de las células muere (Swaab *et al.*, 1988). Por lo tanto, el dimorfismo sexual del área preóptica en humanos no es aparente hasta la pubertad. Algunos modelos animales, han sido útiles para determinar las conductas reguladas por el área preóptica. Si se destruye el área preóptica, las ratas macho no presentan conducta sexual en presencia de una hembra receptiva (Hansen *et al.*, 1982; Heimer *et al.*, 1967; Szechtman *et al.*, 1978). En las ratas hembras, el área preóptica es considerada como parte de un circuito inhibitor de receptividad sexual (Pfaff y Schwartz-Giblin, 1988). En macacos machos, el área





preóptica está asociada con la iniciación del acto sexual, erección del pene, y el período refractario después del acto sexual.

El núcleo ventromedial del hipotálamo (NVM) es facilitador de conducta sexual en las ratas hembras (Davis y *et al.*, 1979; Pfaff y Sakuma, 1979). En ratas hembras la conducta de receptividad sexual (lordosis) se expresa cuando hay niveles altos de hormonas sexuales (estradiol y progesterona), de lo contrario la hembra rechaza los acercamientos sexuales del macho.

En el NVM de las ratas, la densidad sináptica es mayor en los machos que en las hembras (Miller y Aoki, 1991). Aún más interesante, el número de contactos sinápticos en el NVM de la rata hembra varía a lo largo del ciclo de estral (Frankfurt y colaboradores, 1990; Cohen y Pfaff, 1992). Por lo tanto el dimorfismo del NVM está claramente controlado por las hormonas sexuales, y en el caso de las hembras es regulado a lo largo de los ciclos hormonales.

El núcleo supraquiasmático (NSQ) difiere en forma entre hombres y mujeres; esférico en hombres y oblongado en mujeres (Swaab *et al.*, 1985). En roedores de la pradera, se ha demostrado que la vasopresina media conductas asociadas a la reproducción: agresividad, territorialidad, monogamia, y conducta paternal exclusivamente en machos (Young *et al.*, 1998).

La amígdala medial es 85% mayor en volumen en los hombres que en las mujeres (Hines *et al.*, 1992). La amígdala es considerada como el centro de las emociones, y regulador de reacciones de agresividad, miedo y ansiedad. Recientemente se ha demostrado que en humanos la amígdala está asociada con aprendizaje emocional (Morris *et al.*, 1998) y conducta social (Adolphs *et al.*, 1998). La amígdala también juega un papel importante en el despliegue de la conducta sexual. La amígdala es también un



centro de integración de información olfativa, lo cual juega un papel importante en la expresión de la conducta sexual.

La porción base de la *Stria Terminalis (BNST)* es 97% más grande en volumen en hombres que en mujeres (Hines *et al.*, 1992). En ratas lesionadas del *BNST* se altera la secuencia de copulación en machos (Emery y Sachs, 1976; Claro *et al.*, 1995).

Las hormonas esteroides sexuales y sus receptores son reguladores de la transcripción de genes en el SNC y tienen la capacidad de alterar la estructura y función del cerebro en desarrollo (Quadros *et al.*, 2002).

Dos regiones del área preóptica de la rata son especialmente sensibles a los efectos de la T y del E2 en el desarrollo, estas son el núcleo periventricular anteroventral (AVPv) y el núcleo preóptico medial (MPN). Estas áreas son sexualmente dimórficas neuroquímicamente y funcionalmente (Gorski *et al.*, 1980; Davis *et al.*, 1996). El MPN regula el dimorfismo sexual a nivel conductual, el AVPv regula la secreción de gonadotropinas, acción que también es dimórfica (Davis *et al.*, 1996). Muchas de las diferencias en la anatomía y la función de AVPv y MPN son resultado de la diferente exposición de las hembras y los machos a la T y posteriormente a los E2 durante el desarrollo perinatal (Quadros *et al.*, 2002).

Se han reportado diferencias sexuales relacionadas con la acción de la P4 tales como el despliegue de la conducta sexual: los roedores hembras son más sensibles que los machos a la lordosis provocada por el E2 y la P4. En el área hipotalámica de las ratas y de los cobayos las hembras tienen un alto contenido de RP. La concentración citoplasmática del receptor es incrementada por el E2 y disminuida por la P4 (Blaustein *et al.*, 1979). Las ratas macho gonadectomizadas tienen un nivel más bajo de RP que las hembras en el hipotálamo y el E2 provoca un menor incremento en la concentración del receptor en machos que en las hembras (Blaustein *et al.*, 1980).



La P4 tiene un efecto terapéutico en el "síndrome premenstrual", uno de sus efectos es sobre la ansiedad (Dalton, 1984). La P4 ejerce efectos ansiolíticos y estos son sexualmente dimórficos y dependen del proceso de diferenciación sexual que ocurre en el desarrollo temprano (Rodríguez-Sierra *et al.*, 1986). El tratamiento con E2 + P4 posee un efecto ansiolítico en ratas hembras intactas y machos castrados neonatalmente, sin tener efectos en los machos intactos o en hembras androgenizadas (Rodríguez-Sierra *et al.*, 1986).

En el núcleo ventrolateral caudal del hipotálamo del cobayo se ha observado una diferencia significativa en el porcentaje de neuronas inmunorreactivas a RP que expresan somatostatina entre hembras y machos, donde las hembras tienen 25% y los machos 37% (Dufourny L., *et al.*, 1996).

En ratas hembra tratadas con E2 la P4 incrementa el nivel del receptor a oxitocina en el núcleo ventromedial caudal y medial del hipotálamo mientras que en los machos, la P4 no modula el receptor a oxitocina (Coirini *et al.*, 1992).

### **3.2 Receptor a Progesterona.**

#### **3.2.1 Características principales del RP.**

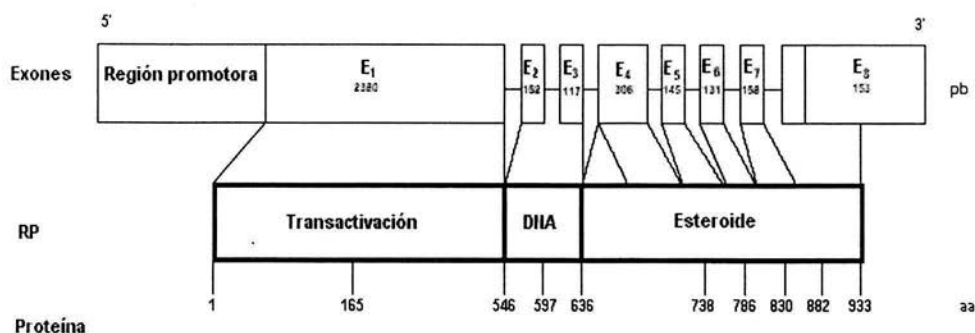
La P4 lleva a cabo la mayoría de sus efectos en la célula a través de la interacción con el receptor a P4 (RP), el cual pertenece a la superfamilia de receptores a hormonas esteroides cuyos miembros coordinan la morfogénesis y la homeostasis en respuesta a la unión con su ligando (Kastner *et al.*, 1990). El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de genes a través de la interacción con secuencias específicas en el DNA (elementos de respuesta hormonal).



El RP humano es codificado por un solo gen localizado en el cromosoma 11q22-23, el tamaño del cDNA es de aproximadamente 90 kb y comprende 8 exones y 7 intrones (Fig. 6; Savouret *et al.*, 1990; Misrahi *et al.*, 1993) y da lugar a un RNA mensajero de 3014 pb (Theveny *et al.*, 1987).

Estructuralmente, el RP está compuesto por dominios que llevan a cabo las siguientes funciones:

- 1) Dominio de transactivación (A/B):** Exón 1 (2380 pb). Participa en la regulación de la transcripción de genes blanco.
- 2) Dominio de unión al DNA (C):** Exones 2 (152 pb) y 3 (117 pb). Participa en la dimerización con otro receptor y en la unión al DNA a través de la presencia de dedos de Zinc.
- 3) Dominio de unión a proteínas de choque térmico (Hsp90; D):** Exón 4 (306 pb). Participa en procesos de estabilización del receptor y en la translocación al núcleo.
- 4) Dominio de unión al esteroide (E):** Exones 5 (145), 6 (131), 7 (158), 8 (153 pb). Interacción con el ligando y función de transactivación.



**Fig. 6 Estructura del gen del RP humano.** El gen del RP está constituido por una región promotora, una región terminal de transactivación, una región de unión al DNA y una región de unión a la hormona. Este gen constituido por 8 exones codifica para una proteína que pesa aproximadamente 120 kDa (Mirashi *et al.*, 1993).

Se ha detectado la presencia del RP en diferentes tejidos del aparato reproductivo de distintos grupos de vertebrados (aves, reptiles y algunos mamíferos); en las células de la granulosa en el ovario (Milgrom *et al.*, 1970; Feil *et al.*, 1972) en las trompas de falopio, vagina, testículo (Terner *et al.*, 1977); en las células de músculo de arterias uterinas (Perrot-Appanat *et al.*, 1988); así como en el oviducto y bolsa de Fabricio de pollo (Ylikomi *et al.*, 1985; González-Morán *et al.*, 1998). El RP se ha localizado también en la glándula mamaria tanto en tejido normal como neoplásico (Pollow *et al.*, 1977; Horwitz *et al.*, 1975) así como en distintas áreas del cerebro tales como el hipotálamo ventro-medial, el área preóptica y la corteza cerebral (Warembourg *et al.*, 1989; Camacho Arroyo *et al.*, 1998). También se encuentra en el timo (Pearce *et al.*, 1983), islotes pancreáticos (Green *et al.*, 1978); en células osteoblásticas (Gunnert *et al.*, 1999) y el pulmón (Camacho-Arroyo *et al.*, 1994).



El mecanismo general de acción del RP activado por el ligando es el siguiente:

En ausencia del ligando específico, el RP se encuentra transcripcionalmente inactivo formando complejos oligoméricos con proteínas de choque térmico como las Hsp (70, 90, 59) (Beato, 1987; Chambrud *et al.*, 1990; Schowalter *et al.*, 1991). Cuando la hormona circulante entra por difusión a través de las membranas citoplásmica y nuclear (Litwack *et al.*, 1992) se une al receptor causando los distintos cambios conformacionales que promueven la fosforilación de éste (en residuos dependientes de ciclina A) y la disociación de las Hsp (Allan *et al.*, 1992; Mirashi *et al.*, 1987; Passinen *et al.*, 1999; Clemm *et al.*, 2000).

El RP es una fosfoproteína cuya actividad puede ser regulada por fosforilación (Sheridan *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 1997). Existe evidencia de que la regulación de las vías de señalización celular alteran la actividad y la fosforilación del RP (Beck *et al.*, 1992; Takimoto *et al.*, 1996) así como de otros receptores a hormonas esteroides (Ignar-Trowbridge *et al.*, 1992; Rogatsky *et al.*, 1999). Algunos de estos cambios se deben a alteraciones directas en la fosforilación del RP, mientras otros parecen ser afectados por proteínas asociadas (Rowan *et al.*, 2000). La fosforilación es un evento muy importante para que se lleve a cabo la transactivación de genes mediada por  $P_4$ . Se ha demostrado que el RP tiene catorce sitios de fosforilación, de éstos se ha demostrado en sistemas *in vivo* que se fosforilan los residuos Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>130</sup>, Ser<sup>162</sup>, Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>213</sup>, Ser<sup>400</sup> y Ser<sup>676</sup>; en sistemas *in vitro* se fosforilan los residuos Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>213</sup>, Thr<sup>430</sup>, Ser<sup>554</sup> y Ser<sup>676</sup> en ausencia de la hormona; y después del estímulo con  $P_4$  se induce la fosforilación temporal de otros tres residuos que son Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>294</sup> y Ser<sup>345</sup> (Zhang *et al.*, 1995). Se han detectado seis sitios de fosforilación que son exclusivos para la isoforma B del hRP en los residuos Ser<sup>20</sup>, Ser<sup>25</sup>, Ser<sup>81</sup>, Ser<sup>102</sup>, Ser<sup>130</sup> y Ser<sup>162</sup>, y ocho sitios de fosforilación que son



comunes para ambas isoformas en los residuos Ser<sup>190</sup>, Ser<sup>213</sup>, Ser<sup>294</sup>, Ser<sup>345</sup>, Ser<sup>400</sup>, Thr<sup>430</sup>, Ser<sup>554</sup> y Ser<sup>676</sup> (Knotts *et al.*, 2001) (Fig. 7).

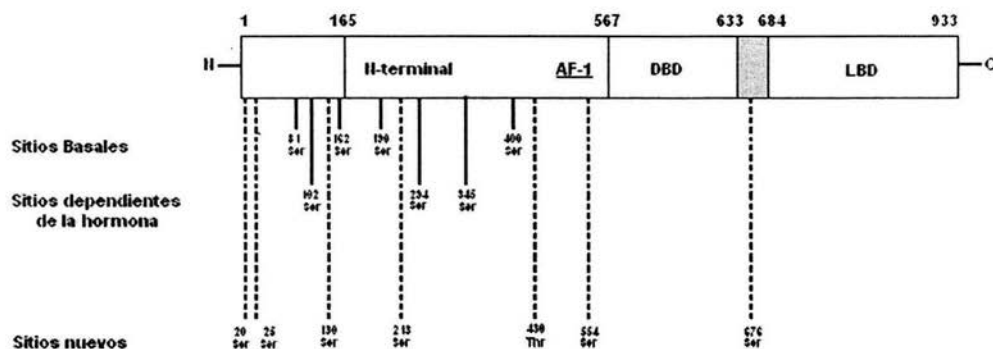
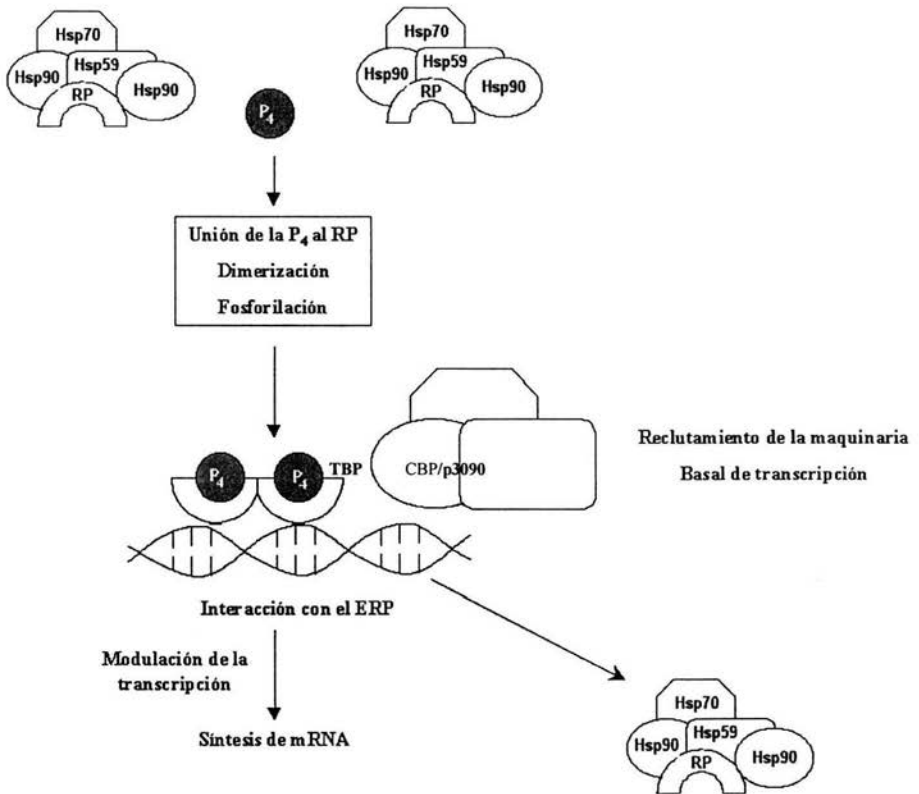


Fig. 7 Sitios de fosforilación en el RP humano (hRP). Residuos de fosforilación en el hRP identificados hasta la fecha. Tomado de Knotts *et al.*, 2001.

Muchos de los sitios de fosforilación en los receptores a hormonas esteroideas contienen motivos Ser/Thr-Pro. Se ha demostrado que en caso de RP de pollo, los cuatro motivos de este tipo son fosforilados (Denner *et al.*, 1990; Poletti *et al.*, 1993). El hRP contiene quince de estas secuencias de las cuales la mayoría han sido identificadas como sitios de fosforilación.

El receptor fosforilado presenta una alta afinidad por sitios en el DNA denominados elementos de respuesta a P4. La unión del RP activado, a su elemento de respuesta, permite reclutar factores de transcripción hacia la región promotora para iniciar y regular la síntesis del RNAm (Mahesh *et al.*, 1996; Beato *et al.*, 1989). Una vez que se ha llevado a cabo la transcripción del gen, el RP y la maquinaria transcripcional se desensamblan del gen blanco y el receptor regresa a la fase de inactivación (Rodríguez *et al.*, 1990) (Fig. 8).



**Fig. 8 Mecanismo general de activación del RP por su ligando.** La P<sub>4</sub> entra al núcleo y se une a su receptor. Esta unión produce un cambio conformacional en el receptor que aumenta su afinidad al DNA y así el complejo ligando-receptor interactúa con secuencias específicas llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE) lo cual modifica la transcripción del gen blanco (Giagrande *et al.*, 1997).

El RP es regulado a la alta por estrógenos y a la baja por P<sub>4</sub> en muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo (Graham *et al.*, 1997; Camacho-Arroyo *et al.*, 1994; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 1999).





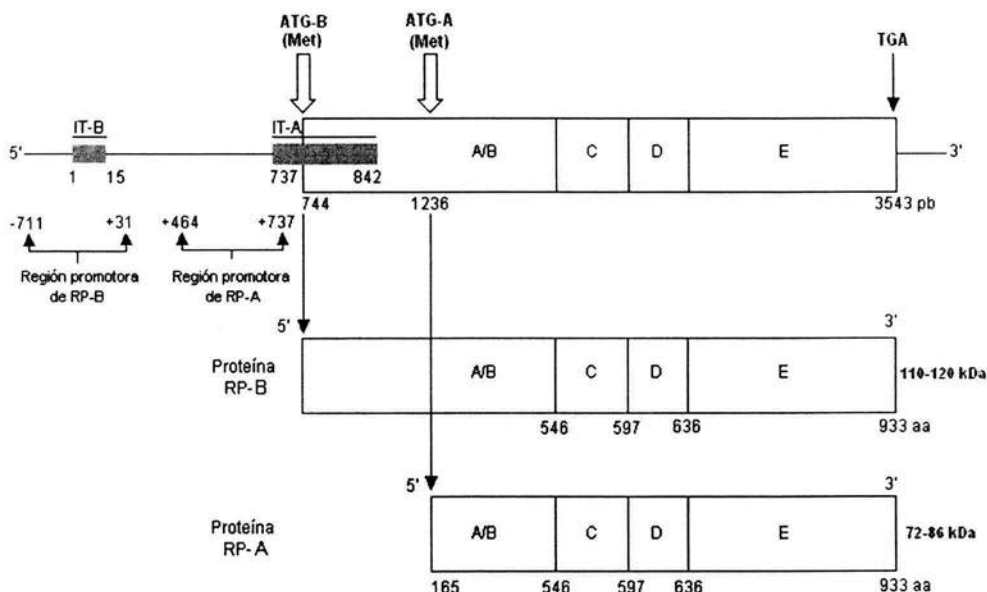
En otros estudios se demostró mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que la expresión del gen del RP es regulada por hormonas sexuales esteroideas en el hipotálamo y en la corteza cerebral, al igual que en el útero en conejas adultas; presentando una regulación a la alta por estrógenos y a la baja por la misma P4 (Camacho-Arroyo *et al.*, 1996).

### 3.2.2 Isoformas del RP.

En algunas especies de vertebrados (aves, roedores y primates) se han identificado dos isoformas del RP denominadas A (80,000-94,000 Daltones) y B (108,000-120,000 Daltones) (Schrader *et al.*, 1981; Horwitz *et al.*, 1996; Guerra-Araiza *et al.*, 2000). Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero son reguladas por distintos elementos de respuesta que se encuentran contenidos en el promotor y son inducidos por estrógenos (Fig. 9).

En el ser humano (Kasnter *et al.*, 1990; Fig. 9) y en la rata (Kraus *et al.*, 1993) las isoformas del RP son originadas por distintos mensajeros, mientras que en las aves se originan por un procesamiento alternativo de un mismo RNAm (Connely *et al.*, 1989).

Estudios bioquímicos indican que ambas isoformas tienen la misma afinidad tanto a la P4 como al elemento de respuesta a P4 (Christensen *et al.*, 1991). El RP tiene la capacidad de unirse al DNA como tres especies diméricas: AA, AB, BB. Se ha demostrado que la transcripción mediada por el RP no es igual cuando se forman homodímeros o heterodímeros e interactúan con agonistas y antagonistas (Tora *et al.*, 1988).



**Fig. 9 Organización de las isoformas del RP humano.** Los números indican la posición de las bases y de los aminoácidos en el gen y en las proteínas de las isoformas de RP respectivamente. IT-B e IT-A: Sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; A-E: dominios funcionales del RP; ATG-B y ATG-A: Inicio de la traducción de RP-B y RP-A respectivamente; Met: Metionina; TGA: Sitio de término de la transcripción (Kastner *et al.*, Fujimoto *et al.*, 1997).

Las isoformas pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo celular, del gen blanco y del promotor (Tung *et al.*, 1993). En muchos sistemas celulares la isoforma RP-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 a la timidina cinasa. Por otro lado, el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por RP-B como por otros receptores a hormonas esteroideas (Vegeto *et al.*, 1993; Tung *et al.*, 1993; Sartorius *et al.*, 1994; Clemm *et al.*, 1995).



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

1.- La isoforma A carece de los primeros 165 aminoácidos presentes en la isoforma B (Graham *et al.*, 1995).

2.- La existencia de tres regiones con funciones de activación (AF1, AF2 y AF3). Las dos primeras están presentes en ambas isoformas, mientras que AF3 solamente se encuentra en el RP-B (Giagrande *et al.*, 1999).

3.- La presencia de una región con función inhibitoria localizada en la región adyacente a AF que solo es funcional en RP-A. Estudios recientes han demostrado que esta región bloquea la activación de la transcripción mediada por AF1 y AF2, pero no por AF3, presente en RP-B (Huse *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 1994).

4. Los dímeros formados por B:B tienen mayor capacidad de unirse a secuencias blanco del DNA (Schoonen *et al.*, 1998), mientras que los heterodímeros son más inestables y presentan diferentes propiedades de unión al DNA.

5.- El RP humano es fosforilado al menos en catorce residuos, seis de estos sitios sólo se encuentran en el RP-B mientras que los otros ocho los comparten ambas isoformas (Knotts *et al.*, 2001).

La diferente distribución y regulación de estos sitios de fosforilación en las isoformas del RP puede conferirles diferentes estados conformacionales que los pueden hacer más o menos afines por las secuencias blanco y regular la transcripción de un gen de manera específica.

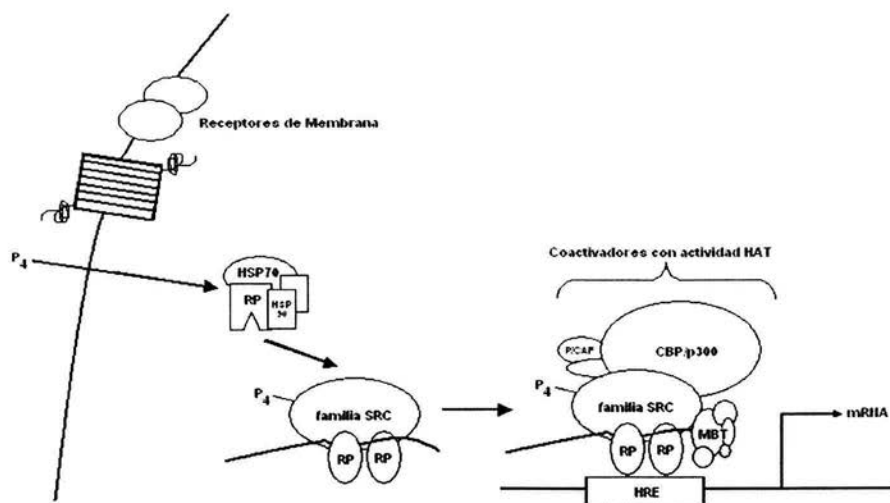
Estas observaciones sugieren que una alteración en la expresión o actividades de ambas isoformas pueden tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la P4. La tasa de expresión de las dos isoformas varía en diferentes órganos y tejidos blanco (Ing *et al.*, 1993; Castren *et al.*, 1990), sugiriendo que la expresión diferencial



puede ser crítica para la respuesta celular apropiada a la P4 (Camacho-Arroyo *et al.*, 1998). RP-A es predominante en el útero de roedores (50:1) así como en el sistema reproductivo de monos y humanos (2:1; Lessey *et al.*, 1983).

Por otro lado, los coactivadores de receptores nucleares son una clase de proteínas correguladoras que interactúan con miembros de la superfamilia de receptores nucleares de manera ligando específica para potenciar su efecto en la transcripción de genes blanco (Fig. 10). Funcionalmente los coactivadores sirven como puentes moleculares que unen al receptor a la maquinaria basal de transcripción (McKenna *et al.*, 1999). Se ha observado que algunos coactivadores tienen actividades enzimáticas que contribuyen a potenciar la transcripción de genes. SRC-1, SRC-2, SRC-3 (Coactivadores de Receptores a Esteroides), p300/CBP y PCAF (Factor Asociado a p300/CBP) tienen actividad de histona acetiltransferasa (HAT) y miembros del complejo SWI/SNF presentan actividad de ATPasa (Sterner *et al.*, 2000). La actividad HAT modifica la estructura represiva de la cromatina neutralizando la carga positiva de las histonas, interrumpiendo las interacciones iónicas entre las histonas cargadas positivamente y el esqueleto de DNA cargado negativamente.

La actividad HAT es la primera función enzimática implicada en la transcripción dependiente de los receptores a hormonas (Spencer *et al.*, 1997). Los coactivadores que tienen actividad de ATPasa físicamente son capaces de abrir la estructura local represiva de la cromatina permitiendo un fácil acceso de otras proteínas auxiliares de la transcripción (Jenster *et al.*, 1997). La existencia de coactivadores representa otro nivel de regulación para la activación del RP.



**Fig. 10. Activación del RP.** El RP está presente en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico (HSP); cuando la P4 se une al RP las HSP se disocian y el RP sufre cambios conformacionales que le permiten unirse a un elemento de respuesta a hormonas (HRE), reclutar la maquinaria basal de transcripción (MBT) y coactivadores de la familia SRC. El complejo formado puede reclutar otros factores al promotor que pueden 1) Abrir la estructura de la cromatina a través de su actividad de Histona Acetiltransferasa (HAT) y, 2) contribuir a la estabilización del complejo de preiniciación. Las vías de señalización que regulan la actividad de cinasas y fosfatasa en la célula contribuyen a la activación del RP, modificando su fosforilación y la de los cofactores (Rowan y O'Malley, 2000).

### 3.2.3 Regulación de la expresión de las isoformas del RP.

Se ha reportado la expresión del RP en diversas regiones cerebrales como el tálamo, el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, el cerebelo, la corteza cerebral, la amígdala y el tallo cerebral (Camacho-Arroyo *et al.*, 1994; Cerbón *et al.*, 1989; MacLusky y McEwen, 1978, Kastrop *et al.*, 1999). Se ha detectado la presencia del RP desde etapas embrionarias en el hipotálamo de roedores de ambos sexos, su expresión diferencial en distintas regiones cerebrales, así como su modificación a lo largo del desarrollo (Wagner *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1990), en diferentes condiciones hormonales como sucede



durante los ciclos estral, menstrual o en animales ovariectomizados tratados con estrógenos o P4 (Camacho-Arroyo *et al.*, 1998, Bethea *et al.*, 1998, Guerra-Araiza *et al.*, 2000).

En la mayoría de los tejidos estudiados se ha observado que la expresión del RP está regulado de manera positiva por estrógenos y de manera negativa por P4. La regulación por estrógenos sucede principalmente a nivel transcripcional y está mediada por elementos de respuesta a estrógenos localizados en la región promotora del gen del RP o en regiones intragénicas del mismo (Kraus *et al.*, 1993; Savouret *et al.*, 1991). En el SNC de la rata la expresión del RP es inducida por estrógenos en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo, mientras que dicha inducción no sucede en la amígdala y el cerebelo (Cerbón *et al.*, 1989; MacLusky y McEwen, 1978; Camacho-Arroyo *et al.*, 1998).

Se ha observado que la regulación del RP por estrógenos a niveles transcripcional y traduccional en algunas áreas del cerebro no es concordante, así, los estrógenos inducen un aumento en los niveles de RNAm del RP en la corteza cerebral de conejas ovariectomizadas, sin embargo éste incremento no se observa a nivel de la proteína, lo cual sugiere una regulación a nivel post-transcripcional (Camacho-Arroyo *et al.*, 1994; Camacho-Arroyo *et al.*, 1996).

Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación a la baja por P4 son hasta el momento desconocidos. Debido a la carencia de elementos de respuesta a P4 en el gen del RP en mamíferos, es posible que tal regulación ocurra a nivel de la proteína (Kraus *et al.*, 1993; Savouret *et al.*, 1991).

La tasa de expresión de las isoformas del RP varía de manera tejido-específica, en respuesta a los estímulos hormonales y de acuerdo a la etapa del desarrollo en la que se encuentre el organismo, sin embargo se ha reportado que hay una expresión diferencial de las isoformas del RP, ya que se ha encontrado que para la corteza cerebral, el área



preóptica y el hipotálamo la isoforma predominante en la rata recién nacida es la RP-B, pero esta expresión se modifica al rededor del día 12, cuando la isoforma predominante es la RP-A (Kato *et al.*, 1993).

En el útero de roedores y primates la isoforma predominante es la RP-A, aunque su tasa de expresión varía durante los ciclos reproductivos (Ilenchuk y Walters, 1987; Mangal *et al.*, 1997 y Duffy *et al.*, 1997), para el caso de la mujer se sabe que en el útero la expresión de ambas isoformas alcanza su máximo durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual, sin embargo, la tasa de expresión RP-A:RP-B es  $> 10:1$  durante la primera semana del ciclo; en los días 9-13 es aproximadamente de 5:1; de los días 14-16 es 2:1 y hacia el final del ciclo RP-B es prácticamente indetectable (Mangal *et al.*, 1997).

Recientemente se han reportado cambios en la expresión de las isoformas del RP en la hipófisis de la rata durante el ciclo estral, siendo notorio el aumento de la expresión de ambas isoformas en la mañana del proestro (Szabo *et al.*, 2000). Además se han observado claras diferencias en la regulación de la expresión de las isoformas del RP a nivel del RNAm (Camacho-Arroyo *et al.*, 1998; Guerra-Araiza *et al.*, 2000).

En el hipotálamo de ratas ovariectomizadas, la expresión de ambas isoformas del RP fue inducida por estrógenos y reducida por P4, y en el área preóptica éstos cambios sólo se presentaron en RP-B, mientras que en hipocampo la isoforma que presentó inducción con estrógenos fue RP-A, sin que la P4 tuviera efectos en la expresión de ambas isoformas (Camacho-Arroyo *et al.*, 1998). En condiciones fisiológicas como en ciclo estral, RP-B fue predominante en el hipotálamo y en el área preóptica, mientras que en el hipocampo no se detectó una diferencia importante entre la expresión de las dos isoformas a nivel del RNAm (Guerra-Araiza *et al.*, 2000).



## 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El papel de las isoformas del RP en la regulación de las acciones de la P4 es fundamental, por lo que el conocimiento tanto de las características de las isoformas del RP, 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.

Se han reportado diferencias sexuales relacionadas con las acciones reguladas por la P4 en SNC, tales como: el despliegue de la conducta sexual, efectos ansiolíticos, distribución de los receptores de somatostatina y oxitocina. Se sabe que la expresión y la regulación del RP en el cerebro de roedores adultos son sexualmente dimórficas. Recientemente se ha reportado un patrón diferencial en la expresión de las isoformas del RP en el cerebro de ratas macho en comparación al observado en las ratas hembra. Sin embargo se desconoce si existe una regulación diferencial en la expresión de las isoformas del RP por hormonas esteroides en el SNC entre ratas hembras y machos.

Esta información es fundamental para llegar a establecer los mecanismos por los cuales la P4 ejerce efectos dimórficos en el SNC ya que las isoformas del RP regulan diferentes genes y por lo tanto distintas funciones. Por lo que en este trabajo se estudiará la regulación de la expresión a nivel del gen de las isoformas del RP en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, la corteza frontal, el bulbo olfatorio y el cerebelo en ratas gonadectomizadas de ambos sexos después de la administración de E2 y P4. Los niveles de RNA mensajero se cuantificarán mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).





## 5. HIPÓTESIS

- Dado que existen diferencias sexuales en las acciones reguladas por P4 y en la expresión de los receptores a RP entonces la regulación de la expresión de las isoformas del RP por E2 y P4 será diferente en el SNC de la rata hembra con respecto a la del macho.
- La regulación de la expresión de las isoformas del RP por E2 y P4 será diferente dependiendo de la región analizada en el SNC de la rata hembra y macho.



## 6. OBJETIVOS.

### OBJETIVO GENERAL

- Conocer si existe un dimorfismo sexual en la regulación por hormonas esteroides de la expresión de las isoformas del RP en el SNC de la rata.

### OBJETIVOS PARTICULARES.

- Estudiar la regulación de la expresión de las isoformas del RP 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.
- Determinar cuál de las isoformas del RP se expresa predominantemente a nivel del RNA mensajero en cada región cerebral estudiada.
- Comparar la regulación de las isoformas del RP en diferentes regiones cerebrales de ratas hembras y machos.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Animales de experimentación.

A lo largo de este estudio se utilizaron ratas hembra y macho adultas (12 semanas de edad) de 200-250 g de peso de la cepa Wistar que se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad 12:12 horas, con agua y comida *ad libitum*.

Se gonadectomizaron ratas de ambos sexos bajo anestesia general con ketamina a una dosis de 80 mg/kg vía intraperitoneal que diez días después de la cirugía fueron tratadas (n=6 ratas por grupo) por vía subcutánea con: a) vehículo que representó al lote testigo (aceite de maíz/etanol 10%); b) 17- $\beta$  E2 en una dosis de 5  $\mu$ g/100 g de peso corporal durante dos días consecutivos; c) 17- $\beta$  E2 durante dos días seguido por P4 al tercer día en una dosis de 400  $\mu$ g/100 g y d) sólo en el caso de los machos, testosterona en una dosis de 100  $\mu$ g/100 g durante dos días consecutivos. Las ratas se sacrificaron 24 h después de la administración de los compuestos y se disecaron el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, la corteza frontal, el cerebelo y el bulbo olfatorio. Todas las regiones fueron inmediatamente procesadas para la extracción del RNA total.

### 7.2 Preparación de las hormonas.

#### 1) Preparación de la P4

Se disolvieron 12 mg de P4 en etanol absoluto al 10% (200  $\mu$ l) más 2 ml de aceite de maíz.

#### 2) Preparación del E2

Se disolvieron 6 mg de 17- $\beta$  estradiol en etanol absoluto al 10% (300  $\mu$ l) más 3 ml de aceite de maíz.



### **7.3 Extracción 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).

El RNA total se extrajo de los tejidos provenientes de los diferentes grupos de ratas en estudio, de la siguiente manera:

1. En tubos nuevos y estériles, se homogenizaron 100 mg de tejido por 1 ml de TRIzol (apéndice) a 4°C. La cuchilla del politrón se enjuagó previamente con agua tratada con DEPC y la solución de TRIzol.
2. Las muestras homogeneizadas se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de cloroformo por 1 ml de homogenado, los tubos se taparon y agitaron con vortex por 30 seg.
3. Se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 15 000 rpm a 4°C por 15 minutos. Al final se obtuvieron dos fases: la inferior de color rojo compuesta por fenol:cloroformo y la porción superior acuosa incolora. El RNA quedó en esta última fase, mientras que el DNA y las proteínas se encontraron en la interfase y en la fase orgánica respectivamente.
4. La fase acuosa se transfirió a otro tubo eppendorf y se agregó un volumen equivalente de isopropanol. La muestra se mantuvo a 4°C durante toda la noche.
5. Las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 15,000 rpm a 4°C y el RNA se encontró en una pastilla blanca amarillenta.



6. El sobrenadante se removió, el precipitado se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 7,500 rpm a 4°C durante 8 minutos.
7. El sobrenadante se removió y el precipitado se lavó nuevamente con etanol al 80%. Posteriormente se centrifugó a 7,500 rpm durante 8 minutos a 4°C.
8. El sobrenadante se removió con pipetas microvolumétricas y se colocaron los tubos boca abajo sobre una gasa estéril para evaporar el etanol.
9. Se disolvió la pastilla de RNA en 40 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC estéril.
10. Se hicieron diluciones 1:500 y se leyó la absorbancia de estas muestras a las siguientes longitudes de onda: 260 y 280 nm. Se determinó la concentración de RNA mediante la siguiente fórmula:  $\mu\text{g}/\mu\text{L de RNA} = 1 \text{ unidad de absorbancia a } 260 \text{ nm} \times \text{factor de dilución (500)} \times 40 / 1000$ . También se determinó la pureza del RNA por medio de la relación de los valores de absorbancia obtenida a 260 y a 280 nm (260/280 nm). El valor de esta relación en el que se considera puro el RNA es entre 1.8 y 2.

#### **7.4 Electroforesis de RNA total**

Para determinar la integridad del RNA extraído, éste se analizó en geles de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes.

1. Se preparó un gel desnaturalizante de agarosa al 1% (apéndice) de la manera siguiente:

La agarosa se disolvió en el agua tratada con DEPC. Posteriormente se agregaron el formaldehído y el MOPS, se mezcló la solución y se vertió en la cámara para geles.



2. Para el corrimiento electroforético se prepararon las muestras de la siguiente manera :

Reactivos	Concentración final.
RNA	3 µg
Formamida	50 %
Formaldehído	6.5 %
MOPS	1 X
Amortiguador de carga	1 X
Bromuro de Etidio	2.5 µg

El RNA se mezcló con la formamida, el formaldehído y el MOPS y se calentó a 75°C por 5 minutos, se colocó inmediatamente en hielo por 5 minutos. Se le agregó el amortiguador de carga (apéndice) y el bromuro de etidio.

3. Las muestras se depositaron en el gel y se separaron a 90 voltios por 90 minutos. Se observaron las muestras en un transiluminador de luz ultravioleta.

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.

### **7.5. Transcripción reversa (RT) acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

#### **RT-PCR**

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido muy utilizada para estudiar la regulación de genes de baja expresión amplificándolos a partir de sus secuencias de RNA. Esta técnica requiere de la conversión del RNA total a DNA complementario (cDNA) por medio de un a Transcripción Reversa (RT) y amplificación del DNA complementario por PCR (RT-PCR) (Rappolee et. al. 1988, Kawasaki 1989).



La técnica de PCR es un método enzimático para amplificar fragmentos específicos de DNA *in vitro*. La PCR se basa en el uso de dos oligonucleótidos como iniciadores para la síntesis catalizada por la DNA polimerasa, desde cadenas opuestas, a través de una región determinada por los sitios de estos dos oligonucleótidos. Por repetición de ciclos de desnaturalización de las cadenas del DNA, unión de los oligonucleótidos iniciadores y síntesis del DNA, se puede alcanzar un incremento exponencial de un fragmento discreto de DNA (Saiki 1985, Mullis 1987).

Debido a las características estructurales de las isoformas del RP cuya única diferencia son 164 aminoácidos de la región amino terminal (Fig 11), 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 RP-B (Fig 11).

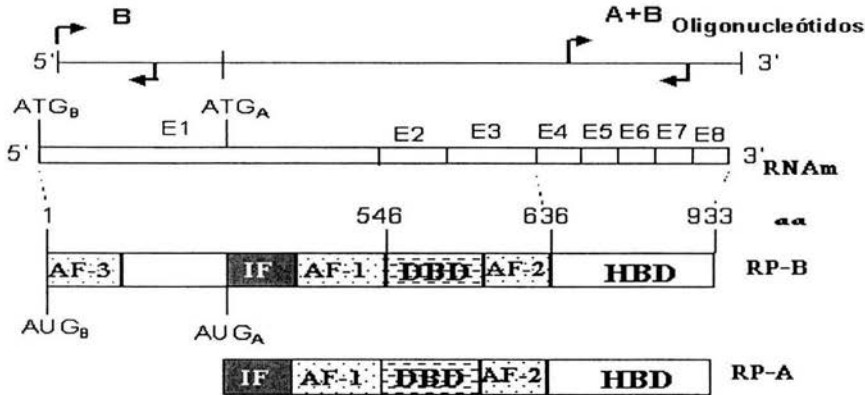


Figura 11 Organización estructural de las isoformas del RP. La organización general de los transcritos y de las proteínas de las isoformas del RP están esquemáticamente ilustradas. El gen del RP está constituido por 8 Exones (E1-E8). El E1 constituye la parte amino-terminal de la proteína, E2 y E3 forman 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 al RP.

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) como control de carga. 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.





### 7.5.1 Amplificación de las isoformas del RP 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 sólo está presente en RP-B y de un fragmento del gen que codifica a la enzima Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que se utilizó como un control interno (Cuadro I).

CUADRO I.

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

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



### 7.5.2 Transcripción Reversa (RT)

Se realizó la transcripción reversa del RNA total. Para ésto se preparó la siguiente mezcla para la reacción:

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Final</b>
RNA Total	2 µg (en un volumen máximo de 2.5 µl)
Buffer RT (5X)	50 mM Tris-HCl pH=8.3 75 mM KCl 3 mM MgCl <sub>2</sub>
DTT (100 mM)	10 mM
dNTPs (10 mM)	0.5 mM de cada dNTP
RT M-MLV (200 U/µl) (apéndice)	400 unidades
Oligo d-T	0.05 µg

La reacción se incubó en un termociclador Perkin Elmer Cetus Modelo 9600 a 38°C por una hora. El control negativo consistió de una muestra de agua en sustitución del RNA.

### 7.5.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para determinar el número de ciclos que se utilizaron para realizar las amplificaciones, éstas se llevaron a cabo a 20, 25, 30, y 35 ciclos. 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.



Las condiciones de PCR utilizadas en todos los experimentos fueron las siguientes:

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Final</b>
Buffer PCR 10 X	20 mM Tris-HCl pH=8.4 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> (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 RP 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.

#### **7.5.4 Electroforesis de los productos de RT-PCR**

Una vez que se realizó el RT-PCR, se llevó a cabo una electroforesis de los productos obtenidos. Se separaron 35 μl de producto de RT-PCR con Amortiguador de carga 6X para DNA (apéndice) en un gel de agarosa al 2% preparado con TBE 0.5 X (apéndice).

Se prepararon 180 ml de gel, se pesó la agarosa y se le agregó el TBE 0.5 X y 4 μl de bromuro de etidio 10 mg/ml (0.2 μg/ml concentración final). El gel se corrió a 90 voltios por 1.5 h en un amortiguador TBE 0.5 X

Los productos de amplificación se observaron en un transiluminador de rayos UV y se fotografiaron e imprimieron con una película Polaroid 665.



### **7.5.5 Análisis densitométrico y estadístico.**

La intensidad de las bandas de RP-A+B, RP-B y GAPDH fue cuantificada mediante un análisis densitométrico mediante el programa "Scion Image program for Windows" (2000 Scion Corporation, NIH, USA). El nivel de la 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" (Graph Pad, CA) fue utilizado para calcular las diferencias significativas de los datos obtenidos.



## 8. RESULTADOS

### 8.1 Extracción y caracterización del RNA total.

Se realizó la extracción del RNA total de los tejidos del SNC de las ratas de los diferentes grupos experimentales usando tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Trizol) y se cuantificó su concentración. La pureza de los RNAs obtenidos se determinó por medio de la relación de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. De los animales tratados con E2, P4 y T se procesaron la corteza frontal, el hipotálamo, el hipocampo, el bulbo olfatorio y el cerebelo tanto de hembras como machos.

En la figura 12 se muestra la electroforesis en un gel representativo de agarosa en condiciones desnaturalizantes de los RNAs totales (3  $\mu$ g) extraídos de corteza frontal de la rata hembra. Se observan dos bandas que corresponden a las subunidades 28s y 18s del RNA ribosomal y no se observa material producto de degradación, lo cual indica que el RNA obtenido se encontraba en buenas condiciones lo cual sirvió como método cualitativo para poder continuar con la amplificación del gen.

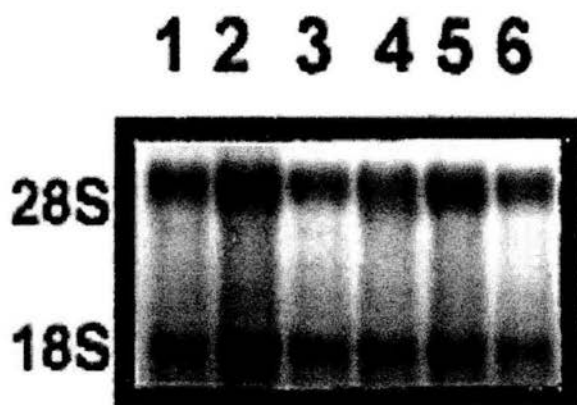


Fig. 12. RNAs ribosomales 18s y 28s, que indican la integridad del RNA extraído de la corteza frontal de la rata después de la administración de estradiol (carriles 1-6).

## 8.2 Determinación de ciclos y concentración de RNA utilizados en la PCR.

Las amplificaciones se llevaron a cabo a 20, 25, 30, y 35 ciclos, se decidió realizar la técnica de PCR a 25 ciclos ya que las amplificaciones obtenidas se encontraron en la fase exponencial de la curva (Fig. 13).

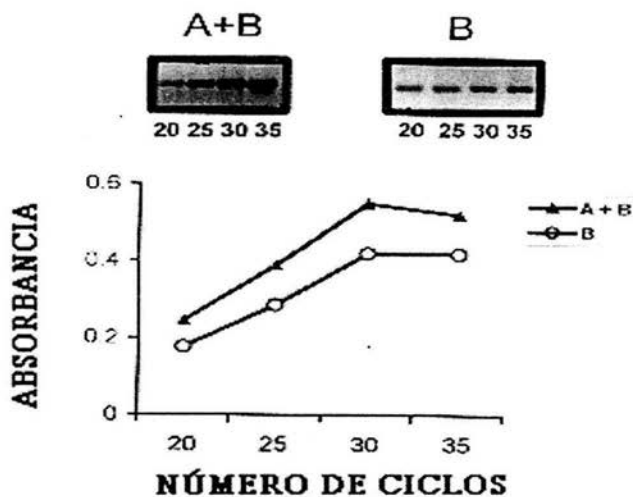


Figura 13. Determinación del número de ciclos de amplificación para los genes del RP. Se realizó la técnica de RT-PCR de RP-A+B y RP-B a partir del RNA total de la corteza frontal de ratas hembra adultas intactas. La reacción de PCR se realizó a diferente número de ciclos (20-35) y la intensidad de las bandas del RP fue cuantificada por un análisis densitométrico.



Se realizó la técnica de PCR con diferente concentración de RNA total 0.25, 0.5, 1, 2, 4  $\mu\text{g}$ . En la figura 14 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  $\mu\text{g}$  de RNA por reacción para estudiar la expresión de los genes.

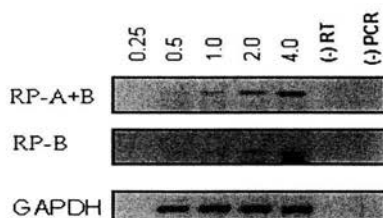


Figura 14. Efecto de la concentración de RNA total sobre el producto amplificado por RT-PCR. Se realizó la técnica de RT-PCR a partir del RNA total del hipotálamo de ratas ovariectomizadas tratadas con E2. La reacción de PCR se realizó utilizando diferentes concentraciones de RNA total (0.25-4.0  $\mu\text{g}$ ) 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).





### 8.3 Expresión de las isoformas A y B del RP en el SNC de la rata hembra y macho.

Los resultados obtenidos demuestran que la expresión de las isoformas del RP en varias regiones del cerebro de la rata macho y hembra es regulada diferencialmente por E2 Y P4.

En la electroforesis se observan bandas de 296, 244 y 453 pb que corresponden a los fragmentos del RP A+B, RP-B y GAPDH (Fig 15). No se encontraron bandas en los controles negativos.

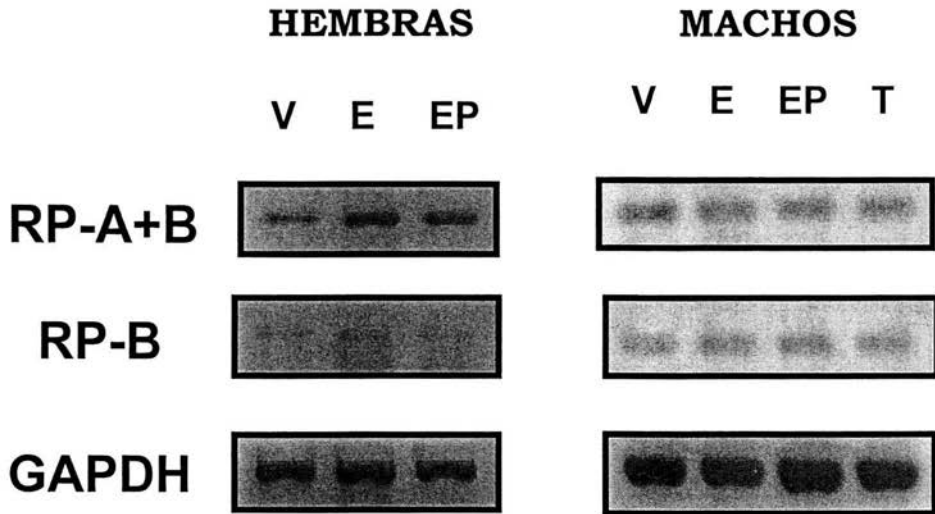


Fig. 15. Expresión de las isoformas del RP en el hipotálamo de ratas hembras y machos. Electroforesis de los productos de RT-PCR del RP (A+B), RP-B y GAPDH a partir de RNA total de una muestra de hipotálamo de rata hembra ovariectomizada y rata macho gonadectomizada tratada con vehículo (V), 17  $\beta$  estradiol (E), E + progesterona (E+P) y testosterona (T) únicamente en los machos.



En el hipotálamo, el área preóptica y el bulbo olfatorio de la rata hembra la expresión del RP total fue inducida por E2, sin embargo en estas mismas regiones del cerebro de la rata macho no se observó dicha inducción (Figs 16 y 17). En la corteza frontal de ambos sexos no se observó el efecto del E2. En el cerebelo de la rata macho, la expresión total del RP fue inducida por los tratamientos con E2 y T (Fig 17D), mientras que no se observó inducción en el cerebelo de la rata hembra después del tratamiento con E2 (Fig 17C).

En el hipotálamo de la rata hembra la expresión de ambas isoformas fue inducida por E2 y se reguló de manera negativa por P4 (Fig 16A). En el área preóptica estos cambios únicamente fueron observados en la isoforma RP-B (Fig 16C). En el hipocampo y el bulbo olfatorio la inducción del RP por E2 fue observada únicamente en RP-A (Fig 17 A y 17E). En comparación con las observaciones realizadas en el cerebro de la rata hembra, la expresión de las isoformas del RP no se modificó por E2 y P4 en el cerebro de la rata macho, a excepción del cerebelo (Figs 16 y 17), en donde la inducción del RP por E2 fue observada en RP-A (Fig 17D).



## HEMBRAS

## MACHOS

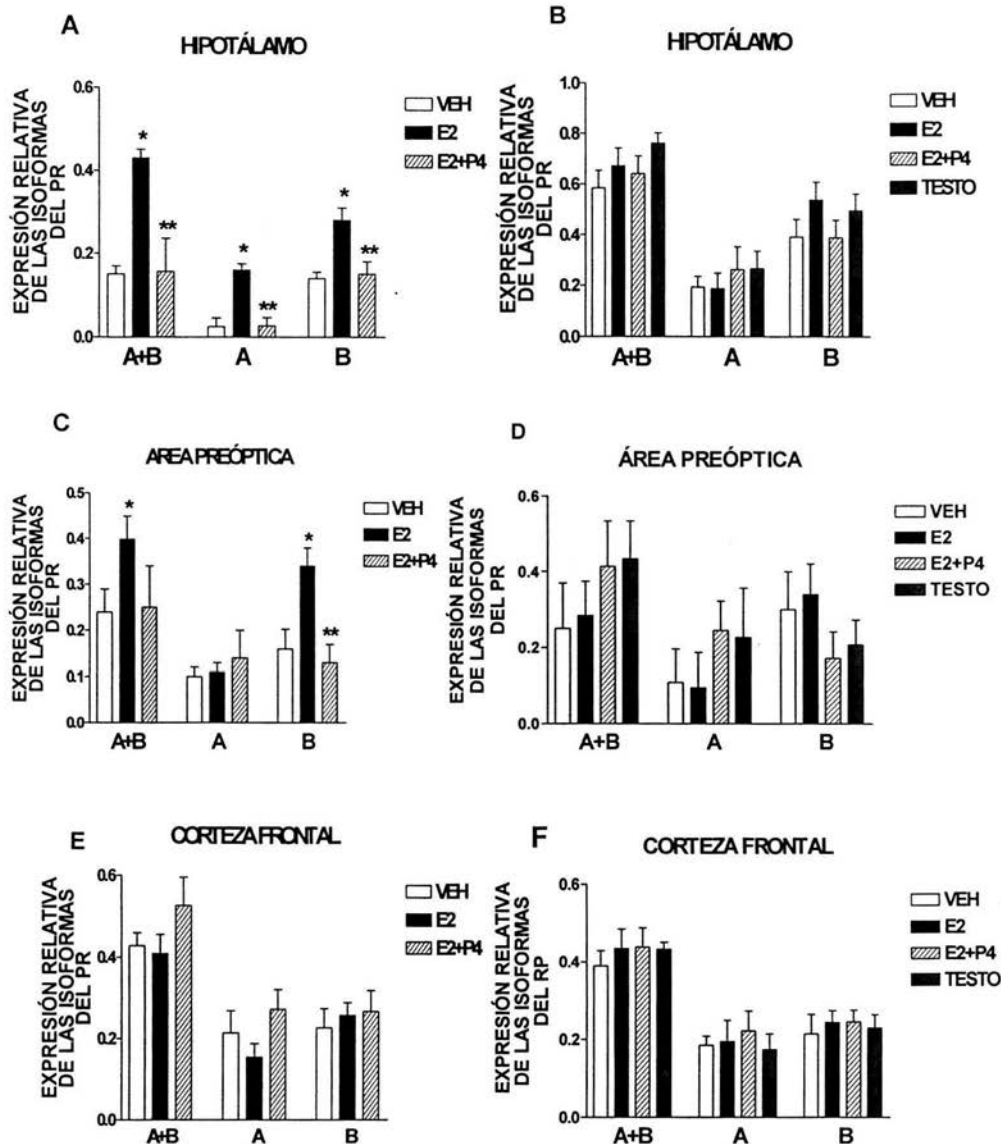


Fig. 16. Análisis densitométrico de la expresión del gen de las isoformas del RP en el hipotálamo, el área preóptica y la corteza frontal de ratas hembras ovariectomizadas y machos gonadectomizados. El RT-PCR fue realizado usando RNA total extraído del hipotálamo (A y B), área preóptica (C y D) y corteza frontal (E y F) de ratas hembras y macho respectivamente. Los productos de PCR fueron cuantificados densitométricamente y corregidos con los valores de GAPDH. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM 8 (n=5). \*  $p < 0.05$  comparado con el VEH. \*\*  $p < 0.05$  comparado con el E2.

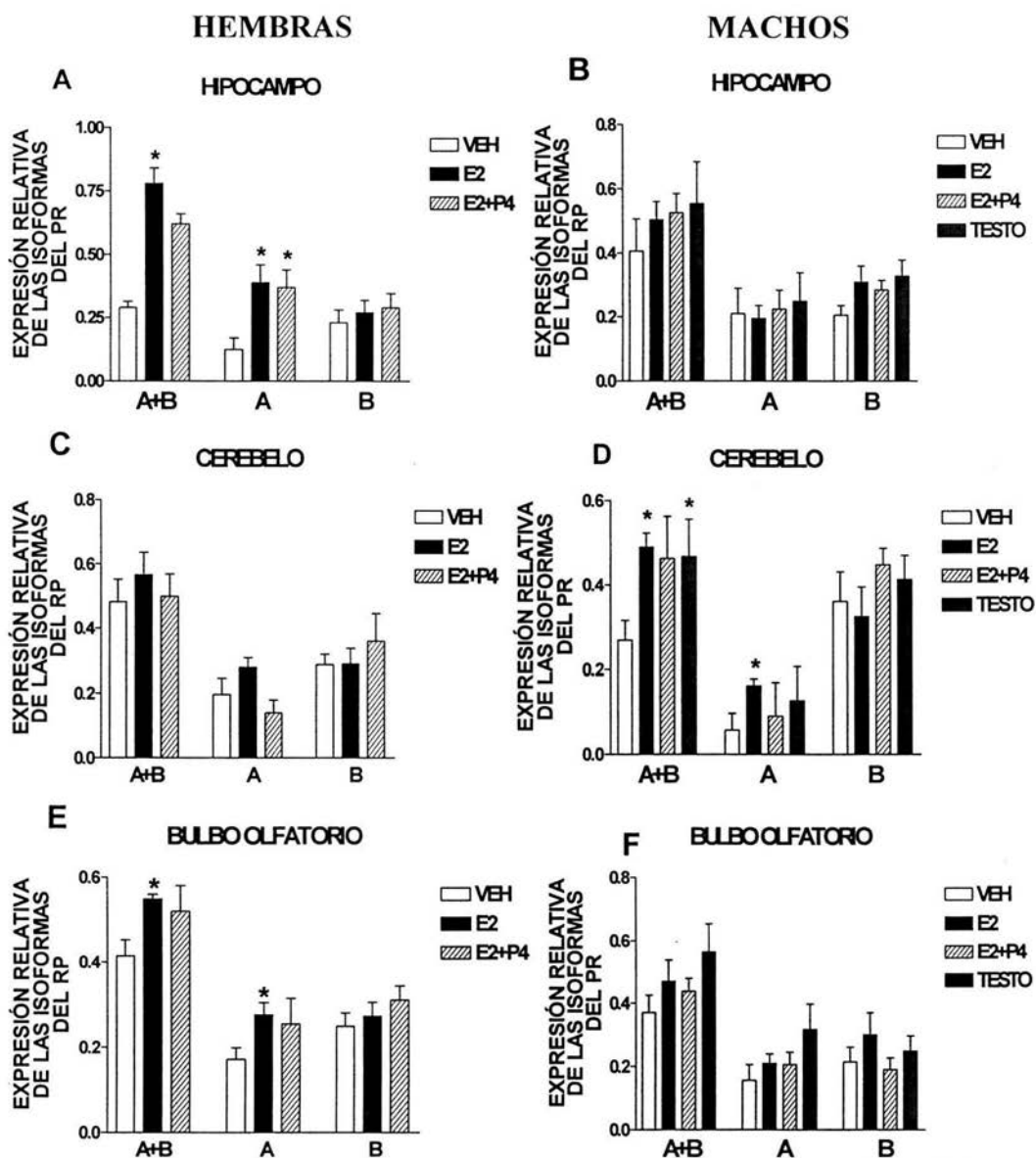


Fig. 17. Análisis densitométrico de la expresión del gen de las isoformas del RP en el hipocampo, el cerebelo y el bulbo olfatorio de ratas hembras ovariectomizadas y machos gonadectomizados. El RT-PCR fue realizado usando RNA total extraído del hipocampo (A y B), cerebelo (C y D) y bulbo olfatorio (E y F) de ratas hembras y macho respectivamente. Los productos de PCR fueron cuantificados densitométricamente y corregidos con los valores de GAPDH. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM 8 (n=5). \*  $p < 0.05$  comparado con el VEH.



En la tabla 2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos de la regulación diferencial por E2 y P4 en la expresión de las isoformas del RP en varias regiones del cerebro de la rata macho y hembra.

Tabla 2. Regulación de la expresión de las isoformas del RP en el SNC de ratas hembra y macho.

SEXO	HEMBRAS		MACHOS		
	E2	E2+P4	E2	E2+P4	T
TRATAMIENTO					
	<b>ISOFORMA REGULADA</b>				
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
<b>REGIÓN</b>					
HIPOTÁLAMO	AMBAS	AMBAS	-----	-----	-----
ÁREA PREÓPTICA	RP-B	RP-B	-----	-----	-----
HIPOCAMPO	RP-A	-----	-----	-----	-----
BULBO OLFATORIO	RP-A	-----	-----	-----	-----
CEREBELO	-----	-----	RP-A RP TOTAL	-----	RP TOTAL
CORTEZA FRONTAL	-----	-----	-----	-----	-----

E2: Esradiol; P4: progesterona; T: Testosterona;  
(+): Positivamente; (-): Negativamente; -----: Ninguna



## 9. DISCUSIÓN

En este trabajo estudiamos la expresión de las isoformas A y B del RP en el SNC de ratas adultas de ambos sexos gonadectomizadas y tratadas con E2 y P4 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, debido a las características propias de la técnica como el hecho de hacer homogenados de todo el tejido, no nos permite conocer las diferencias que pudieran existir en cuanto a la expresión de las isoformas del RP en los diferentes núcleos del hipotálamo o el área preóptica, o en los diferentes tipos celulares del hipocampo o el cerebelo por ejemplo; y de esta manera poder tener un panorama más amplio de las implicaciones fisiológicas de la P4 en una región específica del SNC.

Los resultados muestran que la expresión de las isoformas del RP es regulada diferencialmente por E2 y P4 en la mayoría de las regiones del cerebro de la rata hembra y macho. Los resultados sugieren que la expresión de RP-A y RP-B son regulados tejido y sexo específicos, lo cual es importante para la respuesta apropiada de estas regiones cerebrales a la P4 y que estas diferencias contribuyen a los efectos sexualmente dimórficos de la P4 en el cerebro.



La regulación de la expresión de las isoformas del RP se ha reportado en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo de ratas hembras ovariectomizadas (Camacho-Arroyo *et al.* 1998). También se ha reportado el patrón de expresión en el cerebro de ratas macho intactas prepúberes y adultos (Guerra-Araiza *et al.* 2001), pero esta es la primer evidencia respecto a la regulación de la expresión de las isoformas del RP por E2 y P4 en el cerebro de ratas macho gonadectomizadas, así como su regulación en la corteza frontal, el bulbo olfatorio y el cerebelo de ratas hembra ovariectomizadas. En el presente trabajo se encontró que ambas isoformas son expresadas en el cerebelo, el hipocampo, el hipotálamo, el área preóptica, la corteza frontal y el bulbo olfatorio en ratas hembra y macho (Figs. 16 y 17).

Estos resultados concuerdan con los ya reportados en la literatura que indican la presencia de ambas isoformas en algunas de estas regiones tanto en las ratas hembra como en los machos (Camacho-Arroyo *et al.* 1998; Guerra-Araiza *et al.* 2000; Guerra-Araiza *et al.* 2001). No ha sido anteriormente reportada la regulación de la expresión de las isoformas del RP por E2 y P4 en el cerebelo, el bulbo olfatorio y la corteza frontal de la rata hembra.

La regulación de las isoformas del RP por las hormonas esteroides en el bulbo olfatorio fue similar a la del hipocampo: la expresión del RP-A fue inducida por E2 y el tratamiento con P4 no modificó dicha inducción (Fig. 17E). Estos resultados sugieren que el sistema que regula a la expresión del RP-A por E2 y P4 en ambos tejidos es similar, y que esta isoforma podría participar en el mecanismo



olfatorio que requieren las hembras para el despliegue de la conducta sexual (Dudley and Moss, 1994). En cuanto a la plasticidad neuronal se refiere, se ha reportado que el E2 aumenta la formación de espinas dendríticas en el hipocampo de la rata (Wolley 1990), mientras que la P4 disminuye esta formación de espinas dendríticas inducidas por el E2 (Murphy 2000). Esta plasticidad dada 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. PR-A se regula a la alta por E2 en el hipocampo de ratas hembra. Se ha reportado que 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 este sería el mecanismo a través de la cual la P4 podría disminuir la formación de espinas dendríticas en el hipocampo de la rata hembra y participar en los procesos de memoria y aprendizaje. 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 infusiones intrahipocampales de colchicina en la rata (Vongher 1999). Se ha reportado que 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 en el hipocampo de la rata hembra.

En la corteza frontal de ambos sexos y en el cerebelo de las ratas hembra ovariectomizadas, los tratamientos con E2 y P4 no modificaron la expresión de las isoformas del RP ( Figs 16E,F y 17C respectivamente), lo que concuerda con un trabajo previo de Kato *et al.*, quien no encontró una regulación del RP por hormonas esteroideas en la corteza cerebral de ratas hembra. Los mecanismos asociados a esta insensibilidad a la regulación del RP por E2 y P4 se desconocen.

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 (Guerra-Araiza *et al.* 2000; Guerra-Araiza *et al.* 2001). Se ha reportado que este tejido regula el despliegue de conductas que se presentan antes de la cópula como son saltos, movimiento de orejas, peleas, las cuales en conjunto se han denominado conductas proceptivas. También se ha reportado que 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 los animales gonadectomizados y tratados con E2 y P4, como en los animales intactos, ya que no se observó una modificación de la expresión de ninguna de las isoformas. Para tratar de explicar estas diferencias en la regulación de las isoformas del PR



debemos de tener en cuenta los niveles séricos de E2 y P4, a pesar de que en ambos modelos se alcanzan niveles similares en los picos de estas hormonas, 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 es de 10 veces, mientras que la diferencia en las ratas intactas entre el proestro y los demás días del ciclo fue de solo 2 veces (Guerra-Araiza *et al.* 2000). 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.

La diferente distribución y regulación de las isoformas del RP en el hipotálamo y el área preóptica de ratas hembra y macho juega un papel importante en las diferencias sexuales observadas en relación con las acciones reguladas por la P4, tales como el despliegue de la conducta sexual (Blaustein *et al.* 1980; Samama and Aron 1991), efectos ansiolíticos (Rodríguez-Sierra *et al.* 1986) y el contenido de receptores a oxitocina (Coirini *et al.* 1992).

Es bien conocido que la P4 es un componente importante en la regulación de la retroalimentación del ovario en la secreción de gonadotropinas. Se ha informado que la P4 puede acelerar la pulsabilidad en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en ratas hembras (Karsh 1987). Esta acción la lleva a cabo la P4 a través de la interacción con el PR, el RU486 puede bloquear los efectos de la P4 en la secreción de GnRH y de la hormona luteinizante (LH) las cuales van a permitir la ovulación en los roedores (Bauer-Dantoin 1993). Sin embargo, en la regulación de la expresión del gen de la GnRH participan otros



elementos como neurotransmisores, aminoácidos y otros factores de transcripción (Levine 2001).

La P4 participa en la comunicación mediada por diferentes neurotransmisores, se ha localizado el PR en neuronas noradrenérgicas del núcleo del tracto solitario durante el ciclo estral (Haywood 1999). Se ha reportado también que 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 van a permitir la secreción de GnRH y ésta a su vez aumentará la síntesis de LH la cual va a permitir la liberación del óvulo. Nuestros resultados muestran que PR-B y RP-A aumentan su expresión en el hipotálamo de la rata hembra al ser tratadas con E2. 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 (Guerra-Araiza *et al.* 2000). Es importante mencionar que los mensajeros de PR-A y PR-B van a dar 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 RNA mensajero son reflejados a nivel de la proteína. Lo cual podría explicar las



diferencias observadas entre la etapa del proestro y nuestro modelo, es importante resaltar que no se observa la inducción de la expresión de ninguna isoforma de RP en los machos, los cuales no tienen ovulación.

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 (Pfaff 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).

En el hipotálamo de la rata, la administración de P4 (posterior a la administración con estrógenos) incrementa el contenido de receptores a oxitocina,



la cual aumenta la conducta de lordosis. En el núcleo ventromedial del hipotálamo, los receptores a oxitocina son modulados por P4 solamente en las hembras, lo cual se ha asociado con la insensibilidad de los machos a los efectos facilitadores de P4 sobre la conducta de lordosis (Camacho-Arroyo 1995), lo cual se puede atribuir a que en el hipotálamo de los machos no se observan cambios en la expresión del RP por dichas hormonas, contrario a lo que ocurre en las hembras.

Los resultados muestran que, solo PR-B modifica su expresión en el área preóptica de las hembras. Este patrón es similar al de los péptidos opiodes 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 (Pfaff 1994).

En el cerebelo de los machos gonadectomizados se observó una inducción de la expresión del RP total con el tratamiento con E2 y T y de RP-A en particular con el tratamiento con E2 (Fig 17D). 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 RP. Por otro lado la expresión y la actividad de la enzima 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa que sintetiza la 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 RP-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).



Se ha reportado que 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). Por otro lado se ha reportado que la P4 puede aumentar la síntesis de serotonina (Lu 1999) así como de su receptor (Gundlah 1999) en el SNC. Estos datos sugieren que el probable papel del RP-A en este tejido es aumentar la síntesis de serotonina y de su receptor y así participar en la regulación de la coordinación motora que requiere el macho durante la cópula.

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). Estos datos en conjunto nos sugieren 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. Esto se apoya además por el hecho de que existe una diferencia en regulación de PR 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).

Las diferencias observadas en la regulación de las isoformas del RP por E2 y P4 en los diversos tejidos entre hembras y machos se puede relacionar a la distinta distribución y regulación de varios factores de transcripción que tienen una función importante en la regulación de la expresión de las isoformas del RP. Uno de estos factores es el receptor a estrógenos (RE) el cual se une a su ligando



(E2), se dimeriza y se une a los promotores de las isoformas del RP para regular su expresión (Kastner 1990).

Otra característica importante del RE es que al igual que el RP presenta isoformas denominadas RE $\alpha$  y RE $\beta$  las cuales presentan una distribución diferencial tejido-específica en el SNC de la rata (Shughrue 1997) así como una Variada actividad transcripcional gen-específica (Cowley 1999). Por otro lado, se ha reportado que las isoformas del RE pueden ser reguladas diferencialmente por el E2 en el hipotálamo de la rata dependiendo si la administración del E2 es aguda o crónica (Tena-Sampere 2001). Estos datos nos sugieren que la diferente distribución, actividad transcripcional y regulación por E2 de las isoformas del RE pueden estar influyendo en las diferencias observadas en la regulación de las isoformas del RP por E2 y P4 entre las ratas hembras y machos.

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 RE 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, las cuales difieren en su capacidad de potenciar la transcripción del RE (Misiti *et al* 1998).

Estas proteínas también se regulan diferencialmente por E2 en la hipófisis de la rata (Misiti 1998) lo cual nos sugiere que probablemente también ocurra este



tipo de regulación en las diferentes regiones del SNC. El SRC-1 al ser regulada por E2 interviene en el desarrollo y la morfología del cerebro de la rata en ambos sexos, y regula su conducta (Auger *et al* 2000). Estos datos sugieren que la capacidad transcripcional de estas proteínas podrían tener una influencia en la regulación diferencial del tejido y entre sexos, de las isoformas del RP por E2 y P4.

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 podrían sugerir que los diferentes patrones de metilación pueden modular la expresión de las isoformas del RP entre hembras y machos.





## 10. CONCLUSIONES

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

1. La regulación de la expresión de las isoformas del RP en el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, el bulbo olfatorio y el cerebelo de la rata macho es diferente a la de las hembras, por lo que esta diferencia puede contribuir a los efectos sexualmente dimórficos de la P4 en el cerebro de la rata.
2. La expresión de las isoformas del RP 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 hembras ovariectomizadas.



## 11. REFERENCIAS

- Adolphs, R., Travel, D., Damasio, A.R., 1998. The human amygdala in social judgement. *Nature*. 393: 470-474.
- Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW., 1992. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 89(24):11750-4.
- Allen L.S., Hines M., Shryne J.E., Gorski R.A. 1989. Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. *J Neurosci*. 9(2): 497-506.
- Arbogast LA, Vogt JL.1993. Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 58:501-10.
- 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.
- Bauer-Dantoin AC, Tabesh B, Norgle JR, Levine JE. 1993. RU486 administration blocks neuropeptide Y potentiation of luteizing hormone (LH)-releasing hormone induced LH surges in proestrus rats. *Endocrinology* 133:2418-2423.
- Beato M., 1987. Induction of transcription by steroid hormones. *Biochim. Biophys. Acta* 910(2):95-102.
- Beato M.,1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 56(3):335-44.
- Beck CA, Weigel NL, Edwards DP. 1992. Effects of hormone and cellular modulators of protein phosphorylation on transcriptional activity, DNA binding, and phosphorylation of human progesterone receptors. *Mol. Endocrinol*. 6:607-620.
- Beier HM., 1968. Uteroglobulin a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim. Biophys. Acta*. 160(2):289-91.
- Bethea CL, Widmann AA. 1988. Differential expression of progesterin isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of Rhesus macaques. 1988. *Endocrinology*. 139:677-687.
- 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 J.D., Feder H.H. 1979. Cytoplasmic progesterin-receptors in guinea pig brain: characteristics and relationship to the induction of sexual behavior. *Brain Res*. Jun 29; 169(3): 481-97.
- Blaustein JD, Ryer HI, Feder HH.,1980. A sex difference in the progesterin receptor system of guinea pig brain. *Neuroendocrinology*. 31:403-409.
- Brodeur P, Mockus M, McCullough R, Moore LG., 1986. Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progesterin. *J. Appl. Physiol*. 60(2):590-5.



- Brown TJ, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. 1990. Comparisson of age and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progesterin receptor induction in the rat brain. **Endocrinology**. 126:2965-2972.
- Camacho -Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM, Cerbón MA., 1994. 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**. 50:299-303.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbon MA., 1995. La progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del sistema nervioso central. **Rev Inv Clin**. 47: 329-340.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Cerbón MA., 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of the rabbit. **Neurosci Lett**. 214:25-28.
- 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.
- Camacho-Arroyo I, Hernández-Gollas R, Manjarrez J, Alvarado R., 1999. Progesterone microinjections into the pontine reticular formation modify sleep in male and female rats. **Neurosci. Lett**. 269(1):9-12.
- Cerbón MA, Martínez M, Pérez-Palacios G. 1989. Oestrogen-insensitive progesterone receptors in the central nervous system: physicochemical and immunoreactive characteristic. **J. Neuroendocrinol**. 1:292-298.
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE., 1990. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of heat shock protein-90 complex. **J Biol. Chem**. 265:20686-20691.
- Christensen K, Estes PA, Onate SA, Beck CA, DeMarzo A, Altmann M, Lieberman BA, St John J, Nordeen SK, Edwards DP., 1991. Characterization and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. **Mol. Endocrinol**. 5(11):1755-70.
- Chomczynski, P, Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. **Anal. Biochem**. 162:156-159.
- Clarke CL., 1993. Ovarian steroid hormone receptors and their mechanisms of action: In race GE, Brennecke SP (eds). Molecular aspects of placental and fetal Autacoids. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL, pp 27-54.
- Claro, F., Segovia, S., Guilamón, A., Del Abril, A., 1995. Lesions in the medial posterior region of the BST impair sexual behavior in sexually experienced and inexperienced male rats. **Brain Research Bulletin**. 36: 1-10.
- Clemm DL, Macy BL, Santiso-Mere D, McDonnell DP., 1995. The critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol**. 53(1-6):487-95.



- Clemm DL, Sherman L, Boonyaratanakornkit V, Schrader W, Weigel N, Edwards DP., 2000. Differential Hormone-Dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. *Mol. Endocrinol* 14(1):52-65.
- Cohen, R.S. y Pfaff, D.W., 1992. Ventromedial hypothalamic neurons in the mediation of long-lasting effects of estrogen on lordosis behavior. *Progress in Neurobiology*. 38: 423-453.
- Coirini, H, Johnson, AE, Schumacher, M, McEwen, BS., 1992. Sex differences in the regulation of oxytocin receptors by ovarian steroids in the ventromedial hypothalamus of the rat. *Neuroendocrinology*. 55:269-275.
- Connely OM, Keffelberger DM, Tsa W, Schrader WT, O'Maley B., 1989. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of alternative translation initiation event *J. Biol Chem*. 264:14062-64.
- Cowley SM, Parker MG., 1999. A comparison of transcriptional activation by Er $\alpha$  and Er $\beta$ . *J Steroid Biochem Molec Biol*. 69:165-175.
- Csapo AI, Resch BA., 1979. Induction of preterm labor in the rat by antiprogesterone. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 134(7):823-7.
- Dalkin AC, Paul SJ, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Yasin M, Marshall JC., 1992. Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats *J. Endocrinol*. 132(1):39-45
- Dalton M.E.1984. The effect of progesterone administration on sex hormone binding globulin binding capacity in women with severe premenstrual syndrome. *J Steroid Biochem*. Jan; 20(1): 437-9.
- Davis, P.G., McEwen, B.S., Pfaff, D.W. 1979. Localized behavioral effects of triated estradiol implants in the ventromedial hypothalamus of female rats. *Endocrinology*. 104: 898-903.
- Denner LA, Schrader WT, O'Malley BW, Weigel NL. 1990. Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites. *J. Biol. Chem*. 265:16548-16555.
- Dieudonné S., 2001. Serotonergic neuromodulation in the cerebellar cortex: cellular, synaptic, and molecular basis. *Neuroscientist*. 7:207-219.
- Dluzen DE, Ramírez VD., 1991. Modulatory effects of progesterone upon dopamine release from the corpus striatum of ovariectomized estrogen-treated rats are stereo-specific. *Brain. Res*. 538(1):176-9.
- Dudley C.A. Moss R.L., 1994. Lesions of the accessory olfactory bulb decrease lordotic responsiveness nad reduced mating-induced c-fos expression the accessosy olfactory system. *Brain Res*. 642:29-37.
- Duffy MD, Wells TR, Haluska JG, Stouffer RL. 1997. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpus luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. *Biol. Reprod*. 57:693-699.
- 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.
- Emery, D.A. & Sachs, B.D., 1976. Copulatory behavior in male rats with lesions in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiology and Behavior*. 17: 803-806.



- Etgen AM, Chu HP, Fiber JM, Karkanias GB, Morales JM. 1999. Hormonal integration of neurochemical and sensory signals governing female reproductive behaviour. *Behav Brain Res.* 105:93-103.
- Feil PD, Glasser SR, Toft DO, O'Malley BW., 1972. Progesterone binding in the mouse and rat uterus. *Endocrinol.* 91(3):738-46.
- Ganong WF., 1993. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front. Neuroendocrinol.* 1993,14(3):233-239.
- Giangrande PH, McDonnell DP., 1999. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent. Prog. Horm. Res.* 54:291-313.
- González-Arenas AA, Reyna-Neyra A, Gomez MJ, Mendez I, Larrieta-Carrasco ME, Haces ML, Jimenez B, Camacho-Arroyo I. 2001. Los mensajeros químicos del sistema neuroendócrino. *Educ. Quím.* 3:158-162.
- González-Morán G, Camacho-Arroyo I., 1998. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat. Histol. Embryol.* 27(4):277-82.
- 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 R. E. Armstrong, D.T., 1988. Follicular steroidogenesis and its control. In: Physiology of Reproduction. Knobil E., Neil J. D *et al* (Eds) Vol. 1 pp.331-335 . Raven Press Ed. New York.
- Gorospe WC, Freeman ME., 1985. Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion *in vitro*. *Biol. Reprod.* 32(2):279-83.
- Gorski, R.A., Girdon, J.H., Shryne, J.E., Southman, A.M., 1978. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Research.* 148: 333-346.
- Gorski R. A., Harlan R.E., Jacobson C.D., Shryne J.E., Southam A. M. 1980. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *J Comp Neurol.* 15; 193(2): 529-39.
- Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL., 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 55(21):5063-8.
- Graham JD, Clarke CL., 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18(4):502-19.
- Green IC, Howell SL, El Seifi S, Perrin D., 1978. Binding of 3H-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetol.* 15:349-355
- 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.



- 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.
- Gundla C, Pecins-Thompson H, Schutzer WE, Bethea CL., 1999. Ovarian steroids effects on serotonin 1A, 2A and 2C receptor mRNA in macaque hypothalamus. **Brain Res Mol Brain Res.** 63:325-339.
- Gunnet JW, Granger K, Cryan E, Demarest KT. 1999. Characterization of the progestin receptors in the human TE85 and murine MC3T3-E1 osteoblast-like cell lines. **J. Endocrinol.** 163:139-147.
- Hansen, S., Köhler, C., Glodstein, M., Steinbusch, H.V.M., 1982. Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the rat. **Brain Res.** 239: 213-232.
- Haywood SA, Simonian SX, van der Beek EM, Bicknell RJ, Herbison AE. 1999. Fluctuating estrogen and progesterone receptor expression in brainstem norepinephrine neurons through the rat estrous cycle. **Endocrinology.** 140:3255-63.
- Heimer, L. & Larsson, K., 1967. Impairment of sexual behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum. **Brain Res.** 3: 248-263.
- Hines, M., Allen, L.S., Gorski, R.A., 1992. Sex difference in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. **Brain Research,** 579: 321-326.
- Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr., 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. **Endocr. Rev.** 5(1):76-127.
- Horwitz KB, McGuire WL., 1975. Specific progesterone receptors in human breast cancer. **Steroids** 25:497-505.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takamoto GS, Tung L., 1996. Nuclear receptor coactivators and repressors. **Mol. Endocrinol.** 10:1167-1177.
- Hurd C, Khatteer N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK., 1995. Homonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47-D human breast carcinoma cell line **J. Biol. Chem.** 270: 28507-28510.
- Huse B, Verca SB, Matthey P, Rusconi S., 1998. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. **Mol. Endocrinol.** 12(9):1334-42.
- Hutchison JS, Nelson PB, Zeleznik AJ., 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on *corpus luteum* function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. **Endocrinology** 119(5):1964-7.1
- Ilenchuk T, Walters M. 1987. Rat uterine Progesterone receptor analyzed by [<sup>3</sup>H]R5020 photoaffinity labeling, evidence that the A and B subunits are not equimolar. **Endocrinology.** 120:1449-56.



- Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS. 1992. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4658-4662.
- Ing NH, Beekman JM, Kessler DJ, Murphy M, Jayaraman K, Zendegui JG, Hogan ME, O'Malley BW, Tsai MJ., 1993. *In vivo* transcription of a progesterone-responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. *Nucleic. Acids Res.* 21(12):2789-96.
- Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1997. Steroid receptor induction of gene transcription a two step model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:7879-7884.
- Karavolas HJ, Hodges DR., 1990. Neuroendocrine metabolism of progesterone and related progestins. *Ciba Found Symp.*153:22-44.
- 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. 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.
- Kastrup Y, Hallbeck M, Amandusson A, Hirata S, Hermanson O, Blomquist A. 1999. Progesterone receptor expression in the rat brainstem of the female rat. *Neurosci. Lett.* 275: 85-88.
- Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N., 1993. The ontogeny of gene expression of progestin receptor in the female rat brain. *J steroid Biochem Molec Biol*, 47:173-82.
- Kato J. and Onouchi T.1983. Progestin receptors in female rat brain and hypophysis in the development from fetal to postnatal stages. *Endocrinology.*113(1): 29-36.
- Kawasaki, E. S. and Wang, A. M., 1989. Detection of gene expression. In PCR Technology, principles, and applications for DNA amplification (ed. H.A.Erlich), pp. 89-97. Stockton Press, New York.
- Ke FC, Ramirez VD., 1987. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalami in vitro. *Neuroendocrinology*,45:514-517.
- Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, Weigel NL., 2001. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. *J Biol Chem.*;276:8475-8483.
- Krauss LW, Montano M, Katzenellenbogen B. 1993. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol*; 7:1603-16.



- Kuhn RW, Schrader WT, Coty WA, Conn PM, O'Malley BW., 1977. Progesterone-binding components of chick oviduct. Biochemical characterization of purified oviduct progesterone receptor B subunit. *J Biol Chem.* 252:308-17.
- Lessey BA, Alexander PS, Horwitz KB., 1983. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptor: characterization by chromatography and photoaffinity labeling. *Endocrinology.* 112:1267-74.
- LeVay S. 1991. A difference in hypothalamic structure between heterosexual and homosexual men. *Science.* 253(5023): 1034-7.
- Levine JE, Chappell PE, Schneider JS, Sleiter NC, Szabo M. 2001. Progesterone receptor as neuroendocrine integrators. *Front Neuroendocrinol.* 22:69-106.
- Litwack G., 1992. Remembrance: steps leading to the identification, purification, and characterization of the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 130(5):2433-4.
- Lu NZ, Shlaes TA, Gundlach C, Dziennis SE, Lyle RE, Bethea CL., 1999. Ovarian steroid action on tryptophan hydroxylase protein and serotonin compared to localization of ovarian steroid receptors in midbrain of guinea pigs. *Endocrine* 11:257-67.
- MacLusky Mj, McEwen BS. 1978. Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature.* 274:276-278.
- Madeira M.D., Lieberman A.R. 1995. Sexual dimorphism in the mammalian limbic system. *Prog Neurobiol.* 45(4): 275-333.
- Mahesh V, Brann D., Hendry L., 1996. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 56: 209-219
- Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, Weigel LN. 1997. Differential expression of uterine progesterone receptors forms A and B during the menstrual cycle. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 63:195-202.
- McDonnell D, Goldman ME. 1994. RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J Biol Chem* 269:11945-49.
- McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Molec Biol* 69:3-12.
- Meijer OC, Steenberg PJ, De Kloet ER. 2000. Differential expression and regional distribution of steroid receptor coactivators SRC-1 and SRC-2 in brain and pituitary. *Endocrinology* 141:2192-2199.
- Meizel S, Turner KO., 1991. Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol. Cell. Endocrinol.* 77(1-3):R1-5.
- Mendoza-Rodriguez CA, Camacho-Arroyo I, García GA, Cerbón MA., 1999. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Contraception* 59(5):339-43.





- Milgrom E, Baulieu EE., 1970. Progesterone in the uterus and the plasma. II. The role of hormone availability and metabolism on selective binding to uterus protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 40(3):723-3.
- Misiti S, Schomburg L, Yen PM, Chin WW., 1998. Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. **Endocrinology**;139:2493-2500.
- Mirashi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E., 1987. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 143 (2):740-748.
- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-Verber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E, 1993. Structure of the human progesterone receptor gene **Biochem. Biophys. Acta** 1216(2) 289-92.
- Morris, J.S., Öhman, A., Dolan, R.J., 1998. Concious and unconscious emotional learning in the human amygdala. **Nature.** 393: 467-470.
- Mullis, K. B., and Fallona, F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Meth. Enzymol.** 155: 335-350.
- Murphy DD, Segal M., 2000. Progesterone prevents estradiol-induced dendritic spine formation in cultured hippocampal neurons. **Neuroendocrinology.** 72:133-143.
- Musgrove EA, Lee Cs, Sutherland RL., 1991. Progestins both stimulate and inhibit breast cell cycle progression while increasing expression of transforming growth factor  $\beta$  epidermal growth factor receptor, *c-fos* and *c-myc* genes. **Mol. Cell. Biol.** 11:5032-5043.
- Musgrove EA, Hamilton JA, Lee Cs, Sweenwy KJ, Watts CK, Sutherland RL., 1993. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation on cyclin gene expression associated with changes in T47-D human breast cancer cell progression. **Mol. Cell. Biol.** 13:3577-3587.
- Passinen S, Haverinen M, Pekki A, Rauta J, Paranko J, Syvala H, Tuohimaa P, Yikomi T., 1999. Only a small portion of cytoplasmic progesterone receptor is associated with Hsp 90 *in vivo*. **J. Cell. Biochem.** 74:458-467.
- Pearce PT, Khalid BAK, Funder JW., 1983. Progesterone receptors in rat thymus. **Endocrinology** 113:1287-1291.
- Pérez-Palacios, 1985. Mecanismos de acción de hormonas esteroides en bioquímica e inmunología. Vol 2. Cap VI, Ed Hicks, J y Diaz- Agaya J.C. UNAM. México. 346-370.
- Perrot-Applanat M, David-Ferreira JF., 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. **Cell Tissue Res.** 223(3):627-39.
- Perrot-Applanat M, Groyer-Picard MT, Garcia E, Lorenzo F, Milgrom E., 1988. Immunocytochemical demonstration of estrogen and progesterone receptors in muscle cells of uterine arteries in rabbits and humans. **Endocrinology** 123(3):1511-9.
- Petitti N, Etgen AM., 1992. Progesterone promotes rapid desensitization of alpha 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. **Neuroendocrinology** 55(1):1-8.



- Pfaff, D.W. & Sakuma, Y. 1979a. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J.Physiol.*, London, 288: 189-202.
- Pfaff, D.W. & Sakuma, Y. 1979b. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J.Physiol.*, London, 288: 203-210.
- Pfaff, D.W. & Schwartz-Giblin, S. 1988. Cellular mechanisms of female reproductive behaviors. *The Physiology of Reproduction*, E.Knobil and J.Neil *et al.*, Raven Press, Ltd., New York, 1487-1568.
- Poletti A, Weigel NL. 1993. Identification of a hormone-dependent phosphorylation site adjacent to the DNA-binding domain of the chicken progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 7:241-246.
- Pollow K, Boquoi E, Baumann J, Schmidt-Gollwitzer M, Pollow B., 1977. Comparison of the in vitro conversion of estradiol-17 beta to estrone of normal and neoplastic human breast tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 6(4-5):333-48.
- Quadros P.S., Goldstein A. Y., De Vries G.J., Wagner C.K. 2002. Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats. *J Neuroendocrinol.* 14(10): 761-7.
- Rappolee, D. A., Mark, D., Baanda, M. J., and Werb, Z. 1988. Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. *Science* 241: 708-710.
- Rodriguez R, Carson MA, Weigel NL, O'Malley BW, Schrader WT, 1990. Dimerization of the chicken progesterone receptor in vitro can occur in the absence of hormone and DNA. *Mol Endocrinol.* 4(12):1782-90.
- Rodriguez-Sierra, F.J., Hagley, T.M., Hendricks, E. S., 1986. Anxiolytic effects of progesterone are sexually dimorphic. *Life Sci.* 38,1841-18145.
- Rogatsky I, Trowbridge JM, Garabedian MJ. 1999. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J. Biol. Chem.* 274:22296-22302.
- Rothchild I., 1983. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin CW, Milgrom E, Mauvais-Jarvis P (Eds) Progesterone and progestins. *Raven Press*, New York, pp 219-229.
- Rowan BG, O'Malley BW., 2000. Progesterone receptor coactivators. *Steroids* 65:545-549.
- 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.
- 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.
- Samama, B., Aron, C.L., 1991. Induction of progestin 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.



- Sartorius CA, Groshong SD, Miller LA, Powell RL, Tung L, Takimoto GS, Horwita KB. 1994 New T47D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B and A receptors: only antiprogestin occupied B receptors are switched to transcriptional agonist by Camp. **Cancer Res.** 54 (14):3868-77.
- 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.
- Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E. 1990 Molecular action of progesterone. **Int J. Biochem.** 22(6):579-94
- Savouret JF, Baily A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A, Milgrom E. 1991. Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. **EMBO J.** 10:1875-1883.
- Schaeffer C, Roos J, Aron C. 1990 Lordosis behavior in intact male rats: effects of hormonal treatment and/or manipulation of the olfactory system. **Horm Behav**; 24(1):50-61.
- Schoonen WG, Dijkema R, de Ries RJ, Wagenaars JL, Joosten JW, de Gooyer ME, Deckers GH, Kloosterboer HJ., 1998. 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. Mol. Biol.** 64(3-4):157-70.
- Schowalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson ADW, Soneely OM'Malley BW, Toft DO., 1991. Characterization of progesterone receptor binding to the 90- and 70-kDA heat shock proteins. **J. Biol. Chem.** 266:21165-21173.
- Schrader WT, Birnbaumer ME, Hughes MR, Weigel NL, Grody WW, O'Malley BW., 1981. Studies on the structure and function of the chicken progesterone receptor. **Recent. Prog. Horm. Res.** 37:583-633.
- Sheridan PL, Evans RM, Horowitz KB. 1989. Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. **J. Biol. Chem.** 264:6520-6528.
- Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  and  $-\beta$  mRNA in the rat central nervous system. **J Comp Neurol.** 388:507-525.
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, *et al.* 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. **Nature.** 389: 194-198.
- Stein DG. 2001. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen. **Trends Neurosci**;24:386-391.
- Sterner D.E., Berger S.I., 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. **Microbiol Mol Biol Rev.** 64(2): 435-59.
- Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H., 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptor in human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. **Hum. Reprod.** 9:1589-1595.
- Swaab, D.F., Fliers, E., Partiman, T., 1985. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and dementia. **Brain Research**, 342: 37-44.



- Swaab, D.F. & Hofman, M.A., 1988. Sexual differentiation of the human hypothalamus: ontogeny of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Dev. Brain Res.*, 44: 314-318
- Szechtman, H., Caggiula, A.R., Wulkman, D. 1978. Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats. *Brain Research*, 150: 569-591.
- Takimoto GS, Hovland AR, Tasset DM, Melville MY, Tung L, Horwitz K. 1996. Role of phosphorylation on DNA binding and transcriptional functions of human progesterone receptors. *J Biol Chem* 271:13308-16.
- Tena-Sempere M, Gonzalez LC, 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.
- Terner C., 1977. Progesterone and progestins in the male reproductive system. *Ann NY Acad. Sci.* 286:313-320
- Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Fenichel P, Fehlmann M., 1992. Progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane. *FEBS Lett.* 1308(2):116-20
- Theveny B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E., 1987. Association of DNA-bound progesterone receptors. *Nature* 329(6134):79-81.
- Topper YJ, Freeman CS., 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev* 60: 1049-1106.
- Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P., 1988. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333(6169):185-8.
- Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horwitz KB., 1993. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol.* 7(10):1256-6.
- Ukena K, Kohchi C, Tsutsui K. 1999. Expression and activity of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. *Endocrinology.* 140:805-813.
- Vegeto E, Shahbaz M, Wen X, Goldman M, O'Malley B, McDonnell D. 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter- specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7:1244-55.
- Vongher JM, Frye CA., 1999. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. *Pharmacol Biochem Behav*; 64:777-785.
- 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.
- Warembourg M, Jolivet A, Milgrom E., 1989. Immunohistochemical evidence of the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea pig hypothalamus and preoptic area. *Brain Res.* 480(1-2):1-15.
- Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM., 1993. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195:525-532.



- Weisz J, Ward I., 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. **Endocrinology** 106(1):306-16
- Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP., 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. **Mol Cell Biol.** 14(12):8356-64.
- 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.
- Wong MSJ, Murphy LC., 1991. Differential regulation of c-myc by progestins and antiestrogens in T47-D human breast cancer cells. **J Steroid Biochem. Mol. Biol.** 39:39-44.
- Ylikomi T, Gasc JM, Isola J, Baulieu EE, Tuohimaa P., 1985. Progesterone receptor in the chick bursa of fabricius: characterization and immunohistochemical localization. **Endocrinology** 117(1):155-60.
- Young, L.J., Wang, Z., Insel, T.R. 1998. Neuroendocrine bases of monogamy. **Trends Neurosci.**, 21, 71-75.
- Zhang X, Jeyakumar M, Bagchi M., 1996. Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptor. **J.Biol. Chem.** 271(25):14825-14833.
- Zhang X, Jeyakumar M, Petukhov S, Bagchi MK., 1998. A nuclear receptor corepressor modulates transcriptional activity of antagonist-occupied steroid hormone receptor. **Mol. Endocrinol.** 12(4):513-24.
- 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.
- Zhang Y, Beck CA, Poletti A, Edwards DP, Weigel NL. 1995. **Mol. Endocrinol.** 9:1029-1040
- Zwain IH, Yen SS. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes and neurons of cerebral cortex of rat brain. **Endocrinology.** 140:3843-3852.



## 12. APÉNDICE

### I) REACTIVOS

□ **dNTPS (Gibco BRL)**

dATP (deoxiadenosina trifosfato) 100 mM

dGTP (deoxiguanosina trifosfato) 100 mM

dTTP (deoxitimosina trifosfato) 100 mM

dCTP (deoxicitosina trifosfato) 100 mM

□ **DTT (0.1M) (Gibco BRL)**

Ditiotreitol

□ **Oligo (dt) Primer (Gibco BRL)**

25 µg; 0.5 µg/µl (STOCK)

□ **Transcriptasa Reversa M-MLV (Gibco BRL)**

Transcriptasa reversa del virus de leucemia murino de Moloney

200 U/µl

□ **Reactivo de TRIzol (Gibco BRL)**

Tiocinato de guanidina

Fenol -cloroformo

β-mercaptoetanol



## II) SOLUCIONES

### **Amortiguador de carga para DNA 6X (Loading Buffer).**

0.25% azul de bromofenol.

0.25% Cianol Xileno.

30.0% Glicerol en agua

### **Amortiguador de carga para RNA 6X (Loading Buffer).**

50% Glicerol.

1 mM EDTA (pH 8.0).

0.25% azul de bromofenol

0.25% Xilen cianol.

### **EDTA 0.5 M**

Agregar 186.1 g de EDTA (Etilendiaminotetra acetato) a 800 ml de H<sub>2</sub>O destilada, agitar hasta que se disuelva. Ajustar el pH a 8.0, aforar a 1000 ml y esterilizar en autoclave.

### **H<sub>2</sub>O + DEPC (0.1%)**

Disolver 1 ml de dietilpirocarbonato (DEPC) en 9 ml de alcohol etílico absoluto y aforar a 1000 ml con H<sub>2</sub>O destilada. Poner en baño de temperatura constante a 37° C por dos horas y esterilizar en autoclave.

### **MOPS (12X)**

0.1M MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanesulfónico

40 mM de acetato de sodio

5 mM EDTA

Preparar con H<sub>2</sub>O+DEPC y esterilizar por filtración

**TBE 10 X**

0.5 M Tris base

0.5 M ácido bórico

10 mM EDTA

Para preparar TBE 5X (500mL)

Tris base	27 g
Acido bórico	13.75 g
20.0 ml de EDTA 0.5 M	10 ml

**III) GELES DE AGAROSA**

Condiciones desnaturalizantes (1.1%).

Reactivo	Concentración Inicial	50 ml	120 ml	140 ml	180 ml
Agarosa	100%	0.55 g	1.32 g	1.54 g	1.98 g
MOPS	12X	4.16 ml	9.98 ml	11.64 ml	14.96 ml
Formaldehído	37 %	8.10 ml	19.44 ml	22.63 ml	29.09 ml
H <sub>2</sub> O+DEPC	0.1%	37.70 ml	90.48 ml	105.56 ml	135.00 ml

Condiciones no desnaturalizantes (2%)

Reactivo	Concentración Inicial	50 ml	120 ml	140 ml	180 ml
Agarosa	100%	1 g	2.4 g	2.8 g	3.6 g
TBE	5 X	5 ml	12 ml	14 ml	18 ml