



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"EFECTO DEL RECEPTOR PARA PROGESTERONA SOBRE
EL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE PROYECCIÓN
VOMERONASAL EN RATONES"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

CARLOS RAÚL GARCÍA UGALDE

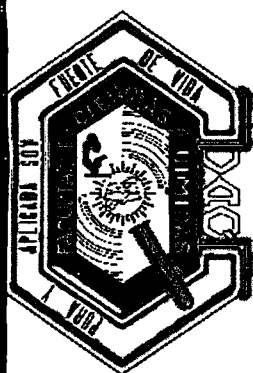
DIRIGIDA POR

Dr. EMILIO DOMÍNGUEZ SALAZAR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010.

**BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. H72593
No. Título _____
Clas TS
619.93
9216e



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DEL RECEPTOR PARA
PROGESTERONA SOBRE EL FUNCIONAMIENTO
DEL SISTEMA DE PROYECCIÓN VOMERONASAL
EN RATONES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

CARLOS RAÚL GARCÍA UGALDE

DIRIGIDA POR

Dr. EMILIO DOMÍNGUEZ SALAZAR

SINODALES

Dr. EMILIO DOMÍNGUEZ SALAZAR
DIRECTOR

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
SINODAL

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
SINODAL

Dr. RAÚL PAREDES GUERRERO
SINODAL

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Emilio Domínguez, por permitirme desarrollar el trabajo. Por su paciencia y por sus consejos que fomentaron mi formación académica y personal. Por todo el apoyo que me brindó y por ser uno de los mejores ejemplos a seguir.

Al Dr. Raúl Paredes, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su equipo.

A las Doctoras. Anaid Antaramián y Adriana González, por el apoyo técnico en la Unidad de Proteogenómica del INB.

Al Dr. Sergio Romero, por sus consejos oportunos y precisos.

A la Dra. Angelina Rodríguez, por las cátedras impartidas, por ayudarme durante todo el proceso burocrático, por aventarse unas revisiones maratónicas y por ser Sensei.

A Roberto Hernández y Paul, por su apoyo técnico.

Al M.V.Z. Francisco Camacho, al Dr. Edwards Antonio, a las Doctoras Wendiis (Portillo y Herrera), Rebeca Corona y Patricia Horsman, a Dulce, Nancy, Cynthia, Alberto y Cassandra, por los momentos más chidos en el laboratorio.

Al M.V.Z. Martín García, por echarles un ojo a mis ratonas en el Bioterio del INB.

A PAPIIT-DGAPA, por el apoyo económico.

DEDICATORIA

A mis Padres, quienes me han apoyado hasta el final. Gracias a su amor y paciencia he comprendido que la familia no le brinca en los momentos de alegría, sino en los momentos de tristeza, de ansiedad y de temor. Ellos han sido un pilar en mi vida y como tal me han sostenido en las malas y en las peores. Lo más importante que he aprendido de ellos es que triunfar no sólo se basa en alcanzar objetivos, sino en darlo todo, luchar y esforzarte todos los días de la vida. A mis Padres Vero y Juan.

A mi esposa Priscila, por demostrarme que la fé y el amor son más poderosos que un libro o un apunte. Porque inconscientemente su personalidad me enseñó que vivir las pruebas de la vida es como hacerse una leche con chocolate.

A mis hermanos Juan y Ricardo, por ayudarme literalmente a escribir la tesis. Por darme las lecciones más interesantes de la vida y por enseñarme que los sábados son de películas.

A mi abuela Eva Santana, porque tal vez nunca se ha dado cuenta que el sólo hecho de existir y vivir es un ejemplo de fuerza y voluntad. A mi abue, por la fé que siempre ha mantenido en mí y por la confianza que siempre mantendrá en lo que hago.

A Melany, por sus consejillos pequeños.

A mis amigos Azucena, Roberto, Gabriela, Marcela, Mariela, Nadia y Natanael, quienes compartieron 5 años conmigo en el mismo lío. A mis amigos por proteger y compartir siempre los mismos valores.

Si eres echado en el foso o en manos de homicidas, y eres condenado a muerte; si eres arrojado al abismo; si las bravas olas conspiran contra ti; si el viento huracanado se hace tu enemigo; si los cielos se ennegrecen y todos los elementos se combinan para obstruir la vía; y sobre todo, si las puertas mismas del infierno se abren de par en par para tragarte, entiende, hijo mío, que todas estas cosas te servirán de experiencia, y serán para tu bien.

El Hijo del Hombre ha descendido debajo de todo ello. ¿Eres tú mayor que él?

D. y C.: 122: 7 y 8

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Conducta sexual femenina	3
II.1.1 Neuroendocrinología de las conductas copulatorias	4
II.1.2 Neuroendocrinología de las conductas paracopulatorias	7
II.2 Sistema olfatorio	7
II.2.1 Feromonas	7
II.2.2 Sistema de Proyección Vomeronasal (SPV)	9
II.2.3 El gen FOS en el sistema nervioso central	12
II.2.3.1 c-Fos y conducta sexual	15
II.3 Progesterona	17
II.3.1 Actividad fisiológica de la progesterona	19
II.3.1.1 Conducta sexual	19
II.3.1.2 Sistema Nervioso Central	22
II.3.1.3 Ovulación	22
II.3.1.4 Desarrollo uterino	25
II.3.1.5 Implantación uterina	28
II.3.1.6 Desarrollo lóbulo-alveolar de las glándulas mamarias	29
II.4 Receptor para progesterona	31
II.4.1 Gen PGR y el receptor para progesterona	32
II.4.2 Funcionamiento del receptor para progesterona	34

II.4.3 Distribución anatómica del receptor para progesterona	37
II.5 Ratones knockout del receptor para progesterona (PRKO)	39
II.5.1 Diseño del vector RV7	39
II.5.2 Desorganización dirigida del gen PR de ratón y generación del ratón PRKO	40
II.5.3 Características fisiológicas de las ratonas PRKO	41
III. HIPÓTESIS	42
IV. OBJETIVOS	43
IV.1 General	43
IV.2 Específicos	43
V. METODOLOGÍA	44
V.1 Animales	44
V.2 Métodos	44
V.2.1 Genotipificación	44
V.2.2 Experimento 1	45
V.2.3 Experimento 2	46
V.2.4 Inmunohistoquímica	47
V.2.5 Cuantificación del número de neuronas inmunoreactivas a Fos	48
V.2.6 Análisis estadístico	49
VI. RESULTADOS	50
VII. DISCUSIÓN	57
VII.1 Experimento 1	57
VII.2 Experimento 2	58
VIII. CONCLUSIÓN	63
IX. BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Régimen del tratamiento para la evaluación de la expresión de la proteína Fos en el sistema de proyección vomeronasal en ratonas de la cepa C57BL/6.	46
2	Valores de U de Mann-Whitney en ratonas C57BL/6 y PRKO.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diagrama esquemático que muestra la relación entre el estradiol y la progesterona durante el ciclo estral de los roedores hembra (modificado de Blaustein y Mani, 2006).	6
2	Órgano vomeronasal (modificado de Kelliher y Wersinger, 2009).	10
3	Sistema de proyección vomeronasal (modificado de Kelliher y Wersinger, 2009).	11
4	Microfotografía representativa de células inmunoreactivas a Fos.	16
5	Ruta metabólica de síntesis para la progesterona (modificado de Mathews, 2002).	18
6	La ovulación depende críticamente de la función del PR (modificado de Conneely y col., 2002).	24
7	El útero de una ratona PRKO es incapaz de realizar la decidualización (modificado de Conneely y col., 2002).	26
8	Apariencia morfológica de las glándulas mamaria de ratonas silvestres y PRKO, tratadas con progesterona o con vehículo (modificado de Lydon y col., 1995).	30
9	Estructura general del receptor para progesterona (PR) (modificado de Chen y col., 2008).	33
10	Mecanismo de acción del PR.	36
11	Distribución de las isoformas A y B del PR en el cerebro de rata (modificado de Brinton y col., 2008).	38
12	Desorganización dirigida del gen mPR mediante la inserción del gen neo ^r (modificado de Lydon y col., 1995).	40

13	Productos de PCR visualizados en un gel de agarosa.	45
14	Diagrama esquemático de las regiones (círculos con número) en que se cuantificaron las células inmunoreactivas a Fos (tomado de Domínguez-Salazar, 2002).	48
15	Microfotografía representativa que muestra las células inmunoreactivas a Fos en el área preóptica medial (marco blanco) de ratonas C57BL/6 (A) expuestas a aserrín limpio y ratonas C57BL/6 (B) y PRKO (C) expuestas a aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos.	50
16	Número de células inmunoreactivas a Fos en la capa mitral y granular del bulbo olfatorio accesorio y el área preóptica medial de ratonas C57BL/6 tratadas con vehículo (n=6) o con progesterona (n=5).	51
17	Número de células inmunoreactivas a Fos en las capas mitral y granular del bulbo olfatorio accesorio y en la amígdala anterior y posterior de ratonas C57BL/6 y PRKO expuestas a aserrín limpio ($n_{C57BL/6}=6$ y $n_{PRKO}=2$ respectivamente) o aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos ($n_{C57BL/6}=6$ y $n_{PRKO}=5$ respectivamente).	53
18	Número de células inmunoreactivas a Fos en las capas anterolateral y principal del núcleo lecho de la estría terminal y en el área preóptica medial de ratonas C57BL/6 y PRKO expuestas a aserrín limpio ($n_{C57BL/6}=6$ y $n_{PRKO}=2$ respectivamente) o aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos ($n_{C57BL/6}=6$ y $n_{PRKO}=5$ respectivamente).	55

- 19 **Número de células inmunoreactivas a Fos en las capas mitral y granular del bulbo olfatorio accesorio, en la amígdala anterior (MEA ant) y posterior (MEA post), en el área preóptica medial (APM) y en las capas anterolateral (NLET al) y principal (NLET prin) del núcleo lecho de la estría terminal de ratonas C57BL/6 (n=6) y PRKO (n=5) expuestas al aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos.** 56

RESUMEN

La progesterona es un esteroide fundamental para el despliegue de la conducta sexual femenina. En humanos y otros mamíferos, el mecanismo clásico de acción de la progesterona involucra la interacción de la hormona con su receptor proteínico intracelular, denominado receptor para progesterona. Este receptor existe como dos proteínas isofórmicas, llamadas A y B, las cuales tienen la capacidad de regular la transcripción de genes específicos. Ambas isoformas se expresan en diversas regiones cerebrales, incluyendo las regiones que forman parte del sistema de proyección vomeronasal. En roedores, el sistema de proyección vomeronasal participa en la detección e integración de las feromonas, lo cual es fundamental para el despliegue de la conducta sexual femenina. En el presente estudio utilizamos ratonas C57BL/6 y ratonas que no expresan ninguna de las dos isoformas del receptor para progesterona (PRKO) para determinar si la actividad de dicho receptor interviene en el funcionamiento del sistema de proyección vomeronasal (evaluado por la expresión de la proteína Fos). La actividad neuronal en las capas mitral y granular del BOA y en el APM no se modifica con el tratamiento sistémico de progesterona en las ratonas C57BL/6. Por el contrario, la exposición al aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos incrementa de manera significativa el número de células inmunoreactivas a Fos en las capas mitral y granular del BOA, en la MEA anterior y posterior, en el APM y en las capas principal y anterolateral del NLET de las ratonas C57BL/6. En contraste, la carencia del receptor para progesterona inhibe la respuesta neuronal en el SPV ante la exposición a feromonas. Además, las ratonas PRKO comparadas con las ratonas C57BL/6 presentan una menor expresión de la proteína Fos en el SPV. Estos datos sugieren que el receptor para progesterona tiene un efecto facilitador sobre el procesamiento de las señales producidas por claves quimiosensoriales sexualmente relevantes.

I. INTRODUCCIÓN.

La progesterona es una hormona esteroide clave en los eventos asociados con la reproducción femenina tales como el despliegue de la conducta sexual, el establecimiento y mantenimiento de la preñez, y la lactancia. Esto involucra desde la inducción de conductas proceptivas para llamar la atención del macho hasta la preparación del útero y el mantenimiento del producto. En mamíferos, los efectos fisiológicos principales de la progesterona están en el sistema nervioso central donde controla funciones nerviosas específicas involucradas en la conducta sexual; en el ovario y en el útero estimula la liberación de los ovocitos maduros y facilita la implantación. En la glándula mamaria promueve el desarrollo lóbulo-alveolar en preparación para la secreción de leche. Además, la actividad biológica de la progesterona se extiende al aprendizaje y la memoria, el estado de ánimo, la diferenciación sexual, la excitabilidad neuronal y el control del sistema vascular y óseo.

De acuerdo con el mecanismo clásico, los efectos fisiológicos de la progesterona están mediados por la interacción de la hormona con su receptor proteínico intracelular, denominado receptor para progesterona, PR (por sus siglas en inglés). Este receptor es un factor de transcripción y es miembro de una familia amplia de proteínas relacionadas estructuralmente, llamada superfamilia de receptores nucleares. En diferentes especies, el PR existe como dos proteínas isofórmicas, llamadas A y B. En roedores y humanos, ambas isoformas se expresan de un solo gen como resultado de la transcripción de dos promotores alternativos y del inicio de traducción en dos codones AUG diferentes. El desarrollo del ratón mutante que no expresa ninguna de las dos isoformas del PR (Progesterone Receptor Knockout, PRKO) ha permitido contestar varias preguntas relacionadas con la acción de la progesterona *in vivo*. Particularmente, las ratonas PRKO no manifiestan conducta sexual, presentan disfunción uterina, no ovulan y el desarrollo de las ramificaciones ductales y la diferenciación lóbulo-alveolar de las glándulas mamarias están dañados.

La conducta sexual consiste de una serie de patrones conductuales que al manifestarse permiten el mantenimiento de las especies. Aunque se han descrito diversos mecanismos celulares mediante los cuales la progesterona actúa en el cerebro de los roedores hembra, el efecto principal de esta hormona sobre la conducta sexual involucra su interacción con los PR intracelulares, inducidos por estradiol. Correlaciones espaciales, temporales y funcionales sugieren que los PR inducidos por estradiol, tras la unión de su ligando cognado, funcionan como reguladores y/o potenciadores de la transcripción de genes responsivos a progesterona lo que induce o sostiene una respuesta fisiológica que afecta los circuitos neuronales involucrados en el control de la conducta sexual. Diversos estudios en que se han utilizado antagonistas del PR, inhibidores de la transcripción de ARN y de la síntesis de proteínas, oligonucleótidos antisentido dirigidos al ARNm que codifica para el PR, han provisto evidencia irrevocable de que la facilitación de la conducta sexual inducida por progesterona requiere la activación de su receptor.

En roedores, la detección e integración de señales quimiosensoriales sexualmente relevantes es fundamental para el despliegue de la conducta sexual femenina. Una de las divisiones principales del sistema olfatorio encargada de este proceso es el sistema de proyección vomeronasal (SPV); el cual está conformado por estructuras cerebrales como el bulbo olfatorio accesorio, la amígdala anterior y posterior, el núcleo lecho de la estría terminal y el hipotálamo ventromedial. La activación del SPV puede evaluarse por la expresión de genes de respuesta temprana tales como FOS, ante la estimulación física (vaginocervical) o el procesamiento de señales quimiosensoriales. Estudios de autoradiografía e inmunohistoquímica muestran que las neuronas que inervan este sistema expresan el receptor para progesterona, por lo que es concebible que este receptor participe en la detección e integración de las señales quimiosensoriales sexualmente relevantes. En el presente estudio buscamos establecer si la activación del receptor para progesterona es necesaria para el funcionamiento completo del sistema de proyección vomeronasal.

II. ANTECEDENTES.

II.1 Conducta sexual femenina.

La conducta sexual está presente en diversos organismos y es indispensable para la preservación de las especies de generación en generación pero no para la sobrevivencia del individuo, siendo para éste una conducta motivacional, por lo tanto la conducta sexual no tiene otra finalidad o propósito más que su propia ejecución (Agmo, 1999).

Se han utilizado una variedad de términos para describir los diferentes componentes de la conducta sexual femenina. Beach (1976) propuso que la conducta sexual femenina comprende tres tipos básicos de conducta: receptividad, proceptividad y atractividad. En roedores, la receptividad se define como las posturas de respuesta-reflejo desplegadas por la hembra ante el contacto sexual. En ratas hembra, la receptividad sexual (ejemplificada por la lordosis) está determinada por la inmovilidad, extensión de las extremidades posteriores, flexión dorsal de la espina, elevación de la cabeza y desviación de la cola (Pfaff y col., 1973). Las conductas proceptivas incluyen una serie de conductas que demuestran la voluntad de la hembra para copular y usualmente están acompañadas de montas por el macho. Entre estas conductas están: pequeños saltos alrededor del macho (hopping), movimiento rápido de orejas (ear wiggling), movimientos en zig-zag y carreras cortas para huir y regresar con el macho (darting). Finalmente, los elementos que hacen atractiva a la hembra para el macho comprenden aspectos conductuales y no conductuales. Estos podrían incluir señales olfatorias y despliegues visuales.

Recientemente, Blaustein y Erskine (2002) sugirieron otro grupo de categorías de la conducta sexual para resaltar la contribución de la hembra. Éste incluye conductas copulatorias, paracopulatorias y progestativas. Las conductas copulatorias son aquellas que resultan en la transferencia exitosa de espermatozoides del macho a la hembra. El término se refiere principalmente a la lordosis y enfatiza en la participación activa de la hembra. Además, las conductas copulatorias involucran aquellos ajustes en la postura que ocurren durante la lordosis, los cuales son

necesarios para facilitar la intromisión por el macho (Adler y col., 1977). Las conductas paracopulatorias son conductas típicas de cada especie desplegadas por las hembras, supuestamente para excitar al macho e inducirlo a montar. Aparte del término de Beach, proceptividad (Beach, 1976), dichas conductas han sido referidas como precopulatorias (Madlafousek y Hlinak, 1977) o de solicitud (Erskine, 1989). Las conductas paracopulatorias mostradas por ratas hembra en estro también incluyen posturas de presentación (Emery y Moss, 1984) y la producción de vocalizaciones ultrasónicas (White y Barfield, 1989). La frecuencia con que estas conductas paracopulatorias se manifiestan está influenciada por los niveles hormonales, la tasa de cópula y las condiciones experimentales (Erskine, 1989).

El tercer componente de la conducta sexual femenina, conductas progestativas, incluyen aquellas conductas que incrementan la probabilidad de que la hembra quede preñada (Blaustein y Erskine, 2002). Dichas conductas involucran la regulación de las interacciones sexuales por parte de la hembra, mediante acercamientos hacia el macho y escapando de él (Peirce y Nuttall, 1961; Gilman y Hitt, 1978). También se incluyen conductas que regulan la frecuencia y el tiempo de intromisión y eyaculación, donde la hembra selecciona a los machos que están listos para eyacular (McClintock y Anisko, 1982) y lleva a cabo un periodo posteyaculatorio, el cual permite el transporte de los espermatozoides mediante la conservación del tapón vaginal. De igual forma, que la hembra adquiera la postura de lordosis para recibir una estimulación vaginocervical (EVC) incrementa la probabilidad del éxito reproductivo (Erskine y col., 2004)

II.1.1 Neuroendocrinología de las conductas copulatorias.

En ratas, la lordosis en respuesta a las montas ejecutadas por un macho sexualmente experto se utiliza como un indicador de la receptividad o conducta sexual femenina. En este caso, el coeficiente de lordosis (porcentaje de montas que provocan la lordosis en la hembra) y el grado de lordosis (valorado en una escala de 0 a 3 de acuerdo a la intensidad de la respuesta) son las medidas que comúnmente se utilizan (Hardy y DeBold, 1972). En ratones, la conducta sexual femenina se evalúa cuantificando el número de intromisiones en cada monta

realizada por el macho, se observa la presencia e intensidad de la conducta de inmovilización y se evalúa la receptividad utilizando la definición de McGill para la receptividad sexual femenina (Domínguez-Salazar y col., 2004).

De acuerdo con McGill, la receptividad femenina se califica de la siguiente manera: 0= La ratona evita totalmente al macho, no hay receptividad. 1= La ratona vocaliza cuando el macho intenta montarla, si el macho logra intrometerla es la hembra quien termina el contacto sexual. 2= La ratona permanece inmóvil hasta que el macho la intromete. La ratona termina el contacto genital huyendo del macho. 3= La ratona se mueve durante la intromisión pero el contacto sexual termina cuando el macho desmonta. 4= La ratona despliega brincoteos durante la intromisión, el macho termina el contacto coital desmontando a la ratona. 5= La ratona se queda quieta durante la intromisión, permitiendo que el macho regule el contacto sexual. De esta manera, se obtiene el número promedio de intromisiones por monta y el coeficiente de lordosis (conducta de congelación, LQ, (número de veces que la hembra se deja montar/número total de intentos de monta x100). También se calcula el índice de receptividad, una puntuación basada en la escala de McGill (la suma de los puntos obtenidos en cada monta/número total de montas).

En ratas y cobayos, durante el ciclo estral, la secreción secuencial de estrógenos y progesterona a partir de los ovarios resulta en el despliegue de la conducta sexual asociado con la ovulación (Collins y col., 1938; Barfield y Lisk, 1974, Figura 1). Luego que el periodo de conducta sexual termina, la receptividad sexual se observa hasta la etapa de proestro del ciclo reproductivo, con el siguiente episodio de secreción de estradiol seguido de progesterona. Esta observación se limita a la receptividad sexual. La ovariectomía provoca una disminución inmediata de los niveles circulantes de las hormonas esteroideas femeninas y, consecuentemente, cesa el despliegue de la conducta sexual femenina (Dempsey y col., 1936; Boling y Blandau, 1939). Estudios realizados en ratas y cobayos demuestran que los requerimientos hormonales para la inducción completa de la conducta sexual femenina involucra un periodo primario de estimulación con estradiol seguido de la exposición a progesterona (Joslyn y col., 1971).

En algunas circunstancias, ratas, cobayos, hámsteres y ratonas manifiestan conductas sexuales ante un tratamiento de puro estradiol. Sin embargo, el tratamiento secuencial de estradiol y progesterona resulta en la expresión de la conducta sexual femenina tal y como se observa durante el ciclo estral de los roedores (Blaustein y Mani, 2006). Por otra parte, la dihidrotestosterona también participa en la regulación de la conducta sexual femenina, inhibiendo la expresión de la receptividad sexual (Baum y col., 1974; Blasberg y col., 1998).

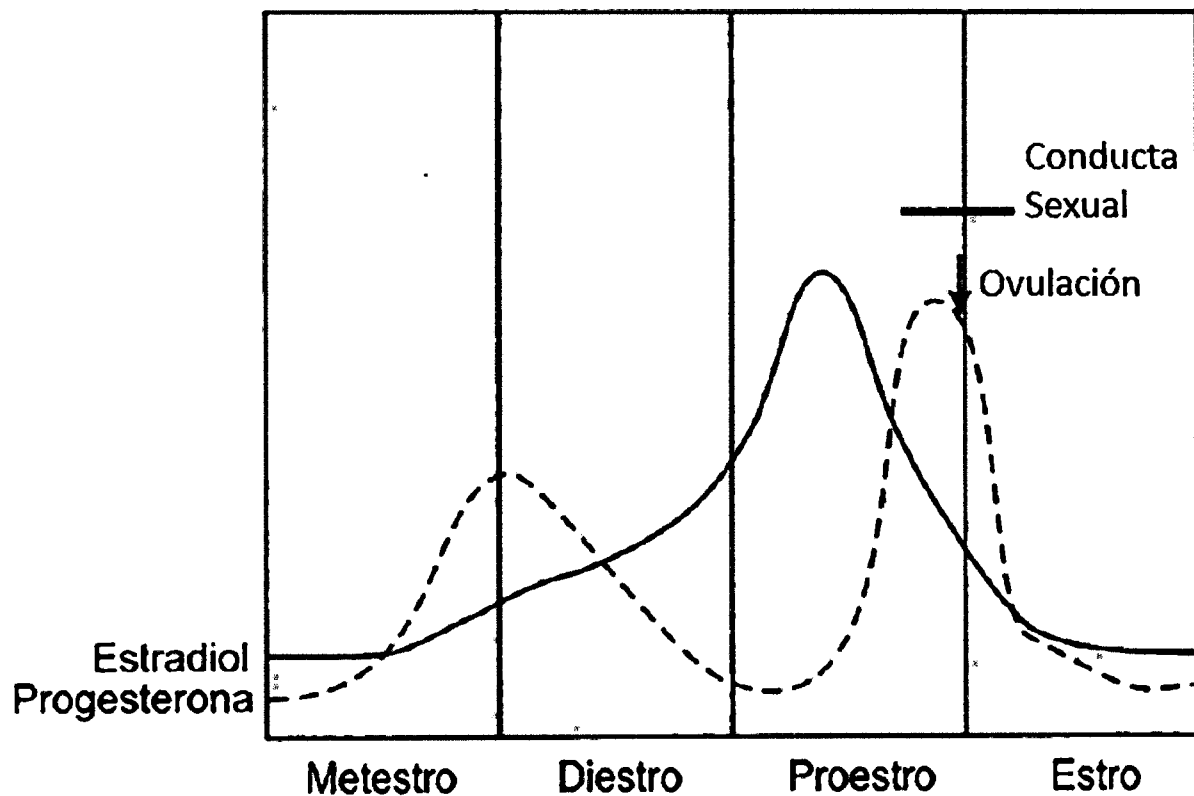


Figura 1. Diagrama esquemático que muestra la relación entre el estradiol y la progesterona durante el ciclo estral de los roedores hembra. Aunque hay diferencias en la regulación del ciclo estral entre las especies discutidas en esta sección (cobayos, ratas y ratones), el patrón hormonal durante la expresión de la conducta sexual es el mismo. Nótese que el inicio de la conducta sexual está correlacionado con la ovulación, la cual modifica la concentración de las hormonas esteroideas femeninas (modificado de Blaustein y Mani, 2006).

La conducta sexual femenina de los ratones difiere de la observada en ratas, cobayos y hámsteres. Luego de la ovariectomía, ratas y cobayos responden ante un tratamiento hormonal apropiado desde la primera exposición. En contraste, las ratonas requieren numerosas exposiciones a estradiol y progesterona antes de expresar la receptividad sexual. Además, el despliegue de la conducta sexual femenina difiere entre las cepas de ratones y entre las condiciones de alojamiento (Blaustein y Mani, 2006).

II.1.2 Neuroendocrinología de las conductas paracopulatorias.

En algunos estudios en ratas y hámsteres, se han evaluado las conductas paracopulatorias como pequeños saltos alrededor del macho (hopping), movimiento rápido de orejas (ear wiggling), movimientos en zig-zag y carreras cortas para huir y regresar con el macho (darting), y la producción de vocalizaciones ultrasónicas. A veces, se observan conductas de rechazo que representan los componentes aversivos de la interacción sexual. En general, se acepta que las conductas paracopulatorias son inducidas por la progesterona. Aunque el estradiol por sí mismo puede inducir conductas paracopulatorias y copulatorias en ratas ovariectomizadas y ovariectomizadas-adrenalectomizadas (Boling y Blandau, 1939; Gorzalka y Moe, 1994), en la mayoría de los casos, la progesterona de origen adrenal es necesaria para el despliegue de las conductas paracopulatorias, pero no para las copulatorias. Estas conductas también son inducidas mediante la estimulación de la isoforma 2 de los receptores para melanocortina con péptidos análogos de la hormona estimulante de α -melanocitos (Blaustein y Mani, 2006).

II.2 Sistema olfatorio.

II.2.1 Feromonas.

La conducta sexual y la fisiología reproductiva están reguladas por varios factores, y en muchas especies, tanto silvestres como domésticas, las claves químicas excretadas por individuos de la misma especie ejercen un profundo efecto. Dichas respuestas a las claves químicas han sido asociadas con respuestas a feromonas. El término feromona se introdujo por primera vez en la literatura hace 50 años por Karlson y Luscher (1959), quienes definieron a las feromonas como "sustancias

secretadas al exterior por un individuo y captadas por un segundo individuo de la misma especie, en el cual provocan una reacción específica, por ejemplo un proceso conductual o el comienzo de un desarrollo fisiológico definitivo". Este término pretendía definir una comunicación especial entre insectos de la misma especie, en los cuales las feromonas tendían a influenciar directamente una respuesta conductual innata para señales sexuales, de alarma o de rastreo.

Con algunas excepciones, los vertebrados no despliegan conductas instintivas o de reflejo ante una sola clave sensorial. Históricamente los efectos feromonaes en mamíferos fueron identificados como respuestas a la orina u otras excreciones pero se desconocía la molécula o conjunto de moléculas que pudieran inducir dichas respuestas. Para algunas especies, particularmente en ratones, han habido avances significativos en la identificación de moléculas que pudieran provocar las respuestas por feromonas (Luo y Katz, 2004), aunque todavía existe cierta controversia con respecto al mecanismo de acción de estas moléculas. McClintock (2002) describe las feromonas de acuerdo a su clasificación; de preparación, liberación, señalización y modulación. Las feromonas de preparación han sido descritas como señales químicas que inician respuestas fisiológicas con una duración de largo plazo. Por ejemplo, las feromonas derivadas de la orina de ratona inducen la secreción de la hormona luteinizante (LH) en ratones, lo que promueve la síntesis y liberación de testosterona (Wysocki y col., 1983). Las feromonas de liberación activan respuestas inmediatas, generalmente conductuales. El ejemplo más común es la androsterona en cerdos, que provoca una postura inmóvil para copula (Dorries y col., 1997). Las feromonas de señalización no necesariamente inducen una respuesta conductual inmediata por el contrario conllevan información socialmente relevante acerca de un individuo, por ejemplo, el estado reproductivo, la jerarquía social o incluso la identidad del individuo (Johnston, 2000). Se ha propuesto que las feromonas moduladoras son señales que regulan el afecto en humanos (Jacob y col., 2002). Dichas feromonas pudieran ser señales sociales que inducen cambios de humor o emocionales, aún cuando éstos no afecten inmediatamente a la conducta.

Es evidente que utilizar una definición flexible para el término feromona no excluye como tal a cualquier señal química que sea defendida convincentemente para entrar en esta categoría. Kelliher sugirió que el término sea utilizado como un concepto, no una entidad discreta, y definió dicho concepto como "una señal quimiosensorial, secretada por un individuo, con la única función de comunicación con otro individuo de la misma especie" (Kelliher y Wersinger, 2009).

II.2.2 Sistema de Proyección Vomeronasal.

El Sistema de Proyección Vomeronasal es una de las principales divisiones del sistema olfatorio en la mayoría de los animales vertebrados exceptuando a las especies aviarias, los mamíferos acuáticos y los primates del Viejo Mundo, incluyendo a los humanos (Wysocki, 1979). En principio, las señales (claves) quimiosensoriales son detectadas por las neuronas vomeronasales receptoras (NVR) localizadas dentro del par de órganos vomeronasales, acoplados bilateralmente, en la base del septum nasal. Estas claves se unen a los receptores vomeronasales ubicados en las microvellocidades neuronales que proyectan hacia adentro del lumen vomeronasal. En mamíferos como roedores y marsupiales, en los cuales este sistema está bien definido, el órgano vomeronasal se divide en una capa apical y una capa basal, distinguidas por las diferencias en sus mecanismos de transducción de señales (Figura 2A). Las neuronas apicales expresan receptores vomeronasales que pertenecen a la familia V1R, los cuales están acoplados a proteínas G (G α i) e inducen vías de señalización mediante segundos mensajeros. Estos receptores requieren de las subunidades TRPC2 (Dulac y Torello, 2003; Tirindelli y col., 1998). En contraste, las neuronas basales expresan receptores vomeronasales que pertenecen a la familia V2R acoplados a proteínas G α o. Los V2R presentan la subunidad TRPC2 pero también pueden procesar las señales quimiosensoriales de manera independiente a esta subunidad (Kelliher y Wersinger, 2009). Aún no es clara la importancia funcional de las divisiones del órgano vomeronasal, sin embargo, la detección de las claves quimiosensoriales por las neuronas apicales y las neuronas basales es diferencial (Leinders-Zufall y col., 2004).

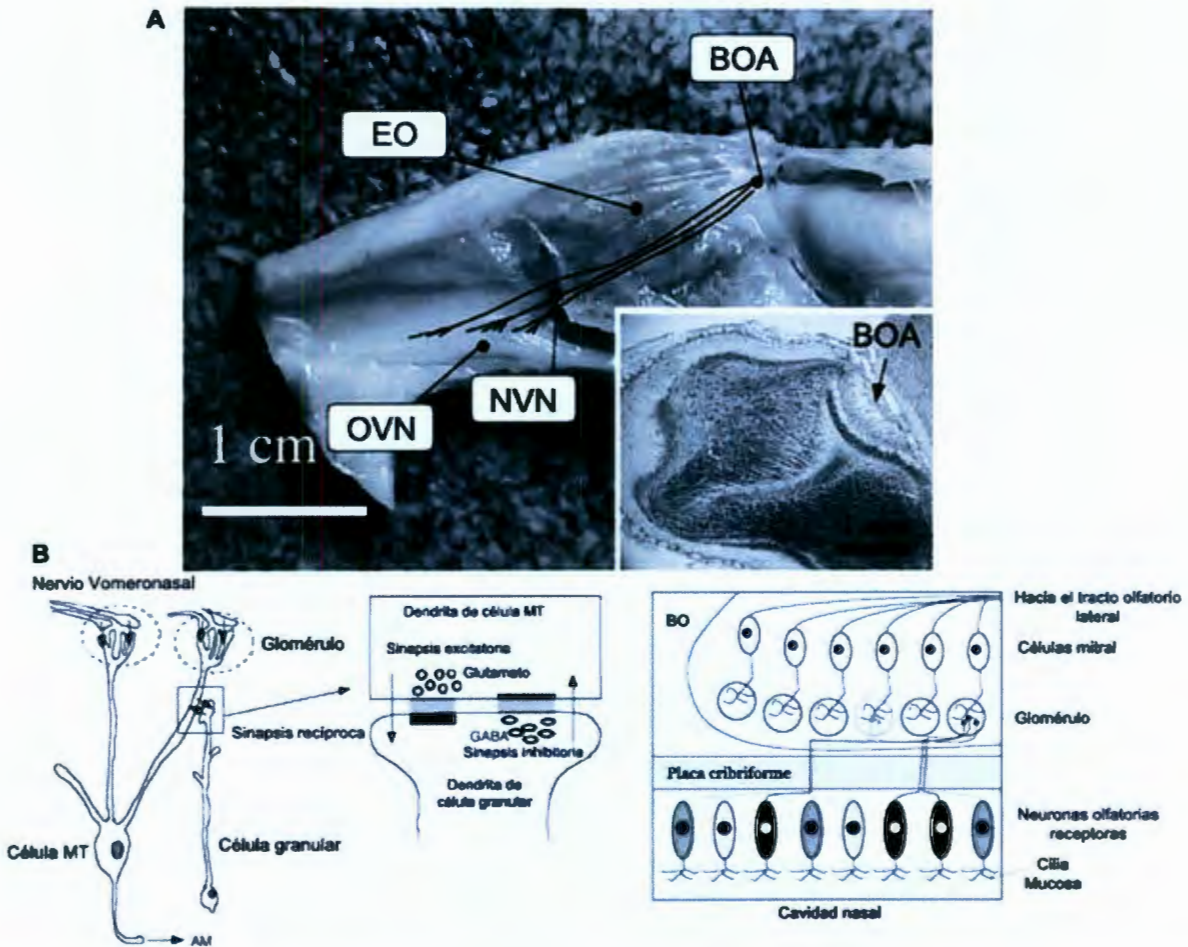


Figura 2. Órgano vomeronasal. (A) Cuando las claves quimiosensoriales son detectadas por las neuronas vomeronasales receptoras (NVN) estas últimas transmiten la señal mediante la proyección de sus axones hacia el bulbo olfatorio accesorio (BOA) en donde se procesa y envía hacia estructuras cerebrales centrales. (B) Cada NVN expresa un solo tipo de receptor olfatorio, aunque las NVN con el mismo receptor estén distribuidas en todo el epitelio olfatorio (EO), sus axones pasan a través de la placa cribriforme del cráneo y proyectan al mismo glomérulo en el BOA. OVN (órgano vomeronasal) (modificado de Kelliher y Wersinger, 2009).

Como se muestra en la figura 2B, las neuronas vomeronasales receptoras proyectan sus axones directamente a los glomérulos del bulbo olfatorio accesorio (BOA), el cual se localiza caudalmente sobre la porción dorsomedial del bulbo olfatorio.

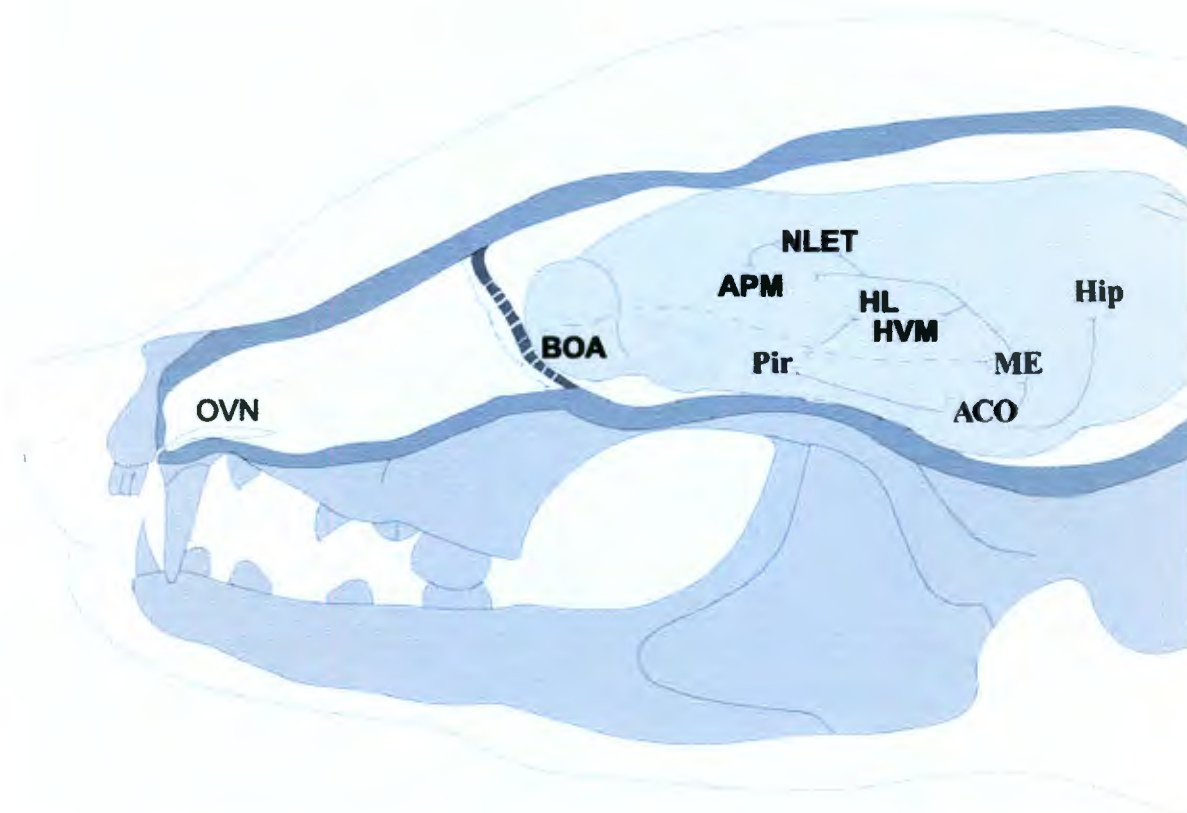


Figura 3. Sistema de proyección vomeronasal. OVN (órgano vomeronasal), BOA (bulbo olfatorio accesorio), ACO (amígdala corticomedial), ME (amígdala medial), Hip (hipocampo), HVM (hipotálamo ventromedial), HL (hipotálamo lateral), Pir (corteza piriforme), APM (área preóptica medial), NLET (núcleo lecho de la estria terminal) (modificado de Kelliher y Wersinger, 2009).

Las proyecciones axonales de las neuronas vomeronasales ubicadas en la capa apical se arborizan en glomérulos situados en el BOA rostral, mientras que las proyecciones axonales derivadas de las VRN localizadas en la capa basal se arborizan en el BOA caudal (Halpern y col., 1998). Los axones de las neuronas

vomeronasales entran a los glomérulos del BOA y hacen contactos sinápticos con las dendritas de las células mitrales y de las células granulares, éstas últimas son interneuronas. Las células mitrales proyectan sus axones hacia estructuras cerebrales anteriores como el núcleo olfatorio anterior, el núcleo lecho del tracto olfatorio accesorio (NLTOA), la amígdala medial (MEA), la amígdala cortical posteromedial y el núcleo lecho de la estría terminal (NLET). Estas proyecciones se dan a través del tracto olfatorio lateral (Kelliher y Wersinger, 2009). Las proyecciones hacia el área preótica medial (APM), la porción ventrolateral del núcleo hipotalámico ventromedial (HVM) y el núcleo premamilar se originan tanto de la amígdala medial como del NLET (Canteras y col., 1995, Figura 3). La polisinápsis del SPV está muy bien caracterizada anatómicamente y se sabe que existen conexiones recurrentes a partir del APM hacia la MEA, y de la MEA hacia el BOA (Canteras y col., 1995; Kelliher y Wersinger, 2007). La retroalimentación de estas conexiones es importante para el procesamiento de las claves quimiosensoriales sexualmente y la generación de una respuesta conductual.

II.2.3 El gen FOS en el sistema nervioso central.

Una de las técnicas que se han utilizado para evaluar el funcionamiento del SPV es la expresión de FOS como un gen de activación temprana ante estímulos quimiosensoriales sexualmente relevantes. Los genes de respuesta temprana fueron descritos originalmente en el campo de la regulación del crecimiento. Éstos son genes que se activan de manera transitoria y rápida en respuesta a una amplia variedad de estímulos extra e intracelulares. Representan un mecanismo de respuesta permanente a nivel transcripcional en la primer oleada de respuesta ante el estímulo, antes de la síntesis de cualquier otra proteína. Codifican proteínas que participan en la regulación de la proliferación y el crecimiento celular (Curran y Morgan, 1995). A la fecha han sido identificadas principalmente 4 proteínas de la familia Fos: c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2 (Nishina y col., 1990; Zerial y col., 1989). Estas proteínas son codificadas por genes que contienen cuatro exones y tres intrones (van Straaten y col., 1983). Se sabe que las hormonas esteroideas, los factores de crecimiento y los neurotransmisores activan cascadas de señalización

intracelular capaces de incrementar la expresión de p-CREB (cAMP response element-binding), la unión de CREB a su coactivador CBP y la consecuente transcripción de genes de respuesta temprana que contienen elementos de respuesta para AMPc, tales como c-Fos y c-Jun (Schule y Evans, 1991). Estos genes codifican los factores de transcripción Fos y Jun, los cuales poseen dominios ricos en leucina que permiten la formación de homo o heterodímeros mediante la interacción con miembros de la familia Jun (c-Jun, JunB y JunD). Este complejo forma el factor de transcripción llamado proteína activadora 1 (AP-1, por sus siglas en inglés), el cual regula directamente la expresión génica interactuando con secuencias de ADN de reconocimiento denominadas AP-1 presentes cerca de la región promotora (Kushner y col., 1994). Los bajos niveles de transcripción de c-Fos en condiciones basales y la responsividad a un amplio rango de estímulos transinápticos/transcripcionales, permiten utilizar éste gen de expresión temprana para el mapeo de la actividad neuronal. En condiciones basales, el ARN mensajero (ARNm) de c-Fos y la proteína Fos se encuentran en niveles muy bajos (Hughes y col., 1992). En cultivos celulares así como en varias regiones cerebrales in vivo, el ARNm es inducido minutos después del estímulo y el máximo pico se encuentra entre 30 y 60 minutos. El nivel máximo de la proteína Fos ocurre entre una y tres horas, y desaparece gradualmente del núcleo celular entre tres y cuatro horas después del tratamiento (Kovács y Sawchenko, 1996).

Se considera que la expresión de la proteína Fos refleja la actividad funcional de las neuronas (Duncan y col., 1993; Sagar y col., 1988). Sin embargo, áreas con altos niveles de actividad neuronal, por ejemplo la corteza visual (Kaczmarek y Chaudhuri, 1997) o células neurosecretoras magnocelulares durante la succión (Fenelon y col., 1993), no muestran una expresión significativa de c-Fos; por lo tanto parece que la sola actividad no es suficiente para inducir la transcripción de este gen. Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la expresión de c-Fos depende de las características temporales de los patrones de disparo de los potenciales de acción. En cultivos de células ganglionares de la raíz dorsal, incrementos grandes y sostenidos del calcio intracelular o altos niveles de calcio

separados por largos intervalos de disparos provocan una expresión muy baja de Fos. La activación de este gen está correlacionada inversamente con el intervalo de disparo de los potenciales de acción (Fields y col., 1997). Al nivel de sistema, la estimulación de entradas sensoriales (aferencias), como la visual, a una intensidad normal no provoca un incremento en la expresión de Fos, a menos de que haya un periodo de privación sensorial o que las ratas sean expuestas a un objeto novedoso (Kaczmarek y Chaudhuri, 1997). Una estimulación auditiva a diferentes intensidades no cambia la expresión de Fos en comparación con una situación de ruido de fondo, pero esta expresión es dependiente de la intensidad en estructuras relacionadas a la audición (Campeau y Watson, 1997). Sin embargo, se han observado diferencias en otras estructuras cerebrales; algunas áreas como los núcleos basolateral, medial y cortical de la amígdala, el tálamo anterodorsal y mediodorsal, así como la corteza piriforme, la infralímbica y del cíngulo, expresan Fos en respuesta a leves estímulos como la exploración de un ambiente novedoso (Cullinan y col., 1995; Duncan y col., 1993).

En el sistema de proyección vomeronasal de ratas hembra y ratonas se han observado incrementos significativos en la expresión de Fos luego de la estimulación con claves quimiosensoriales sexualmente relevantes de machos sexualmente expertos (Blaustein y Mani, 2006). El patrón de expresión de la proteína Fos es específico para el tipo de estímulo aplicado. Por ejemplo, en experimentos donde se inyectan ratas con una solución hipertónica y se sacrifican después de treinta minutos se han localizado muchas células inmunoreactivas a Fos en el órgano subfornical, estructura circunventricular del cerebro involucrada en la regulación de los fluidos del cuerpo (Giovannelli y Bloom, 1992). Al investigar la realización de tareas motoras o la hipertermia en ratas, se ha observado que después del estímulo hay una gran cantidad de neuronas inmunoreactivas a Fos en las regiones cerebrales implicadas con la detección e integración de dichos estímulos y no en otras regiones (Scammell y col., 1993). Lo anterior pone de manifiesto que en las regiones donde la actividad neuronal es detectada por la expresión de la proteína Fos, éstas dependen del tipo de estímulo aplicado. Por lo

tanto, la detección de las proteínas expresadas a partir de genes de respuesta temprana como Fos, refleja los circuitos neuronales involucrados en el procesamiento de un estímulo determinado. Existe un número de factores que inducen la expresión de c-Fos tales como: factores neurotróficos, hormonas de naturaleza esteroidea, neurotransmisores, la despolarización, el incremento del flujo de calcio y la elevación del calcio intracelular.

II.2.3.1 c-Fos y conducta sexual.

La expresión de la proteína Fos se ha utilizado como un método para medir la respuesta de los circuitos neuronales involucrados en el control de la conducta sexual, sobre todo la respuesta del sistema de proyección vomeronasal en ratas y ratones, ante estímulos sexualmente relevantes, tanto en machos como en hembras (Paredes y col., 1998). Algunos trabajos en donde se ha utilizado la detección inmunohistoquímica de esta proteína como un indicador de la actividad neuronal, sugieren que los roedores hembra tienen un patrón sorprendentemente similar al de los machos en respuesta a estímulos feromonales derivados de una hembra en estro (Bressler y Baum, 1996). En otro estudio realizado por Wersinger y colaboradores en 1993, tanto ratas macho como hembras gonadectomizadas y tratadas con estrógenos fueron sometidas a varios estímulos sexualmente relevantes, los resultados mostraron patrones idénticos de inmunoreactividad para Fos en la amígdala medial anterior (MEA ant) y posterior (MEA pos), el núcleo lecho de la estria terminal (NLET), el tegmento dorsolateral y el área preóptica medial (APM) (Wersinger y col., 1993). Los resultados anteriores demuestran claramente que la detección de la proteína Fos permite evaluar la participación del sistema de proyección vomeronasal en la detección e integración de estímulos sexualmente relevantes.

Por otro lado, Bakker y colaboradores (1995) demostraron que las claves quimiosensoriales sexualmente relevantes derivadas de ratas hembra en estro aumentaban el número de neuronas inmunoreactivas a Fos en la amígdala medial posterior, el NLET y el APM de ratas macho castradas y tratadas con estradiol. También observaron aumentos similares en machos que habían sido tratados

neonatalmente con un inhibidor de la aromatasa, 1, 4, 6-androstatrien-3, 17-diona (ATD), el cual interfiere con la masculinización del núcleo dimórfico sexual del APM. Además, cuando Bakker y colaboradores expusieron a los machos a claves quimiosensoriales sexualmente relevantes derivadas del aserrín proveniente de machos sexualmente expertos, sólo observaron la activación de las áreas periféricas (BOA y la amígdala medial anterior); no se activaron las áreas centrales (NLET y APM) (Bakker y col., 1995; Domínguez-Salazar y col., 2002).

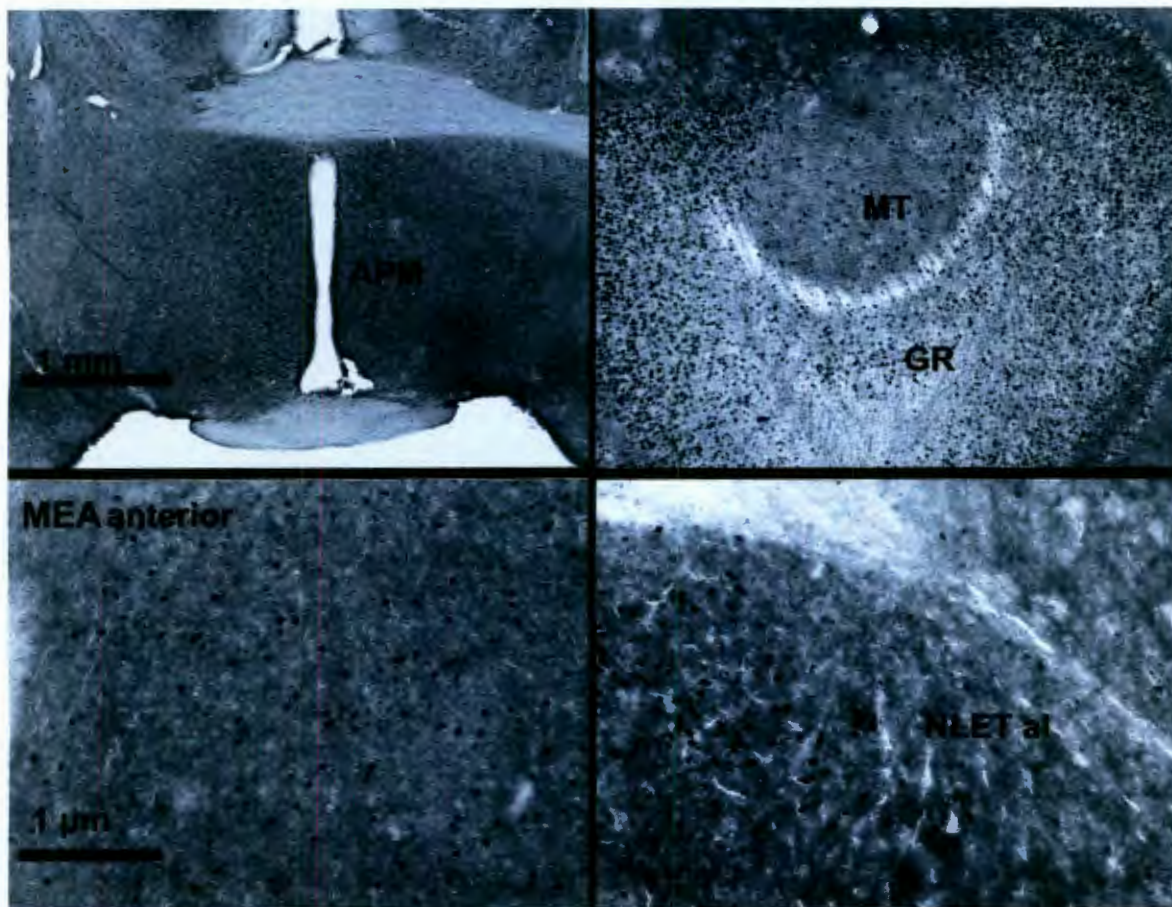


Figura 4. Microfotografía representativa de células inmunoreactivas a Fos. La expresión de genes tempranos como FOS ha sido utilizada como un marcador de la actividad neuronal para delinear las regiones cerebrales involucradas con el despliegue de la conducta sexual. APM (área preóptica medial), MEA (amígdala), MT (capa mitral del bulbo olfatorio accesorio), GR (capa granular del bulbo olfatorio accesorio), NLET al (núcleo lecho de la estría termina anterolateral).

Diferentes autores han demostrado que la estimulación sexual y la estimulación vaginocervical inducida experimentalmente en ratas hembra y ratonas provoca un aumento en el número de células inmunoreactivas a Fos en el APM, HVM, el NLET, la amígdala medial, el BOA y el campo tegmental central (Dudley y col., 1992; Erskine, 1993; Pfau y col., 1993; Rowe y Erskine, 1993; Dudley y Moss, 1994). Con estas evidencias es claro que la detección inmunoreactiva de la proteína Fos permite mapear la actividad neuronal de las regiones que responden a estímulos asociados con la conducta sexual.

II.3 Progesterona.

El colesterol es el origen biosintético de todas las hormonas esteroideas, los mensajeros extracelulares elaborados por las gónadas y la corteza suprarrenal, más la placenta en las mujeres embarazadas. En general, las hormonas esteroideas controlan la fisiología celular a nivel de los genes. Actúan mediante la interacción con receptores proteicos intracelulares, y los complejos hormona-receptor se unen a lugares específicos del genoma afectando la transcripción de genes responsivos a dichas hormonas.

Una de las categorías más importantes de las hormonas esteroideas es denominada progestágenos (progesterona), que regulan los eventos asociados con la reproducción femenina y son los precursores de todas las demás hormonas esteroideas. Una característica general de estas hormonas es que no se almacenan para su liberación tras su síntesis. En consecuencia, la concentración de una hormona circulante está controlada por su tasa de síntesis, la cual, en última instancia, está regulada por el sistema nervioso central. La síntesis de las hormonas esteroideas involucra la hidrólisis de los ésteres del colesterol en las mitocondrias celulares del órgano blanco. Y allí, la enzima citocromo P450 colesterol desmolasa (P450 scc), hidroxila la cadena lateral en C20 y C22 y la escinde, para producir el metabolito denominado pregnenolona, precursor de todas las demás hormonas esteroideas. La pregnenolona se convierte en la hormona esteroidea progesterona mediante una deshidrogenación y la isomerización de un

doble enlace catalizadas por las enzimas 3 β - hidroxisteroide deshidrogenasa 1/ 3 β - hidroxisteroide deshidrogenasa 2 (Mathews, 2002, Figura 5).

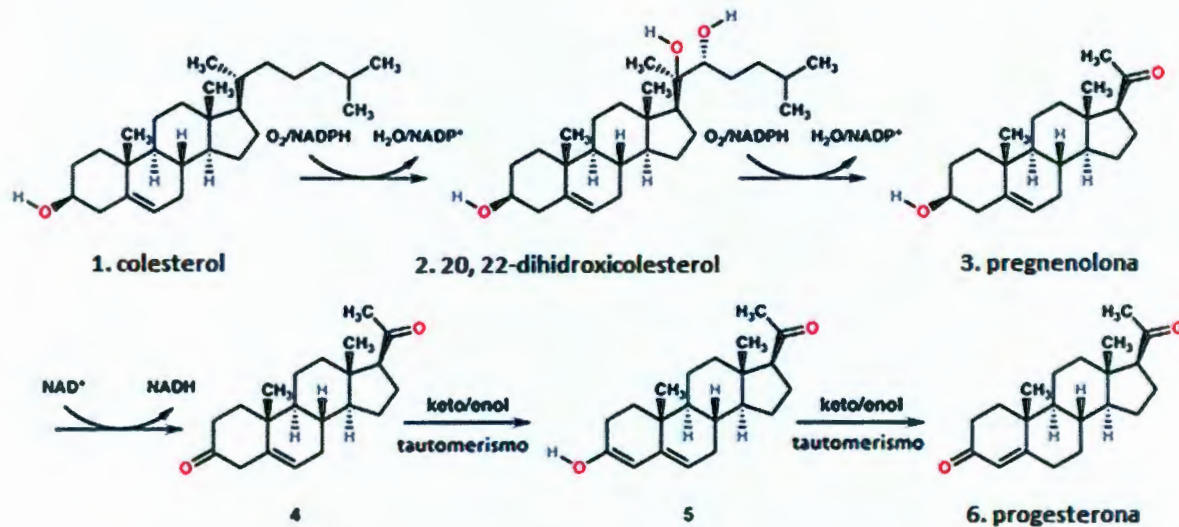


Figura 5. Ruta metabólica de síntesis para la progesterona (modificado de Mathews, 2002).

En los mamíferos, el ovario es el sitio principal de síntesis y secreción de estrógenos y progesterona, provocando las fluctuaciones cíclicas en los niveles circulantes de dichas hormonas. Los folículos primarios tienen una actividad dual en la secreción de ambas hormonas y son responsables de la liberación del óvulo durante el ciclo normal. Antes de la ovulación, las células de la granulosa en el folículo biosintetizan y secretan estrógenos. Luego de la ruptura del folículo y la liberación del óvulo, estas células de la granulosa se diferencian y forman el cuerpo lúteo, el cual es responsable de la secreción de progesterona y estrógenos en la parte tardía del ciclo. En los humanos, si no ocurre la fecundación durante los tres primeros días de fertilidad, el cuerpo lúteo continuará expandiéndose por 10-12 días más. Entonces se observa una regresión de dicha glándula y cesará la liberación tanto de estrógenos como de progesterona. Si un óvulo es fecundado, el cuerpo lúteo crecerá moderadamente y funcionará por los 2 a 3 primeros meses de embarazo (preñez). Luego de este tiempo retrocederá lentamente en tanto la

placenta asume el papel de biosíntesis hormonal para el mantenimiento de la gestación (Graham y Clarke, 1997).

La liberación de progesterona por parte del cuerpo lúteo está influenciada por diversas hormonas. Una de las más importantes, LH (hormona luteinizante), ejerce su efecto mediante la activación de vías de señalización celular dependientes de AMPc (Marsh y col., 1966). Otras hormonas como FSH (folículo estimulante) y PRL (prolactina) así como prostaglandinas y agentes β adrenérgicos controlan también la secreción de progesterona (Norman y Litwach, 1987). Algunos intermediarios como activina, la cual es estimulada por FSH e inhibe la secreción de progesterona por las células de la granulosa, y la folistatina, que es sintetizada por las células de la granulosa y es capaz de unir activina, contribuyen con el patrón regulatorio de la secreción de progesterona. Al momento de la implantación del blastocito en el útero de la rata, el incremento en la síntesis de progesterona está acompañado de la inducción de la expresión de folistatina ovárica, que parece favorecer la continua secreción de progesterona (Mercado y col., 1993). Una vez liberada, la progesterona es transportada en el torrente sanguíneo por la transcortina (globulina de unión a corticoesteroides). Esta proteína ha sido identificada en diversas especies incluyendo a los humanos (Graham y Clarke, 1997).

II.3.1 Actividad fisiológica de la progesterona.

A continuación se describirán algunos de los eventos asociados con la reproducción femenina en los cuales la progesterona ejerce un efecto modulador.

II.3.1.1 Conducta sexual.

De la misma manera en que ocurre en los tejidos reproductivos, la progesterona regula la fisiología celular en el sistema nervioso central para coordinar los eventos asociados a la reproducción femenina en varias especies (Mani, 2008). En roedores hembra cuyas gónadas están intactas, la liberación secuencial de estradiol y progesterona a partir del ovario integran la aparición de la conducta sexual (conducta estral) junto con la ovulación (Mani y col., 1997). Esta conducta puede abatirse por la ovariectomía y restaurarse por el tratamiento crónico con estradiol y progesterona o con dosis altas de estradiol. Sin embargo, el tratamiento

secuencial con estradiol y progesterona maximiza la probabilidad de que la hembra despliegue la respuesta sexual de receptividad, la lordosis, al ser montada por un macho conespecífico. Aunque se han descrito diversos mecanismos celulares mediante los cuales la progesterona actúa en el cerebro, el efecto principal de esta hormona sobre la conducta sexual involucra su interacción con PR intracelulares, inducidos por estradiol. Correlaciones espaciales, temporales y funcionales sugieren que los PR inducidos por estradiol, tras la unión de su ligando cognado, funcionan como reguladores y/o potenciadores de la transcripción de genes responsivos a progesterona lo que provoca o sostiene una respuesta fisiológica que afecta los circuitos neuronales involucrados en el control de la conducta sexual (Mani y col., 1997). Es bien sabido que los PR neuronales expresados en el HVM y en el APM median la facilitación de las conductas femeninas proceptivas y receptivas inducidas por progesterona. El curso temporal del despliegue y terminación de la conducta sexual es paralelo al incremento y disminución, respectivamente, de los sitios de unión a progestinas en estas áreas cerebrales (Mani y col., 1997).

El incremento en la concentración de PR citosólicos desocupados en las neuronas del hipotálamo, seguido de la acumulación de PR nucleares unidos a ligando en respuesta a una dosis efectiva de progesterona se correlaciona con el establecimiento de la conducta sexual en roedores. Esto indica que la facilitación de la conducta sexual inducida por progesterona está regulada por los receptores intracelulares en un mecanismo de dos pasos, la acumulación de sitios de unión en el citoplasma celular y la translocación nuclear del PR unido al ligando (Blaustein y Feder, 1980). Además, estudios realizados en cobayos muestran que la progesterona puede inducir un estado de refracción o resistencia durante el cual los animales están hiposensibles a dicha hormona. En este periodo, la concentración de PR desocupados disminuye en las neuronas del hipotálamo. El tratamiento con progesterona resulta en niveles bajos de PR nucleares unidos a ligando, lo que sugiere que la hiposensibilidad, y la consecuente terminación de la conducta sexual, se debe a la incapacidad de acumular una cantidad adecuada de PR

ocupados en respuesta a progesterona (Blaustein y col., 1994). Diversos estudios en que se han utilizado antagonistas del PR, inhibidores de la transcripción de ARN y de la síntesis de proteínas, oligonucleótidos antisentido dirigidos al ARNm que codifica para el PR, han provisto evidencia irrevocable de que la facilitación de la conducta sexual inducida por progesterona requiere la participación de los PR (Meisel y Pfaff, 1984; Ogawa y col., 1994). El desarrollo de los ratones PRKO ha representado una herramienta muy importante para delimitar los efectos de los PR intracelulares sobre la conducta copulatoria femenina; análisis in vitro de unión de ligando en el hipotálamo mediobasal demostraron que la concentración de PR se redujo 70% y 40% en las ratonas PRKO y heterocigotas, respectivamente, comparada con las ratonas silvestres (WT) dejando claro que las ratonas PRKO presentan una reducción significativa en los niveles de PR. Los niveles bajos de PR se han correlacionado con la receptividad sexual en los animales PRKO. Ratonas heterocigotas y silvestres tratadas con estradiol y progesterona exhiben niveles altos de receptividad sexual en respuesta a la cópula con machos silvestres, sin embargo, las ratonas PRKO, bajo las mismas condiciones, presentan una respuesta mínima ante la cópula con machos silvestres (Mani y col., 1997).

Estudios de neuroanatomía han mostrado la colocalización de neurotransmisores y neuropéptidos en núcleos cerebrales que expresan PR. Se ha reportado que las neuronas inmunoreactivas a la dopamina- β -hidroxilasa y a la tirosina hidroxilasa hacen contactos sinápticos con las neuronas inmunoreactivas a PR en el hipotálamo y en el APM de cobayos, ratas y monos (Blaustein y Mani, 2006). Además de la progesterona, los neurotransmisores como la serotonina (5-HT) afectan el despliegue de la conducta de lordosis (Gereau y col., 1993). Dependiendo del subtipo del receptor activado, los agonistas de los receptores 5-HT pueden inhibir o facilitar la conducta de lordosis (Uphouse y col., 2009). La activación de los receptores 5-HT_{1A} en el hipotálamo ventromedial es responsable, principalmente, de los efectos inhibitorios sobre la lordosis inducidos por la serotonina. En contraste, la activación de los receptores 5-HT_{2A/2C} facilita el despliegue de la conducta sexual femenina en roedores y atenúa la inhibición

mediada por los receptores 5-HT_{1A} en el hipotálamo. El tratamiento hormonal que facilita el despliegue de la lordosis disminuye la actividad de los receptores 5-HT_{1A} y potencia la actividad de los receptores 5-HT_{2A/2C} (Uphouse y col., 2009).

II.3.1.2 Sistema Nervioso Central.

La progesterona estimula las vías de señalización del ácido γ -aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) en áreas específicas del cerebro. Se ha postulado que los aumentos mediados por progesterona en los sitios de enlace del receptor GABA_A en algunas áreas cerebrales, incluyendo aquellas donde su expresión es baja o ausente, contribuye a la estimulación de la conducta de lordosis en ratas y hámsteres, suprime la conducta agresiva e induce la liberación de GnRH (Maggi y Pérez, 1984). Parte de este efecto pudiera estar mediado por una interacción directa entre los metabolitos 5-alfa reducidos de la progesterona y el receptor GABA_A en regiones que no expresan el PR, y por el PR en estructuras tales como el hipotálamo. En el hipotálamo ventromedial, el tratamiento secuencial con estrógenos y progesterona potencia la liberación de norepinefrina, inducida por oxitocina (Vincent y Etgen, 1993), la cual estimula la conducta sexual dependiente de hormonas a través de las proyecciones noradrenérgicas. También la progesterona y los estrógenos regulan la conducta de lordosis afectando la síntesis del POMC (proopiomelanocortina), el precursor de las β -endorfinas, en el hipotálamo ventromedial. Los estrógenos regulan negativamente la síntesis de este péptido y la progesterona previene esta regulación negativa (Wilcox y Roberts, 1985). La β -endorfina disminuye la secreción pituitaria de LH y FSH. En el área preóptica medial/hipotálamo anterior de ratas, la progesterona aumenta la actividad de la adenilato ciclasa y, consecuentemente, los niveles de AMP cíclico (Collado y col., 1985) y regula de manera negativa el recambio de serotonina (Gereau y col., 1993), ambos eventos se han correlacionado con un aumento en la conducta sexual.

II.3.1.3 Ovulación.

Aunque el ovario ha sido reconocido como el tejido endócrino primario en la biosíntesis y liberación de progesterona, definir este esteroide como un modulador

local de la fisiología ovárica representó un tema controversial durante muchos años (Yoshimura y col., 1987). Sin embargo, las evidencias de que la progesterona pudiera participar en la regulación autócrina de la función del ovario surgieron cuando se demostró que la hormona luteinizante (LH), señal primaria para la ruptura de los folículos preovulatorios que provoca la ovulación, podía estimular la expresión transitoria del ARNm del PR y la consecuente síntesis de la proteína en células de la granulosa aisladas de folículos preovulatorios (Park y Mayo, 1991; Natraj y Richards, 1993), y que inhibidores de la síntesis de progesterona, así como el antagonista de progestinas RU486 inhiben la ovulación (Lydon y col., 1995). El fenotipo ovárico de las ratonas PRKO resultó esencial para el esclarecimiento de la regulación mediada por PR (Figura 6). A pesar de la exposición a niveles superovulatorios de las gonadotropinas PMSG (gonadotropina sérica de yegua) y hCG (gonadotropina coriónica humana), las ratonas PRKO no ovulan. El análisis de la histología de estas ratonas reveló un desarrollo normal de los folículos intraováricos en la etapa folicular (Lydon y col., 1995). Los folículos contienen ovocitos maduros que son totalmente funcionales cuando se aíslan y se fertilizan in vitro. Aún con el bloqueo ovulatorio, las células de la granulosa dentro de los folículos pueden diferenciarse en el fenotipo luteal (Robker y col., 2000). Por lo tanto, PR es necesario específicamente para la ruptura folicular dependiente de LH, lo que lleva a la ovulación, pero no se requiere para la diferenciación de las células de la granulosa en el cuerpo lúteo (luteinización).

La ruptura folicular requiere la inducción de una respuesta inflamatoria mediada por prostaglandina así como la degradación del folículo preovulatorio, evento mediado por proteasas que degradan la matriz extracelular (revisado en Conneely y col., 2002). Los análisis de la expresión de mediadores potenciales de la ovulación en las ratonas PRKO han demostrado que la regulación de Cox-2, enzima que cataliza la producción de prostaglandinas, está intacta (Robker y col., 2000). Cox-2 es expresada por células del cúmulus en la granulosa y es necesaria para la ovulación (Dinchuk y col., 1995; Morham y col., 1995). En contraste, la expresión de las metaloproteasas ADAMTS-1 (desintegrina y metaloproteasa con motivos de

trombospondina) y catepsina-L (cisteínproteasa lisosomal) está inhibida en células de la granulosa de los folículos maduros en las ratonas PRKO (Robker y col., 2000).

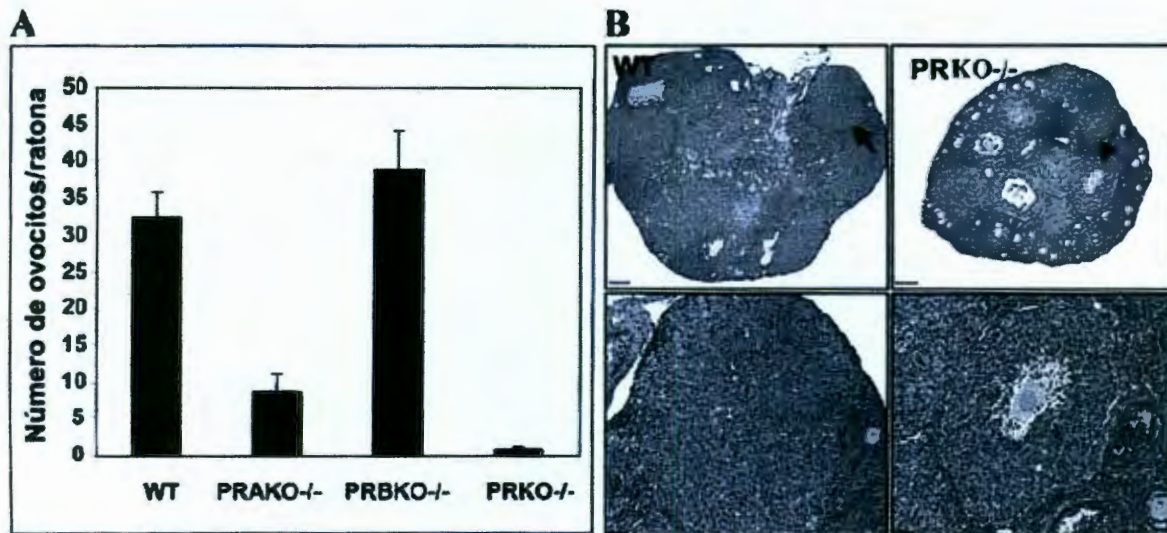


Figura 6. La ovulación depende críticamente de la función del PR. (A) Número promedio de ovocitos (\pm DE) liberados luego de la sobreexposición a gonadotropinas en ratonas silvestres (WT), en ratonas que no expresan específicamente la isoforma A o B del PR (PRAKO^{-/-} y PRBKO^{-/-} respectivamente) y en ratonas que no expresan ninguna de las dos isoformas (PRKO^{-/-}). (B) Muestras de tejido de ovarios teñidas con hematoxilina y eosina obtenidas de ratonas WT y PRKO^{-/-} luego de ser tratadas con concentraciones superovulatorias de gonadotropinas. Barras de escala: paneles superiores 200 μ m, paneles inferiores 50 μ m (modificado de Conneely y col., 2002).

ADAMTS-1 es esencial en la ovulación (Shindo y col., 2000), lo que sugiere que esta proteína es un regulador crítico de la ovulación inducida por progesterona. Estudios realizados en células de la granulosa de rata sugieren que el incremento inducido por progesterona en los niveles de relaxina, hormona peptídica secretada por el cuerpo lúteo, facilita la ruptura folicular mediante el incremento de los niveles de expresión del: activador tisular del plasminógeno (tPA), la colagenasa, la

proteoglicanasa y la β -glucuronidasa. Esto es apoyado por reportes en ratas donde un tratamiento con epostano, que inhibe la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, reduce los niveles de progesterona y consecuentemente disminuyen los niveles de las enzimas que degradan la matriz extracelular (Tanaka y col., 1992).

II.3.1.4 Desarrollo uterino.

En el útero y a través de todo el tracto reproductivo femenino, grupos especializados de células son sometidos a continuos eventos sincronizados de proliferación y diferenciación en respuesta a los altibajos cíclicos en los niveles de estrógenos y progesterona (Lydon y col., 1995). Se sabe que en respuesta a señales de decidualización, estrógenos y progesterona promueven cambios morfológicos en el crecimiento y diferenciación de los estratos celulares epitelial y del estroma en el compartimiento endometrial (Clarke y Shuterland, 1990). El PR se expresa en el compartimento epitelial, estromal y miometrial del útero, y dicha expresión es inducida por estrógenos (Tibbets y col., 1998). El estímulo primario de proliferación del compartimento epitelial son los estrógenos (Conneely y Lydon, 2000, Figura 7), mientras que la progesterona, mediante los PR del estroma (Kurita y col., 1998), inhibe la hiperplasia del tejido epitelial glandular y luminal producida por estrógenos.

En contraste, la progesterona ejerce un efecto proliferativo y de diferenciación sobre el compartimento estromal (Conneely y col., 2000). La proliferación de estas células y su diferenciación a células deciduales requiere de la estimulación de estrógenos y progestinas. La especificidad de los efectos proliferativos de la progesterona en el tejido uterino pudieran deberse a la regulación de la expresión de receptores para factores de crecimiento y de sus ligandos peptídicos, eventos que ocurren de manera particular en ciertos tipos celulares (Graham y Clarke, 1997). El factor de crecimiento tipo EGF de unión a heparina (HBEGF-likeGF) es inducido por progesterona específicamente en las células del estroma, en donde actúa como mitógeno; en contraste, el tratamiento con progestinas suprime la expresión de este factor de crecimiento en el epitelio luminal y glandular (Graham y Clarke, 1997). De la misma manera, la progesterona induce la expresión de

prolactina y TGF- β en células estromales e inhibe la producción de enzimas que degradan la matriz extracelular (matrilisinas) y prolactina por parte del epitelio uterino.

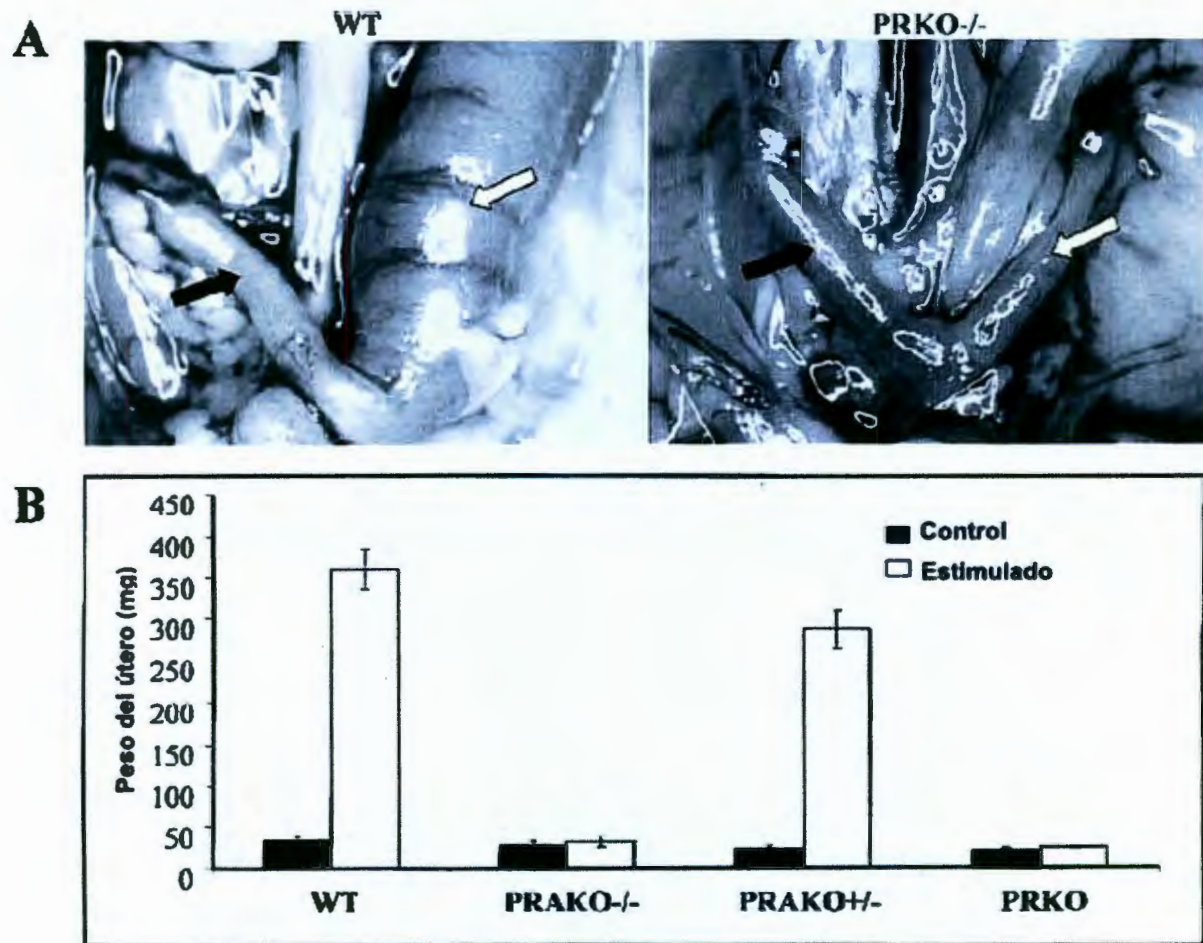


Figura 7. El útero de una ratona PRKO es incapaz de realizar la decidualización. (A) Respuestas del útero de ratonas WT y ratonas PRKO^{-/-} ante una estimulación mecánica capaz de inducir la decidualización (proliferación de las células del estroma y su diferenciación en células deciduales). Las flechas negras indican el cuerno uterino no estimulado mientras que las flechas blancas denotan el cuerno uterino luego de la estimulación. Es evidente la diferencia en el tamaño del cuerno uterino entre ambos genotipos. (B) Peso del útero (mg) luego de la decidualización (modificado de Conneely y col., 2002).

La estimulación estrogénica induce la proliferación celular en el endometrio a través de vías de señalización activadas por factores de crecimiento, incluyendo el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I); los efectos producidos por IGF están controlados por la progesterona, mediante la regulación de la proteína I de unión a IGF (IGFBP-I); dicha proteína podría estar actuando de manera paracrina en la inhibición de la proliferación de células epiteliales, debido a que las progestinas aumentan la secreción de IGFBP-I a partir de células del estroma en el endometrio. Se ha postulado que la unión de IGFBP-I a IGF evita la interacción del factor de crecimiento con su receptor cognado, lo que provoca una menor responsividad a IGF (Giudice y col., 1991; Bell y col., 1991; Pekonen y col., 1992; Westley y May, 1994). La progesterona podría estar controlando la proliferación de las células del estroma por un mecanismo autocrino con IGFBP-I. La trombospondina 1, glicoproteína de la matriz extracelular que inhibe la angiogénesis, es producida por las células del estroma ante el tratamiento con progesterona, lo que sugiere que esta glicoproteína regula la formación vascular y la diferenciación en el compartimento estromal (Graham y Clarke, 1997).

Las ratonas PRKO ovariectomizadas presentan amplias anomalías morfológicas en el útero y el tracto reproductivo bajo al someterse a un tratamiento crónico de estradiol y progesterona, está característica se relaciona con experimentos en ratonas WT ovariectomizadas tratadas con estrógenos durante periodos prolongados en ausencia de progesterona (Quarmby y Koarch, 1984). La carencia del PR resulta en una hiperplasia del compartimento epitelial debido a la falta de oposición contra la actividad de los estrógenos (Lydon y col., 1995). En contraste, el compartimento estromal presenta baja proliferación debido a la incapacidad para responder a las señales mitogénicas (Conneely y Lydon, 2000). Mientras el estradiol es un fuerte agente proinflamatorio en el útero, la progesterona ejerce un fuerte efecto antiinflamatorio mediado por PR. La disrupción del PR resulta en la alteración de la arquitectura uterina acompañada de una fuerte respuesta endémica con la infiltración de neutrófilos y macrófagos al compartimento estromal del útero (Conneely y Lydon, 2000). De acuerdo con estas

observaciones, se ha mostrado previamente que la progesterona regula la expresión de interleucina-8 (IL-8), citocina quimiotáctica para neutrófilos y linfocitos, en cultivo de fibroblastos uterinos. Probablemente, el efecto antiinflamatorio del PR en el útero es importante en la facilitación de la implantación del embrión y la protección contra el rechazo inmune (Ito y col., 1994).

II.3.1.5 Implantación uterina.

La infertilidad de las ratonas PRKO también está asociada con una implantación uterina defectuosa y la ausencia de diferenciación decidual de las células del estroma en respuesta a la progesterona (Lydon y col., 1995). De acuerdo con estas observaciones, embriones derivados de ratonas WT fallaron en la implantación al ser transferidas al útero de hembras PRKO pseudopreñadas. La decidualización está vinculada con el incremento del peso uterino y la apariencia histológica característica asociada con la diferenciación de las células del estroma en células deciduales. Ambas respuestas están ausentes en las ratonas PRKO, a las cuales se les estimuló mecánicamente el cuerno izquierdo del útero (Conneely y col., 2002, Figura 7). Se ha demostrado que la progesterona induce la secreción de factores de crecimiento a partir del epitelio luminal y glandular en el endometrio de ratón, dichos factores promueven la proliferación de las células del trofotodermo del blastocito que expresan los receptores para EGF, facilitando la implantación (Das y col., 1994).

Durante la preñez temprana, el ARNm del receptor para EGF también es inducido por progesterona en el estroma del útero materno pero no en el epitelio glandular o luminal (Das y col., 1994). En los primeros dos días de preñez en ratón, el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I) es secretado a partir del epitelio glandular y luminal del útero bajo la estimulación con estrógenos, lo que contribuye a los efectos sobre el blastocito. Luego de este tiempo, la secreción a partir del epitelio disminuye e incrementa significativamente la síntesis y secreción de IGF-I a partir del estroma por la presencia de progesterona, lo que resulta en un aumento de la proliferación y en el alargamiento del útero (Kapur y col., 1992). Se ha postulado que el incremento en la expresión de los receptores para factores de crecimiento en las

células del estroma facilita los efectos del EGF, TGF α (Transforming Growth Factor α) y el HBEFG-like GF secretados a partir del epitelio y del IGF-I del estroma, lo que culmina en la estimulación de la proliferación de tejidos específicos.

En base a las evidencias que muestran la participación de diferentes proteínas y factores de crecimiento en la implantación, se demostró que las hembras PRKO presentan derogada la regulación de genes que responden a progesterona y que están asociados con la implantación, entre ellos calcitonina (CT), histidina descarboxilasa (HDC) y amfiregulina (AR) cuya expresión se incrementa en el epitelio uterino en respuesta a progesterona y está relacionada con la receptividad uterina (Das y col., 1995; Paria y col., 1998). La lactoferrina (LF), glicoproteína de secreción epitelial vinculada con la implantación, es inducida por estradiol e inhibida por progesterona. En el caso de las ratonas PRKO, LF se expresa aún en la presencia de progesterona (Conneely y col., 2002). Estos resultados resaltan la importancia dual del PR en el desarrollo del durante la decidualización y en la formación del fenotipo uterino que permite la implantación del huevo fecundado.

II.3.1.6 Desarrollo lóbulo-alveolar de las glándulas mamarias.

La progesterona y estrógenos son las principales hormonas esteroideas involucradas en el desarrollo normal de las glándulas mamarias así como en la tumorigénesis (revisado en Conneely y Lydon, 2000), evento que depende de la comunicación molecular recíproca entre los compartimentos estromal y epitelial (Cunha y Yom, 1996). Durante la preñez, se incrementan las ramificaciones, proliferación alveolar y la diferenciación de los lóbulos alveolares primordialmente por la estimulación con progesterona. Lydon mostró que la localización del PR está principalmente en el lumen del epitelio mamario; además, utilizando técnicas de trasplante de glándula mamaria, se ha demostrado que el epitelio mamario y no el estroma es el blanco primario para la progesterona durante la proliferación y diferenciación de la glándula mamaria (Lydon y col., 2000). Estudios en las ratonas PRKO han confirmado reportes previos de que el PR participa en la proliferación y diferenciación del epitelio mamario. La ablación del PR provoca la disminución del desarrollo asociado a la preñez y la ramificación dicotómica del epitelio ductal; la

ausencia de las gemas terminales; y una inhibición completa de la diferenciación lóbulo-alveolar en respuesta al tratamiento con estrógenos y progesterona (Conneely y Lydon, 2000, Figura 8).

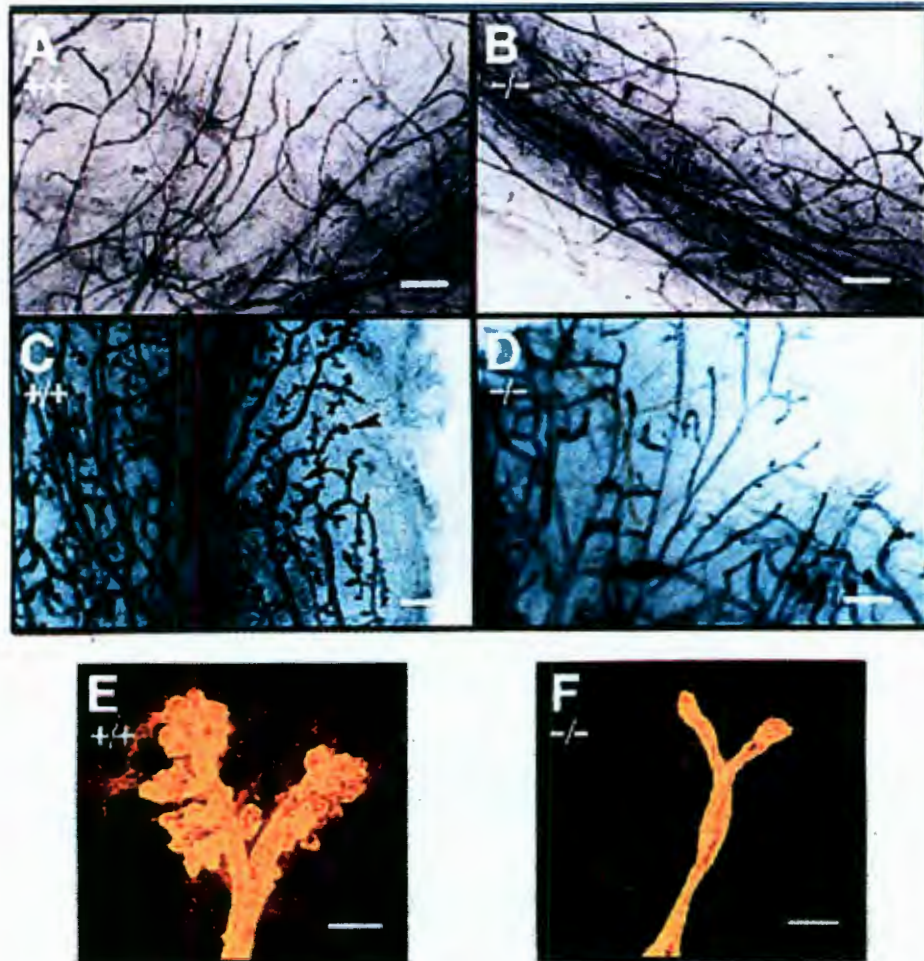


Figura 8. Apariencia morfológica de las glándulas mamaria de ratonas silvestres y PRKO, tratadas con progesterona o con vehículo. Tejido inguinal de las glándulas mamarias de ratonas WT (A) y PRKO (B) ovariectomizadas; tejido inguinal de las glándulas mamarias de ratonas WT (C) y PRKO (D) ovariectomizadas y tratadas con estradiol y progesterona. Barra de escala 500 μm . (D). Microscopía confocal del extremo terminal del ducto en las ratonas WT (E) y PRKO (F) que confirma la ausencia total de los botones ductales en las PRKO; barras de escala 20 μm (modificado de Lydon y col., 1995).

Aunque se desconocen los mecanismos moleculares por los que el PR influencia el epitelio mamario, el fenotipo de las ratonas PRKO es similar al de los ratones mutantes de factores STAT (Signal Transducer and Activators of Transcription) (Liu y col., 1997), ciclina D1, Receptor para prolactina, PRLR y del Receptor para el Factor de Crecimiento Epidermal, EGFR (revisado en Conneely y Lydon, 2000). Es probable que dichos factores converjan en las vías de señalización por las cuales provocan un efecto fisiológico. Estudios *in vitro* demuestran que la progesterona puede inducir la expresión de factores de crecimiento, incluyendo EGFR, STAT5a y STAT5b, y la proteína de regulación del ciclo celular ciclina D1 en células de cáncer de mama (Musgrove y col., 1993). Con respecto a ciclina D1, Said y colaboradores, demostraron que los efectos proliferativos del PR sobre el epitelio mamario están estrechamente relacionados con el incremento en los niveles de ciclina D1 inducido por el propio PR; ambas respuestas están ausentes en las ratonas PRKO (Said y col., 1997). Debido a que STAT5a es un importante transductor de las señales inducidas por prolactina (PRL), este factor de transcripción representaría un punto de convergencia entre progesterona y prolactina durante el desarrollo de las glándulas mamarias. La progesterona podría regular la proliferación de las células epiteliales a través de mecanismos paracrinos en donde los PR expresados en células que se encuentran en un estado quiescente pudieran inducir señales de proliferación que estimulan a las células vecinas. Brisken y colaboradores demostraron que la glicoproteína de secreción Wnt-4 se coexpresa en células inmunoreactivas a PR y que dicha expresión está regulada de manera indirecta por el receptor para progesterona. Wnt-4 es esencial para la regulación paracrina de la ramificación ductal, ya que promueve la proliferación de las células del epitelio ductal (revisado en Conneely y col., 2001).

II.4 Receptor para progesterona.

Los efectos de la progesterona, de acuerdo al mecanismo clásico, están mediados por receptores nucleares. El receptor proteico que se enlaza de manera específica a la progesterona fue caracterizado inicialmente en el útero de mamíferos y en el oviducto de pollo a principios de los 70's (Milgrom y col., 1970; Sherman y col.,

1970). O'Malley y sus colaboradores determinaron que el PR del oviducto de pollo era un dímero compuesto de dos proteínas receptoras, PR A y PR B, cada una de las cuales se enlazaba a la progesterona (Spelsberg y col., 1972). Las proteínas A y B del PR de humano fueron caracterizadas en células cancerosas de mama tanto in vitro (Lessey y col., 1983) como in vivo (Horwitz y Alexander, 1983). Éstas son detectadas con un peso molecular de 81 y 115 kDa, respectivamente. Las dos isoformas del PR son codificadas por un solo gen cuya expresión está bajo el control de dos promotores distintos, cada uno de los cuales da origen a un subgrupo de especies de ARN mensajero para el PR (Kastner y col., 1990).

II.4.1 Gen PGR y el receptor para progesterona.

El gen que codifica para el PR humano contiene ocho exones y se localiza sobre el cromosoma 11q22.1. Como se muestra en la figura 9, el PR se caracteriza por sus isoformas generadas por splicing alternativo (Kastner y col., 1990). Las dos isoformas principales del PR son PR-B y PR-A, las cuales se expresan de un solo gen como resultado de la transcripción de dos promotores alternativos y del inicio de traducción en dos codones AUG diferentes (Conneely y col., 2001). En el mismo contexto, una tercera isoforma, PR-C, también ha sido descrita (Condon y col., 2006). Los exones 1 y 2 pueden considerarse como exones para splicing alternativo y/o para una traducción alternativa dado que todo el exón 1 y la mayor parte del exón 2 están seccionados de la isoforma PR-C y parte del exón 1 está escindido de la isoforma PR-A. Los exones restantes se conservan luego del proceso de splicing dado que están incluidos en todas las isoformas principales (Chen y col., 2008).

Las isoformas principales varían en la longitud pero no en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo no cambia el marco de lectura abierta). La isoforma B consta de 933 aminoácidos mientras que la isoforma A carece de un segmento de 164 aminoácidos en la región amino terminal, esto determina la capacidad transactivacional de cada isoforma. La arquitectura general de los dominios del PR se muestra en la figura 9C. Estructuralmente, ambas isoformas constan de una región amino terminal, un dominio de unión al ADN (DBD, por sus siglas en inglés)

localizado en la parte central de la proteína y un eje carboxilo terminal que incluye señales para translocación nuclear así como un dominio de unión a ligando (LBD, por sus siglas en inglés).

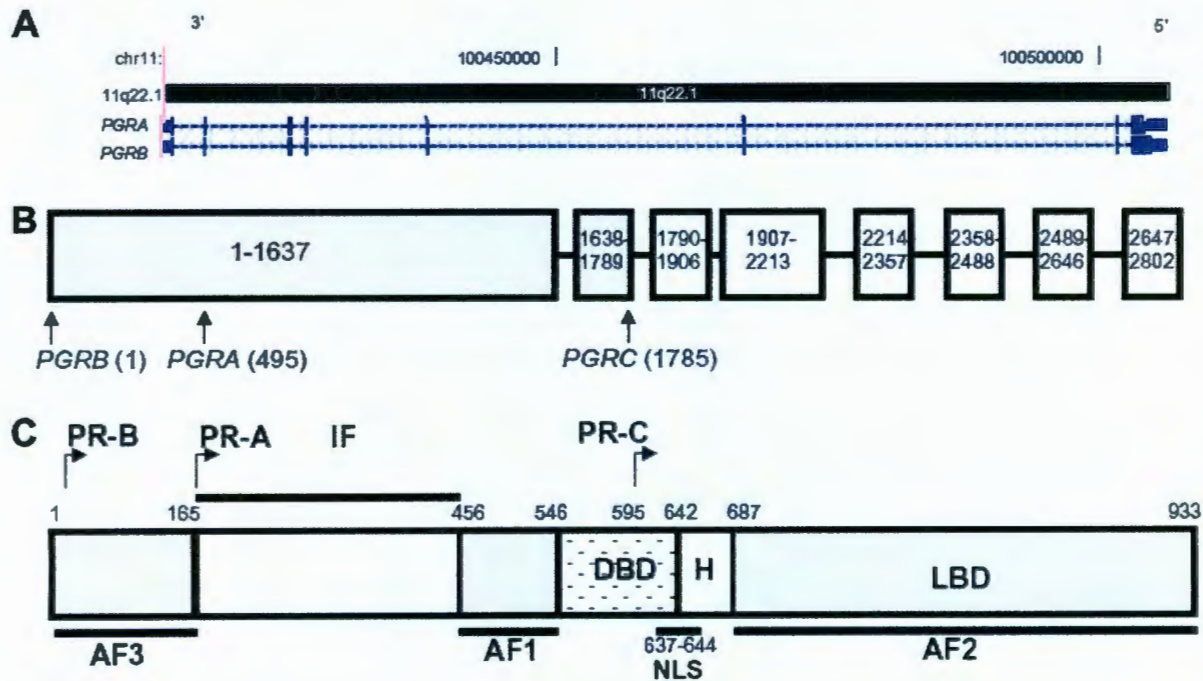


Figura 9. Estructura general del receptor para progesterona (PR). (A) Localización y orientación del PGR en el genoma humano. (B) Estructura del gen PGR. Los sitios de inicio de traducción para las isoformas del PR están indicados con flechas. (C) Ilustración esquemática de los dominios en el receptor para progesterona humano. Los números representan la posición de los aminoácidos que delinean el inicio y el final de cada dominio estructural. AF (función de activación), IF (región con función inhibitoria), DBD (dominio de unión al ADN), NLS (señales de translocación nuclear), H (región de unión), LBD (dominio de unión a ligando) (modificado de Chen y col., 2008).

La proteína también contiene tres dominios con función para la activación transcripcional (AF). El AF-1 está localizado río arriba del dominio DBD mientras que el AF-2 se encuentra en el dominio LBD (Hirata y col., 2003). El otro dominio

para la activación transcripcional (AF-3) es único para la isoforma PR-B y se localiza en la región N-terminal (Meyer y col., 1992; Sartorius y col., 1994). Además, el PR contiene también una región con función inhibitoria denominada IF, por sus siglas en inglés, localizada entre los dominios AF-3 y AF-1; se ha propuesto que ésta es responsable de la autoinhibición y la transrepresión del PR (Abdel-Hafis y col., 2002). La función de la isoforma PR-C es desconocida aún (Hirata y col., 2000; Yamanaka y col., 2002). Dicha isoforma es traducida a partir de un sitio de inicio de traducción dentro del marco de lectura abierto, Met⁵⁹⁵, presente en la sección final del segundo exón de PGR. Dado que el PR-C carece del DBD, diferentes autores han demostrado que dicha isoforma es incapaz de actuar como un factor de transcripción, aún formando un heterodímero con el PR-B (Wei y col., 1997).

II.4.2 Funcionamiento del receptor para progesterona.

En tanto que el receptor para progesterona existe como dos isoformas, la expresión de dichas proteínas se conserva en numerosas especies de vertebrados incluyendo a los humanos y roedores (Bethea y Widmann, 1998; Lessey y col., 1983) y la proporción de las isoformas individuales varía en los tejidos reproductivos en función del estado del desarrollo y hormonal (Mangal y col., 1997; Shyamala y col., 1990) así como de la carcinogénesis (Graham y col., 1996).

Ambas proteínas, PR-A y PR-B, son factores de transcripción activados por ligando. La unión de la progesterona a cualquiera de los PR induce cambios conformacionales en la proteína (Allan y col., 1992) que resultan en la dimerización de complejos receptor-ligando (Guiochon-Mantel y col., 1989), en el aumento en la fosforilación del receptor (Weigel, 1994) y en la unión de los dímeros proteínicos a secuencias específicas de DNA de respuesta a hormonas, localizadas en las regiones promotoras de los genes blanco (Tsai y O'Malley, 1994). Entonces, los complejos proteínicos activados reclutan coactivadores específicos y factores generales de transcripción formando multímeros de iniciación de la transcripción funcionales sobre la región promotora del gen (Kamei y col., 1996). La respuesta a la progesterona se manifiesta como una alteración del fenotipo celular debido a la regulación de la expresión de genes específicos dependiente del PR. Actualmente

se han definido las características estructurales generales necesarias para que el receptor para progesterona lleve a cabo su actividad fisiológica. La región amino terminal esta conservada pobremente entre las especies y contiene dominios de función transactivacional (AF-1 y AF-3) que regulan el nivel de transcripción génica y la especificidad por el promotor (Meyer y col., 1992; Sartorius y col., 1994; Tora y col., 1988). El dominio de unión al ADN está altamente conservado y se localiza en la parte central de la proteína conteniendo aminoácidos que contribuyen tanto para la dimerización del receptor así como para la especificidad de la unión al ADN (Freedman, 1992., Luisi y col., 1991). Río abajo del dominio de unión al ADN yace una pequeña región hipervariable que contiene señales de translocalización nuclear y un dominio adicional de transactivación (AF-2) (Hollenberg y Evans, 1988., Picard y Yamamoto, 1987). El dominio de unión a ligando (LBD, por sus siglas en inglés) se localiza río abajo de esta región y presenta una actividad completa. Además de su capacidad para interactuar con la progesterona, contiene secuencias importantes para que el receptor inactivo pueda interactuar con proteínas "heat shock" celulares así como residuos necesarios para la dimerización del receptor, la actividad transactivacional y el silenciamiento inter e intramolecular (Fawell y col., 1990; Pratt y col., 1988; Vegeto y col., 1992).

Las isoformas PR-A y PR-B difieren solamente por que el PR-B presenta un segmento adicional de 164 aminoácidos localizado en la región amino terminal del receptor. Se ha demostrado que esta región codifica un dominio de función de transactivación específico de la isoforma B (Sartorius y col., 1994; Wen y col., 1994) y permite especificar aquellos genes que serán activados por la isoforma B pero no por la isoforma A (McDonnell, 1995). Por lo tanto, ambas proteínas A y B del receptor para progesterona son capaces de interactuar con la progesterona, dimerizarse y unirse a los elementos de respuesta a progesterona, y reclutar la maquinaria de transcripción para regular la expresión génica. Cuando se expresan en las células en proporciones equimolares, las isoformas A y B pueden dimerizarse y unirse al ADN como tres especies: homodímeros A:A o B:B o en heterodímeros A:B. La contribución específica de cada una de estas especies en la

mediación de los efectos de la progesterona dependerá de las propiedades diferenciales de transactivación proporcionadas por el dominio específico de la isoforma B.

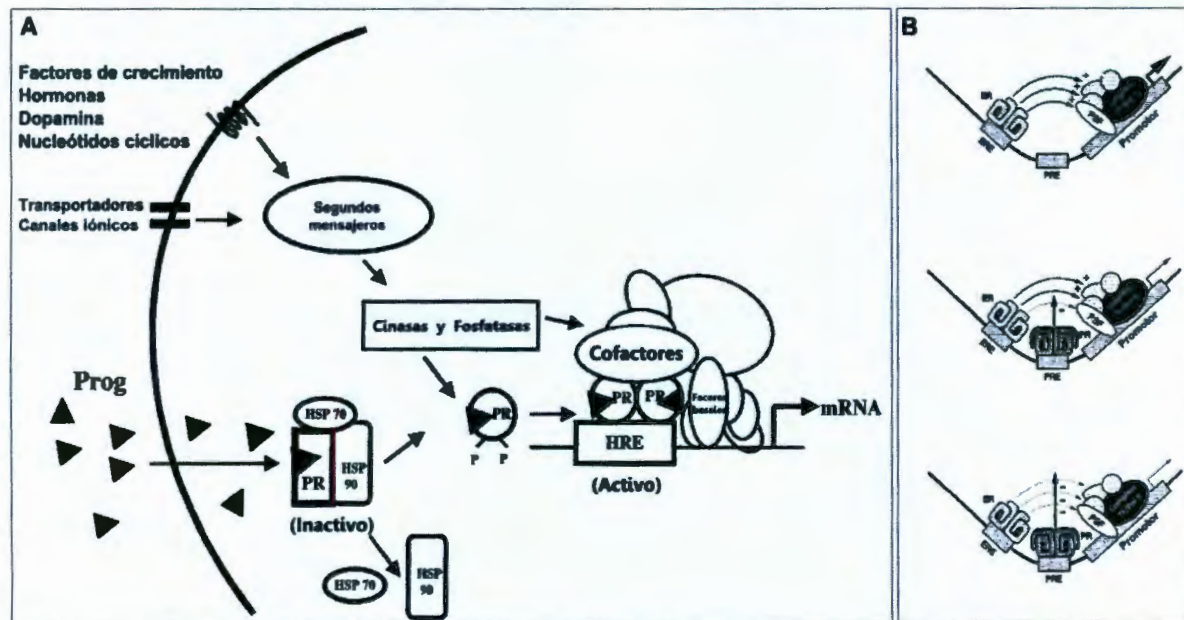


Figura 10. Mecanismo de acción del PR. (A) La progesterona se une de manera específica a proteínas receptoras en el citoplasma denominadas receptores para progesterona. El complejo hormona-receptor se transloca al núcleo en donde puede regular la transcripción de genes específicos. PR (receptor para progesterona), HRE (elementos de respuesta a hormonas), HSP (proteínas de choque térmico). (B) Se ha establecido que la isoforma PR-A puede afectar la capacidad transcripcional de otros miembros de la familia de receptores nucleares, incluido el receptor para estrógenos (ER). Uno de los mecanismos propuestos es la interferencia estérica, mediante el cual el PR bloquea la interacción entre el ER y la maquinaria basal de transcripción.

Existe evidencia que demuestra que el PR-A y el PR-B son funcionalmente diferentes. Primero, cuando se expresan de manera individual en un cultivo celular, PR-A y PR-B manifiestan diferentes propiedades transactivacionales específicas

del tipo celular y del promotor sobre el que actúan (Kastner y col., 1990; Hovland y col., 1998). Se ha demostrado que el PR-B funciona como un potente activador de la transcripción de varios genes responsivos a la progesterona en una variedad de líneas celulares en la cuales el PR-A está inactivo. Estos hallazgos sugieren que el PR-A y el PR-B regulan la expresión de diferentes genes blanco en respuesta al estímulo con progesterona y cada proteína presenta capacidades diferentes de transactivación de manera tejido-específico. Segundo, cuando las isoformas A y B se coexpresan en un cultivo celular, en el contexto en que el PR-A está activado por un agonista y no tiene la capacidad de interactuar con ninguna región promotora, dicha proteína actúa como un represor dominante de la actividad del PR-B (Kraus y col., 1995). El carácter represor del PR-A, que parece ser selectivo sólo para esta isoforma, no solo se extiende para PR-B sino para otros receptores para hormonas esteroideas. Se ha demostrado que la isoforma A inhibe la actividad transcripcional de los receptores para estrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides presumiblemente mediante el reclutamiento competitivo de coactivadores comunes (McDonnell y col., 1994). Tercero, el PR-A y el PR-B responden de manera diferente a los antagonistas. Mientras que el PR-A unido a un antagonista se mantiene inactivo, la isoforma B unida a un antagonista se convierte en un potente activador de vías de señalización tipo MAPK en las células que expresan el PR-B (Beck y col., 1993). Finalmente, se ha observado que cuando ambas isoformas están unidas a un antagonista pueden reprimir la actividad del receptor para estrógenos (Kraus y col., 1997).

II.4.3 Distribución anatómica del receptor para progesterona.

La expresión del PR ha sido descrita en tejidos que se sabe responden a progesterona tales como el útero (García y col., 1988; Press y Greene, 1988; Press y col., 1988) y el ovario (Duffy y Stouffer, 1995; Park-Sarge y col., 1995), en la bolsa de Fabricio y oviducto de pollo (Spelsberg y col., 1972; Ylikomi y col., 1985). También se ha descrito su presencia en otros tejidos reproductivos tales como testículos (Turner, 1977) y tejido vaginal (Batra and Iosif, 1985). Por otro lado, estudios de RT-PCR, hibridación in situ y western blot han demostrado que las

isoformas A y B del PR se expresan de manera constitutiva en las regiones que componen al SPV así como en la hipófisis (Guerra-Araiza y col., 2000, Figura 11) y también que la actividad de estas proteínas en regiones como el APM y el HVM es necesaria para la expresión de la conducta sexual femenina en los roedores (Mani, 2008). Estas áreas están asociadas con la producción y liberación de factores liberadores de hormonas sexuales (Kato y col., 1978; MacLusky y col., 1980; MacLusky y McEwen, 1980).

Isoformas A y B del PR en el cerebro de rata

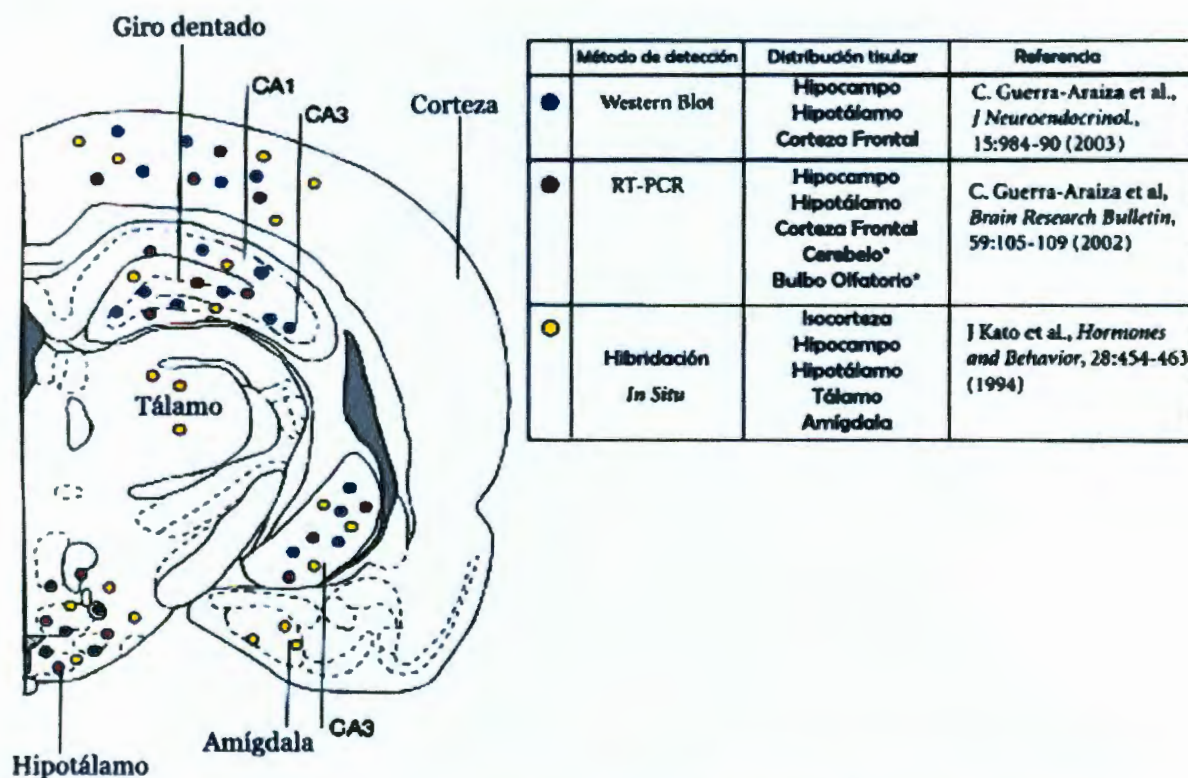


Figura 11. Distribución de las isoformas A y B del PR en el cerebro de la rata. Aunque la expresión del PR ha sido descrita en tejidos que se sabe responden a progesterona tales como el útero y el ovario, las isoformas clásicas del receptor para progesterona han sido localizadas en regiones a través de todo el cerebro mediante estudios de RT-PCR, hibridación in situ y western blot (modificado de Brinton y col., 2008).

II.5 Ratones knockout del receptor para progesterona (PRKO).

Como ya se mencionó, los efectos fisiológicos de la progesterona están mediados por la interacción de la hormona con los PR intracelulares. El PR existe como dos proteínas isofórmicas, llamadas A y B. Se ha demostrado que el PR es absolutamente esencial para la reproducción femenina asociada a progesterona mediante el desarrollo del ratón con mutación nula en que se corta la expresión del gen de PR (Conneely y Lydon, 2000). Como se ha mencionado, las ratonas presentan anormalidades reproductivas pleiotrópicas que demuestran la importancia del PR como coordinador de todos los eventos reproductivos que en conjunto culminan en la preparación y mantenimiento de la preñez.

II.5.1 Diseño del vector RV7.

El fragmento de ADN del gen del PR de ratón (mPR) que comprendía el vector de alteración genética RV7 se aisló de la librería genómica de ratón 129Sv λ Dash II. Dicho fragmento de ADN incluía los dos primeros exones del gen mPR y el primer intrón así como una parte del segundo intrón. La secuencia restante en la posición 5' del exón 1 correspondía a la sección UTR del gen mPR. El exón 1 codifica el dominio amino-terminal no conservado del receptor, conteniendo los dos codones diferentes de inicio de traducción ATG_B y ATG_A (Conneely y col., 1987). El exón 2 codifica el primer dedo de zinc del dominio conservado de unión a ADN en el receptor (Huckaby y col., 1987). El gen neo^r PGKNEObpA se insertó en el único sitio de restricción de XhoI dentro del exón 1 localizado a 225 y 721bp río-abajo de los codones de iniciación ATG_A y ATG_B, respectivamente, en el gen mPR. Se eligió este sitio para introducir el gen neo^r porque de esta manera se podría dividir efectivamente el exón 1, terminando de manera prematura los transcritos iniciados a partir de los codones ATG_A y ATG_B (Figura 12). El gen de la timidina cinasa del virus herpes simple, HSV-TK (Mansour y col., 1988), fue ligado en la posición 5' del exón 1 y colocado con una orientación transcripcional opuesta al gen neo^r y mPR. Finalmente, el RV7 se linealizó en el extremo 3' del brazo largo de homología por la enzima de restricción Asp718 introducida en el sitio NcoI del vector (Lydon y col., 1995).

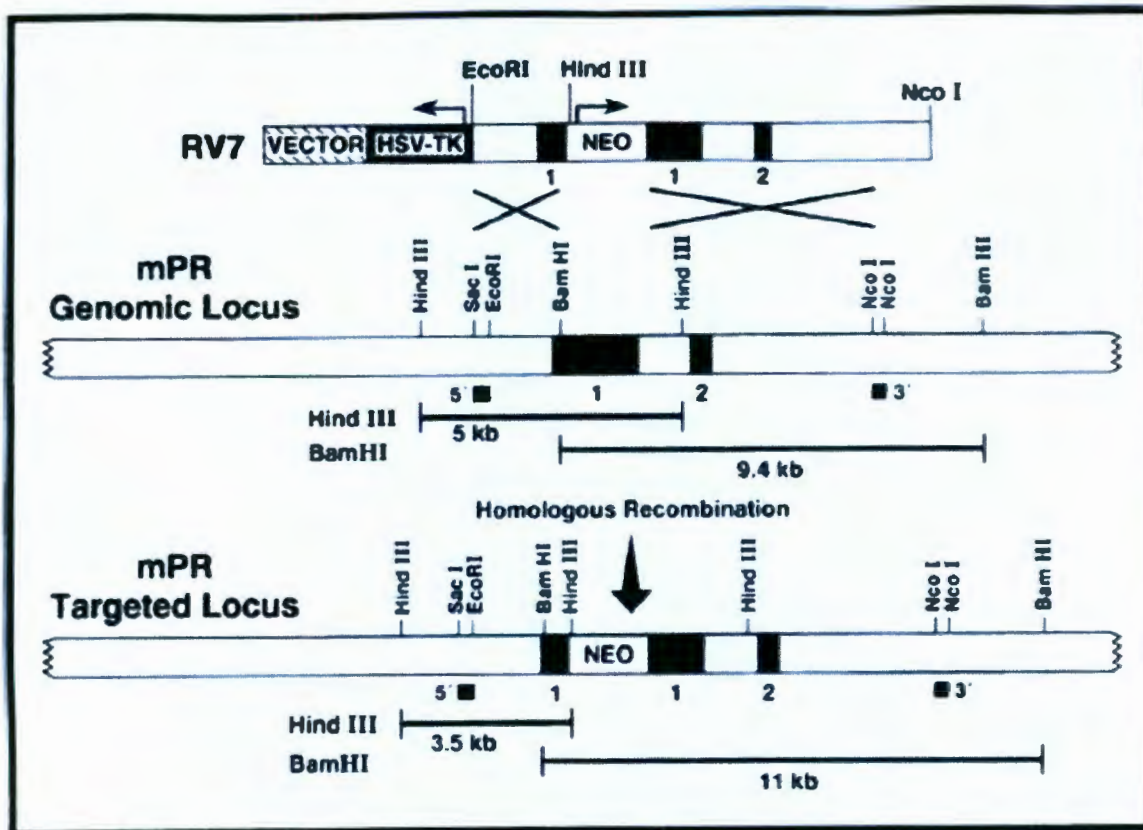


Figura 12. Desorganización dirigida del gen mPR mediante la inserción del gen neo^r (modificado de Lydon y col., 1995).

II.5.2 Desorganización dirigida del gen mPR y generación del ratón PRKO.

Para tener una visión más amplia en cuanto a la función fisiológica del PR y diferenciar entre las respuestas mediadas por PR y/o el Receptor para Estrógenos (ER), se generó un modelo de ratón con una mutación nula del gen del PR utilizando recombinación homóloga en células troncales (ES) de ratón (AB-1) (Lydon y col., 1995). El vector para la alteración genética, RV7, se diseñó para introducir el gen de resistencia a neomicina (neor) dentro del exón 1 del gen mPR, río-abajo de los codones de iniciación ATGA y ATGB que codifican las isoformas A y B del PR (Figura 12). Se eligió dicho sitio de inserción para alterar efectivamente la transcripción de ambas isoformas del PR. Para generar los ratones quimera, las células ES que presentaban la mutación del gen mPR fueron microinyectadas en blastocitos de ratones C57BL/6 de 3.5 días, los cuales se transfirieron

subsecuentemente a hembras nodrizas C57BL/6 pseudopreñadas. Dos machos quimera heredaron la mutación del PR a la siguiente generación. Los ratones heterocigotos (PRKO+/-) se cruzaron entre sí para obtener ratones homocigotos (PRKO-/-) de la disrupción dirigida del mPR. Aunque la expresión del PR se ha detectado en la etapa de blastocito del desarrollo embrionario (Hou y Gorski, 1993), la cópula entre heterocigotos generaron embriones homocigotos PRKO con una frecuencia Mendeliana normal sin desviaciones en la proporción de género, en donde el 25% de los animales presentaron un genotipo silvestre (wild type, WT), un 50% heterocigoto (HT) y un 25% homocigoto (PRKO). Esto indica que el PR expresado durante la etapa embrionaria no es necesario para la sobrevivencia del embrión (Lydon y col., 1995).

II.5.3 Características fisiológicas de las ratonas PRKO.

Los ratones homocigotos de ambos sexos que llegan a la edad adulta aparentan un desarrollo saludable, con una diferenciación normal de los genitales externos. Estudios anatómicos generales no revelan diferencias obvias en la morfología de los órganos entre los animales PRKO y los WT. Sin embargo, las ratonas PRKO son infértiles en las cruzas con ratones WT (Lydon y col., 1995). Estudios histológicos del sistema reproductivo de las ratonas PRKO comparado con las hembras WT, mostraron diferencias morfológicas tras la estimulación con gonadotropinas exógenas (Lydon y col., 1995). Las ratonas PRKO no manifiestan conducta sexual y muestran alteraciones en la regulación neuroendocrina de gonadotropinas, presentan disfunción uterina, no ovulan, la involución tímica es lenta y el desarrollo de las ramificaciones ductales así como la diferenciación lóbulo-alveolar de las glándulas mamarias están dañados (revisado en Conneely y col., 2002).

III. HIPÓTESIS.

El sistema de proyección vomeronasal de las ratonas PRKO no se activará (evaluado por Fos) en respuesta a los estímulos quimiosensoriales sexualmente relevantes procedentes de ratones.

IV. OBJETIVOS.

IV.1 General.

Dilucidar el efecto de la activación del receptor para progesterona sobre el funcionamiento del Sistema de Proyección Vomeronasal (SPV) en ratonas.

IV.2 Específicos.

- Reproducir ratonas $PRKO^{-/-}$ homocigotos mediante la cruce de ratones $PRKO^{-/-}$ homocigotos y ratonas $PRKO^{+/-}$ heterocigotos.
- Genotipificar los animales procreados de la cruce entre ratones homocigotos y ratonas heterocigotos.
- Evaluar la expresión de la proteína Fos en las capas granular y mitral del bulbo olfatorio accesorio y en el área preóptica medial de ratonas C57BL/6 tratadas con estradiol y progesterona o vehículo.
- Evaluar la expresión de la proteína Fos en el SPV de ratonas $PRKO^{-/-}$ homocigotos y silvestres expuestas a señales quimiosensoriales sexualmente relevantes provenientes de machos sexualmente expertos.

V. METODOLOGÍA.

V.1 Animales

Se utilizaron ratonas de la cepa C57BL/6, silvestres y PRKO^{-/-} homocigotos. Las ratonas silvestres y PRKO^{-/-} homocigotos se obtuvieron mediante la cruce de ratones PRKO^{+/-} homocigotos y ratonas PRKO^{+/-} heterocigotos. Los animales fueron genotipificados diferencialmente, clasificados y alojados por genotipo en condiciones de alimento/agua *ad libitum* y ciclo invertido de luz (12 h luz/oscuridad). Todos los sujetos fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla. Los animales se mantuvieron y se manipularon de acuerdo a las normas aprobadas por el comité de bioética del INB de la UNAM, las cuales están fundamentadas en las normas internacionales establecidas para el manejo y uso de animales de laboratorio (National Research Council, 2003).

V.2 Métodos.

V.2.1 Genotipificación.

Se obtuvo una pequeña muestra de tejido de la cola de las ratonas generadas por la cruce entre ratones PRKO^{+/-} homocigotos y ratonas PRKO^{+/-} heterocigotos. El tejido fue colocado en un tubo eppendorf y se agregaron 500 µL de una solución de NaOH 0.05 M. La mezcla se incubó a 95°C en una placa de calentamiento durante 15 minutos. Luego de la incubación, se agregaron 50 µL de EDTA 0.01 M en una solución de Tris-HCl 1 M a pH 8.0. El producto de la digestión alcalina se utilizó para la amplificación del gen mPR mediante PCR. Los oligonucleótidos utilizados fueron: 5'-TAG ACA GTG TCT TAG ACT CGT TGT TG-3' sentido, 5'-GAT GGG CAC ATG GAT GAA ATC-3' antisentido y N2 5'-GCATGC TCC AGA CTG CCT TGG GAA A-3' antisentido, que hibrida dentro del gen neo^r. El producto de la amplificación se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Las bandas producidas por el producto de PCR de 473 ó 700 pb corresponden al genotipo PRKO (PRKO^{-/-} homocigoto) o silvestre, respectivamente. El producto de PCR que genere ambas bandas representa el genotipo heterocigoto (PRKO^{+/-} heterocigoto) (Figura 13).

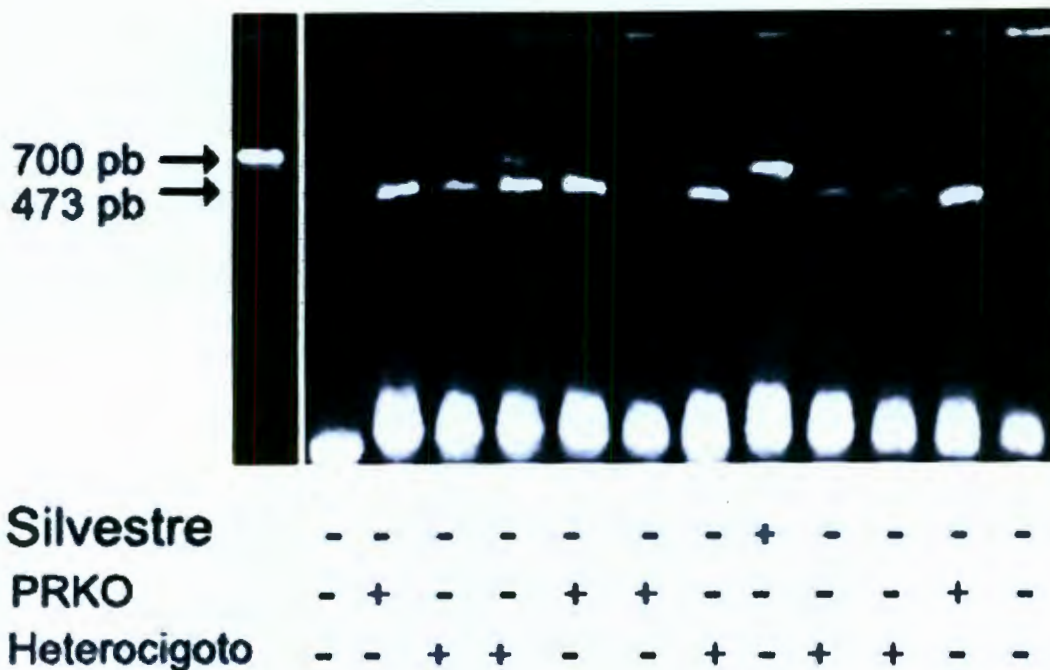


Figura 13. Productos de PCR visualizados en un gel de agarosa. Positivos para el genotipo silvestre (Silvestre +), PRKO (PRKO +) y heterocigoto (Heterocigoto +).

V.2.2 Experimento 1.

Se utilizaron 11 ratonas (3-4 meses de edad) de la cepa C57BL/6 para evaluar el efecto de la progesterona sobre la expresión de la proteína Fos. Las ratonas fueron ovariectomizadas y tratadas con benzoato de estradiol (25 µg/Kg) cada 24 horas por un periodo de tres días, para controlar la receptividad sexual de las ratonas. Una hora después de cada administración del estradiol, los sujetos experimentales fueron expuestos a ratones PRKO sexualmente expertos por un lapso de una hora, para que las ratonas adquirieran experiencia sexual. 48 horas después del último tratamiento con benzoato de estradiol, se administró progesterona (400 µg/Kg, n=5) o vehículo (25 µL de aceite de maíz, n=6) a las ratonas y se colocaron, de manera individual, en cajas con aserrín limpio por un periodo de 90 minutos (Domínguez-Salazar y col., 2004). La distribución de los tratamientos se muestra en el cuadro 1. Luego, los animales fueron sacrificados por decapitación, se les extrajo el cerebro y el tejido fue procesado por inmunohistoquímica para evaluar la expresión de la proteína Fos.

Cuadro 1. Régimen del tratamiento para la evaluación de la expresión de la proteína Fos en el sistema de proyección vomeronasal en ratonas de la cepa C57BL/6.

Ratón	Grupo	Aserrín	Tratamiento
1	Control	Limpio	Vehículo
2	Control	Limpio	Progesterona
3	E	Macho	Vehículo
4	E+P	Macho	Progesterona
5	Control	Limpio	Vehículo
6	Control	Limpio	Progesterona
7	E	Macho	Vehículo
8	E+P	Macho	Progesterona
9	E	Macho	Vehículo
10	E+P	Macho	Progesterona
11	E	Macho	Vehículo

V.2.3 Experimento 2.

Se utilizaron ratonas silvestres (n=12) y PRKO^{-/-} homocigotos (n=7) para determinar si la detección e integración de señales quimiosensoriales sexualmente relevantes requiere de la activación del receptor para progesterona. Las hembras fueron ovariectomizadas y tratadas con benzoato de estradiol (25 µg/Kg) cada 24 horas durante cuatro días. Una hora después de cada administración del estradiol, las ratonas fueron colocadas en cajas con ratones PRKO sexualmente expertos por un lapso de una hora, para que adquirieran experiencia sexual. 48 horas después del último tratamiento con benzoato de estradiol, se administró progesterona (400 µg/Kg) a todos los animales y se dividieron en 2 grupos. Las ratonas del grupo I fueron colocadas, de manera individual, en cajas que contenían aserrín limpio. Las hembras del grupo II se mantuvieron en cajas con aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos. Cada animal permaneció en su respectiva caja por un periodo de 90 minutos. Luego, los sujetos fueron sacrificados por

decapitación, se les extrajo el cerebro y el tejido fue procesado por inmunohistoquímica para evaluar la expresión de la proteína Fos.

V.2.4 Inmunohistoquímica.

Los cerebros fueron fijados con paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos (PB) 0.1 M y se mantuvieron en refrigeración en una solución de sacarosa al 30%. Cada cerebro, embebido en Tissue tec, fue rebanado en el plano coronal con un grosor de 35 μm , mediante un microtomo de congelación. Los cortes se utilizaron para ensayar la inmunoreactividad contra Fos (Fos-IR). El tejido se lavó con solución salina en amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1 M, posteriormente se le dio un tratamiento con soluciones de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 1% y borohidrato de sodio (NaBH_4) al 1% para eliminar la actividad peroxidasa endógena y exponer los epítopes del antígeno. Nuevamente se hizo un lavado con PBS 0.1 M y se incubó con albúmina bovina al 0.5% en PBS 0.1 M (A-9418, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) por 15 minutos, para bloquear los epítopes inespecíficos. A continuación, el tejido se lavó con PBS 0.1 M y se incubó con el anticuerpo primario contra Fos (sc-52 policlonales en conejo de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluido 1:5000, durante un mínimo de 16 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, los cortes se lavaron con Tritón X 100 al 0.02% en PBS 0.1 M y se incubaron con el anticuerpo secundario (IgG biotinizada en cabra anticonejo, Vector Laboratories, Burlingong, CA, USA) diluido 1:200, por dos horas. El tejido se lavó con PBS 0.1 M y se incubó con el complejo avidina-biotina (PK-6101, ABC kit, Vector Laboratories, Burlingong, CA, USA) por 90 minutos. En seguida se hizo un lavado con PBS 0.1 M y finalmente se realizó la reacción enzimática agregando DAB (Diaminobenzidina, SK-4100, peroxidase substrate kit, Vector Laboratories, Burlingong, CA, USA) utilizando Sulfato de Amonio Niquelado para intensificar el producto de reacción. Los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados dejándolos secar por tres días a temperatura ambiente. Por último se colocó una gota de permount sobre cada portaobjetos y se puso el cubreobjetos. Las laminillas fueron analizadas para cuantificar el número de células Fos-IR.

V.2.5 Cuantificación del número de neuronas inmunoreactivas a Fos.

El conteo de las células inmunoreactivas a Fos (Fos-IR) se realizó en las regiones que integran el sistema de proyección vomeronasal, incluyendo: bulbo olfatorio accesorio (BOA) mitral y granular, amígdala medial posterior (MEA pos) y anterior (MEA ant), área preoptica medial (APM) y el núcleo lecho de la estría terminal (BNST) principal y anterolateral. Se tomaron fotografías de cada región mediante una cámara (Evolution VF, Media Cybernetics, Inc.) acoplada a un microscopio Olympus BX60 (Olympus America, Inc.) ajustado previamente por iluminación de Kohler, las imágenes fueron analizadas utilizando el software Image-Pro 6.1 (Media Cybernetic, Inc.).

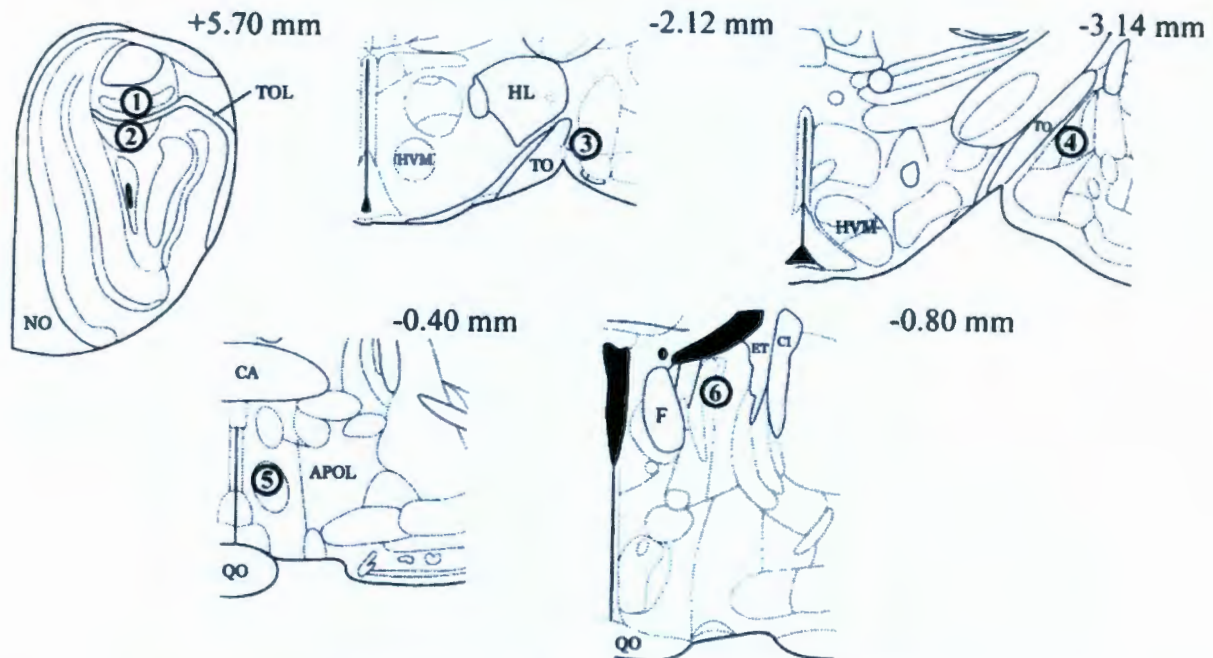


Figura 14. Diagrama esquemático de las regiones (círculos con número) en que se cuantificaron las Fos-IR. 1. Capa mitral del BOA, 2. Capa granular del BOA, 3. MEA anterodorsal, 4. MEA posterodorsal, 5. APM, 6. NLET. NO (nervio olfatorio), TOL (tracto olfatorio lateral), TO (tracto óptico), HL (hipotálamo lateral), HVM (hipotálamo ventromedial), CA (comisura anterior), QO (quiasma óptico), APOL (área preóptica lateral), F (fornix), CI (cápsula interna), ET (estria terminal) (tomado de Domínguez-Salazar, 2002).

V.2.6 Análisis estadístico

Dada la distribución normal de los datos obtenidos en el experimento 1, se realizó el análisis estadístico utilizando la prueba de t (t de Student) para comparar el tratamiento con vehículo y progesterona. Los datos del número de células inmunoreactivas a Fos del experimento 2 no siguieron una distribución normal por lo que fueron analizados con una prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba U de Mann-Whitney para comparar el genotipo y la exposición al aserrín.

VI. RESULTADOS.

La expresión de los genes tempranos inmediatos como c-Fos ha sido utilizada como un marcador de la actividad neuronal para delinear los circuitos neuronales involucrados en el procesamiento de las aferencias relacionadas con la conducta sexual (Erskine y col., 2004). Las regiones cerebrales en las que se cuantificó el número de células inmunoreactivas a Fos incluyen las estructuras que componen al sistema de proyección vomeronasal (SPV, Figura 14). En la figura 15 se muestran ejemplos de células inmunoreactivas a Fos en el área preóptica medial de ratonas silvestres y PRKO.

Área preóptica medial

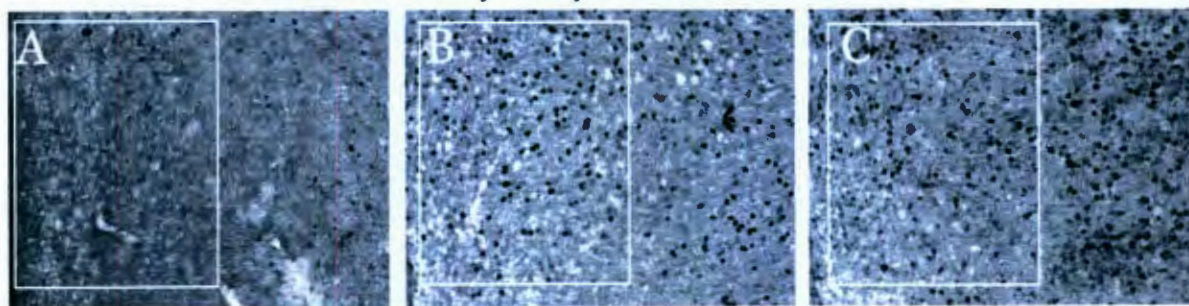


Figura 15. Microfotografía representativa que muestra las células inmunoreactivas a Fos en el área preóptica medial (marco blanco) de ratonas silvestres (A) expuestas a aserrín limpio y ratonas silvestres (B) y PRKO (C) expuestas a aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos.

Para determinar si la progesterona incrementa la actividad neuronal en las capas mitral y granular del BOA y en el APM, cuantificamos el número de células inmunoreactivas a Fos (Fos-IR) en esas regiones en ratonas C57BL/6 ovariectomizadas y tratadas con estradiol seguido de la administración de progesterona o aceite de maíz (vehículo). Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en el número promedio de células inmunopositivas a Fos en la capa mitral ($t=0.215$, $p=0.838$) y granular ($t=0.207$, $p=0.849$) del BOA ni en el APM ($t=0.210$, $p=0.841$) de las ratonas C57BL/6 tratadas con progesterona en comparación con las ratonas tratadas con aceite de maíz (vehículo) (Figura 16).

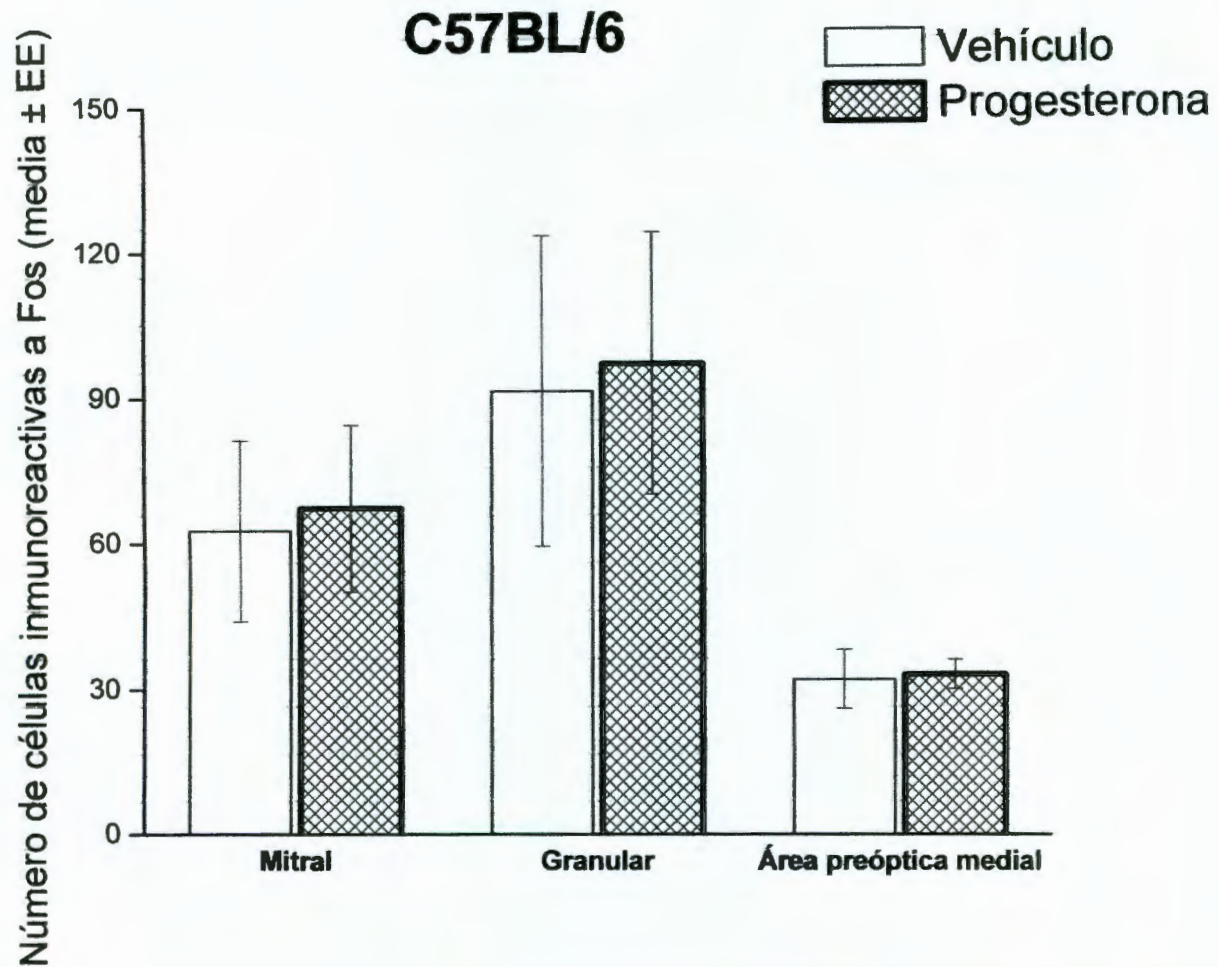


Figura 16. Número de células inmunoreactivas a Fos en la capa mitral y granular del bulbo olfatorio accesorio y en el área preóptica medial de ratonas C57BL/6 tratadas con vehículo (n=6) o con progesterona (n=5). Los datos se expresan como la media \pm error estándar (EE). Los datos fueron analizados mediante una prueba t de Student sin encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos.

Estudios realizados en ratas demuestran que tanto la cópula como la exposición a feromonas incrementan significativamente el número de células Fos-IR en las estructuras que integran al SPV, en ambos sexos (Flanagan-Cato y McEwen, 1995; Paredes y col., 1998; Wersinger y col., 1993). Así mismo, se ha sugerido que la detección e integración de las feromonas es importante para el despliegue de la conducta sexual femenina en los roedores (Kelliher y Wersinger, 2009). Para examinar si la exposición a feromonas provenientes de machos sexualmente expertos modifica la actividad neuronal en el SPV de las ratonas, evaluamos la expresión de la proteína Fos en los núcleos que integran dicho circuito en ratonas silvestres expuestas al aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos. La expresión de la proteína Fos (Figura 17 y 18) es significativamente mayor en todas las capas analizadas del SPV en las ratonas silvestres expuestas al aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos en comparación de las ratonas colocadas en una caja con aserrín limpio (cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de U de Mann-Whitney en ratonas silvestres y PRKO. Se compara el número de células positivas a Fos entre aserrín limpio y aserrín de machos sexualmente expertos.

Región	Silvestre	PRKO
BOA		
Mitral	U=0, p=0.0039	U=1.5, p=0.1675
Granular	U=1, p=0.0065	U=0, p=0.052
MEA		
Anterior	U=0, p=0.0037	U=0, p=0.0507
Posterior	U=1, p=0.0064	U=4.5, p=0.8451
APM	U=0, p=0.0039	U=1, p=0.1079
NLET		
Anterolateral	U=0, p=0.0039	U=4.5, p=0.8437
Principal	U=0, p=0.0037	U=3, p=0.4215

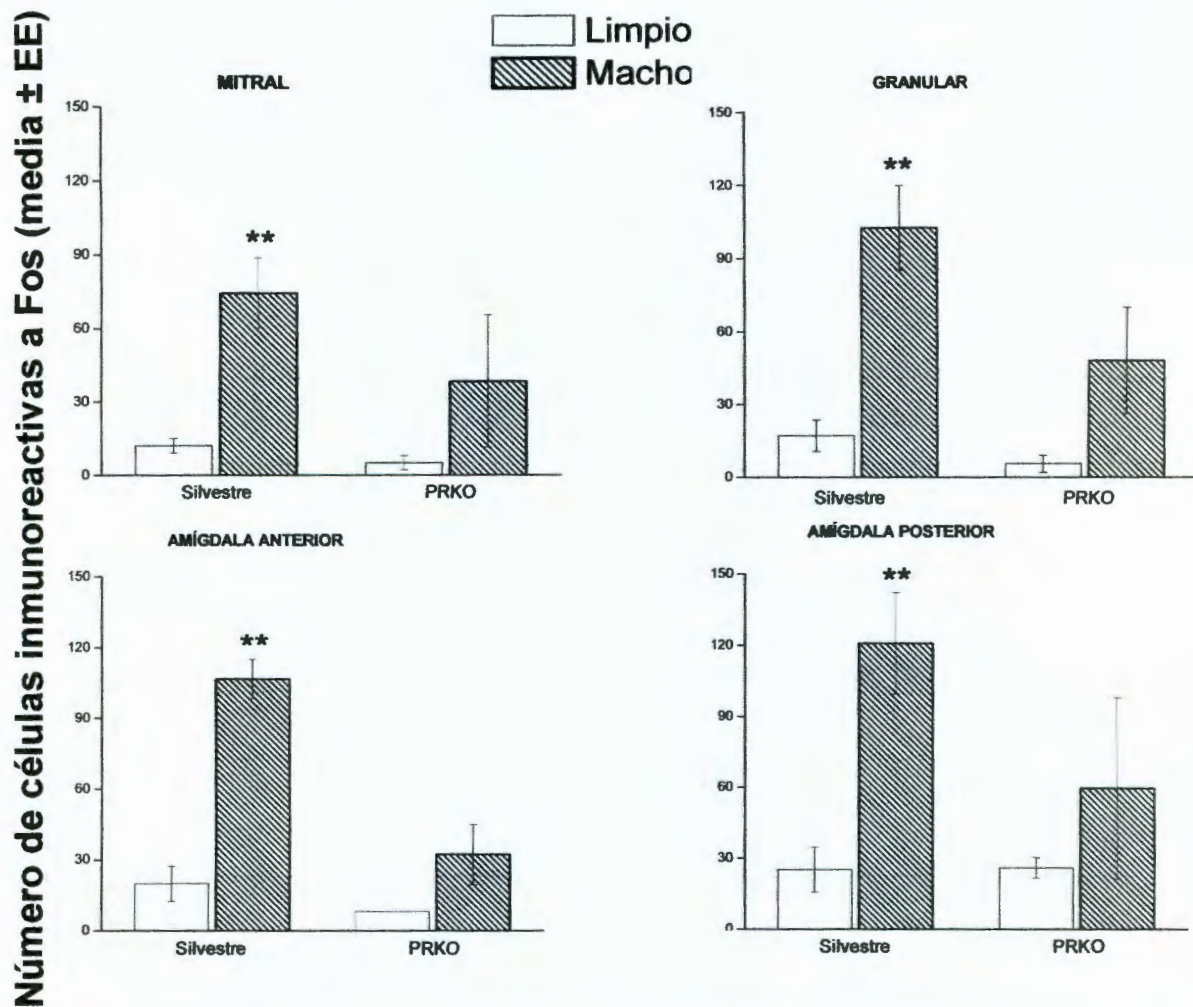


Figura 17. Número de células inmunoreactivas a Fos en las capas mitral y granular del bulbo olfatorio accesorio y en la amígdala anterior y posterior de ratonas silvestres y PRKO expuestas a aserrín limpio ($n_{\text{silvestres}}=6$ y $n_{\text{PRKO}}=2$) o aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos ($n_{\text{silvestres}}=6$ y $n_{\text{PRKO}}=5$). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (EE). Los datos fueron analizados con una prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba U de Mann-Whitney.

Diferente de limpio en el mismo genotipo. ** $p < 0.01$

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que las isoformas A y B del PR se expresan de manera constitutiva en las regiones que forman parte del SPV en roedores macho y hembra (Guerra-Araiza y col., 2002). También se ha descrito que la actividad de estas proteínas en regiones como el APM y el HVM es necesaria para la expresión de la conducta sexual femenina en los roedores (Mani, 2008).

Para determinar si la ausencia de estas proteínas afecta la respuesta neuronal en las estructuras que conforman el SPV ante la exposición a feromonas, utilizamos ratonas que no expresan ninguna de las dos isoformas del PR (PRKO). En contraste con las observaciones en las ratonas silvestres, no hay diferencias significativas en el número promedio de células inmunoreactivas a Fos (Figura 17 y 18) entre las ratonas PRKO expuestas al aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos comparadas con las ratonas colocadas en cajas con aserrín limpio. Los valores estadísticos de las comparaciones entre las ratonas PRKO expuestas al aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos y las ratonas colocadas en cajas con aserrín limpio se resumen en el cuadro 2.

Interesantemente, en la capa granular ($U=4$, $n_{(silvestres)}=6$, $n_{(PRKO)}=5$, $p=0.0446$) del BOA, en la MEA anterior ($U=0$, $n_{(silvestres)}=6$, $n_{(PRKO)}=5$, $p=0.0062$), en el APM ($U=2$, $n_{(silvestres)}=6$, $n_{(PRKO)}=5$, $p=0.0176$) y en la capa anterolateral ($U=0$, $n_{(silvestres)}=6$, $n_{(PRKO)}=5$, $p=0.0061$) del NLET de las ratonas silvestres comparadas con las ratonas PRKO, la expresión de la proteína Fos es significativamente mayor ante la exposición al aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos (Figura 19). Aún cuando no hay una significancia estadística en el número promedio de células inmunoreactivas a Fos en la capa mitral del BOA, en la MEA posterior ni en la capa principal del NLET, se observa un patrón descendente en las ratonas PRKO comparadas con las ratonas silvestres (Figura 19, estadística no publicada). Sin embargo, la variabilidad entre el número promedio de células inmunoreactivas a Fos presente en cada grupo de animales delimitan la tendencia existente entre las condiciones experimentales.

Número de células inmunoreactivas a Fos (media \pm EE)

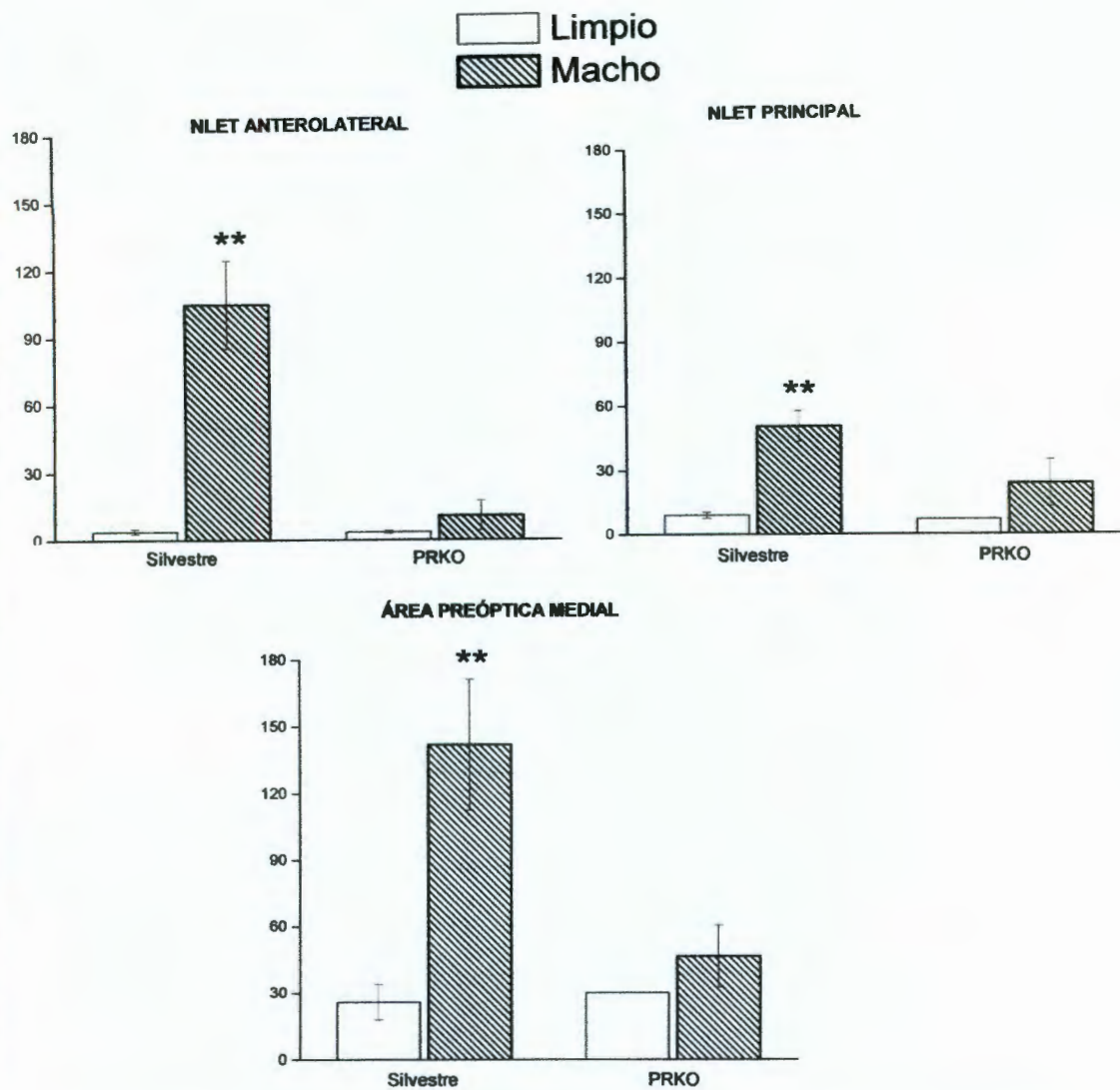


Figura 18. Número de células inmunoreactivas a Fos en las capas anterolateral y principal del núcleo lecho de la estría terminal y en el área preóptica medial de ratonas silvestres y PRKO expuestas a aserrín limpio ($n_{\text{silvestres}}=6$ y $n_{\text{PRKO}}=2$) o aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos ($n_{\text{silvestres}}=6$ y $n_{\text{PRKO}}=5$). Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (EE). Los datos fueron analizados con una prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba U de Mann-Whitney.

Diferente de limpio en el mismo genotipo. ** $p < 0.01$.

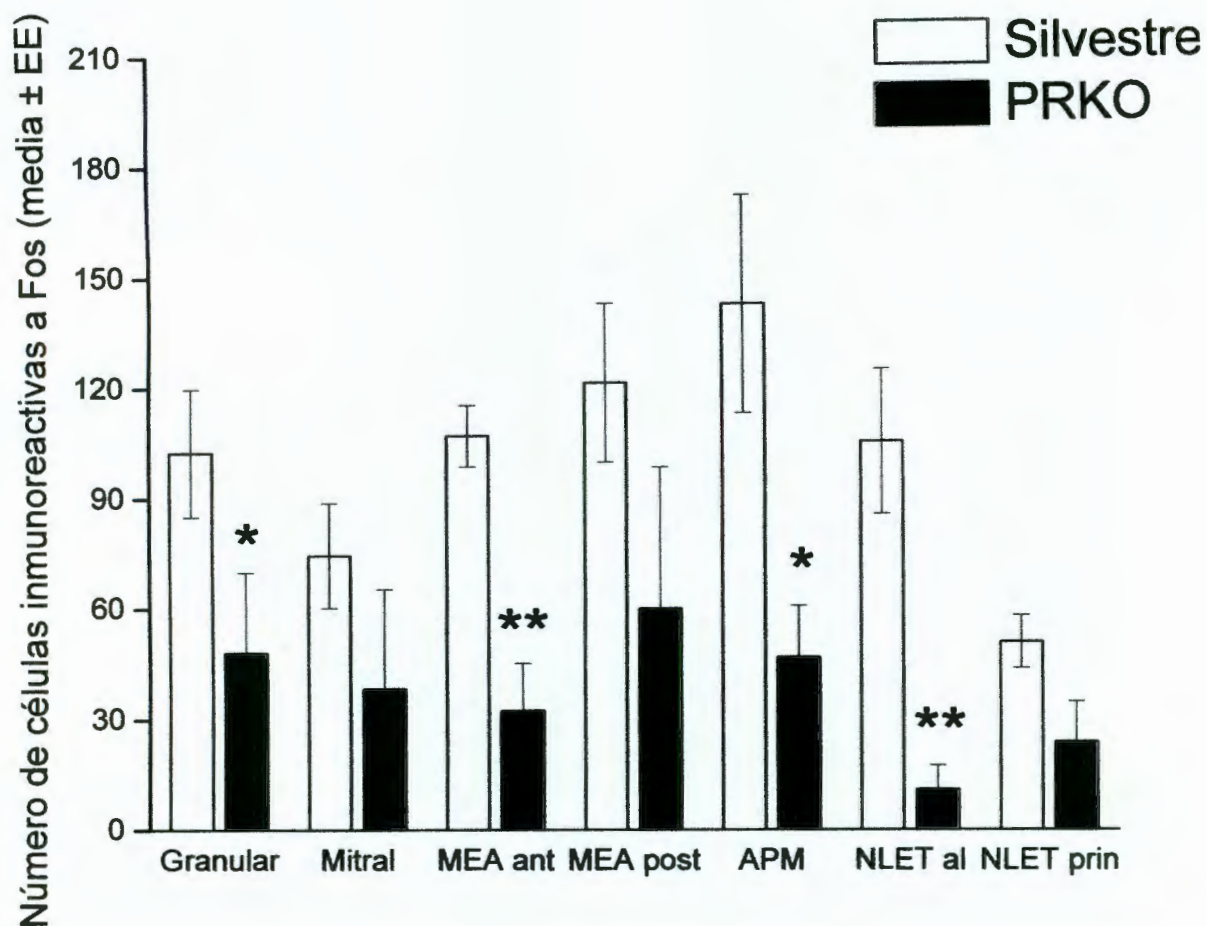


Figura 19. Número de células inmunoreactivas a Fos en las capas mitral y granular del bulbo olfatorio accesorio, en la amígdala anterior (MEA ant) y posterior (MEA post), en el área preóptica medial (APM) y en las capas anterolateral (NLET al) y principal (NLET prin) del núcleo lecho de la estría terminal de ratonas silvestres (n=6) y PRKO (n=5) expuestas al aserrín proveniente de la cama de machos sexualmente expertos. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (EE). Los datos fueron analizados con una prueba Kruskal-Wallis seguida de una prueba U de Mann-Whitney.

Diferente de las ratonas silvestres. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

VII. DISCUSIÓN.

VII.1 Experimento 1.

Las respuestas conductuales son una expresión de la interacción que ocurre dentro del sistema nervioso central. La conducta sexual, en la mayoría de los vertebrados, ocurre cuando las gónadas son estimuladas para producir hormonas esteroideas. Esto sugiere que los elementos neurales responsivos a hormonas interactúan con un estímulo hormonal específico que resulta en una conducta.

Nuestros hallazgos sugieren que el tratamiento con hormonas esteroideas, utilizando una dosis conductualmente efectiva, no cambia la actividad neuronal en las regiones que integran el SPV de las ratonas. En el experimento 1, la administración sistémica de benzoato de estradiol (BE, 25 µg/Kg) + progesterona (400 µg/Kg) no modificó el número de células que expresan Fos dentro de las capas mitral y granular del BOA ni del APM (Figura 16). Estos resultados están apoyados por otros reportes acerca del efecto de las hormonas esteroideas sobre la expresión de Fos en roedores hembra (Gibbs y col., 1990; Insel, 1990). Insel (1990) determinó que al inyectar una dosis alta de BE (100 µg/Kg) en ratas hembra, se incrementaba de manera significativa la expresión de la proteína Fos en la MEA, en el APM y en el núcleo hipotalámico ventromedial. Este cambio ocurría de 12-48 h después del tratamiento con BE. Sin embargo, no observó ningún cambio adicional al administrar la misma dosis de BE seguida de una dosis de progesterona (500 µg/Kg) 48 h después. En este caso, la inmunoreactividad contra Fos fue evaluada 4 h después del tratamiento con progesterona. Gibbs y colaboradores (1990) hallaron que la administración concurrente de 5 µg de estradiol en etanol/solución salina + 5 µg de benzoato de estradiol en aceite de maíz, en ratas hembra, no inducía ningún cambio en la expresión de la proteína Fos al evaluarla 24 h después. Además, observaron que no había un incremento evidente en el número de células inmunoreactivas a Fos en las ratas que recibieron estradiol seguido de una dosis de progesterona (1 mg) 24 h después. Los animales fueron perfundidos 4 h después de la administración de progesterona.

En contraste con nuestros datos, hay evidencias que sugieren que la progesterona induce un incremento en la expresión de Fos en algunas regiones del SPV en los roedores. Auger y Blaustein (1995) describieron que el tratamiento con BE (5 µg) seguido por una dosis de progesterona (500 µg), 48 h después, incrementa significativamente el número de células inmunoreactivas a Fos en la MEA, en el APM y en el hipotálamo dorsomedial lateral de ratas hembra. En ese experimento, los autores evaluaron la expresión de Fos 1 h después de administrar la progesterona. Se sabe que después del estímulo apropiado, el nivel máximo de la proteína Fos se observa de 1-3 horas, mientras que su concentración disminuye de 4-6 h después del tratamiento (Kovács y Sawchenko, 1996). En el presente estudio evaluamos la expresión de la proteína Fos 1.5 h después del tratamiento con progesterona y aún así no encontramos diferencias significativas.

VII.2 Experimento 2.

En muchas especies, los estímulos olfatorios son importantes para la modulación y expresión de la conducta sexual (Keverne, 1999). Las respuestas neuroendócrinas que resultan en la aceleración de la pubertad, el bloqueo de la preñez, la secreción de LH (hormona luteinizante), la preferencia sexual y la selección de la pareja sexual son estimuladas por componentes que se encuentran en las secreciones (feromonas) del individuo conespecífico del sexo opuesto (Kelliher, 2007). La inmunoreactividad contra Fos ha sido utilizada extensamente como un marcador de la actividad neuronal. Mediante esta técnica ha sido posible determinar las estructuras neuronales que integran las señales feromonales con señales hormonales internas para guiar una conducta apropiada. En diferentes especies de roedores, se ha descrito que las regiones cerebrales que incrementan su actividad neuronal por la exposición a olores sexualmente relevantes incluyen el BOA, la MEA, el APM y el NLET (Kippin y col., 2003). Nuestros resultados demuestran que la exposición a feromonas provenientes de machos sexualmente expertos incrementa de manera significativa la actividad neuronal en las regiones analizadas del SPV de ratonas silvestres (Figura 17 y 18). Estos datos concuerdan con las observaciones descritas en ratas, hámsteres, cobayos y hurones macho (Kipping y

col., 2003). Bressler y Baum (1996) mostraron que la exposición a claves quimiosensoriales derivadas del aserrín proveniente de la cama de hembras receptoras (estro) aumenta la expresión de Fos en todas las regiones que integran el SPV de hembras y machos gonadectomizados y tratados crónicamente con testosterona (Bressler y Baum, 1996). Bakker y colaboradores (1995) probaron que la exposición a feromonas derivadas de la orina de ratas macho aumenta el número de células inmunoreactivas a Fos en las regiones que integran el SPV en ratas hembra ovariectomizadas y tratadas con estrógenos (Bakker y col., 1995).

Por otro lado, diferentes estudios han demostrado que las isoformas A y B del PR se expresan de manera constitutiva en las regiones que componen al SPV (Guerra-Araiza y col., 2000) y también, que la actividad de estas proteínas en regiones como el APM y el HVM es necesaria para la expresión de la conducta sexual femenina en los roedores (Mani, 2008). En el presente estudio, evaluamos la respuesta neuronal en el SPV de ratonas PRKO, que no expresan ninguna de las dos isoformas del PR, inducida por la exposición a feromonas provenientes de machos sexualmente expertos. Nuestros resultados sugieren que la carencia del PR inhibe la respuesta neuronal inducida por la exposición a las feromonas de machos sexualmente activos. En el experimento 2, las ratonas PRKO expuestas al aserrín proveniente de la cama de ratones sexualmente activos tienen niveles similares de células Fos-IR comparadas con las ratonas colocadas dentro de cajas con aserrín limpio (Figura 17 y 18). Además, la actividad neuronal basal en las estructuras analizadas es similar a lo que observamos en las ratonas silvestres expuestas al aserrín limpio. Con esto podemos descartar la posibilidad de que la ausencia de diferencias significativas se deba a una hiperactividad basal intrínseca (Figuras 17 y 18). Interesantemente, aún cuando el número promedio de células Fos-IR en las ratonas PRKO comparadas con las ratonas silvestres sea significativamente menor en la capa granular del BOA, en la MEA anterior, en el APM y en la capa anterolateral del NLET, el promedio de células sigue el mismo patrón descendiente en las demás regiones (Figura 19). Esto apoya nuestros

descubrimientos con respecto al bloqueo de la actividad neuronal inducido por la ausencia del PR.

El mecanismo por el cual el receptor para progesterona afecta la detección y el procesamiento de las claves quimiosensoriales sexualmente relevantes y, consecuentemente, la conducta sexual, involucra diversos procesos neuronales. La polisinapsis del SPV está muy bien caracterizada anatómicamente (Canteras y col., 1995; Tirindelli y col., 1998). Las neuronas vomeronasales receptoras localizadas en el órgano vomeronasal proyectan sus axones hacia los glomérulos en el bulbo olfatorio accesorio (BOA), en donde forman contactos sinápticos con las dendritas de las células mitrales y granulares. Las células granulares retroalimentan la comunicación con las células mitrales, inhibiendo su actividad eléctrica, mediante contactos dendrodendríticos. Por su parte, las células mitrales proyectan hacia la amígdala medial anterior (MEA ant) y posterior (MEA post). Las neuronas de la MEA ant proyectan, a través de la vía amigdalofugal ventral, hacia la porción intermedia del NLET y hacia la región lateral del APM. De la misma manera, las neuronas de la MEA post proyectan sus axones, mediante la estria terminal, hacia el NLET y hacia el APM. Existen conexiones recurrentes a partir del APM hacia la MEA, y de la MEA hacia el BOA (Canteras y col., 1995; Kelliher y Wersinger, 2007). La retroalimentación de estas conexiones es importante para el procesamiento de las claves quimiosensoriales sexualmente y la generación de una respuesta conductual. En el caso de las ratonas PRKO, esta retroalimentación está ausente dado que la actividad neuronal en el SPV se mantiene en niveles basales aún cuando los animales son expuestos al aserrín con feromonas de machos sexualmente activos.

Pankevich y colaboradores (2004) han sugerido que las claves olfatorias activan el sistema dopaminérgico mesolímbico, el cual está implicado en procesos de recompensa. El fenómeno denominado preferencia de lugar condicionada (Paredes y col., 1999) es una forma efectiva para probar si un animal percibe un estímulo como recompensante. La idea es entrenar al animal para que asocie un lugar con un estímulo recompensante; entre más recompensante sea el estímulo, la

preferencia del animal por el lugar asociado con dicho estímulo será más fuerte. Pankevich y colaboradores (2004) utilizaron este paradigma para evaluar la recompensa producida por una ratona en estro en ratones con su órgano vomeronasal intacto o lesionado. Los ratones que tenían su órgano vomeronasal (OVN) intacto pasaron más tiempo en el lugar en donde habían sido expuestos a la ratona en estro en comparación con el lugar neutro. Los ratones con el OVN lesionado no exhibieron esta preferencia. Además, evaluaron la expresión de la proteína Fos en las regiones que integran el SPV y observaron que los animales con el OVN intacto tenían un mayor número de células inmunoreactivas en el SPV comparado con los animales cuyo OVN estaba lesionado (Pankevich y col., 2004). Estos datos concuerdan con nuestros resultados, sugiriendo que la carencia del PR pudiera incapacitar a las hembras para mostrar una preferencia por la pareja sexual. Es posible que las ratonas PRKO sean incapaces de procesar los olores sexualmente relevantes en estructuras como el OVN o el BOA, por ende la transmisión de la información no llega a estructuras centrales en el cerebro.

Las hormonas esteroideas, como el estradiol y la progesterona, activan mecanismos neuronales que regulan la conducta sexual dirigiendo la síntesis de enzimas y receptores involucrados en sistemas neuroquímicos. Entre éstos están los sistemas de dopamina, norepinefrina, melanocortina y oxitocina. Dichos sistemas actúan sobre regiones hipotalámicas y límbicas en el cerebro, estimulando el despertar sexual, la atención y el despliegue de las conductas precopulatorias y de receptividad (Pfaus, 2009). En el hipotálamo ventromedial, el tratamiento secuencial con estrógenos y progesterona potencia la liberación de norepinefrina, inducida por oxitocina (Vincent y Etgen, 1993), la cual estimula la conducta sexual dependiente de hormonas a través de las proyecciones noradrenérgicas. La administración intrahipotalámica del antagonista del PR, RU486, inhibe la transmisión noradrenérgica en el hipotálamo, lo cual está correlacionado con la pérdida de la conducta sexual femenina (Auger y Blaustein, 1995). Estos datos sugieren que la actividad del PR es necesaria para mantener la transmisión noradrenérgica en el cerebro. Por otro lado, los receptores para

opioides μ (MOR) son receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembranales, los cuales son translocados de la membrana plasmática al citoplasma mediante endosomas. La internalización del receptor es un indicador de la activación de la proteína ante un estímulo. Se sabe que la activación de los receptores MOR en el APM inhibe la conducta sexual femenina (Pfaus, 2009). Sinchak y Micevych (2001) encontraron que la administración de estradiol incrementa el número de MOR internalizados en el APM de ratas ovariectomizadas. Este fenómeno se correlaciona con la inhibición de la conducta sexual femenina. Por el contrario, el tratamiento conjunto de estradiol y progesterona restablece la conducta sexual e inhibe la translocación de los MOR hacia el citoplasma (Sinchak y Micevych, 2001). En conjunto, estos estudios sugieren que la actividad del PR es necesaria para la regulación de sistemas de neurotransmisores específicos que permiten el despliegue de la conducta sexual en los roedores. Esto permite pensar que la ausencia del PR en las ratonas PRKO está alterando estos sistemas de manera que la respuesta conductual esta inhibida.

VIII. CONCLUSIONES.

Las respuestas neuroendócrinas que resultan en la aceleración de la pubertad, el bloqueo de la preñez, la secreción de LH (hormona luteinizante), la preferencia sexual y la selección de la pareja sexual son estimuladas por componentes que se encuentran en las secreciones (feromonas) del individuo conespecífico del sexo opuesto. Dichas feromonas son procesadas por el sistema de proyección vomeronasal el cual está asociado con el control de la conducta sexual femenina y en el que se expresan de manera constitutiva los receptores para progesterona.

En el experimento 1 demostramos que la administración sistémica de progesterona (400 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) no modifica la actividad neuronal en las capas mitral y granular del BOA ni en el APM. Estas regiones son parte importante del SPV y han sido evaluadas extensamente para la determinación de las estructuras que participan en el control de la conducta sexual femenina y masculina en roedores.

En el experimento 2 observamos que la exposición a feromonas provenientes de machos sexualmente expertos incrementa de manera significativa la actividad neuronal en las regiones analizadas del SPV de ratonas silvestres. Estos datos concuerdan con las observaciones descritas en ratas, hámsteres, cobayos y hurones macho. Con esto aportamos mayor evidencia acerca de la capacidad de las claves quimiosensoriales sexualmente relevantes para inducir un cambio en la actividad neuronal de estructuras específicas dentro del sistema nervioso central.

El objetivo principal de este estudio era determinar el efecto de la actividad del PR sobre la detección e integración de feromonas en el SPV. Utilizando ratonas transgénicas que no expresan ninguna de las isoformas A y B del PR (PRKO), demostramos que la exposición a feromonas de ratones sexualmente activos no cambia la actividad neuronal del SPV como sucede en las ratonas silvestres en las cuales la actividad del PR está intacta.

La actividad neuronal basal en las estructuras analizadas de las ratonas PRKO es similar a lo que observamos en las ratonas silvestres expuestas al aserrín limpio.

Con esto podemos descartar la posibilidad de que la ausencia de diferencias significativas se deba a una hiperactividad basal intrínseca.

Finalmente, el número promedio de células Fos-IR en las ratonas PRKO comparadas con las ratonas silvestres es significativamente menor en todas las regiones analizadas. Con esto, aportamos nueva evidencia de la participación del receptor para progesterona en la detección y procesamiento de aferencias quimiosensoriales por parte de estructuras bien definidas dentro del sistema nervioso central.

Es evidente que la actividad de la progesterona no sólo se limita al establecimiento y mantenimiento de la preñez, sino que ejerce un efecto modulador sobre estructuras cerebrales importantes para la elección de la pareja sexual así como para el despliegue de la conducta sexual.

BIBLIOGRAFÍA.

Abdel-Hafiz, H., Takimoto, G. S., Tung, L., Horwitz, K. B., 2002. The inhibitory function in human progesterone receptor N termini binds SUMO-1 protein to regulate autoinhibition and transrepression. *The Journal of Biological Chemistry*: 277: 33950–33956.

Adler, N. T., Davis, P. G., Komisaruk, B. R. 1977. Variation in the size and sensitivity of a genital sensory field in relation to the estrous cycle in rats. *Hormones and Behavior*: 9: 334-344.

Agmo, A. 1999. Sexual motivation, an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioural Brain Research*: 105: 129-150.

Agmo, A. 2003. Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology* : 117: 3-14.

Allan, G. F., Leng, X., Tsai, S. Y., Weigel, N. L., Edwards, D. P., Tsai, M. J., O'Malley, B. W. 1992. Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid receptor activation. *The Journal of Biological Chemistry*: 267: 19513–19520.

Allan, G. F., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., O'Malley, B. W., 1992. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: 89: 11750–11754.

Auger, A. P., Blaustein, J. D. 1995. Progesterone Enhances an Estradiol-Induced Increase in Fos Immunoreactivity in Localized Regions of Female Rat Forebrain. *The Journal of Neuroscience* : 15: 2272-2279.

Bakker, J., Baum, M. J., Slob, A. K. 1995. Neonatal inhibition of brain estrogen formation and later neural Fos responses to chemosensory stimulation in the male rat. *The conference on reproductive behavior*: 27: 54 (resumen).

Bakker, J., van Ophemert, J., Timmerman, M. A., de Jong, F. H., Slob, A. K. 1995. Endogenous reproductive hormones and nocturnal rhythms in partner preference and sexual behavior of ATD-treated male rats. *Neuroendocrinology*: 62: 396-405.

- Barfield, M. A., Lisk, R. D. 1974.** Relative contributions of ovarian and adrenal progesterone to the timing of heat in the 4-day cyclic rat. *Endocrinology*: 94: 571-575.
- Batra, S., Losif, S. 1985.** Progesterone receptors in human vaginal tissue. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* : 153: 524-528.
- Baum M. J., Sodersten, P., Vreeburg, J. T. M. 1974.** Mounting and receptive behavior in the ovariectomized female rat: Influence of estradiol, dihydrotestosterone, and genital anesthetization. *Hormones and Behavior*: 5: 175-190.
- Beach, F. A. 1976.** Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and Behavior*: 7: 105-138.
- Beck, C. A., Weigel, N. L., Moyer, M. L., Nordeen, S. K., Edwards, D. P. 1993.** The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: 90: 4441-4445.
- Bell, S. C., Jackson, J. A., Ashmore, J., Zhu, H. H., Tseng, L. 1991.** Regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 synthesis and secretion by progestin and relaxin in long term cultures of human endometrial stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 72: 1014-1024.
- Bethea, C. L., Widmann, A. A. 1998.** Differential expression of progestin receptor isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of rhesus macaques. *Endocrinology*: 139: 677-687.
- Blasberg, M. E., Robinson, S., Henderson, L. P., Clark, A. S. 1998.** Inhibition of estrogen-induced sexual receptivity by androgens: Role of the androgen receptor. *Hormones and Behavior*: 34: 283-293.
- Blaustein, J. D., Feder, H. H. 1979.** Cytoplasmic progestin receptors in female guinea pig brain and their relationship to refractoriness in expression of female sexual behavior. *Brain Research* : 177: 489-498.

Blaustein, J. D., Turcotte, J. C. 1990. Down-regulation of progesterin receptors in guinea pig brain: new findings using an immunocytochemical technique. *Journal of Neurobiology* : 21: 675-685.

Blaustein, J. D., Tetel, M. J., Ricciardi, K. H., Delville, Y., Turcotte, J. C. 1994. Hypothalamic ovarian steroid hormone-sensitive neurons involved in female sexual behavior. *Psychoneuroendocrinology*: 19: 505-516.

Blaustein J. D., Erskine, M. S. 2002. Feminine sexual behavior: Cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent forebrain. *Hormones, Brain and Behavior*. Pfaff DW, Arnold AP, Etgen AM, Fahrbach SE, Rubin RT, editors. New York: Academic Press; pp. 139-214.

Blaustein, J. D., Mani, S. K. 2006. Feminine sexual behavior from neuroendocrine and molecular neurobiological perspectives. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg: 3-8.

Boling J. L., Blandau, R. J. 1939. The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology*: 25: 359-364.

Bressler S. C., Baum, M. J. 1996. Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience*: 71: 1063-1072.

Brinton, R. D., Thompson, R. F., Foy, M. R., Baudry, M., Wang, J. M., Finch, C. E., Morgan, T. E., Pike, C. J., Mack, W. J., Stanczyk, F. Z., Nilsen, J. 2008. Progesterone receptors: Form and function in brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*: 29: 313-339.

Campeaun, S., Watson, S. 1997. Neuroendocrine and behavioural response and brain pattern of c-Fos induction associate with audiogenic stress. *Journal of Neuroendocrinology* : 9: 577-588.

Canteras, N. S., Simerly, R. B., Swanson, L. W. 1995. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: A PHAL study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*: 360: 213-245.

Chen, C., Opazo, J., Erez, O., Uddin, M., Santolaya-Forgas, J., Goodman, M., Grossman, L., Romero, R., Wildman, D. 2008. The human progesterone receptor

shows evidence of adaptive evolution associated with its ability to act as a transcription factor. *Molecular Phylogenetics and Evolution* : 47: 637-649.

Clarke, C. L., Sutherland, R. L. 1990. Progesterin regulation of cellular proliferation. *Endocrine Reviews*: 11: 266-301.

Cohen, D., Curran, T. 1988. Fra-1: a serum inducible, cellular immediate-early gene that encodes a Fos-related antigen. *Molecular and Cellular Biology*: 8: 2063-2069.

Collado, M. L., Rodríguez-Manzo, G., Cruz, M. L. 1985. Effect of progesterone upon adenylate cyclase activity and cAMP levels on brain areas. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* : 23: 501-504.

Collins V. J., Boling, J. I., Dempsey, E. W., Young, W. C. 1938. Quantitative studies of experimentally induced sexual receptivity in the spayed guinea pig. *Endocrinology*: 23: 188-196.

Condon, J. C., Hardy, D. B., Kovaric, K., Mendelson, C. R. 2006. Upregulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor- κ B may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Molecular Endocrinology*: 20: 764-775.

Conneely, O. M., Dobson, A. D., Dobson, A. D., Tsai, M. J., Beattie, W. G., Toft, D. O., Huckaby, C. S., Zarucki, T., Schrader, W. T., O'Malley, B. W. 1987. Sequence and expression of a functional chicken progesterone receptor. *Molecular Endocrinology*: 1: 517-525.

Conneely, O. M., Lydon J. P. 2000. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids*: 65: 571-577.

Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., Lydon, J. P., De Mayo, F. J. 2001. Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* : 179: 97-103.

Conneely, O. M., Lydon, J. P., De Mayo, F., O'Malley, B. W. 2002. Reproductive functions of the progesterone receptor. *J Soc Gynecol Investig*: 7: S25-32.

Cullinan, W. E., Herman, J. P., Battaglia, D. F., Akil, H., Watson, S. J. 1995. Pattern and time course of immediate-early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*: 64: 477-505.

- Cunha, G. R., Hom, Y. K. 1996.** Role of mesenchymal-epithelial interactions in mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* : 1: 21-35.
- Curran, T., Morgan, J. 1995.** Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *Journal of Neurobiology* : 26: 403-412.
- Das, S. K., Tsukamura, H., Paria, B. C., Andrews, G. K., Dey, S. K. 1994.** Differential expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) gene and regulation of EGF-R bioactivity by progesterone and estrogen in the adult mouse uterus. *Endocrinology*: 134: 971-81.
- Das, S. K., Chakraborty, I., B. C., Wang, X. N., Plowman, G., Dey, S. K. 1995.** Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Molecular Endocrinology*: 9: 691-705.
- Dempsey, E. W., Hertz, R., Young, W. C. 1936.** The experimental induction of oestrus (sexual receptivity) in the normal and ovariectomized guinea pig. *American Journal of Physiology*: 116: 201-209.
- Dinchuk, J. E., Car, B. D., Focht, R. J., Johnston, J. J., Jaffee, B. D., Covington, M. B., Contel, N. R. 1995.** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature*: 378: 406-409.
- Dominguez-Salazar, E., Portillo, W., Baum, M. J., Bakker, J., Paredes, R. G. 2002.** Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiology and Behavior* : 75: 337-346.
- Dominguez-Salazar, E., Bateman, H. L., Rissman, E. F. 2004.** Background matters: the effects of estrogen receptor alpha gene disruption on male sexual behavior are modified by background strain. *Hormones and Behavior*: 46: 482-490.
- DonCarlos, L. L., Greene, G. L., Morrell, J. I. 1989.** Estrogen plus progesterone increases progesterin receptor immunoreactivity in the brain of ovariectomized guinea pigs. *Neuroendocrinology*: 50: 613-623.

- Dorries, K. M., Adkins-Regan, E., Halpern, B. P. 1997.** Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal organ in domestic pigs. *Brain, Behavior and Evolution* : 49: 53–62.
- Dudley, C. A., Rajendren, G., Moss, R. L. 1992.** Induction of FOS immunoreactivity in central accessory olfactory structures of the female rat following exposure to conspecific males. *Molecular and Cellular Neuroscience*: 3: 360-369.
- Dudley, C. A., Moss, R. L. 1994.** Lesions of the accessory olfactory bulb decrease lordotic responsiveness and reduce mating-induced c-fos expression in the accessory olfactory system. *Brain Research* : 642: 29-37.
- Duffy, D. M., Stouffer, R. L. 1995.** Progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the primate corpus luteum during the menstrual cycle: possible regulation by progesterone. *Endocrinology*: 136: 1869-1876.
- Dulac, C., Torello, A. T. 2003.** Molecular detection of pheromone signals in mammals: From genes to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*: 4: 551-562.
- Duncan, G. E., Johnson, K. B., Breese, G. R. 1993.** Topographic patterns of brain activity in the response to swim stress: assessment by 2-deoxyglucose and expression of Fos-like immunoreactivity. *The Journal of Neuroscience*: 13: 3932-3943.
- el-Etr, M., Akwa, Y., Fiddes, R. J., Robel, P., Baulieu, E. E. 1995.** A progesterone metabolite stimulates the release of gonadotropin-releasing hormone from GT1-1 hypothalamic neurons via the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: 92: 3769-3773.
- Elliot, E. E., Sibley, D. R., Katz, J. L. 2003.** Locomotor and discriminative-stimulus effects of cocaine in dopamine D5 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*: 169: 161-168.
- Emery, D. E., Moss, R. L. 1984.** Lesions confined to the ventromedial hypothalamus decrease the frequency of coital contacts in female rats. *Hormones and Behavior*: 18: 313-329.
- Erskine, M. S. 1989.** Solicitation behavior in the estrous female rat: A review. *Hormones and Behavior*: 23: 473-502.

- Erskine, M. S. 1993.** Mating-induced increases in FOS protein in preoptic area and medial amygdala of cycling female rats. *Brain Research Bulletin*: 32: 447-451.
- Erskine, M. S., Lehmann, M. L., Cameron, N. M., Polston, E. K. 2004.** Co-regulation of female sexual behavior and pregnancy induction: An exploratory synthesis. *Behavioural Brain Research*: 153: 295-315.
- Erskine, M. S., Lehmann, M. L., Cameron, N. M., Polston, E. K. 2004.** Co-regulation of female sexual behavior and pregnancy induction: an exploratory synthesis. *Behavioural Brain Research*: 153: 295-315.
- Evans, R. M. 1988.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*: 240: 889-895.
- Fawell, S. E., Lees, J. A., White, R., Parker, M. G. 1990.** Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. *Cell*: 60: 953-962.
- Fenelon, V. S., Poulain, D. A., Theodosis, D. T. 1993.** Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience*: 53: 77-89.
- Fields, R. D., Eshete, F., Stevens, B., Itoh, K. 1997.** Action potential –dependent regulation of gene expression: temporal specificity in Ca²⁺, camp-responsive element binding proteins and mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Neuroscience*: 17: 7252-7266.
- Flanagan-Cato, L. M., McEwen, B. S. 1995.** Pattern of Fos and Jun expression in the female rat forebrain after sexual behavior. *Brain Research* : 673:q 53-60.
- Freedman, L. P. 1992** Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocrine Review*: 13: 129-145.
- Garcia, E., Bouchard, P., De Brux, J., Berdah, J., Frydman, R., Schaison, G., Milgrom, E., Perrot-Applanat, M. 1988.** Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 67: 80-87.

- Gereau, R. W. t., Kedzie, K. A., Renner, K. J. 1993.** Effect of progesterone on serotonin turnover in rats primed with estrogen implants into the ventromedial hypothalamus. *Brain Research Bulletin*: 32: 293-300.
- Giannopoulos, G., Phelps, D. S., Munowitz, P. 1982.** Heterogeneity and ontogenesis of progestin receptors in rabbit lung. *The Journal of Steroid Biochemistry* : 17: 503-510.
- Gibbs, R. B., Mobbs, C. V., Pfaff, D. W. 1990.** Sex steroids and Fos expression in rat brain and uterus. *Molecular and Cellular Neuroscience*: 1: 29-40.
- Gilman, D. P., Hitt, J. C. 1978.** Effects of gonadal hormones on pacing of sexual contacts by female rats. *Behavioural Biology*: 24: 77-87.
- Giovannelli, L., Bloom, F. E. 1992.** c-Fos protein expression in the rat subfornical organ following osmotic stimulation. *Neuroscience. Lett*: 139: 1-6.
- Giudice, L. C., Lamson, G., Rosenfeld, R. G., Irwin, J. C. 1991.** Insulin-like growth factor-II (IGF-II) and IGF binding proteins in human endometrium. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 626: 295-307.
- Gonzalez-Flores, O., Camacho, F. J., Dominguez-Salazar, E., Ramirez-Orduna, J. M., Beyer, C., Paredes, R. G. 2004.** Progestins and place preference conditioning after paced mating. *Hormones and Behavior*:46: 151-157.
- Gorzalka, B. B., Moe, I. V. 1994.** Adrenal role in proceptivity and receptivity induced by two modes of estradiol treatment. *Physiology and Behavior* : 55: 29-34.
- Graham, J. D., Yeates, C., Balleine, R. L., Harvey, S. S., Milliken, J. S., Bilous, A. M., Clarke, C. L. 1996.** Progesterone receptor A and B protein expression in human breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* : 56: 93-98.
- Graham, J. D., Clarke, C. L. 1997.** Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*: 18: 502-519.
- Green, I. C., Howell, S. L., El Seifi, S., Perrin, D. 1978.** Binding of 3H-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetologia*: 15, 349-355.
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B., 1984.** Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-Fos proto-oncogene. *Nature*: 311: 433-438.

- Gronemeyer, H. 1991.** Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annual Review of Genetics*: 25: 89-123.
- Gronemeyer, H., Meyer, M. E., Bocquel, M. T., Kastner, P., Turcotte, B., Chambon, P. 1991.** Progestin receptors: isoforms and antihormone action. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* : 40: 271-278.
- 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 Sciences* : 66: 1743–1752.
- Guerra-Araiza, C., Coyoy-Salgado, A., Camacho-Arroyo, I. 2002.** Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Research Bulletin*: 59: 105–109.
- Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Appianat, M., Milgrom, E., 1989.** Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell*: 57: 1147–1154.
- Halpern, M., Jia, C., Shapiro, L. S. 1998.** Segregated pathways in the vomeronasal system. *Microscopy Research and Technique*: 41: 519-529.
- Hardy, D. F., De Bold, J. 1972.** Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*: 78: 400-408.
- Hirata, S., Shoda, T., Kato, J., Hoshi, K., 2000.** The novel isoform of the progesterone receptor cDNA in the human testis and detection of its mRNA in the human uterine endometrium. *Oncology*: 59: 39–44.
- Hirata, S., Shoda, T., Kato, J., Hoshi, K., 2003.** Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 14: 124–129.
- Hollenberg, S. M., Evans, R. M. 1988.** Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*: 55: 899–906.
- Horwitz, K. B., Alexander, P. S. 1983.** In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation. *Endocrinology*: 113: 2195-2201.

- Horwitz, K. B. 1992.** The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? *Endocrine Reviews*: 13: 146-163.
- Hou, Q., Gorski, J. 1993.** Estrogen receptor and progesterone receptor genes are expressed differentially in mouse embryos during preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: 90: 9460-9464.
- Hovland, A. R., Powell, R. L., Takimoto, G. S., Tung, L., Horwitz, K. B. 1998.** An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *The Journal of Biological Chemistry*: 273: 5455-5460.
- Huckaby, C. S., Conneely, O. M., Beattie, W. G., Dobson, A. D., Tsai, M. J., O'Malley, B. W. 1987.** Structure of the chromosomal chicken progesterone receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: 84: 8380-8384.
- Hughes, P., Lawlor, P., Dragunow, M. 1992.** Basal expression of Fos, Fos-related Jun and Krox 24 proteins in the rat hippocampus. *Mol. Brain. Reser*: 13: 355-357.
- Insel, T. R. 1990.** Regional induction of c-Fos-like protein in rat brain after estradiol administration. *Endocrinology*: 126: 1849-1853.
- Ito, A., Imada, K., Sato, T., Kubo, T., Matsushima, K., Mori, Y. 1994.** Suppression of interleukin 8 production by progesterone in rabbit uterine cervix. *Biochemical Journal* : 301: 183-186.
- Jacob, S., McClintock, M.K., Zelano, B., Ober, C., 2002.** Paternally inherited HLA alleles are associated with women's choice of male odor. *Nat. Genet*: 30: 175-179.
- Johnston, R. E. 2000.** Pheromones, the vomeronasal system, and communication: from hormonal responses to individual recognition. *Annals of the New York Academy of Sciences* : 855: 333-348 (Olfaction and taste XII).
- Joslyn, W. D., Feder, H. H. 1971.** Facilitatory and inhibitory effects of supplementary estradiol benzoate given to ovariectomized, estrogen-primed guinea pigs. *Hormones and Behavior*: 2: 307-314
- Kaczmarek, L., Chaudhuri, A. 1997.** Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Research. Rev*: 23: 237-256.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*: 85: 403–414.

Kapur, S., Tamada, H., Dey, S. K., Andrews, G. K. 1992. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biology of Reproduction*: 46: 208-219.

Karlson, P., Luscher, M. 1959. Pheromones: A new term for a class of biologically active substances. *Nature*: 183: 55-56.

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO Journal*: 9: 1603-1614.

Kato, J., Onouchi, T., Okinaga, S. 1978. Hypothalamic and hypophysial progesterone receptors: estrogen-priming effect, differential localization, 5 α -dihydroprogesterone binding and nuclear receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry* : 9: 419-427.

Kelliher, K. R. 2007. The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Hormones and Behavior*: 52: 561-570.

Kelliher, K. R., Wersinger, S. 2009. Olfactory regulation of the sexual behavior and reproductive physiology of the laboratory mouse: effects and neural mechanism. *ILAR Journal*: 50: 28-39.

Keverne, E.B. 1999. The vomeronasal organ. *Science*: 286: 716–720.

Kippin, T. E., Sotiropoulos, V., Badih, J., Pfau, J. G. 2004. Opposing roles of the nucleus accumbens and anterior hypothalamic area in the control of sexual behavior in the male rat. *European Journal of Neuroscience*: 19: 698-704.

- Kovács, K. J., Sawchenko, P. E. 1996.** Sequence of stress induced alteration in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *Journal of Neuroscience*: 16: 262-273.
- Kraus, W. L., Weis, K. E., Katzenellenbogen, B. S. 1995.** Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progestin receptors. *Molecular and Cellular Biology*: 15: 1847-1857.
- Kraus, W. L., Weis, K. E., Katzenellenbogen, B. S. 1997.** Determinants for the repression of estrogen receptor transcriptional activity by ligand-occupied progestin receptors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* : 63: 175-188.
- Kudwa, A. E., Dominguez-Salazar, E., Cabrera, D. M., Sibley, D. R., Rissman, E. F. 2005.** Dopamine D5 receptor modulates male and female sexual behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl)*: 180: 206-214.
- Kurita, T., Young, P., Brody, J. R., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., Cunha, G. R. 1998.** Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*: 139: 4708-4713.
- Kushner, P. J., Baxter, J. D., Duncan, K. G., Lopez, G. N., Schaufele, F. 1994.** Eukaryotic regulatory elements lurking in plasmid DNA: The activator protein-1 site in pUC. *Molecular Endocrinology*: 8: 405-407.
- Leinders-Zufall, T., Brennan, P., Widmayer, P., Chandramani, P., Maul-Pavicic, A., Jager, M., Xiao-Hong, L., Breer, H., Zufall, F., Boehm, T. 2004.** MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science*: 306: 1033-1037.
- Lessey, B. A., Alexander, P. S., Horwitz, K. B. 1983.** The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity labeling. *Endocrinology*: 112: 1267-1274.

- Liu, X., Robinson, G. W., Wagner, K. U., Wynshaw-Boris, A., Hennighausen, L. **1997**. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes and Development* : 11: 179–186.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., Sigler, P. B. **1991**. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature (London)*: 352: 497–505.
- Luo, M., Katz, L. C. **2004**. Encoding pheromonal signals in the mammalian vomeronasal system. *Current Opinion in Neurobiology* : 14: 428–434.
- Lydon, J. P., DeMayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., Jr., Shyamala, G., Conneely, O. M., O'Malley, B. W. **1995**. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes and Development* : 9: 2266-2278.
- Lydon J. P., Sivaraman L., Conneely O. M. **2000**. A reappraisal of progesterone action in the mammary gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*: 5: 325-338.
- MacLusky, N. J., Lieberburg, I., Krey, L. C., McEwen, B. S. **1980**. Progesterin receptors in the brain and pituitary of the bonnet monkey (*Macaca radiata*): differences between the monkey and the rat in the distribution of progesterin receptors. *Endocrinology*: 106: 185-191.
- MacLusky, N. J., McEwen, B. S. **1980**. Progesterin receptors in rat brain: distribution and properties of cytoplasmic progesterin-binding sites. *Endocrinology*: 106: 192-202.
- Madlafousek, J., Hlinak, Z. **1977**. Sexual behavior in the female laboratory rat: Inventory, patterning and measurement. *Animal Behaviour* : 63: 129-174.
- Maggi, A., Pérez, J. **1984**. Progesterone and estrogens in rat brain: modulation of GABA (gamma-aminobutyric acid) receptor activity. *European Journal of Pharmacology* : 103: 165-168.
- Mangal, R. K., Wiehle, R. D., Poindexter, A. N. III, Weigel, N. L. **1997**. Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* : 63: 195–202.

- Mani, S. K., Allen, J. M., Clark, J. H., Blaustein, J. D., O'Malley, B. W. 1994.** Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science*: 265: 1246-1249.
- Mani, S. K., Blaustein, J. D., Allen, J. M., Law, S. W., O'Malley, B. W., Clark, J. H. 1994.** Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology*: 135: 1409-1414.
- Mani, S. K., Allen, J. M., Clark, J. H., Blaustein, J. D., O'Malley, B. W. 1995.** Steroid hormone—and neurotransmitter-induced rat sexual behavior: addendum. *Science*: 268: 1833-1839.
- Mani, S. K., Allen, J. M., Lydon, J. P., Mulac-Jericevic, B., Blaustein, J. D., DeMayo, F. J., Conneely, O., O'Malley, B. W. 1996.** Dopamine requires the unoccupied progesterone receptor to induce sexual behavior in mice. *Molecular Endocrinology*: 10: 1728-1737.
- Mani, S. K., Blaustein, J. D., O'Malley, B. W. 1997.** Progesterone receptor function from a behavioral perspective. *Hormones and Behavior*: 31: 244-255.
- Mani, S. K., Mitchell, A., O'Malley, B. W. 2001.** Progesterone receptor and dopamine receptors are required in Delta 9-tetrahydrocannabinol modulation of sexual receptivity in female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: 98: 1249-1254.
- Mani, S. K., Reyna, A. M., Chen, J. Z., Mulac-Jericevic, B., Conneely, O. M. 2006.** Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Molecular Endocrinology*: 20: 1322-1332.
- Mani, S. 2008.** Progestin receptor subtypes in the brain: the known and the unknown. *Endocrinology*: 149: 2750-2756.
- Mansour, S. L., Thomas, K. R., Capecchi, M. R. 1988.** Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*: 336: 348-352.

Marsh, J. M., Butcher, R. W., Savard, K., Sutherland, E. W. 1966 The stimulatory effect of luteinizing hormone on adenosine 39,59-monophosphate accumulation in corpus luteum slices. *The Journal of Biological Chemistry*: 241: 5436–5440.

Martinez, I., Paredes, R. G. 2001. Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Hormones and Behavior*: 40: 510-517.

Mathews, C., van Holde, K. E., Ahern, K. G. *Bioquímica*. Ed. Pearson Educación S.A. Madrid. 2002. 774-775.

McClintock, M. K. 2002. Pheromones, odors, and vasanas: the neuroendocrinology of social chemosignals in humans and animals. In: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 797–870.

McClintock, M. K., Adler, N. T. 1978. The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Behavior*: 67: 67-96.

McClintock, M. K., Anisko, J. J. 1982. Group mating among Norway rats I. Sex differences in the pattern and neuroendocrine consequences of copulation. *Animal Behaviour* : 30: 398-409.

McDonnell, D. P., Goldman, M. E. 1994. RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*: 269: 11945-11949.

McDonnell, D. P., Shahbaz, M. M., Vegeto, E., Goldman, M. E. 1994. The human progesterone receptor A-form functions as a transcriptional modulator of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* : 48: 425-432.

McDonnell, D. P. 1995. Unraveling the human progesterone receptor signal transduction pathway: insights into antiprogestin action. *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 6: 133–138.

Meisel, R. L., Pfaff, D. W. 1984. RNA and protein synthesis inhibitors: effects on sexual behavior in female rats. *Brain Research Bulletin*: 12: 187-193.

Mercado, M., Shimasaki, S., Ling, N., DePaolo, L. 1993. Effects of estrous cycle stage and pregnancy on follistatin gene expression and immunoreactivity in rat

reproductive tissues: progesterone is implicated in regulating uterine gene expression. *Endocrinology*: 132: 1774–1781.

Meyer, M. E., Quirin–Stricker, C., Lerouge, T., Bocquel, M. T., Gronemeyer, H. 1992. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*: 267: 10882–10887.

Meyerson, B. J., Lindstrom, L. H. 1973. Sexual motivation in the female rat. A methodological study applied to the investigation of the effect of estradiol benzoate. *Acta Physiologica Scandinavica, Supplementum*: 389: 1–80.

Milgrom, E., Atger, M., Baulieu, E. E. 1970. Progesterone in uterus and plasma. IV. Progesterone receptor(s) in guinea pig uterus cytosol. *Steroids*: 16: 741–754.

Milgrom, E., Thi, L., Atger, M., Baulieu, E. E. 1973. Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. *The Journal of Biological Chemistry*: 248: 6366–6374.

Morham, S., Langenbach, G. R., Loftin, C. D., Tiano, H. F., Vouloumanos, N., Jennette, J. C., Mahler, J. F., Kluckman, K. D., Ledford, A., Lee, C. A., Smithies, O. 1995. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*: 83: 473–482.

Musgrove, E. A., Hamilton, J. A., Lee, C. S., Sweeney, K. J., Watts, C. K., Sutherland, R. L. 1993. Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biology*: 13: 3577–3587.

National Research Council. 2003. Guidelines for the care and use of mammals. National Research Council of the National Academies Neuroscience and Behavioral Research. Washington: National Academies: 20.

Natraj, U., Richards, J. S. 1993. Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology*: 133: 761–769.

Nishina, H., Sato, H., Suzuki, T., Sato, N., Iba, H. 1990. Isolation and characterization of Fra-2, an additional member of the fos gene family. Proceedings of the National Academy of Sciences USA: 87: 3619-3623.

Norman, A. W., Litwack, G. 1987. Hormones. Academic Press, Orlando, FL

Ogawa, S., Olazabal, U. E., Parhar, I. S., Pfaff, D. W. 1994. Effects of intrahypothalamic administration of antisense DNA for progesterone receptor mRNA on reproductive behavior and progesterone receptor immunoreactivity in female rat. Journal of Neuroscience: 14: 1766-1774.

O'Malley, B. W., Sherman, M. R., Toft, D. O. 1970. Progesterone "receptors" in the cytoplasm and nucleus of chick oviduct target tissue. Proceedings of the National Academy of Sciences USA: 67: 501-508.

Pankevich, D. E., Baum, M. J., Cherry, J. A. 2004. Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. Journal of Neuroscience: 24: 9451-9457.

Paredes, R. G., López, M. E., Baum, M. J. 1998. Testosterone augments neuronal Fos responses to estrous odors throughout the vomeronasal projection pathway of gonadectomized male and female rats. Hormones and Behavior 33: 48-57.

Paredes, R. G., Vazquez, B. 1999. What do female rats like about sex? Paced mating. Behavioural Brain Research: 105: 117-127.

Paredes, R. G., Martinez, I. 2001. Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats. Behavioral Neuroscience: 115: 1363-1367.

Paria, B. C., Das, N., Das, S. K., Zhao, X., Dileepan, K. N., Dey, S. K. 1998. Histidine decarboxylase gene in the mouse uterus is regulated by progesterone and correlates with uterine differentiation for blastocyst implantation. Endocrinology: 139: 3958-3966.

Park, O. K., Mayo, K. E. 1991. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. Molecular Endocrinology: 5: 967-978.

- Park-Sarge, O. K., Parmer, T. G., Gu, Y., Gibori, G. 1995.** Does the rat corpus luteum express the progesterone receptor gene?. *Endocrinology*: 136: 1537-1543.
- Pearce, P. T., Khalid, B. A., Funder, J. W. 1983.** Progesterone receptors in rat thymus. *Endocrinology*: 113: 1287-1291.
- Peirce, J. T., Nuttall, R. L. 1961.** Self-paced sexual behavior in the femal rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*: 54: 310-313.
- Pekonen, F., Nyman, T., Lahteenmaki, P., Haukkamaa, M., Rutanen, E. M. 1992.** Intrauterine progestin induces continuous insulin-like growth factor-binding protein-1 production in the human endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*: 75: 660-664.
- Perrot-Applanat, M., Groyer-Picard, M. T., Lorenzo, F., Jolivet, A., Vu Hai, M. T., Pallud, C., Spyrtos, F., Milgrom, E. 1987.** Immunocytochemical study with monoclonal antibodies to progesterone receptor in human breast tumors. *Cancer Research*: 47: 2652-2661.
- Perrot-Applanat, M., Cohen-Solal, K., Milgrom, E., Finet, M. 1995.** Progesterone receptor expression in human saphenous veins. *Circulation*: 92: 2975-2983.
- Pfaff, D., Keiner, M. 1973.** Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *The Journal of Comparative Neurology*: 151: 121-158.
- Pfaus, J. G., Kleopoulos, S. P., Mobbs, C. V., Gibbs, R. B., Pfaff, D. W. 1993.** Sexual stimulation activates c-fos within estrogenconcentrating regions of the female rat forebrain. *Brain Research*: 624: 253-267.
- Pfaus, J. G. 2009.** Pathways of Sexual Desire. *Journal of Sexual Medicine*: 6: 1506-1533.
- Picard, D., Yamamoto, K. R. 1987.** Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *The EMBO Journal*: 6: 3333-3340.
- Portillo, W., Diaz, N. F., Retana-Marquez, S., Paredes, R. G. 2006.** Olfactory, partner preference and Fos expression in the vomeronasal projection pathway of sexually sluggish male rats. *Physiology and Behavior* : 88: 389-397.

- Pratt, W. B., Jolly, D. J., Pratt, D. V. 1988.** A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA binding GS glucocorticoid receptor complex. *The Journal of Biological Chemistry*: 263: 267–273.
- Press, M. F., Greene, G. L. 1988.** Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *Endocrinology*: 122: 1165-1175.
- Press, M. F., Udove, J. A., Greene, G. L. 1988.** Progesterone receptor distribution in the human endometrium. Analysis using monoclonal antibodies to the human progesterone receptor. *American Journal of Pathology*: 131: 112-124.
- Quarmby, V. E., Korach, K. S. 1984.** The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus. *Endocrinology*: 114: 694-702.
- Quiroz, C., Martinez, I., Quirarte, G. L., Morales, T., Diaz-Cintra, S., Prado-Alcala, R. A. 2003.** Enhanced inhibitory avoidance learning prevents the memory-impairing effects of post-training hippocampal inactivation. *Experimental Brain Research* : 153: 400-402.
- Reddy, D. S., Castaneda, D. C., O'Malley, B. W., Rogawski, M. A. 2004.** Anticonvulsant activity of progesterone and neurosteroids in progesterone receptor knockout mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*: 310: 230-9.
- Robker, R. L., Russell, D. L., Espey, L. L., Lydon, J. P., O'Malley, B. W., Richards, J. S. 2000.** Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: 97: 4689-4694.
- Rowe, D. W., Erskine, M. S. 1993.** c-Fos proto-oncogene activity induced by mating in the preoptic area, hypothalamus and amygdala in the female rat—role of afferent input via the pelvic nerve. *Brain Research* : 621: 25-34.
- Sagar, S. M., Sharp, F. R., Curran, T. 1988.** Expression of c-Fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*: 240: 1328-1331.

- Said, T. K., Conneely, O. M., Medina, D., O'Malley, B. W., Lydon, J. P. 1997.** Progesterone, in addition to estrogen, induces cyclin D1 expression in the murine mammary epithelial cell, in vivo. *Endocrinology*: 138: 3933-3939.
- Sartorius, C. A., Melville, M. Y., Hovland, A. R., Tung, L., Takimoto, G. S., Horwitz, K. B. 1994.** A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Molecular Endocrinology*: 8:1347- 1360.
- Sartorius, C. A., Melville, M. Y., Hovland, A. R., Tung, L., Takimoto, G. S., Horwitz, K. B. 1994.** A third transactivation function (AF3) of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Molecular Endocrinology*: 8: 1347-1360.
- Savouret, J. F., Misrahi, M., Milgrom, E. 1988.** Molecular action of progesterone. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*: 10: 293-347.
- Savouret, J. F., Misrahi, M., Milgrom, E. 1990.** Molecular action of progesterone. *Resultados de la búsqueda*The International Journal of Biochemistry and Cell Biology
- Scamell, T. E., Price, K. J., Sagar, S. M. 1993.** Hypertermia induces c-Fos expression in the preóptica area. *Brain Research*: 618: 303-307.
- Schule, R., Evans, R. M. 1991.** Cross-coupling of signal transduction pathways: Zinc finger meets leucine zipper. *Trends in Genetics*: 7: 377-381.
- Sherman, M. R., Corvol, P. L., O'Malley, B. W. 1970.** Progesterone-binding components of chick oviduct. I. Preliminary characterization of cytoplasmic components. *The Journal of Biological Chemistry*: 245: 6085-6096.
- Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wada, T., Kurihara, Y., Imai, T., Wang, Y., Ogata, M., Nishimatsu, H., Moriyama, N., Oh-hashii, Y., Morita, H., Ishikawa, T., Nagai, R., Yazaki, Y., Matsushima, K. 2000** ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *The Journal of Clinical Investigation*: 105: 1345-1352.
- Shyamala, G., Schneider, W., Schott, D., 1990.** Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology*: 126: 2882-2889.

- Sinchak, K., Micevych, P. E. 2001.** Progesterone blockade of estrogen activation of μ -opioid receptors regulates reproductive behavior. *Journal of Neuroscience*: 21: 5723–5729.
- Soderqvist, G., von Schoultz, B., Tani, E., Skoog, L. 1993.** Estrogen and progesterone receptor content in breast epithelial cells from healthy women during the menstrual cycle. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* : 168: 874-879.
- Spelsberg, T. C., Steggle, A. W., Chytil, F., O'Malley, B. W. 1972.** Progesterone-binding components of chick oviduct. V. Exchange of progesterone-binding capacity from target to nontarget tissue chromatin. *The Journal of Biological Chemistry*: 247: 1368-1374.
- Tanaka, N., Espey, L. L., Stacy, S., Okamura, H. 1992.** Epostane and indomethacin actions on ovarian kallikrein and plasminogen activator activities during ovulation in the gonadotropin-primed immature rat. *Biology of Reproduction*: 46: 665–670.
- Turner, C. 1977.** Progesterone and progestins in the male reproductive system. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 286: 313-320.
- Tibbetts, T. A., Mendoza-Meneses, M., O'Malley, B. W., Conneely, O. M. 1998.** Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biology of Reproduction*: 59: 1143-1152.
- Tirindelli, R., Mucignat-Caretta, C., Ryba, N. J. 1998.** Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends in Neurosciences*: 21: 482-486.
- Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M-P., Chambon, P. 1988,** The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature (London)*: 333: 185–188.
- Tsai, M. J., O'Malley, B. W. 1994.** Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Review of Biochemistry* : 63: 451-486.
- Tung, L., Mohamed, M. K., Hoeffler, J. P., Takimoto, G. S., Horwitz, K. B. 1993.** Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without

binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Molecular Endocrinology*: 7: 1256-1265.

Tzschentke, T. M. 1998. Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology* : 56: 613-672.

Uphouse, L., Hiegel, C., Guptarak, J., Maswood, N. 2009. progesterone reduces the effect of the serotonin 1B/1D receptor antagonist, GR 127935, on lordosis behavior. *Hormones and Behavior*: 55: 169-174.

van Straaten, F., Müller, R., Curran, T., van Beveren, C., Verma, J. M. 1983. Complete nucleotide sequence of a human c-oncogene: deduced amino acid sequence of the human c-Fos protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*: 80: 3183-3187.

Vegeto, E., Allan, G. F., Schrader, W. T., Tsai, M-J., McDonnell, D. P., O'Malley, B. W. 1992. The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell*: 69: 703-713.

Vegeto, E., Shahbaz, M. M., Wen, D. X., Goldman, M. E., O'Malley, B. W., McDonnell, D. P. 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Molecular Endocrinology*: 7: 1244-1255.

Vincent, P. A., Etgen, A. M. 1993. Steroid priming promotes oxytocin-induced norepinephrine release in the ventromedial hypothalamus of female rats. *Brain Research* : 620: 189-194.

Wei, L. L., Leach, M. W., Miner, R. S., Demers, L. M. 1993. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* : 195: 525-532.

Wei, L. L., Norris, B. M., Baker, C. J. 1997. An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PRC, forms heterodimers with PRB but interferes in PRB-DNA binding. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. *Mol. Biol*: 62: 287-297.

- Weigel, N. L. 1994.** Receptor Phosphorylation. In: Tsai, M.-J., O'Malley, B.W. (Eds.), Mechanism of steroid hormone regulation of gene transcription. R. G. Landes Company, Austin, pp. 93–110.
- Wen, D. X., Xu, Y. F., Mais, D. E., Goldman, M. E., McDonnell, D. P. 1994.** The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Molecular and Cellular Biology*: 14: 8356-8364.
- Wersinger, S. R., Baum, M. J., Erskine, M. S. 1993.** Mating-induced FOS-like immunoreactivity, in the rat forebrain: a sex comparison and a dimorphic effect of pelvic nerve transection. *Journal of Neuroendocrinology* . 5: 557-568.
- Westley, B. R., May, F. E. 1994.** Role of insulin-like growth factors in steroid modulated proliferation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* : 51: 1-9.
- White, N. R., Barfield, R. J. 1989.** Playback of female rat ultrasonic vocalizations during sexual behavior. *Physiology and Behavior* : 45: 229-233.
- Wilcox, J. N., Roberts, J. L. 1985.** Estrogen decreases rat hypothalamic proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*: 117: 2392-2396.
- Wood, R. I. 1997.** Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Hormones and Behavior*: 32: 40-45.
- Wysocki, C. J. 1979.** Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*: 3: 301-341.
- Yamanaka, T., Hirata, S., Shoda, T., Hoshi, K. 2002.** Progesterone receptor mRNA variant containing novel exon insertions between exon 4 and exon 5 in human uterine endometrium. *Endocrine Journal*: 49: 473–482.
- Ylikomi, T., Gasc, J. M., Isola, J., Baulieu, E. E., Tuohimaa, P. 1985.** Progesterone receptor in the chick bursa of fabricius: characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology*: 117: 155-160.

Yoshimura, Y., Hosoi, Y., Bongiovanni, A. M., Santulli, R., Atlas, S. J., Wallach, E. E. 1987. Are ovarian steroids required for ovum maturation and fertilization? Effects of cyanoketone on the in vitro perfused rabbit ovary. *Endocrinology*: 120: 2555-2561.

Zerial, M., Toschi, L., Ryseck, R., Schuermann, M., Müller, R., Bravo, R. 1989. The product of a novel growth activation gene, fosB, interacts with jun proteins enhancing their DNA binding affinity. *The EMBO Journal*: 8: 805-813.