



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efectos del gestodeno y de su metabolito reducido 3-beta, 5-alfa tetrahydrogestodeno sobre el contenido de las isoformas del receptor a progesterona en el útero y el hipotálamo de la rata.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

EMMANUELLE ALVARADO ÁLVAREZ



DIRECTOR DE TESIS
Dr. Ignacio Camacho Arroyo

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente.

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

“Efectos del gestodeno y de su metabolito reducido 3 beta, 5 alfa tetrahydrogestodeno sobre el contenido de las isoformas del receptor a progesterona en el útero y el hipotálamo de la rata”

realizado por **Alvarado Álvarez Emmanuelle**, con número de cuenta **09650420-0**, quien opta por titularse en la opción **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Christian Humberto Guerra Araiza

Propietario M. en C. Gabriela González Agüero

Tutor(a) Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Propietario

Suplente Biól. Exp. Edith Araceli Cabrera Muñoz

Suplente Biól. Teresa Neri Gómez

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Univeritaria, D. F., a 20 de febrero del 2007
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGIA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Este proyecto de investigación se realizó en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Ignacio Camacho Arroyo con el apoyo del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP), Facultad de Química, U.N.A.M. No. 6190-07.

Agradecimientos

Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Gracias por haber aceptado dirigir este trabajo de tesis, por toda la enseñanza directa e indirecta, así como tu guía, infinita paciencia y comentarios referentes no solo a este trabajo sino a muchos otros aspectos de quien la escribía.

Dr. Christian Guerra Araiza

Siempre es grato tener a alguien con tanto conocimiento cerca, y más aún el que esa persona sea no solo una guía importante en el camino, sino también una fuente de enseñanza y aprendizaje.

Dr. Gustavo García de la Mora

Por haber proporcionado los fármacos utilizados para el desarrollo de este proyecto.

Dr. Marco Antonio Cerbón

No fueron pocos los comentarios que me sirvieron para entender más a fondo el funcionamiento de las hormonas esteroides y de su metabolismo.

M. en C. Gabriela González Agüero, M. en C. Olga Villamar Cruz, Dra. Milena Saqui Salces, B.E. Edith Araceli Cabrera Muñoz, Biol. Teresa Néri Gómez, así como todos mis demás compañeros del laboratorio ex-202 y ahora 107 (Ivan, Andrea RN, Tania, Aliesha, etc.)

Gracias por el apoyo brindado a lo largo de TODO lo que implicó el desarrollo del presente trabajo (extracción de muestras, diseños, explicaciones, apoyo en información, análisis y sobre todo las revisiones y comentarios) y también estar ahí para platicar sobre temas diversos y permitirme aprender de todos y cada uno de ustedes.

Dedicatorias

María del Carmen Álvarez Monroy

Con profundo e inmenso amor, por tu ejemplo, paciencia motivación y apoyo incondicional. Te agradezco profundamente por esta meta alcanzada, que también es tuya.

Alfonso Alvarado López

Mi desarrollo no habría sido el mismo sin escucharte, y motivarme para hacer siempre algo más, y después de tantos árboles me percaté que también buscabas, desde lejos, mi desarrollo.

Aída Alvarado Álvarez (y su ahora enorme Familia)

Por permitirnos aprender el uno del otro y por el ejemplo que siempre me has dado al luchar por lo que más deseas.

Erika Ledezma Rivera

Por brindarme palabras de aliento que me motivaron a no desistir en los momentos de tristeza, desánimo, y porque no solo en momentos difíciles me has apoyado, sino también porque has creído en mí. Por darme el placer de disfrutar de la luz de tu sonrisa.

Familia Álvarez (Rivera y Sánchez, junto con sus derivados y complementos Mondragón, Reyes, Salas, Álvarez, Monterrubio, Gallegos, Figueroa)

Gracias por estar en los momentos difíciles y alegres, y por haberme motivado con su ejemplo. Gracias por apoyarme.

Lilia y Tano

Gracias por haber estado ahí para fomentar mi curiosidad y habilidades.

A Usted.

A Ti.

“¿Qué crees que respondería si le dijeran que hasta entonces no ha visto más que fantasmas, que ahora tiene ante los ojos objetos más próximos a la verdad?”

Platón. La República. Libro VII.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
2	ANTECEDENTES	4
2.1	ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES	4
2.1.1	<i>Generalidades</i>	4
2.1.2	<i>La progesterona</i>	6
2.2	EL RECEPTOR A PROGESTERONA (RP)	11
2.2.1	<i>Características principales del RP</i>	11
2.2.2	<i>Isoformas del RP</i>	15
2.2.3	<i>Regulación de la expresión de las isoformas del RP</i>	18
2.2.4	<i>Regulación del RP a nivel de la proteína</i>	20
2.3	ANTICONCEPCIÓN	22
2.3.1	<i>Métodos anticonceptivos</i>	22
2.3.1.1	Determinación de la Eficiencia de un Anticonceptivo	24
2.3.1.2	Métodos Naturales.....	25
2.3.1.3	Dispositivos Intrauterinos (DIU).....	26
2.3.1.4	Anticonceptivos de Acción Local	27
2.3.1.5	Métodos Quirúrgicos.....	28
2.3.1.6	Anticonceptivos Hormonales.....	30
2.3.2	<i>El gestodeno</i>	33
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
4	HIPÓTESIS	36
5	OBJETIVOS	36
5.1	OBJETIVO GENERAL	36
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
6	MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y TRATAMIENTOS	37
6.2	OBTENCIÓN DEL TEJIDO	38
6.3	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	38
6.4	WESTERN BLOT	38
6.5	ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
7	RESULTADOS	39
8	DISCUSIÓN	43
9	CONCLUSIONES	44
10	REFERENCIAS	45
11	APÉNDICE	60
11.1	REACTIVOS.....	60
11.2	SOLUCIONES.....	60
11.3	PREPARACIÓN DE LAS HORMONAS.....	61
11.3.1	<i>Preparación de la Progesterona (P4)</i>	61
11.3.2	<i>Preparación del Estradiol (E2)</i>	61

Resumen

El gestodeno (GSD) es una de las progestinas sintéticas más efectivas utilizadas como anticonceptivos orales disponibles en el mercado. El GSD puede llevar a cabo sus efectos a través de la interacción con el receptor a progesterona (RP), el cual presenta dos isoformas denominadas RP-A y RP-B con distinta regulación y función. El GSD tiene una afinidad por el RP similar a la progesterona (P_4), pero no se une al receptor a estrógenos (RE); sin embargo su metabolito reducido en el anillo A, el $3\beta,5\alpha$ tetrahydrogestodeno ($3\beta,5\alpha$ GSD) si, y posee actividad estrogénica. Sin embargo se desconoce si estas progestinas modifican el contenido de las isoformas del RP in vivo; por lo que en el presente estudio se determinó el papel que tienen el GSD y el $3\beta,5\alpha$ GSD en la regulación de dichas isoformas en dos tejidos hormonoregulados como son el útero y el hipotálamo de la rata. Para lo cual se ovariectomizaron ratas de 180-220 g, a las cuales se les aplicaron vía subcutánea los siguientes tratamientos: 1) Vehículo, dos días (aceite de maíz/propilenglicol 10%); 2) E2, dos días (10 μ g); 3) E2, dos días + P_4 , dosis única al tercer día (1 mg); 4) GSD, dos días (300 μ g); 5) $3\beta,5\alpha$ GSD, dos días (300 μ g); 6) E2, dos días + GSD, dosis única al tercer día; y 7) E2, dos días + $3\beta,5\alpha$ GSD, dosis única al tercer día. Mediante la técnica de Western Blot se detectaron las isoformas del RP. Los resultados obtenidos muestran que existe una regulación diferencial en el contenido del RP por GSD y $3\beta,5\alpha$ GSD, ya que en el útero el contenido de RP-A se incrementó significativamente con GSD y con $3\beta,5\alpha$ GSD sin que hubiera diferencias significativas entre éstos dos, en tanto que el contenido de RP-B no se modificó significativamente con ninguno de los tratamientos. En el caso del hipotálamo hubo un incremento en el contenido de ambas isoformas por efecto del GSD y del $3\beta,5\alpha$ GSD.

1 Introducción

La progesterona (P_4) y el estradiol (E2) son hormonas sexuales fundamentales en la reproducción. Muchos de sus efectos están mediados por receptores nucleares. El receptor a P_4 (RP) presenta dos isoformas (RP-A y RP-B) con distinta función y regulación.

La P_4 y el E2 se han utilizado ampliamente como anticonceptivos orales. Una progestina en combinación con un estrógeno es la formulación más utilizada para la anticoncepción (Punyadeera et al, 2002). Sin embargo los efectos y los mecanismos por los cuales estos anticonceptivos y sus metabolitos actúan no han sido dilucidados por completo.

Por lo que en este trabajo se estudiaron los efectos de un anticonceptivo oral usado ampliamente en el ser humano: El gestodeno (GSD) que se une al RP y su metabolito reducido en el anillo A, 3β - 5α tetrahydrogestodeno ($3\beta,5\alpha$ GSD) que se une al receptor a estrógenos (RE) sobre el contenido de las isoformas del RP en el útero y el hipotálamo de la rata.

Mediante la técnica de Western Blot se detectaron las isoformas del RP. Los resultados obtenidos muestran que existe una regulación diferencial en el contenido del RP por GSD y $3\beta,5\alpha$ GSD, ya que en el útero el contenido de RP-A se incrementó significativamente con GSD y con $3\beta,5\alpha$ GSD sin que hubiera diferencias significativas entre éstos dos, en tanto que el contenido de RP-B no se modificó significativamente con ninguno de los tratamientos. En el caso del hipotálamo hubo un incremento en el contenido de ambas isoformas por efecto del GSD y del $3\beta,5\alpha$ GSD.

2 Antecedentes

2.1 *Estructura y función de las hormonas esteroides*

2.1.1 Generalidades

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

Las hormonas esteroides desempeñan un papel muy importante en la regulación de múltiples procesos biológicos en los mamíferos, entre ellos destacan la homeostasis hidrolítica, el dimorfismo sexual, la función reproductiva y la respuesta al estrés. Entre las hormonas esteroides se encuentran los estrógenos, las progestinas, los andrógenos, los glucocorticoides y los mineralocorticoides (González-Arenas et al., 2001). Estas hormonas modifican la actividad celular al interactuar con sus receptores específicos. Los receptores a hormonas esteroides son proteínas que en su mayoría se localizan en el núcleo de la célula y pertenecen a una familia de factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos positiva o negativamente a través de la interacción con distintas secuencias en el DNA denominadas elementos de respuesta hormonal (Zhang et al., 1996).

Los esteroides son usados comúnmente en la práctica clínica. Los estrógenos solos o en combinación con progestágenos son usados en la terapia de reemplazo hormonal (HRT por sus siglas en inglés; Greendale et al., 1999) y proveen beneficios al reducir los síntomas postmenopáusicos (Sherwin, 1996), la morbilidad, mortalidad cardiovascular (Newton, 1998) y actúan como anticonceptivos (Huezo, 1998), entre otros. Por otro lado, los antagonistas a estas hormonas son utilizados como abortivos (anti-P₄) y los antiestrógenos (anti-E₂) sin embargo, son utilizados comúnmente en la prevención y tratamiento del cáncer de mama (Powles, 1997;

McGregor y Jordan, 1998). Los beneficios de estos esteroides están limitados por los efectos secundarios que surgen de desordenes en la función endometrial, la cual está aún muy poco estudiada (Oehler et al., 2000)

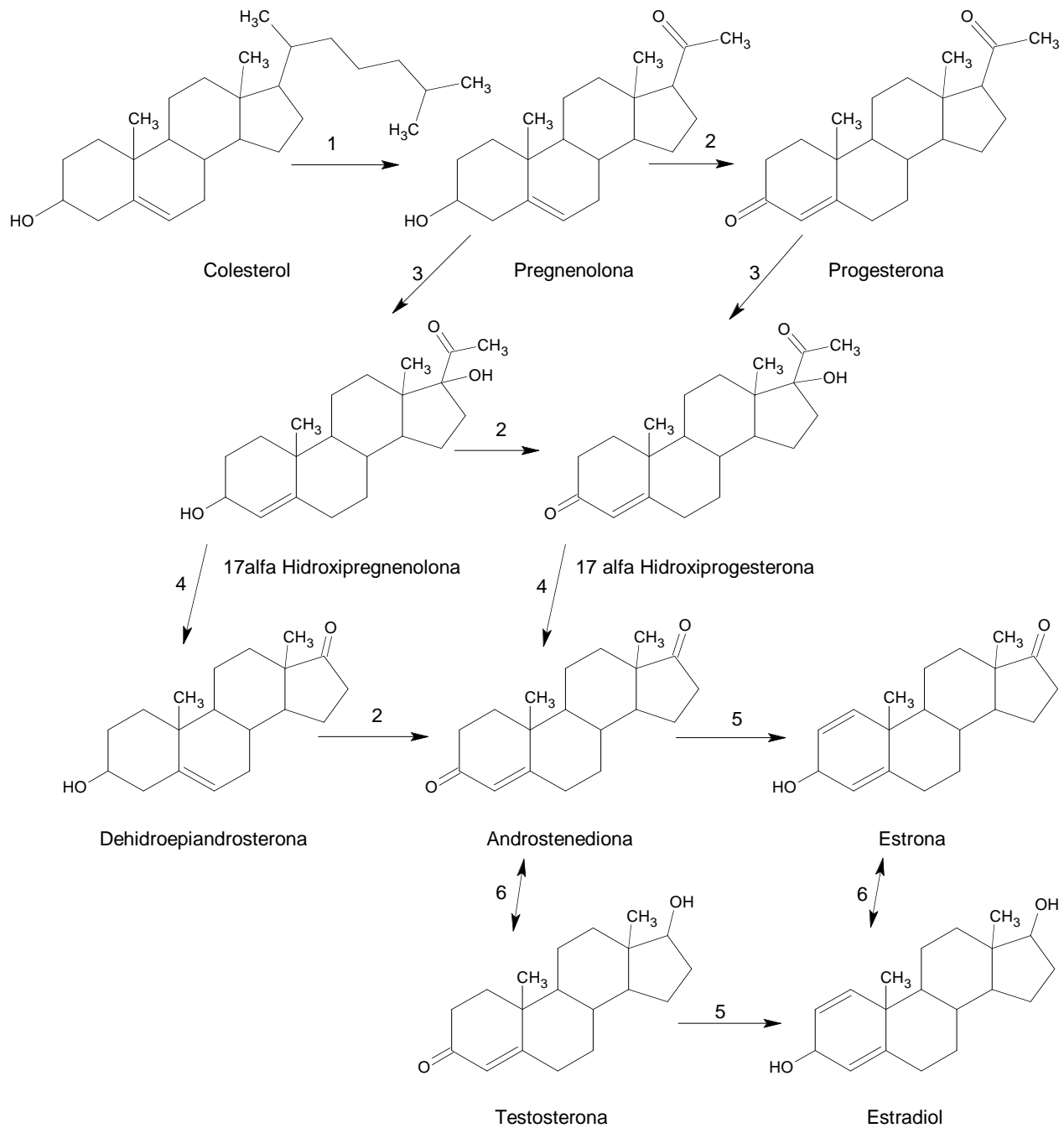


Figura 1. Síntesis de las hormonas esteroides. 1) 20, 22 desmolasa; 2) 3β-OH-esteroide deshidrogenasa; 3) 17α-hidroxilasa; 4) 17, 20-esteroide liasa; 5) Aromatasa; 6) 17β-OH-esteroide deshidrogenasa. (Gore-Langton, 1988).

2.1.2 La progesterona

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

La estructura química de la P₄ y de sus metabolitos (derivados hidroxilados o reducidos) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono (Figura 2). Esta hormona se sintetiza principalmente en el retículo endoplásmico liso en las células de cuerpo lúteo, en el ovario, durante el ciclo menstrual (Hsueh et al., 1984; Hutchison et al., 1986). Su síntesis está regulada por numerosas hormonas como la luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), las prostaglandinas y los agentes β-adrenérgicos (Graham et al., 1995). Otros órganos donde también se ha demostrado la síntesis de P₄ son la corteza adrenal, la placenta (Goroscope y Freeman, 1985; Perrot-Applanat y David-Ferreira, 1982) y el testículo (Weisz y Ward, 1980; Dalkin et al., 1992). En el sistema nervioso central (SNC) la P₄ se sintetiza desde etapas embrionarias en neuronas, en células gliales de la corteza cerebral y del cuerpo estriado de la rata desde el día 17 de la gestación (Zwain y Yen, 1999; Ukena et al., 1999).

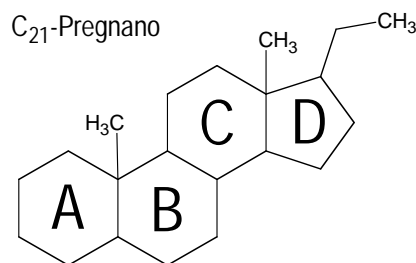


Figura 2. Estructura del C₂₁ Pregnano. Las letras muestran la denominación de cada uno de los anillos de la estructura principal de todas las hormonas esteroides. (Gore-Langton, 1988).

La P₄ participa en un amplio rango de actividades biológicas en numerosos tejidos como lo que se muestra en la Tabla 1. Sus efectos pueden ser estimuladores como en el caso de la liberación de la GnRH (Ke y Ramírez, 1987), de la dopamina (Dluzen y Ramírez, 1991) en la inducción de la lordosis (Schaeffer et al., 1990); en la síntesis de uteroglobina (Beier, 1968), en la reacción acrosomal y en el flujo Ca²⁺ en el espermatozoide (Meizel y Turner, 1991; Tesarik et al., 1992) y durante la diferenciación sexual (Guerra-Araiza et al, 2000); o bien, inhibidores como

en la contractilidad uterina (Csapo y Resch, 1979) y en la síntesis de norepinefrina inducida por AMPc en el hipotálamo (Petitti y Etgen, 1992).

La síntesis de P_4 se inicia con la conversión del colesterol a pregnenolona y posteriormente a P_4 (Figura 3), mediada por las enzimas 20,22-esteroide liasa y 3β -OH-esteroide deshidrogenasa que se localizan en los tejidos u órganos anteriormente citados.

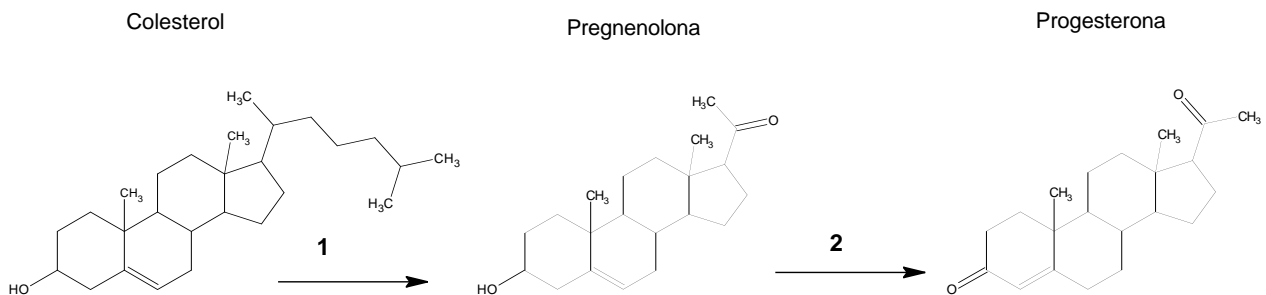
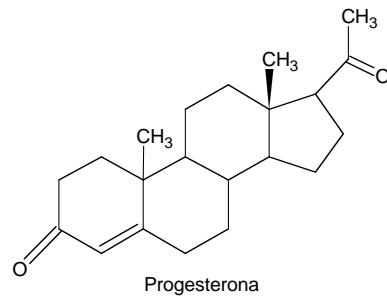
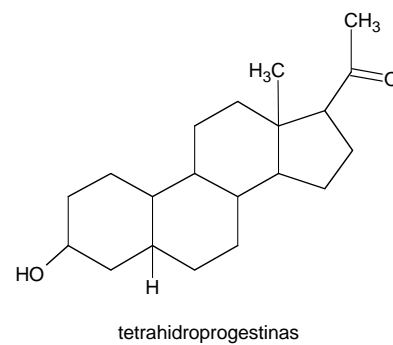
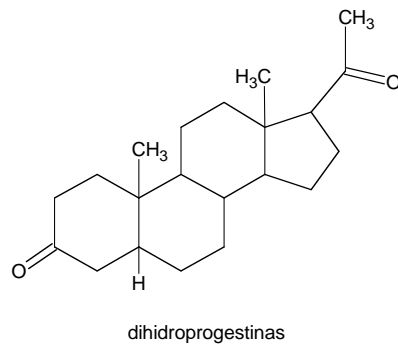


Figura 3. Biosíntesis de la P_4 . La biotransformación de colesterol a P_4 implica tres cambios estructurales en la molécula: a) Pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en el C-17. b) La oxidación del grupo alcohol en el C-3. c) La migración del doble enlace del anillo B al anillo A. (1)= 20,22-esteroide liasa, (2) 3β -OH-esteroide deshidrogenasa (Gore-Langton , 1988).

La P_4 puede reducirse para formar varios metabolitos, los cuales pueden incrementar, prolongar o terminar los efectos de la P_4 o bien proporcionar mecanismos alternativos que modulen las acciones de la hormona (Karavolas y Hodges, 1990) (Figura 4). Existen dos tipos de metabolitos: los reducidos en el anillo A: Dihidroprogestinas (5β ó 5α -progestinas), las cuales tienen una gran potencia anestésica y las tetrahidropogestinas (reducción en los carbonos 5 y 3) que modulan la excitabilidad neuronal y la producción y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Existen otros metabolitos reducidos en el carbono 20 y en el carbono 17, la 20α -hidroxiprogesterona y la 17α -hidroxiprogesterona respectivamente, los cuales presentan numerosas actividades en el organismo. Los metabolitos se sintetizan en el ovario, el hígado, el riñón, la placenta y el SNC.



a) Metabolitos reducidos en el anillo A



b) Metabolitos modificados en C-17 y C-20

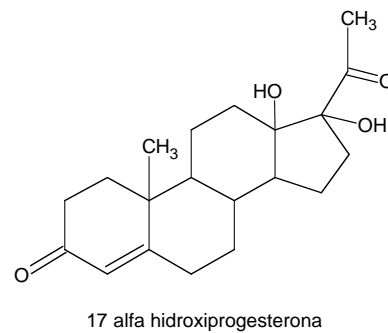
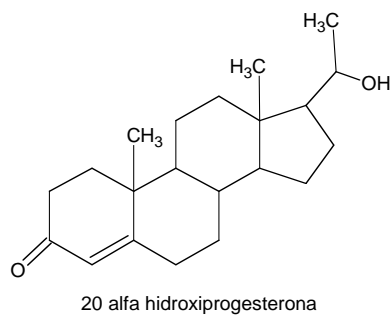


Figura 4. Principales metabolitos de la P₄. A) Metabolitos reducidos en el anillo A en C-5 y C-3 por la 5 α -esteroide reductasa y la 3 α -esteroide reductasa, respectivamente. B) metabolitos reducidos en C-17 y C-20 sintetizados por la 17 α -esteroide hidroxilasa y la 20 α -esteroide reductasa, respectivamente.

Los principales órganos blanco de la P₄ son: El útero, en donde regula su proliferación y diferenciación; el miometrio, en donde controla su contractilidad y mantiene las condiciones

adecuadas para la implantación del embrión (Graham y Clarke, 1997); en el ovario, en donde interviene en la maduración y liberación del ovocito maduro; en la glándula mamaria, en donde promueve la proliferación y diferenciación del tejido alveolar de la misma, además de la secreción de leche después del nacimiento (Graham y Clarke, 1997). En el cerebro regula la excitabilidad neuronal, el sueño, la reproducción y la conducta sexual (Camacho-Arroyo et al., 1994b, 1995 y 1999), así como la temperatura corporal durante el ciclo menstrual (Ganong, 1993).

Tabla 1. Acciones fisiológicas de la P₄

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

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

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

sistemas de segundos mensajeros, interacción con receptores membranales específicos e interacción con receptores a neurotransmisores como el GABA_A (Mahesh et al., 1996; Figura 5).

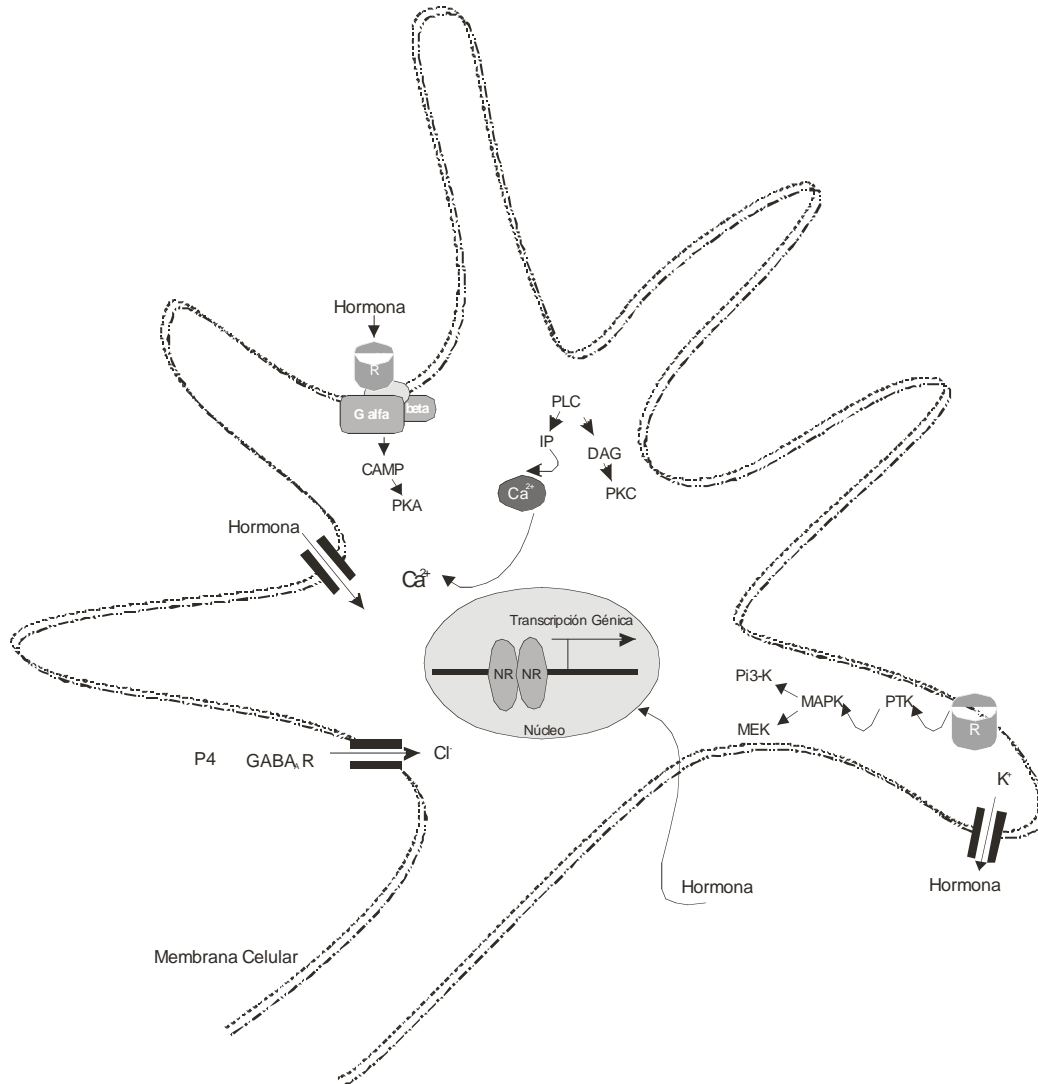


Figura 5. Mecanismos de acción de la (P₄). 1) Unión con un receptor intracelular (RP) regulando así la transcripción de genes específicos a través de elementos de respuesta a P₄ (ERP). 2) La acción de la P₄ sobre bicapas fosfolípicas. 3) Sistemas de receptores acoplados a segundos mensajeros como el de dopamina y los receptores de factores de crecimiento (RFC). 4) Interacción con receptores membranales a P₄. 5) Interacción con receptores a neurotransmisores como el receptor GABA_A (Camacho-Arroyo, 2003).

Una vez que la P_4 y sus metabolitos han llevado a cabo su función en el organismo, su catabolismo ocurre en dos etapas secuenciales:

1. La reducción en el carbono 20 y del anillo A en los carbonos 3 y 5.
2. La formación de los glucorónidos, donde se incrementa la polaridad de la molécula formando compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción por vía urinaria.

El proceso de reducción de la P_4 ocurre inicialmente en el carbono 20 dando lugar a la formación de la 20α y 20β dihidroprogesterona que tienen actividad biológica. Posteriormente formará pregnandiolos o pregnantrioles, los cuales al reducirse a glucorónidos serán excretados por la orina (Figura 6).

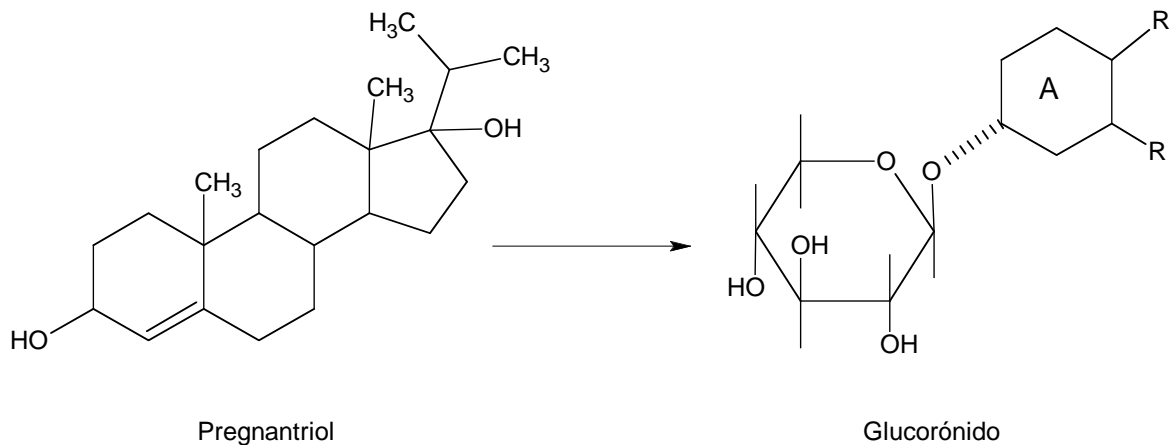


Figura 6. Principales catabolitos de la P_4 donde A es el anillo "A" de los esteroides y "R" simboliza la posición del anillo B.

2.2 *El receptor a progesterona (RP)*

2.2.1 Características principales del RP

La P_4 lleva a cabo la mayoría de sus efectos en la célula a través de la interacción con el RP, el cual pertenece a la superfamilia de receptores a hormonas esteroides cuyos miembros coordinan la morfogénesis y la homeostasis en respuesta a la unión con su ligando (Kastner et

al., 1990). El RP es un factor de transcripción que regula la expresión de genes a través de la interacción con secuencias específicas en el DNA (elementos de respuesta hormonal).

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

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

1) Dominio de transactivación (A/B): Exón 1 (2380 pb). Participa en la regulación de la transcripción de genes blanco.

2) Dominio de unión al DNA (C): Exones 2 (152 pb) y 3 (117 pb). Participa en la dimerización con otro receptor y en la unión al DNA a través de la presencia de dedos de Zinc.

3) Dominio de unión a proteínas de choque térmico (Hsp90; D): Exón 4 (306 pb). Participa en procesos de estabilización del receptor y en la translocación al núcleo.

4) Dominio de unión al esteroide (E): Exones 5 (145), 6 (131), 7 (158), 8 (153 pb). Interacción con el ligando y función de transactivación.

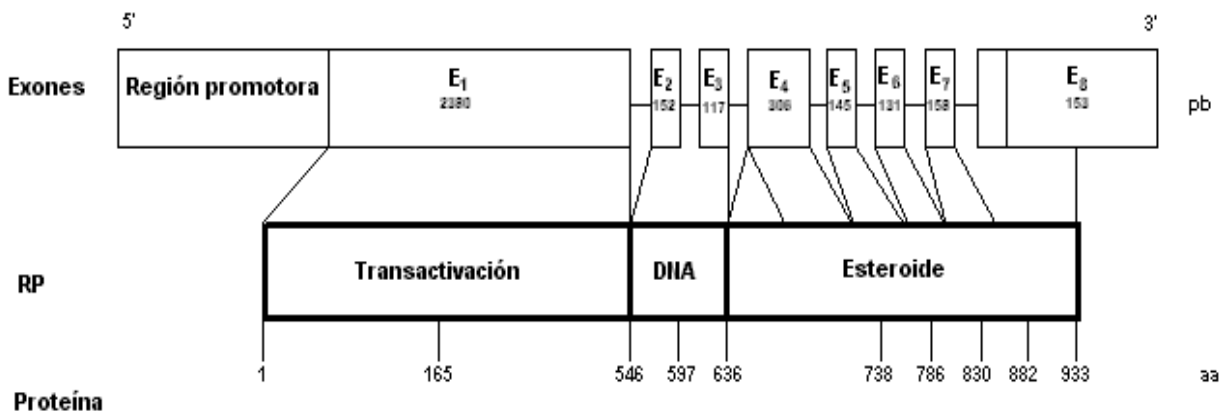


Figura 7. Estructura del gen del RP humano. El gen del RP está constituido por una región promotora, una región amino terminal de transactivación, una región de unión al DNA y otra de unión a la hormona. Este gen constituido por 8 exones codifica para una proteína que pesa aproximadamente 120 kDa (Mirashi et al., 1993).

Se ha detectado la presencia del RP en diferentes tejidos del aparato reproductivo de distintos grupos de vertebrados (aves, reptiles, roedores, conejos, perros, vacas, primates); en las células de la granulosa en el ovario (Milgrom et al., 1970; Feil et al., 1972) en las trompas de falopio, vagina, testículo (Terner et al., 1977); en las células de músculo de arterias uterinas (Perrot-Applanat y David-Ferreira, 1982); así como en el oviducto y bolsa de Fabricio de pollo (Ylikomi et al., 1985; González-Morán y Camacho-Arroyo, 1998). El RP se ha localizado también en la glándula mamaria tanto en tejido normal como neoplásico (Pollow et al., 1977; Horwitz y McGuire, 1975) así como en distintas áreas del cerebro tales como el hipotálamo ventro-medial, el área preóptica, la corteza cerebral y el hipocampo (Warembourg et al., 1989; Camacho Arroyo et al., 1998). También se encuentra en el timo (Pearce et al., 1983), islotes pancreáticos (Green et al., 1978); en células osteoblásticas (Gunn et al., 1999) y el pulmón (Camacho-Arroyo et al., 1994a).

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

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

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

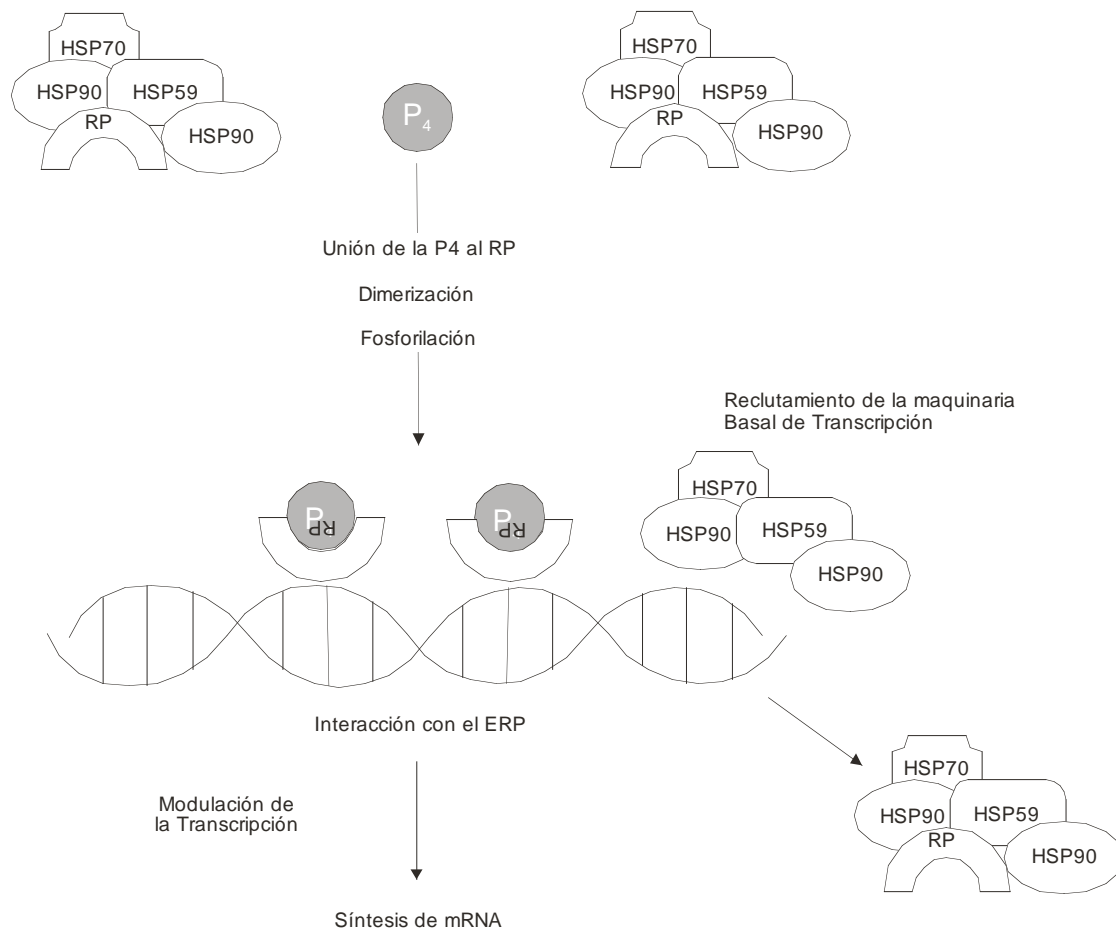


Figura 8. Mecanismo general de activación del RP por su ligando. La P₄ entra al núcleo y se une a su receptor. Esta unión produce un cambio conformacional en el receptor que aumenta su afinidad al DNA y así el complejo ligando-receptor interactúa con secuencias específicas llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE) lo cual modifica la transcripción del gen blanco (Giangrande et al., 1997).

El RP es regulado a la alta por estrógenos y a la baja por P₄ en muchos tejidos blanco, como el útero y el hipotálamo (Graham y Clarke, 1997; Camacho-Arroyo et al., 1994b; Mendoza-Rodríguez et al., 1999).

2.2.2 Isoformas del RP

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

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

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

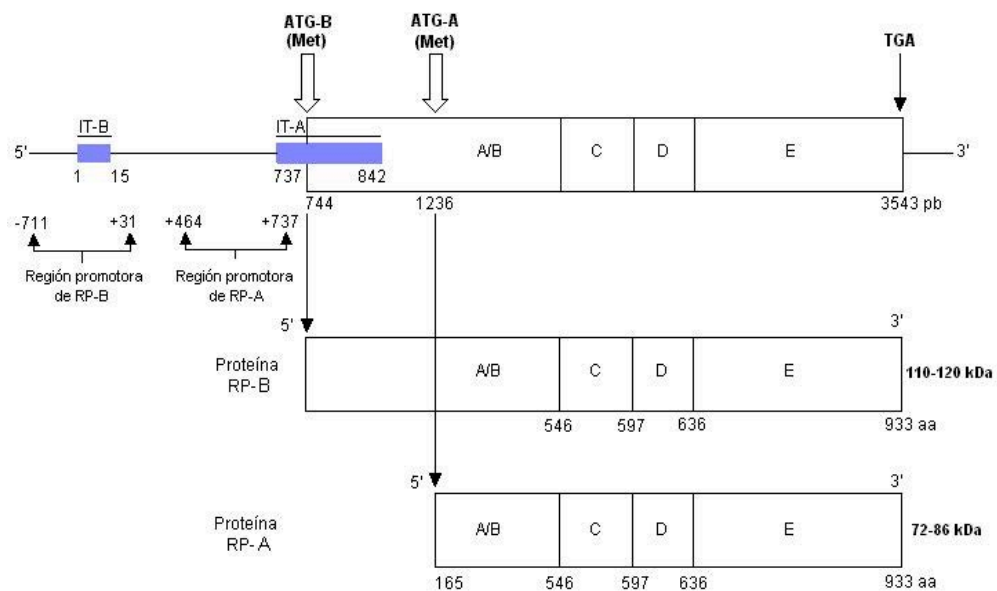


Figura 9. Organización de las isoformas del RP humano. Los números indican la posición de las bases y de los aminoácidos en el gen y en las proteínas de las isoformas de RP respectivamente. IT-B e IT-A: Sitios de inicio de la transcripción de las isoformas RP-B y RP-A respectivamente; A-E: dominios funcionales del RP; ATG-B y ATG-A: Inicio de la traducción de RP-B y RP-A respectivamente; Met: Metionina; TGA: Sitio de término de la transcripción (Kastner et al., 1990; Fujimoto et al., 1997).

Las isoformas del RP pueden tener diferentes funciones dependiendo del tipo celular, del gen blanco y del promotor (Tung et al., 1993). En muchos sistemas celulares la isoforma RP-B actúa como un activador transcripcional de genes como el del virus tumoral mamario de ratón, el gen que codifica a la tirosina aminotransferasa y a la timidina cinasa, mientras que el RP-A funciona como un fuerte represor de la actividad transcripcional mediada tanto por RP-B como por otros receptores a hormonas esteroides (Vegeto et al., 1993; Tung et al., 1993; Sartorius et al., 1994; Clemm et al., 1995) como el receptor a estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos (McDonell y Goldman, 1994).

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

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

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

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

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

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

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

Estas observaciones sugieren que una alteración en la expresión o actividades de ambas isoformas pueden tener importantes consecuencias en la capacidad de respuesta a la P_4 . La tasa de expresión de las dos isoformas varía en diferentes órganos y tejidos blanco (Ing et al., 1993), RP-A es predominante en el útero de roedores (50:1) así como en el sistema reproductivo de monos y humanos (2:1; Lessey et al., 1983). sugiriendo que la expresión

diferencial puede ser crítica para la respuesta celular apropiada a la P_4 (Camacho-Arroyo et al., 1998).

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

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

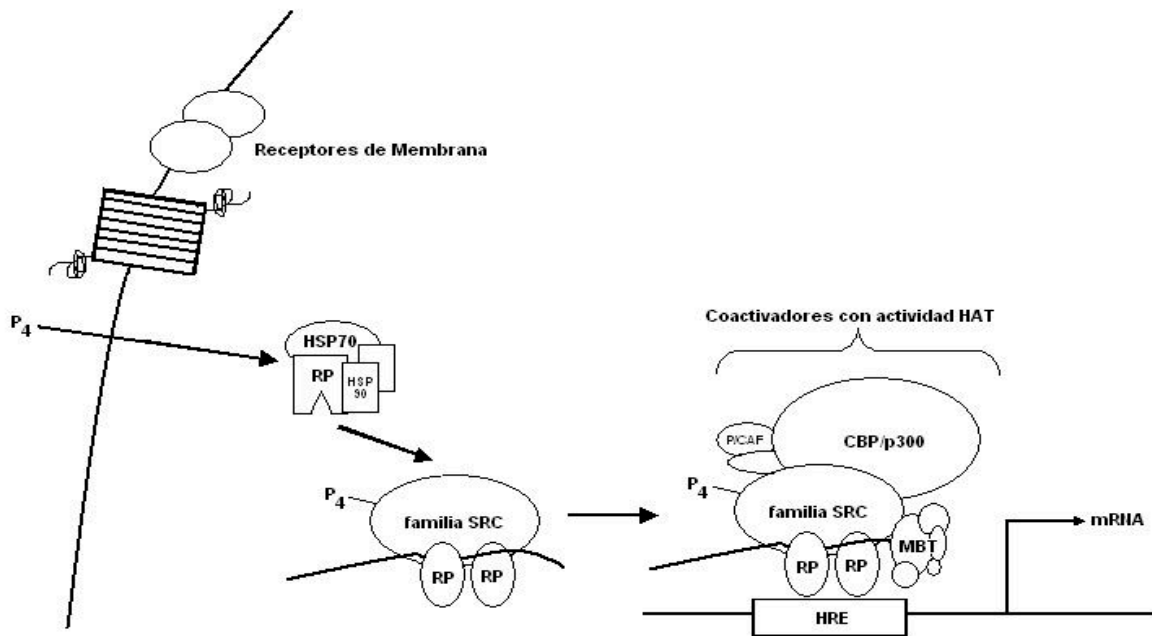


Figura 10. Activación del RP. El RP está presente en un complejo inactivo con proteínas de choque térmico (HSP); cuando la P_4 se une al RP las HSP se disocian y el RP sufre cambios conformacionales que le permiten unirse a un elemento de respuesta a hormonas (HRE), reclutar la maquinaria basal de transcripción (MBT) y coactivadores de la familia SRC. El complejo formado puede reclutar otros factores al promotor que pueden 1) Abrir la estructura de la cromatina a través de su actividad de Histona Acetiltransferasa (HAT) y, 2) contribuir a la estabilización del complejo de preiniciación. Las vías de señalización que regulan la actividad de cinasas y fosfatasas en la célula contribuyen a la activación del RP, modificando su fosforilación y la de los cofactores (Rowan et al, 2000).

2.2.3 Regulación de la expresión de las isoformas del RP

Se ha reportado la expresión del RP en diversas regiones cerebrales como el tálamo, el hipotálamo, el área preóptica, el hipocampo, el cerebelo, la corteza cerebral, la amígdala y el tallo cerebral (Camacho-Arroyo et al., 1994b; Cerbón et al., 1989; MacLusky y McEwen, 1978, Kastrup et al., 1999). Se ha detectado la presencia del RP desde etapas embrionarias en el hipotálamo de roedores de ambos sexos, su expresión diferencial en distintas regiones cerebrales, así como su modificación a lo largo del desarrollo (Wagner et al., 1998; Brown et al., 1990), en diferentes condiciones hormonales como sucede durante los ciclos estral, menstrual o en animales ovariectomizados tratados con E2 o P_4 (Camacho-Arroyo et al., 1998, Bethea et al., 1988, Guerra-Araiza et al., 2000).

En la mayoría de los tejidos estudiados se ha observado que la expresión del RP está regulada de manera positiva por estrógenos y de manera negativa por P₄. La regulación por estrógenos sucede principalmente a nivel transcripcional y está mediada por elementos de respuesta a estrógenos localizados en la región promotora del gen del RP o en regiones intragénicas del mismo (Kraus y Katzenellenbogen, 1993; Savouret et al., 1990). En el SNC de la rata la expresión del RP es inducida por estrógenos en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo, mientras que dicha inducción no sucede en la amígdala y el cerebelo (Cerbón et al., 1989; MacLusky y McEwen, 1978; Camacho-Arroyo et al., 1998).

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

Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación a la baja por P₄ son hasta el momento desconocidos. Debido a la carencia de elementos de respuesta a P₄ en el gen del RP en mamíferos, es posible que tal regulación ocurra a nivel de la proteína (Kraus y Katzenellenbogen, 1993; Savouret et al., 1990).

La tasa de expresión de las isoformas del RP varía de manera tejido-específica, en respuesta a los estímulos hormonales y de acuerdo a la etapa del desarrollo en la que se encuentre el organismo, sin embargo se ha reportado que hay una expresión diferencial entre las isoformas del RP, ya que se ha encontrado que para la corteza cerebral, el área preóptica y el hipotálamo la isoforma predominante en la rata recién nacida es RP-B, pero esta expresión se modifica al rededor del día 12, cuando la isoforma predominante es RP-A (Kato et al., 1993).

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

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

En el hipotálamo de ratas ovariectomizadas, la expresión de ambas isoformas del RP fue inducida por estrógenos y reducida por P_4 , y en el área preóptica éstos cambios sólo se presentaron en RP-B, mientras que en hipocampo la isoforma que presentó inducción con estrógenos fue RP-A, sin que la P_4 tuviera efectos en la expresión de ambas isoformas (Camacho-Arroyo et al., 1998). En condiciones fisiológicas como en el ciclo estral, RP-B fue predominante en el hipotálamo y en el área preóptica, mientras que en el hipocampo no se detectó una diferencia importante entre la expresión de las dos isoformas a nivel del RNAm (Guerra-Araiza et al., 2000).

2.2.4 Regulación del RP a nivel de la proteína.

Los mecanismos de acción de las hormonas esteroides han sido de los más estudiados y los que más han contribuidos al estudio de la regulación de la transcripción. Uno de los aspectos que están siendo investigados actualmente es el de estabilidad de sus receptores, es decir, su degradación y recambio, lo cual ayudará a entender el funcionamiento de estos receptores en diferentes condiciones fisiológicas.

En la mayoría de los tejidos la expresión del RP está regulada positivamente por estrógenos y negativamente por P_4 . La regulación por estrógenos ocurre principalmente a nivel transcripcional y está mediada por el RE a través de su interacción con elementos de respuesta a estrógenos localizados en la región promotora del gen del RP o en regiones intragénicas del mismo. En el SNC de la rata la expresión del RP es inducida por estrógenos en el hipotálamo, el área preóptica y el hipocampo, mientras que la amígdala es insensible a dicha regulación (Camacho-Arroyo et al 1998; Camacho-Arroyo, 2003). La regulación negativa del RP por su propio ligando ocurre a nivel de la proteína, al inducir la degradación de la misma como se detalla más adelante.

Es bien conocido que las proteínas de las células eucariontes sufren un continuo recambio, sin embargo, hay variaciones enormes entre ellas, y se sabe que pueden cambiar en

horas o en días. La degradación de las proteínas ocurre principalmente en el lisosoma y en el proteosoma 26S, que es un sistema localizado tanto en el núcleo como en el citoplasma que utiliza la célula para degradar proteínas que tienen una vida media corta, como son los factores de transcripción, reguladores del ciclo celular, protooncogenes o genes de inducción temprana (y por lo tanto son de recambio rápido) y los receptores a hormonas esteroides (Nawaz et al 1999). Las proteínas degradadas por el proteosoma necesitan estar ubiquitinadas lo cual implica la participación consecutiva de tres enzimas, la enzima activadora de ubiquitina, el complejo de enzimas conjugadoras de ubiquitina, y las ligasas de ubiquitina (Figura 11)

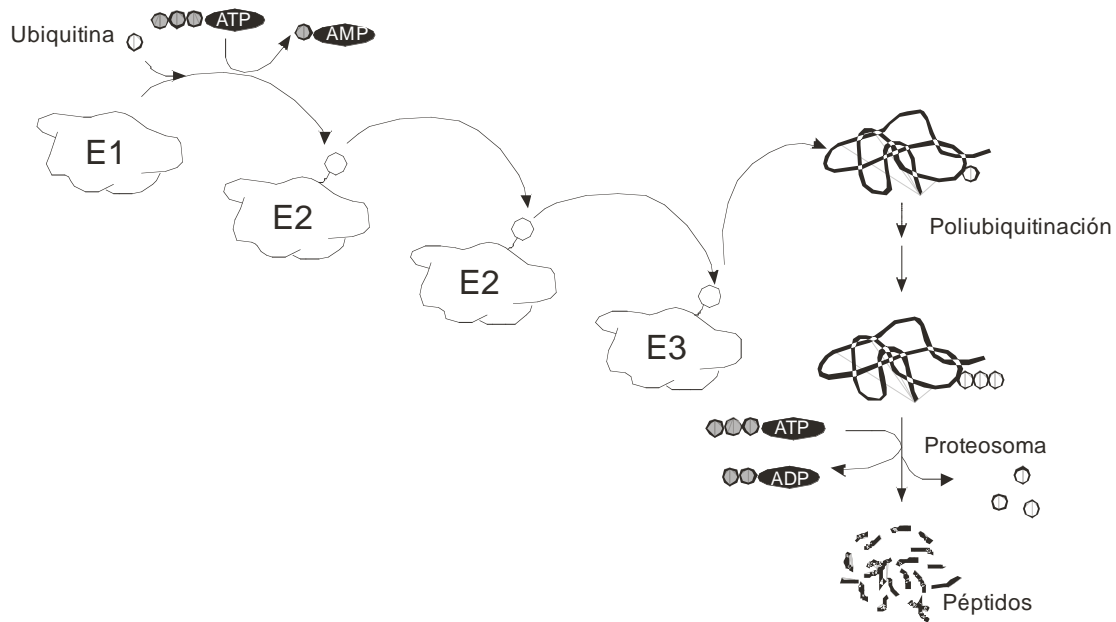


Figura 11. Ubiquitinación. Ubiquitinación por medio de la enzima activadora de ubiquitina (E1), el complejo de enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2), y las ligasas de ubiquitina (E3) (González Flores, et al, 2004)

En el caso del RP humano se ha observado que la P_4 induce la fosforilación del residuo Ser294 a través de la Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPKs). Esta fosforilación es una señal para la ubiquitinación del RP y su degradación por el proteosoma 26S, por lo que además de su papel en la activación transcripcional, la fosforilación es la señalización que promueve la regulación negativa del RP por su ligando (Lange et al, 2000). Después de ser fosforilado y poliubiquitinado, el RP es degradado por el proteosoma 26S, que se puede localizar tanto en el núcleo como en citoplasma.

Se ha reportado que en el oviducto de aves, en líneas celulares de cáncer de mama humano, en gonadotropos de la hipófisis de la rata y en diferentes regiones del SNC de la rata,

la regulación del contenido del RP por su propio ligando ocurre a nivel de la degradación de la proteína por el proteosoma 26S (Camacho-Arroyo et al 2002; Lange et al 2000).

2.3 Anticoncepción

2.3.1 Métodos anticonceptivos

La anticoncepción es la previsión temporal y reversible de la concepción que es la consecuencia directa de la fecundación del óvulo. Se entiende por anticonceptivo o contraceptivo al método destinado a prevenir en forma temporal y reversible la producción de la concepción en una pareja fértil como los que se muestran en la (Figura 12). El posible mecanismo de acción de los diversos métodos anticonceptivos vigentes en la actualidad, puede ser evaluado de acuerdo a si el método provoca:

- Inhibición de la ovulación
- Aceleración en el transporte del óvulo o del blastocisto (haciéndole llegar a la cavidad uterina en un momento prematuro para su implantación)
- Alteración de las condiciones metabólicas del endometrio.
- Efecto blastotóxico
- Modificación en las características bioquímicas y fisicoquímicas del moco cervical (impidiendo el adecuado transporte del espermatozoide)



Figura 12. Diversos métodos anticonceptivos usados en la actualidad. En la fotografía se aprecian de arriba hacia abajo el diafragma, diferentes presentaciones de la píldora, espumas y jaleas espermicidas, inyecciones hormonales, condón femenino, DIUs y condón masculino. (<http://www.stii.dost.gov.ph/sntpost/frames/OctoDec03/pg12.htm>)

Los procedimientos destinados a evitar la concepción se pueden clasificar en cinco grandes grupos que son:

1. Métodos Naturales
2. Dispositivos Intrauterinos (DIU)
3. Anticonceptivos de acción local
4. Métodos Quirúrgicos
5. Anticonceptivos Hormonales

2.3.1.1 Determinación de la Eficiencia de un Anticonceptivo

La eficiencia en el uso de un método anticonceptivo se define en términos de su capacidad para evitar los embarazos inesperados. Generalmente se expresa en términos de una tasa de fallas por cien años-mujer (1200 ciclos) de estar expuesta al riesgo de concebir. La base para calcular esta tasa de procesos se conoce como la “Fórmula de Pearl” que se expresa así:

$$\text{Tasa de fracasos} = \frac{\text{Embarazos Totales} \times (1200)}{\text{Meses totales de riesgo}}$$

En cualquier aplicación de la fórmula, el total de embarazos accidentales del numerador, debe incluir todas las concepciones, cualquiera que sea el resultado final; el factor 1200 es una constante que corresponde al número de meses que hay en cien años. El total de meses de riesgo, del denominador, se obtiene sumando los meses del período que se revisa (Ruiz-Durá, 1988).

La estandarización lograda con este índice se puede considerar como el número de embarazos inesperados que se presentaría ya sea, en cien mujeres que utilicen un método anticonceptivo especial durante un año o bien, en una mujer hipotética que experimente un siglo de fecundidad y de actividad sexual. En la Tabla 2 se presenta más información al respecto. Existen muchas pruebas de que, la completa ausencia de prácticas de control sobre la natalidad equivaldría a un total de aproximadamente 10 a 12 embarazos durante el período de vida reproductora promedio; y esta cifra parece ser constante de una sociedad a otra y entre grupos socioeconómicos distintos. (Ruiz-Durá, 1988).

Tabla 2. Principales métodos de control y prevención de la natalidad. Tabla que indica los nueve métodos principales de control de la natalidad por orden de eficacia (de arriba abajo). Las estadísticas se han tomado de muchos estudios distintos, y son útiles como indicadores de su eficacia (índice de Pearl). (Modificado de: Haverman, E. Control de la Natalidad, p.59, Time-Life Internacional, Nederland)

MÉTODO	EFICACIA (Número de embarazos probables por cada 100 mujeres que usan este método durante un año)	POSIBLES EFECTOS SECUNDARIOS	VISITA MÉDICA NECESARIA
ESTERILIZACIÓN	0.003	Ninguno	Operación por un cirujano
LA PILDORA	0.3	Aumento de peso, náuseas; generalmente terminan después de varios meses de tratamiento	En la mayor parte de los países debe ser recetada por un médico; casi todos recomiendan exámenes periódicos
DISPOSITIVOS INTRAUTERINOS	5	Pérdidas irregulares de sangre, incomodidad al principio	Deben ser insertados por un médico o técnico especializado; suele aconsejarse un examen anual
DIAFRAGMA O TAPÓN CERVICAL (CON POMADA)	12	La pomada o crema puede ocasionar una leve irritación	Debe hacerse sobre medidas tomadas por el médico
CONDON	14 (aumenta la eficacia si se usa con un anticonceptivo químico)	Ninguno	No
BARRERAS QUÍMICAS	20 (La espuma de aerosol es considerablemente más eficaz)	Leve irritación	No
MÉTODOS NATURALES	RECESO	18	Efectos psicológicos
	RITMO	24 (el uso del termómetro acrecienta mucho la eficacia)	Ninguno
	DUCHA	31	Ninguno

2.3.1.2 Métodos Naturales

Los llamados métodos naturales de regulación de la natalidad son aquellos que proponen impedir la concepción evitando las relaciones sexuales en el periodo fértil del ciclo menstrual femenino. Este tipo de métodos no utilizan ningún tipo de accesorio externo al cuerpo. Entre los métodos naturales se encuentran el *coitus interruptus* en el que se descarga el líquido seminal fuera de la vagina, la abstinencia de la relación sexual durante el período fecundo del ciclo menstrual (método de Ogino y Knaus) en el que la mujer se toma la temperatura rectal todas las mañanas a lo largo de un número razonable de ciclos consecutivos tratando de detectar una

elevación persistente (37.4° - 37.5° C) y detectar de esa forma el día de la ovulación (Corrado et al, 1982). Entre las más frecuentes están estos métodos.

2.3.1.3 Dispositivos Intrauterinos (DIU)

Por muchos siglos los árabes y turcos emplearon esta técnica para impedir la preñez en camellos, ya que era importante cuidar a los camellos hembra de un posible embarazo en las travesías por el desierto. La técnica consistía en introducir, a través de la vagina, en el útero del camello hembra, una piedra pequeña redondeada a aquellos animales que se preparaban para el viaje.

La historia del DIU como anticonceptivo en la especie humana data del siglo XVIII. En la actualidad el método consiste en introducir al interior de la cavidad uterina, a través del cuello uterino, un dispositivo de material plástico (polietileno) opaco a los rayos X y que contiene sulfato de Bario como elemento de contraste radiológico. Existen las más diversas formas de DIU (anillo, espiral, T, siete, etc.), a las que generalmente se les conoce con el nombre de quien lo diseñó. (Figura 13) (Ruiz-Durá, 1988).



Figura 13. Dispositivos Intrauterinos (DIUs). Diversas formas de DIUs elaborados con materiales plásticos (polietileno)

El mecanismo de acción de los dispositivos intrauterinos consiste principalmente en modificaciones bioquímicas del endometrio, infiltración linfocitaria, presencia de enzimas y aumento del peristaltismo de las Trompas de Falopio.

En los últimos años, a algunos de estos DIU (tipo T y 7) se les ha agregado cobre (a manera de un delgado alambre enrollado en espiral), que tiene un área de acción de por lo menos 200 mm² los cuales desprenden diariamente de 20 a 100 mg de este metal. El DIU es un método anticonceptivo cada vez más empleado. (Ruiz-Durá, 1988)

2.3.1.4 Anticonceptivos de Acción Local

Son los métodos anticonceptivos que actúan tratando de impedir la unión del espermatozoide con el óvulo, interponiendo una barrera generalmente al nivel de la vagina. Los métodos de barrera más frecuentes son: tabletas, óvulos, espumas usadas como espermicidas vaginales, diafragma vaginal, lavados vaginales, y condones masculino y femenino. (Figura 14).



Diafragma Vaginal y Espermicida



Condón Femenino



Condón Masculino

Figura 14. Anticonceptivos de acción local. Ejemplos de diversos métodos de barrera, entre los que se pueden apreciar el diafragma vaginal y espermicida, y los condones femenino y masculino.

Las tabletas, jaleas, espumas y óvulos vaginales actúan como anticonceptivos por medio de las sustancias espermaticidas que contienen. Asimismo están constituidas por dos componentes: una sustancia espermaticida (ácido bórico, acetato de mercurio) y una base inerte (jalea, crema, espuma). La primera inmoviliza y destruye a los espermatozoides y la segunda bloquea mecánicamente el cuello del útero o cervix. (Ruiz-Durá, 1988).

2.3.1.5 Métodos Quirúrgicos

Existen además de estos métodos temporales y reversibles, otros métodos que son definitivos e impiden posteriores embarazos llamados métodos quirúrgicos de esterilización. Existen tanto para la mujer como para el hombre. En la mujer se practica realizando una ligadura o sección de la Trompa de Falopio (Salpingoclasia; Figura 15) y ésta puede realizarse por vía abdominal o vaginal. Para realizar este procedimiento, se hacen una o dos pequeñas incisiones en el abdomen (generalmente cerca al ombligo) y en un laparoscopio (tubo flexible) se inserta un dispositivo similar a un telescopio pequeño. Luego, utilizando instrumentos que se insertan a través del laparoscopio, las trompas se coagulan (se queman) y se sellan por medio de cauterización o con un pequeño gancho que se ubica en la trompa. Después se sutura la incisión que se realizó en la piel. La paciente puede volver al hogar en unas pocas horas después del procedimiento. La salpingoclasia puede también realizarse después de un parto a través de una pequeña incisión cerca al ombligo o durante una cesárea.



Figura 15. Representación esquemática del Útero, Trompas de Falopio y Ovarios en la que puede apreciarse la sección en las Trompas de Falopio (Salpingoclasia) posterior a una intervención quirúrgica

En el hombre se practica la vasectomía, que sirve para ligar los conductos deferentes con el fin de provocar esterilidad permanente, evitando el paso de los espermatozoides fuera de los testículos (Figura 16). Esta intervención quirúrgica se realiza generalmente en el consultorio del cirujano, mientras el paciente está despierto y sin dolor bajo anestesia local. En la vasectomía se hace una pequeña incisión en la parte superior del escroto debajo del pene, luego se ligan y se cortan los conductos deferentes para separarlos. Se cierra la incisión en la piel con puntos de sutura. El paciente puede volver a su casa inmediatamente, puede retornar al trabajo al día siguiente (si es un trabajo sedentario) y reanudar la actividad física extenuante en un lapso de 3 a 7 días.

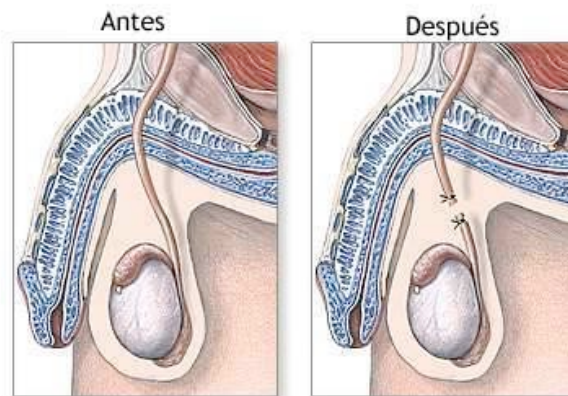


Figura 16. Representación esquemática de una parte del aparato reproductor masculino, en donde puede apreciarse la sección en el Conducto Deferente (Vasectomía) posterior a la intervención quirúrgica

2.3.1.6 Anticonceptivos Hormonales

La posibilidad de anticoncepción por medio del uso de hormonas sexuales fue sugerida por primera vez por Ludwig Haberlandt, un fisiólogo de la Universidad de Innsbruck, Alemania, quien mostró en 1920 que las inyecciones de extractos del cuerpo lúteo podían hacer infértiles a los conejos. Él sugirió que extractos similares podrían proveer de un método de control de natalidad en mujeres (Haberlandt, 1921 en Fraser, 2000). La primera evidencia clínica sobre este aspecto llegó con la demostración, en 1940, de que la dismenorrea podía ser disminuida y la ovulación simultáneamente inhibida con la administración de estrógenos (Sturgis, 1940 en Fraser, 2000).

El desarrollo de la anticoncepción hormonal moderna esperó a la síntesis de progestágenos y estrógenos orales efectivos hasta principios de la década de 1950, cuando Pincus, Rock y García mostraron que la ovulación en mujeres podía ser suprimida con esos compuestos, los cuales fueron puestos en venta en 1957 en Estados Unidos de Norteamérica para la “regulación menstrual”. En 1960, después de modificaciones a leyes y refinamiento de estos fármacos, salió a la venta el primer anticonceptivo oral combinado, conociéndose a la formulación como Enovid, compuesta de mestranol (150 µg; Searle, 1957) y diacetato de etinodiol (10 µg; Sondheimer y Klibansky, 1959), los cuales son derivados químicos del etinilestradiol (Figura 17). El nombre popular de “La Píldora” fue acuñado dos años antes por

Aldous Huxley, quien posteriormente también dijo que el control natal por medio de la anticoncepción oral “no es solamente un problema en medicina, química, bioquímica y fisiología; es también un problema en sociología, psicología, teología y educación.” (Fraser, 2000). Este hecho constituyó uno de los eventos de mayor trascendencia en el siglo XX.

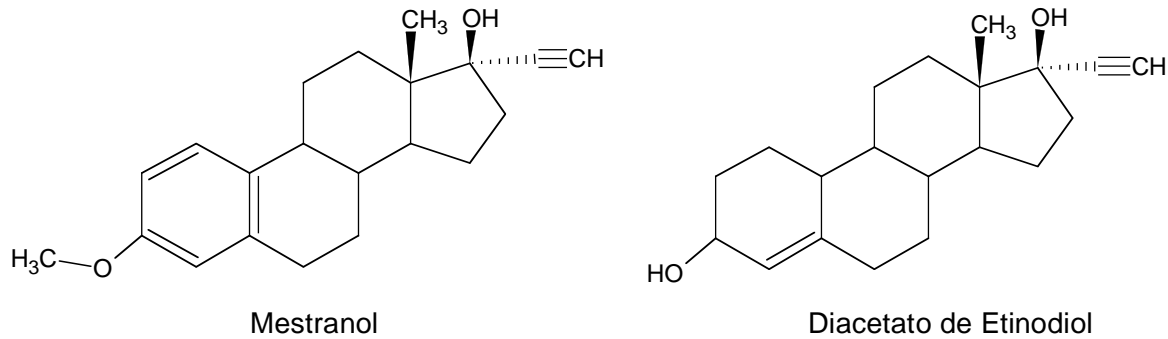


Figura 17. Estructura molecular del mestranol (Searle, 1957) y del diacetato de etinodiol (Sondheimer y Klibansky, 1959), componentes de Enovid:

Las primeras versiones de la píldora contenían dosis muy altas tanto de estrógenos como de progestágenos que eran farmacológicamente necesarias para suprimir la ovulación, por lo que el desarrollo histórico de la píldora ha consistido principalmente en una reducción continua y progresiva de la dosificación (Fraser, 2000). Se desarrollaron además, nuevos progestágenos en un intento de producir agentes con una actividad progestacional más selectiva que mejoraran el control del ciclo menstrual y minimizaran cambios metabólicos, así como otros efectos adversos al tiempo que ayudaran a prevenir efectivamente el embarazo (Wilde y Balfour, 1995).

Varios progestágenos han sido introducidos en el mercado desde principios de la década de 1980. Todos difieren considerablemente en su estructura y en la relación dosis-efecto, pero comparten la propiedad común de producir efectos androgénicos muy bajos (Kuhl, 1996). Los principales productos que han aparecido son el Levonorgestrel (LNG) (1972) (Vandenbroucke, 1997), el Desogestrel (DSG) introducido en Holanda en 1981, el Norgestimato (NGM) en 1986 en Alemania e Inglaterra, el Gestodeno (GSD) en 1987 y el Dienogest (DNG) en 1991 en Alemania, mientras que el Nomegestrol (acetato de nomegestrol (NOMAc) fue desarrollado en Francia (Kuhl, 1996). Los nuevos anticonceptivos orales contienen en dosis diaria, como agente estrogénico al etinilestradiol (20 µg) y como progestina cualquiera de los productos mencionados anteriormente (Figura 18). La cantidad total de esteroides ingerida actualmente

equivale a aproximadamente el 1.2% de la dosis original, siendo las nuevas combinaciones sumamente efectivas (Fraser, 2000).



Figura 18. “La Píldora” en dos de sus presentaciones más comunes. Ambas presentaciones contienen un calendario e indicaciones para la administración diaria. (<http://workers.labor.net.au/pictures/146thepill.gif>)

De acuerdo a London (1992) actualmente existen 3 categorías de progestágenos sintéticos: *Pregnanos* (estructuralmente relacionados con la 17α -hidroxiprogesterona), *Estranos* y *Gonanos* (derivados ambos de la 19-nortestosterona). Estos últimos son biológicamente más potentes que los estranos (primeros progestágenos usados en las preparaciones anticonceptivas orales combinadas) e incluyen al LNG y a sus tres nuevos derivados que son: GSD, DSG y NGM. La única diferencia entre el GSD y el LNG es un doble enlace entre los carbonos 15 y 16. (Wilde y Balfour, 1995). (Figura 19).

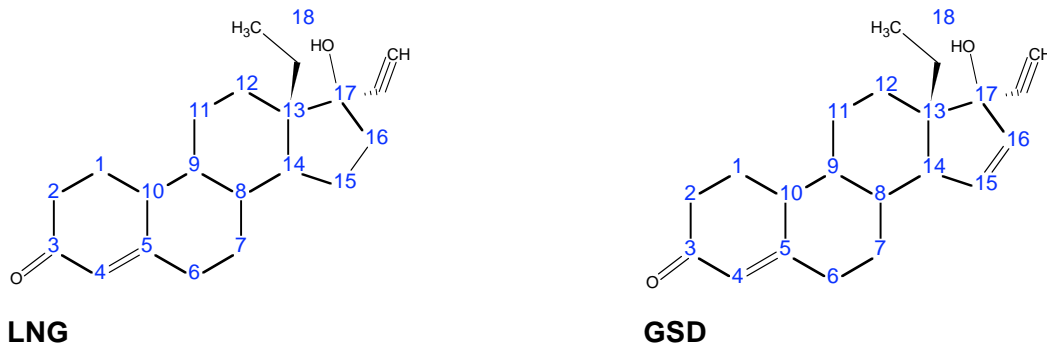


Figura 19. Estructura molecular del Levonorgestrel (LNG) y del Gestodeno (GSD) (Wilde y Balfour, 1995)

2.3.2 El gestodeno

El GSD (17α -etil- 13β -etil- 17β -hidroxi-4,15-gonadien-3-ona) es actualmente uno de los progestágenos más efectivos. Es un derivado de la nortestosterona, ubicado dentro de los 13 -etil-gonanos (Kuhl, 1996). En 1987 Düstenberg y colaboradores demostraron la conversión metabólica *in vivo* del GSD, a 3β - 5α tetrahydrogestodeno ($3\beta,5\alpha$ GSD), y $3\alpha,5\alpha$ tetrahydrogestodeno ($3\alpha, 5\alpha$ GSD). Otro metabolito del GSD es el 5α -dihydrogestodeno (5α GSD) (Figura 20), pero éste se obtiene de manera sintética (Lemus et al, 2000).

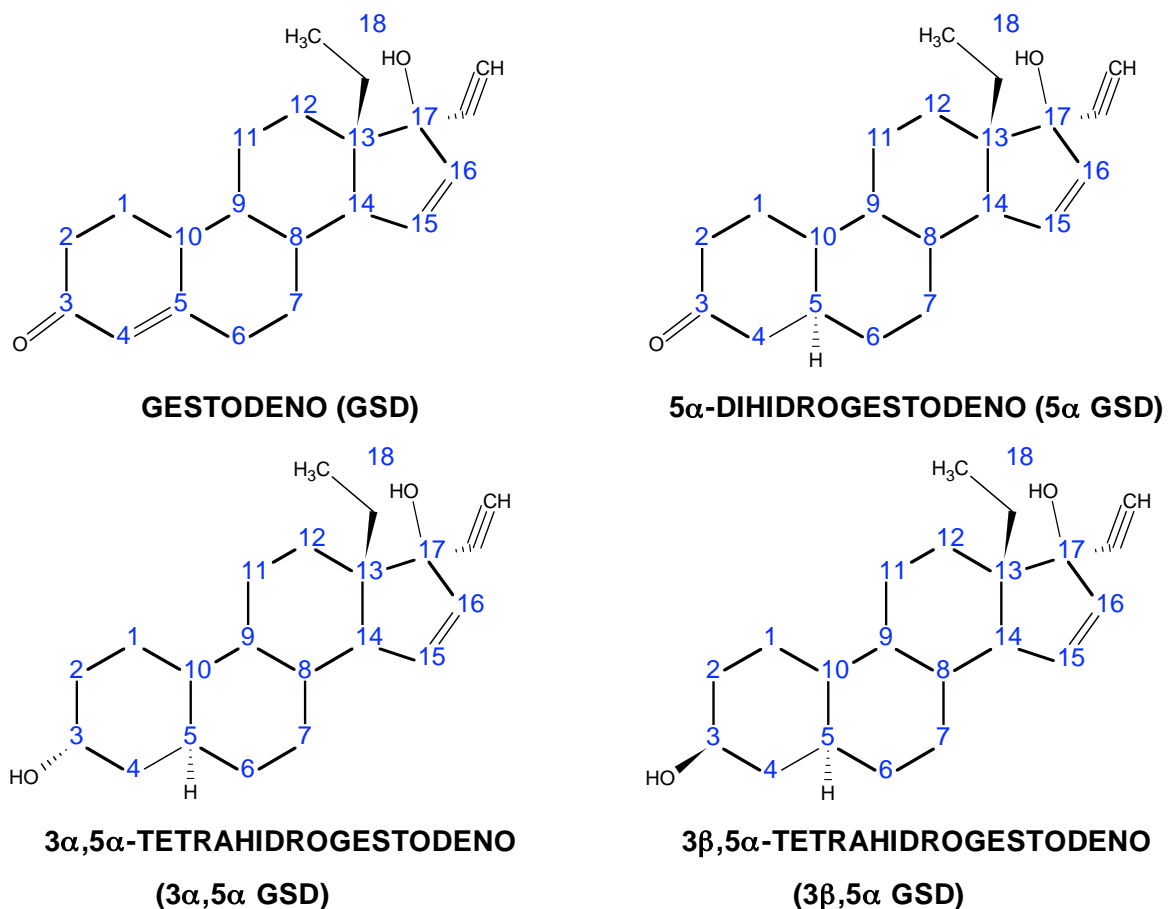


Figura 20. Estructura molecular del GSD y tres de sus metabolitos, 5α -dihydrogestodeno (5α GSD), $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydrogestodeno ($3\alpha, 5\alpha$ GSD) y $3\beta,5\alpha$ -tetrahydrogestodeno ($3\beta, 5\alpha$ GSD) (Lemus et al, 2000).

El GSD tiene ventajas farmacocinéticas sobre los otros progestágenos ya que es activo *per se* (los otros son pro-fármacos) y tiene una muy alta biodisponibilidad ingerido oralmente (aproximadamente, 100%) (Wilde y Balfour, 1995). En la mujer, las principales modificaciones metabólicas son la reducción del grupo ceto Δ -4-3 y la hidroxilación en los C₁, C₆ y C₁₁, mientras que el doble enlace Δ -15 y el grupo etinil son mantenidos, a excepción de un metabolito que presenta una expansión de 5 a 6 C del anillo D, resultante de la activación química del grupo etinil (Kuhl, 1996).

El GSD es combinado con etinilestradiol en preparaciones monofásicas o trifásicas, lo que significa que la dosis de GSD es única y constante en el primer caso, o varía en tres dosis diferentes a lo largo del tratamiento. La nomenclatura adoptada para las preparaciones anticonceptivas consisten en la dosis del progestágeno y del etinilestradiol en μ g. Por ejemplo Gestodeno 75/30. (Wilde y Balfour, 1995)

La afinidad al ligando relativa *in vitro* del GSD para los RP en útero humano (esteroide de referencia = ³H-R5020) es de 85% y la de la P₄ es de 40% (Pollow et al, 1989). In vivo, la afinidad del GSD a los RP es similar a la de la P₄.

Los anticonceptivos orales que contienen un estrógeno y un progestágeno previenen la ovulación via inhibición por retroalimentación (feedback) del eje hipotálamo-pituitaria. Después de discontinuar el tratamiento con GSD, se observa una rápida recuperación de la función hipotálamo-pituitaria-ovárica. (Fotherby y Caldwell, 1994). La dosis de GSD necesaria para inhibir la ovulación es de 0.04 mg/día, sin embargo es la combinación del estrógeno y del progestágeno lo que suprime efectivamente los niveles de LH y FSH (Runnebaum y Rabe, 1987).

Los estrógenos son responsables de la proliferación endometrial, mientras que los progestágenos transforman el endometrio en un endometrio secretor. Los nuevos progestágenos son altamente progestogénicos con respecto a sus efectos en la morfología endometrial. La dosis de GSD necesaria para la transformación endometrial es de 2 a 3 mg/ciclo (Runnebaum y Rabe, 1987).

3 Planteamiento del Problema

El GSD es un progestágeno usado de manera frecuente en seres humanos como anticonceptivo hormonal. El $3\beta,5\alpha$ GSD es un metabolito reducido en el anillo A del GSD cuya función metabólica no está completamente estudiada. Ambos tienen una fuerte afinidad por el RP de acuerdo a pruebas *in vitro*. De manera interesante en el GSD como en el $3\beta,5\alpha$ GSD se han observado efectos estrogénicos en ausencia de E2. Los efectos de ambos fármacos sobre el RP en mamíferos *in vivo* al nivel de la proteína no han sido completamente caracterizados.

Por lo que en este proyecto se estudió el contenido de las isoformas del RP a nivel de la proteína, usando la técnica de Western Blot (WB) en el útero y el hipotálamo de ratas ovariectomizadas después de la administración de E2, P₄, GSD y $3\beta,5\alpha$ GSD.

4 Hipótesis

Si el GSD y su metabolito $3\beta,5\alpha$ GSD poseen propiedades progestacionales y estrogénicas respectivamente, entonces su administración provocará cambios en el contenido del RP en el útero y en el hipotálamo de la rata.

5 Objetivos

5.1 *Objetivo General*

- Determinar los efectos del GSD y de su metabolito reducido $3\beta,5\alpha$ GSD sobre el contenido de las isoformas del RP en el útero y en el hipotálamo de la rata.

5.2 *Objetivos Específicos*

1. Cuantificar el contenido de las isoformas del RP a nivel de la proteína en el útero y el hipotálamo de ratas tratadas con GSD y $3\beta,5\alpha$ GSD mediante la técnica de Western Blot (WB).
2. Determinar si hay un cambio en la proporción de RP-A : RP-B después del tratamiento con GSD y $3\beta,5\alpha$ GSD en el útero y el hipotálamo de la rata.

6 Materiales y Métodos

6.1 Animales de experimentación y tratamientos

A lo largo de este estudio se utilizaron ratas hembra adultas (12 semanas de edad) de 200-250 g de peso de la cepa Sprague Dawley que se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad 12:12 horas (luces encendidas a las 6:00 am), con agua y comida *ad libitum*.

Se gonadectomizaron las ratas bajo anestesia general con ketamina a una dosis de 80 mg/kg vía intraperitoneal que quince días después de la cirugía fueron tratadas (n=3 ratas por grupo) por vía subcutánea con aceite de maíz/metanol como vehículo, E2, P₄, GSD y 3β,5α GSD, vía subcutánea de la siguiente manera:

a) vehículo que representó al lote testigo (aceite de maíz/metanol 10%); durante dos días consecutivos;

b) 17βE2 en una dosis de 5 µg/100 g de peso corporal durante dos días consecutivos;

c) 17βE2 durante dos días seguido por P₄ al tercer día en una dosis de 200 µg/100 g.

d) GSD 300 µg por día en 200 µl de aceite de maíz durante 2 días.

e) 3β,5α GSD 300 µg por día en 200 µl de aceite de maíz durante 2 días.

f) 17βE2 + GSD: E2 durante 2 días consecutivos y GSD al tercer día en las mismas dosis señaladas en a) y d)

g) 17βE2 + 3β,5α GSD: E2 durante 2 días consecutivos y 3β,5αGSD al tercer día en las mismas dosis señaladas en a) y e).

Las ratas se sacrificaron 24 h después de la administración de la última dosis de los compuestos y se disecaron el útero y el hipotálamo. Todas las muestras fueron inmediatamente procesadas para la extracción de los tejidos necesarios para este estudio.

6.2 Obtención del tejido

Las ratas fueron disecadas para extraer el hipotálamo y el útero, tejidos que fueron inmediatamente congelados para extraérseles el total de proteínas mediante la técnica que se indica a continuación.

6.3 Extracción de proteínas totales

Se homogenizaron los tejidos en buffer de lisis TDG con una mezcla de diversos inhibidores de proteinasas (Tris-HCl 10 mM, ditioneitol 1mM, glicerol al 30%, tritón al 1%, azida de sodio 15 mM, EDTA 1mM, leupeptina 4 µg/ml, aprotinina 22 µg/ml, PMSF 1mM, ortovanadato de sodio 1mM) en una relación de 1 ml de buffer/1 g de tejido a 4°C.

Las muestras homogenizadas fueron centrifugadas a 15,000 rpm, durante 15 min, a 4°C para obtener en el sobrenadante las proteínas totales. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. (Bradford, 1976)

6.4 Western Blot

Las proteínas totales obtenidas del útero (80 µg de proteína) se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 7.5% a 80 volts durante 2 horas. Cada muestra se preparó con buffer de carga (Tris 0.5 M pH 6.8, glicerol al 10%, SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 5%) en un volumen 1:1 y se hirvieron durante 5 minutos para posteriormente cargarse en los geles antes mencionados.

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 75 volts durante 4 horas a 4 °C. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas por dos horas a temperatura ambiente con una solución de leche descremada en polvo al 5% y albúmina al 0.5% en TBS 1X.

Las membranas fueron incubadas durante dos horas a temperatura ambiente con un anticuerpo primario monoclonal que reconoce a ambas isoformas con la misma afinidad, anti-RP (IgG) (Santa Cruz sc-810) en una concentración de 1µg/ml, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween (TBS+Tween 20 al 0.1%) 3 veces por 5 minutos; posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón (IgG-HRP) conjugado con peroxidasa en una concentración de 0.24 µg/ml (Santa Cruz sc-2005). Se utilizó un método de detección de alta sensibilidad (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) para determinar la

presencia de las isoformas del RP. En este sistema, la peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario actúa sobre el peróxido de luminol en presencia de un potenciador de la reacción y se detecta una señal de quimioluminiscencia al exponer las membranas a placas radiográficas.

Para corregir las posibles diferencias en la cantidad de proteína total cargada en cada pozo se determinó la cantidad α -tubulina (sigma T9026- .2ml clone DM1A. ascites fluid) en cada experimento. Se lavaron las membranas con glicina ácida (glicina 0.1 M SDS 0.5% pH 2.5) toda la noche a 4 °C y 30 minutos a 37 °C para posteriormente incubarlas con un anticuerpo primario anti- α -tubulina en una concentración de 2 μ g/ml (Sigma T9026) durante 2 horas a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas con TBS-Tween 3 veces por 5 minutos; después se incubaron una hora con un anticuerpo secundario anti-cabra (IgG-HRP) conjugado a peroxidasa en una concentración de 0.24 μ g/ml (Santa Cruz sc-2033). Se utilizó el método de detección de alta sensibilidad descrito anteriormente.

6.5 *Análisis de resultados*

Cada placa fue sometida a un análisis densitométrico utilizando el programa Scion Image, para cuantificar el contenido de las isoformas del RP y α -tubulina de acuerdo a la intensidad de cada banda.

A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de t-student. Se utilizó el programa Prism 2.01 (Graph Pad, CA) para calcular los valores de probabilidad.

7 Resultados

Para observar los efectos del E2, la P₄, el GSD y el 3β,5α GSD sobre el contenido de las isoformas del RP a nivel de la proteína, se extrajeron las proteínas totales del útero y del hipotálamo de ratas Sprague Dawley ovariectomizadas y tratadas con V, E2, P₄, GSD, 3β,5α GSD, E2+GSD y E2+3β,5α GSD y se realizaron ensayos de Western Blot cómo se describió en la sección de Materiales y Métodos.

En la Figura 20 se muestra un blot representativo de la detección de las isoformas del RP en el útero en el que se observa una banda de 120 kDa que corresponde a RP-B, una banda a 94 kDa que corresponde a RP-A y una banda a 50 kDa correspondiente a α-Tubulina.

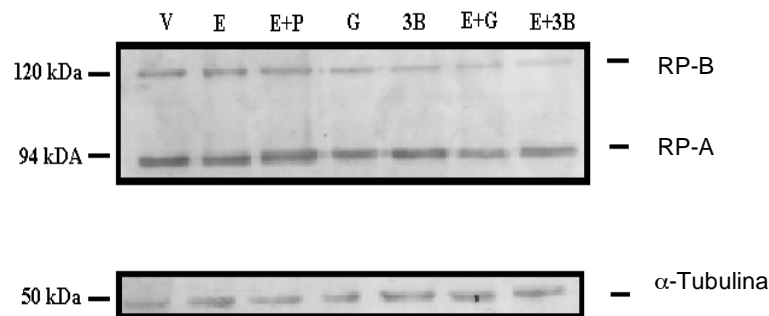


Figura 20. Contenido de las isoformas RP-A y RP-B en el útero de la rata. Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los de tubulina.

En la Figura 21 puede observarse que el contenido de RP-A en el útero cambia dependiendo del tratamiento. Esta figura muestra las isoformas A y B del RP por cada tratamiento. En el caso de la isoforma A, hay diferencias significativas para E2, GSD, 3β,5α GSD, E2+GSD, E2+3β,5α GSD con respecto al Veh. Y en la isoforma B puede observarse que hay diferencias de E2 con respecto al Veh, y de igual forma también hay diferencias significativas de todos los grupos contra el E2 para esta misma isoforma.

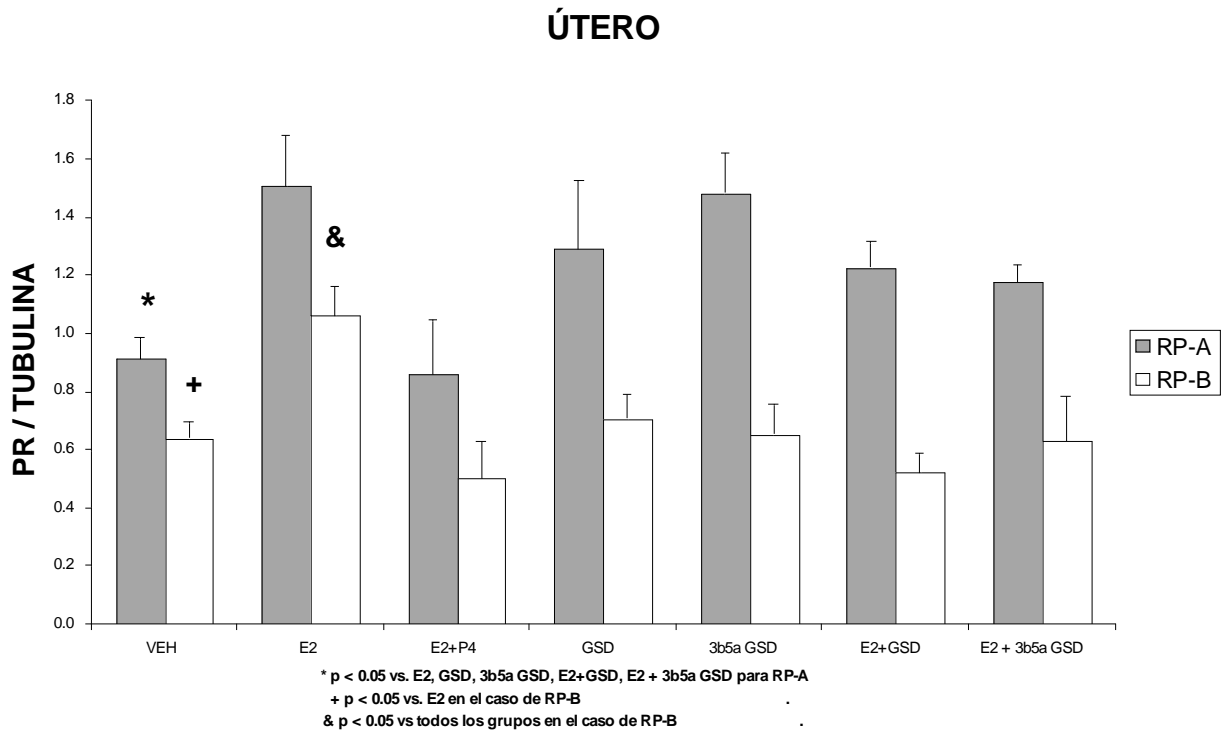


Figura 21. Contenido de RP-A y RP-B en el útero de la rata. Las isoformas detectadas por Western Blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores se corrigieron a los de tubulina. Las Gráficas muestran el promedio \pm E.S. de 3 ensayos.

En la Figura 22 **¡Error!No se encuentra el origen de la referencia.** se muestra un blot representativo de la detección de las isoformas del RP en el hipotálamo en el que se observa una banda de 120 kDa que corresponde a RP-B, una banda a 94 kDa que corresponde a RP-A y una banda a 50 kDa correspondiente a α -Tubulina.

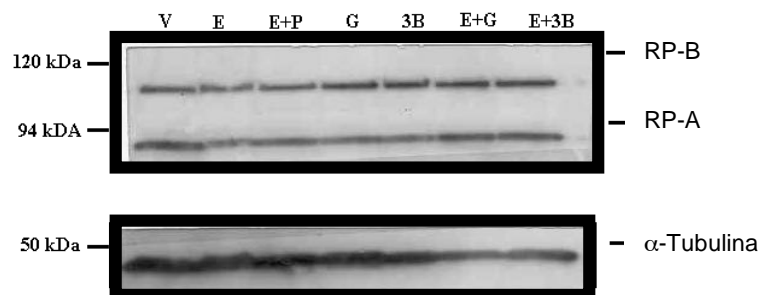


Figura 22. Contenido de las isoformas A y B del RP en el hipotálamo de la rata. Las isoformas detectadas por Western blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores obtenidos se corrigieron respecto a los de la tubulina.

En la Figura 23 **¡Error!No se encuentra el origen de la referencia.** se observa el contenido de ambas isoformas en el hipotálamo para cada uno de los tratamientos. En esta figura la regulación positiva de RP-A por E2 es significativa al compararla con el Veh, y los grupos tratados con GSD, $3\beta,5\alpha$ GSD, E2+GSD y E2+ $3\beta,5\alpha$ GSD también. Se observa que en la isoforma A existen diferencias significativas de todos los tratamientos con respecto del Veh a excepción del tratamiento de E2+P4 el cual no presenta dichas diferencias. También puede apreciarse que para la isoforma B existen diferencias significativas entre el tratamiento de Veh y el tratamiento de E2. También existen diferencias significativas entre el tratamiento de E2 y los demás grupos en el caso de la misma isoforma B. Es importante notar que en esta figura se observa que la variación en el contenido de ambas isoformas es similar, es decir, RP-A y RP-B varían su contenido en la misma proporción para cada uno de los tratamientos, y se observa también que el índice de proporción de RP-A : RP-B es 1:1.

HIPOTÁLAMO

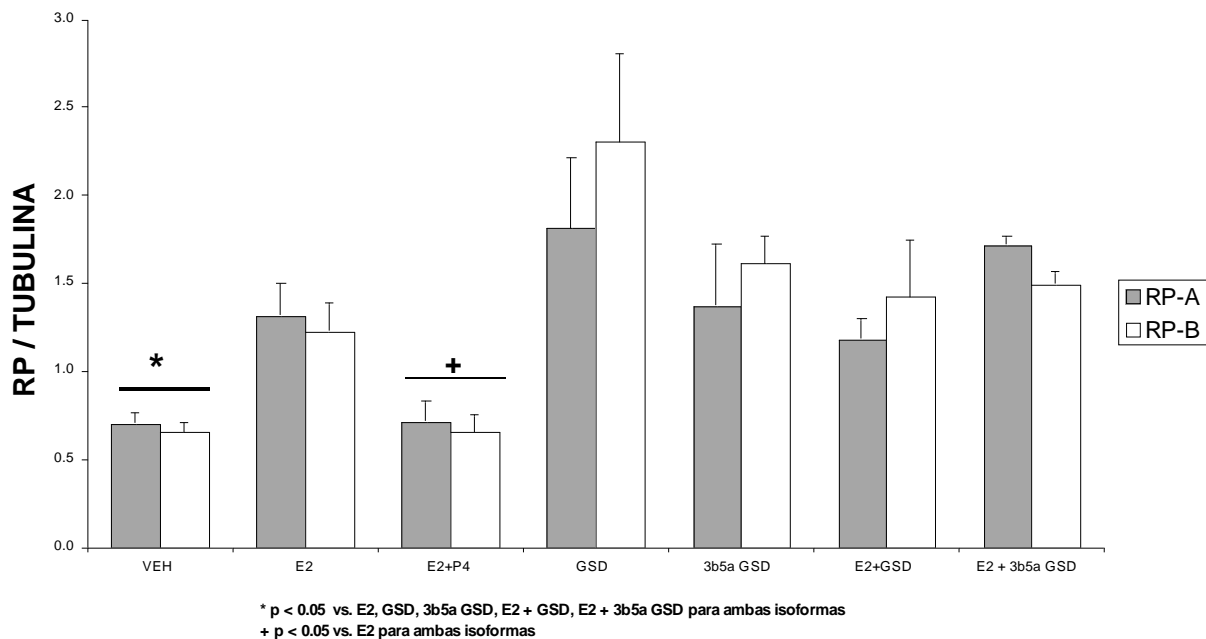


Figura 23. Contenido de RP-A y RP-B en el hipotálamo de la rata. Las isoformas detectadas por Western Blot se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico y los valores se corrigieron a los de tubulina. Las gráficas muestran el promedio \pm E.S. de 3 ensayos.

8 Discusión

El aumento significativo del contenido de RP-B en los tratamientos que contienen GSD y $3\beta,5\alpha$ GSD con respecto al VEH hacen ver que el GSD y su metabolito reducido $3\beta,5\alpha$ GSD presentan efectos estrogénicos, tal como se había reportado con anterioridad y que estos efectos pueden ser significativamente diferentes entre sí debido a la presencia o ausencia de E2 en los tratamientos. Comparando la Figura 22 con la Figura 24 podemos notar que el contenido de RP-A y de RP-B no muestra un patrón de comportamiento similar en útero y en hipotálamo. Mientras que en útero RP-A y RP-B se comportaron de forma significativamente diferente, en hipotálamo no sucede lo mismo, puesto que la relación entre RP-A y RP-B presentan un índice de 1:1 en todos los casos para cada uno de los tratamientos, lo que hace pensar que no hay cambios significativos en el índice de RP-A : RP-B dentro del hipotálamo de la rata.

El GSD no presentó el efecto esperado de progestágeno en presencia de E2. Se observó una inducción en el contenido de la isoforma A tanto en útero como en hipotálamo. La isoforma B en útero no mostró cambios significativos, y en hipotálamo también se registró una inducción positiva en el contenido de esta isoforma. Por lo tanto, el GSD presenta efectos estrogénicos en ausencia de E2, tal como se ha reportado con anterioridad.

El metabolito reducido $3\beta,5\alpha$ GSD presenta un comportamiento similar al de la inducción con P4 en el útero, sin embargo también se observaron efectos estrogénicos en el hipotálamo para ambas isoformas.

9 Conclusiones

- El GSD y su metabolito reducido $3\beta,5\alpha$ GSD regulan de manera diferencial el contenido de las isoformas del RP en el útero y en el hipotálamo de la rata.
- En el útero el GSD y el $3\beta,5\alpha$ GSD, incrementan el contenido de RP-A.
- En el hipotálamo de la rata, el GSD y su metabolito reducido $3\beta,5\alpha$ GSD incrementaron de manera significativa el contenido de las isoformas A y B del RP.

10 Referencias

- Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW., 1992. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding ***Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*** 89:11750-11754.
- Beato M., 1987. Induction of transcription by steroid hormones. ***Biochem. Biophys. Acta.*** 910:95-102.
- Beato M., 1989. Gene regulation by steroid hormones. ***Cell.*** 56:335-344.
- Beier HM. 1968. Uteroglobulin a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. ***Biochem. Biophys. Acta.*** 160:289-291.
- Bethea CL, Widmann AA. 1988. Differential expression of progestin isoforms in the hypothalamus, pituitary, and endometrium of Rhesus macaques. 1988. ***Endocrinology.*** 139:677-687.
- Bradford, M. 1976 "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" ***Anal. Biochem.*** **72**:248-254.
- Brodeur P, Mockus M, McCullough R, Moore LG. 1986. Progesterone receptors and ventilatory stimulation by progestin. ***J. Appl. Physiol.*** 60:590-595.
- Brown TJ, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. 1990. Comparison of age and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progestin receptor induction in the rat brain. ***Endocrinology.*** 126:2965-2972.
- Camacho-Arroyo I, Ruiz A, Gamboa-Domínguez A, Pérez-Palacios G, Cerbón MA., 1994a. Immunohistochemical localization of intracellular progesterone and glucocorticoid receptors in the rabbit lung. ***J. Endocrinol.*** 142:311-316.

- Camacho-Arroyo I, Pérez-Palacios G, Pasapera AM, Cerbón MA., 1994b. Intracellular progesterone receptors are differentially regulated by sex steroid hormones in the hypothalamus and cerebral cortex of the rabbit. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.** 50:299-303.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Pérez-Palacios G, Cerbón MA., 1995. Progesterone and its metabolites in central nervous system function. **Rev. Invest. Clin.** 47:329-340.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera AM, Cerbón MA., 1996. Regulation of progesterone receptor gene expression by sex steroid hormones in the hypothalamus and the cerebral cortex of rabbit. **Neurosci. Lett.** 214:25-28.
- Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón MA., 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. **Neuroreport.** 9(18):3993-3996.
- Camacho-Arroyo I, Hernández Gollas R, Manjarrez J, Alvarado R., 1999. Progesterone microinjections into the pontine reticular formation modify sleep in male and female rats. **Neurosci. Lett.** 269:9-12.
- Camacho-Arroyo I, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Guerra-Araiza C. 2002. Participation of the 26S proteasome in the regulation of progesterone receptor concentrations in the rat brain. **Neuroendocrinology.** 76(5):267-71.
- Camacho- Arroyo I. 2003. Progesterone receptor isoforms expression and progesterone actions in the brain. En: Recent Research Developmente in Life Sciences. A. Gayathri (Ed.) Research Signpost, Kerala. pp221-242.
- Cerbón MA, Martínez M, Pérez-Palacios G. 1989. Oestrogen-insensitive progestine receptors in the central nervous system: physicochemical and immunoreactive characteristic. **J. Neuroendocrinol.** 1:292-298.

- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE., 1990. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of heat shock protein-90 complex. **J Biol. Chem.**265:20686-20691.
- Christensen K, Estes PA, Onate SA, Beck CA, DeMarzo A, Altman M, Liberman BA, St John J, Nordeen SK; Edwards DP., 1991. Characterisation and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. **Mol. Endocrinol.** 5:1755-1770.
- Clarke PB, 1993 Ovarian steroid hormone receptors and their mechanism of action: In race GE, Brennecke SP (eds) Molecular aspects of placental and fetal Autacoids. CRP Press, Inc, Boca Raton, FL, pp 27-54.
- Clemm DL, Macy BL, Santiso-Mere D, McDonell DP., 1995. The critical cellular components which distinguish between hormone and antihormone activated progesterone receptor. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.**53:487-495.
- Clemm DL, Sherman L, Boonyaratanakornkit V, Schrader W. Weigel N, Edwards DP., 2000. Differential Hormone-Dependent phosphorylation of progesterone receptor A and B forms revealed by a phosphoserine site-specific monoclonal antibody. **Mol. Endocrinol.**14:52-65.
- Conneley OM, Keffelberger DM, Tsa W, Schrader WT, O'Maley B., 1989. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of alternative translation initiation event. **J. Biol. Chem.** 264:14062-14064.
- Corrado Córdova, Lautre M.J. 1982. *Hombre, medicina y salud. Enciclopedia médica.* Tomo 1. Britannica. 404 pp
- Csapo AI, Resch BA. 1979. Induction of preterm labor in the rat by antiprogesterone. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 134:823-827.

- Dalkin AC, Paul SJ, Haisenleder DJ, Ortolano GA, Yasin M, Marshall J.C. 1992 Gonadal steroids effect similar regulation of gonadotrophin subunit mRNA expression in both male and female rats. **J. Endocrinol.** 132:39-45.
- Dluzen DE, Ramírez VD. 1991. Modulatory effects of progesterone upone dopamine release from the corpus striatum of ovariectomized estrogen-treated rats are sterea-specific. **Brain Res.** 538:176-179.
- Duffy MD, Wells TR, Haluska JG, Stouffer RL. 1997. The ratio of progesterone receptor isoforms changes in the monkey corpous luteum during the luteal phase of the menstrual cycle. **Biol. Reprod.** 57:693-699.
- Feil PD, Glasser SR, Toft DO, O'Malley BW., 1972. Progesterone binding in the mouse and rat uterus. **Endocrinol.** 91:738-746.
- Fotherby, K., Caldwell, A.D.S. New progestogens in oral contraception. **Contraception** 1994; 49:1-32.
- Fraser, I.S. Fourty years of combined oral contraception: the evolution of a revolution. **Med J Aust** 2000; 173:541-544.
- Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. 1997. Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 62:449-454
- Ganong WF., 1993. Blood, pituitary, and brain renin-angiotensin systems and regulation of secretion of pituitary gland. **Front. Neuroendocrinol.** 14:233-239.
- Giangrande PH, Pollio G, McDonnell., 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. **J. Biol. Chem.** 272: 32889-32900.

- Giangrande PH, McDonnell DP., 1999. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. **Recent. Prog. Horm. Res.** 54:291-313.
- González-Arenas AA, Reyna-Neyra A, Gómez MJ, Méndez I, Larrieta-Carrasco ME, Haces ML, Jiménez B, Camacho-Arroyo I. 2001. Los mensajeros químicos del sistema neuroendócrino. **Educ. Quím.** 3:158-162.
- González- Flores O, Cerbón MA, Camacho-Arroyo I. 2004. Participación del Proteosoma 26S en la regulación de los receptores a hormonas sexuales y su relevancia en la conducta sexual femenina en roedores. En: Temas selectos de Neurociencias III. Javier Velásquez Moctezuma (Ed.) UAM. pp293-303.
- González-Morán G, Camacho-Arroyo I., 1998. Histomorphometric and progesterone receptor immunohistochemical analysis in the oviduct of newly hatched chicks treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. **Anat. Histol. Embryol.**27:277-282.
- González-Vidal MD, Cervera-Gavira M, Ruelas R, Escobar A, Morali G, Cervantes M.1998. Progesterone: protective effects on the cat hippocampal neuronal damage due to acute global cerebral ischemia. **Arch. Med. Res.** 29:117-124.
- Gore-Langton RE. 1988 Cyclosporine differentially affects estrogen and progestin synthesis by rat granulosa cells in vitro. **Moll. Cell. Endocrinol.**27:277-282.
- Goroscope WC, Freeman ME. 1985. Effects of placenta and maternal serum on prolactin secretion *in vitro*. **Biol. Reprod.** 32:279-283.
- Graham JD, Yeates C, Balleine RL, Harvey SS, Milliken JS, Bilous AM, Clarke CL. 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. **Cancer Res.** 55:5063-5068.
- Graham JD, Clarke CL., 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. **Endocr. Rev.** 18:502-519.

- Green IC, Howell SL, El Seifi S, Perrin D., 1978. Binding of 3h-progesterone by isolated rat islets of Langerhans. *Diabetol.*15:349-355.
- Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. 1999.The Menopause. *The Lancet.* 353, 571.
- Guerra-Araiza C, Cerbón MA, Morimoto S, Camacho-Arroyo I. 2000. Progesteronereceptor isoforms expression pattern in the rat brain during the estrous cycle. *Life Sci.* 73:1743-1752.
- Gunnet JW, Granger K, Cryan E, Demarest KT. 1999. Characterization of the progestin receptors in the human TE85 and murine MC3T3-E1 osteoblast-like cell lines. *J. Endocrinol.* 163:139-147.
- Haberalandt, L. Hormonal sterilization of female animals. *Munchner Med Wochenschr* 1921; 68:1577-1588.
- Horwitz KB, McGuire WL., 1975. Specific progesterone receptors in human breast cancer. *Steroids.* 25:497-505.
- Horwitz KB, Jackson TA, Bain DL, Richer JK, Takamoto GS, Tung L., 1996. Nuclear receptor coactivators and represors. *Mol. Endocrinol.*10:1167-1177.
- Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr. 1984. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr. Rev.* 5:76-127.
- Huerdo, C. 1998. Current reversible contraceptive methods: a global perspective *C. Int J. Gynaecol. Obstet.* 62, S3.
- Huse B, Verca SB, Matthey P, Rusconi S., 1998. Definition of a negative modulation domain in the human progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.*12:1334-1342.

- Hutchison JS, Nelson PB, Zelenik AJ. 1986. Effects of different gonadotropin pulse frequencies on *corpus luteum* function during the menstrual cycle of rhesus monkeys. ***Endocrinology***. 119:1964-1971.
- Huxley, A. *Brave new world revisited*. New York: Harper and Row, 1958:138-139.
- Huxley, A. *The population explosion*. En *The human situation, a series of lectures delivered at the University of California, Santa Barbara, in 1969*. London: Chatto and Windus, 1978: 40-55.
- Ilenchuk T, Walters M. 1987. Rat uterine progesterone receptor analyzed by 3H-R5020 photoaffinity labeling, evidence that A and B subunits are not equimolar. ***Endocrinology***. 120:1449-1456.
- Ing NH, Beekman JM, Kessler DJ, Murphy M, Jayaraman K, Zendegui JG, Hogan ME, O'Malley BW, Tsai MJ., 1993. *In vivo* transcription of a progesterone responsive gene is specifically inhibited by a triplex-forming oligonucleotide. ***Nucleic Acids Res.*** 21:2789-2796.
- Ing N.H., Spencer, T.E., Bazer, F.W., 1996. Estrogen enhances endometrial estrogen receptor gene expression by a posttranscriptional mechanism in the ovariectomized ewe. ***Biol. Reprod.*** 54(3):591-9.
- Jenster G, Spencer TE, Burcin MM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1997. Steroid receptor induction of gene transcription a two step model. ***Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*** 94:7879-7884.
- Karavolas HJ, Hodges DR. 1990. Neuroendocrine metabolism of progesterone and related progestins. ***Ciba Found Symp.*** 153:22-44.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. ***EMBO J.*** 9:1603-1614.

- Kastrup Y, Hallbeck M, Amandusson A, Hirata S, Hermanson O, Blomquist A. 1999. Progesterone receptor expression in the rat brainstem of the female rat. **Neurosci. Lett.** 275: 85-88.
- Kato J, Hirata S, Nozawa A, Mouri N. 1993. The ontogeny of gene expression of progesterone receptors in the female rat brain. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.** 47:173-182.
- Ke FC, Ramírez VD. 1987. Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalamus in vitro. **Neuroendocrinology.** 45:514-517.
- Knobil E. 1988. The hypothalamic gonadotropin hormone releasing hormone (GnRH) pulse generator in the rhesus monkey and its neuroendocrine control. **Hum. Reprod.** 3:29-31.
- Knotts TA, Orkiszewski RS, Cook RG, Edwards DP, Weigel NL. 2001. Identification of a phosphorylation site in the hinge region of the human progesterone receptor and additional amino-terminal phosphorylation sites. **J. Biol. Chem.** 276:8475-8483.
- Kraus WL, Katzenellenbogen BS., 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone end sex steroid hormone antagonists. **Endocrinology.** 132:2371-2396.
- Kuhl, H. Comparative pharmacology of newer progestogens. **Drugs** 1996; 51(2):188-215.
- Lange CA, Shen T, Horwitz KB. 2000. Phosphorylation of human progesterone receptor at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 97: 1032-1037.
- Lemus, A.E., Zaga, V., Santillán, R., García, G.A., Grillasca, I., Damián-Matsumura, P., Jackson, K.J., Cooney, A.J., Larrea, F., Pérez-Palacios, G. The oestrogenic effects of

gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-Ring reduced metabolites. *Endocrinology* 2000; 165: 693-702.

- Lessey BA, Alexander PS, Horowitz KB., 1983. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity labelling. *Endocrinology*. 112:1267-1274.
- Litwack G., 1992. Remembrance: steps leading to the identification, purification, and characterization of the glucocorticoid receptor. *Endocrinology*. 130:2433-2434.
- London, RS. 1992. The new era in oral contraception: pills containing gestodene, norgestimate, and desogestrel. *Obstet Gynecol Surv* 47:777-782.
- MacLusky Mj, McEwen BS. 1978. Oestrogen modulates progesterone receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature*. 274:276-278.
- Mahesh V, Brann D., Hendry L., 1996. Diverse modes of action of progesterone and its metabolites. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 56:209-219.
- Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN, Weigel LN. 1997. Differential expression of uterine progesterone receptors forms A and B during the menstrual cycle. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 63:195-202.
- MacGregor, JI, Jordan, VC. 1998. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action *Pharmacol. Rev.* 50, 151.
- McDonnell D, Goldman ME. 1994. RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 269:11945-11949.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 20:321-344.
- Meizel S, Turner KO., 1991. Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm. *Mol. Cell. Endocrinol.* 77:R1-5.

- Mendoza-Rodríguez CA, Camacho-Arroyo I, García GA, Cerbón MA., 1999. Variations of progesterone receptor and c-fos gene expression in the rat uterus after treatment with norethisterone and its A-ring reduced metabolites. **Contraception**. 59:339-343.
- Milgrom E, Baulieu EE., 1970. Progesterone in uterus and the plasma.II. The role of hormone availability and metabolism on selective binding to uterus protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 40:723-733.
- Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E., 1987. Structure of the human progesterone receptor gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 143:740-748.
- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E, 1993. Structure of the human progesterone receptor gene. **Biochem. Biophys. Acta.** 1216:289-292.
- Nawaz Z, Lonard DM, Dennis AP, Smith CL, O'Malley BW. 1999. Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 96:1858-1862.
- Newton, JN.1998. **J. Br. Menop. Soc.** 4, 135.
- Oehler MK, Rees MCP, Bicknell R. 2000. Steroids and the endometrium. **Current Medical Chemistry.** 7, 543-560.
- Passinen S, Haverinen M, Pekki A, Rauta J, Paranko J, Syvala H, Tuohimaa P, Yikomi T., 1999. Only a small portion of cytoplasmic progesterone receptor is associated with Hsp 90 in vivo. **J. Cell. Biochem.** 74:458-467.
- Pearce PT, Khalid BAK, Funder JW., 1983. Progesterone receptors in rat thymus. **Endocrinology.** 113:1287-1291.
- Pérez-Palacios, G.1985.Mecanismos de acción de hormonas esteroides en bioquímica e inmunología. Vol. 2.Cap. VI, Ed. Hicks, J y Díaz-Agaya J.C. UNAM. México. 346-370.

- Perrot-Appanat M, David-Ferreira JF. 1982. Immunocytochemical localization of progesterone-binding protein (PBP) in guinea-pig placental tissue. ***Cell Tissue Res.*** 223:1511-1519.
- Petitti N, Etgen AM. 1992. Progesterone promotes rapid desensitization of alpha 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. ***Neuroendocrinology.*** 55:1-8.
- Pollow K, Boquoi E, Baumann J, Schmidt-Gollwitzer M, Pollow B., 1977. Comparison of the in vitro conversion of estradiol-17 beta to estrone of normal and neoplastic human breast tissue. ***Mol. Cell. Endocrinology.*** 6:333-348.
- Pollow, K., Juchem, M., Grill, H-J. 1989. Gestodene: a novel synthetic progestin – characterization of binding to receptor and serum proteins. ***Contraception*** 40:325-41.
- Powles, TJ. 1997. Efficacy of tamoxifen as treatment of breast cancer. ***Semin. Oncol.*** 24(1 Suppl 1):S1-48-S1-54.
- Punyadeera, C., Verbost, P., Groothuis, P. 2002. Oestrogen and progestin response in human endometrium. ***J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*** 84:393-410.
- Rodríguez R. Carson MA, Weigel NL, O'Malley BW, Schrader WT., 1990. Dimerization of the chicken progesterone receptor in vitro can occur in the absence of hormone and DNA. ***Mol. Endocrinol.*** 4:1782-1790.
- Rotchild I, 1983. Role of progesterone in initiating and maintaining pregnancy. In: Bardin CW, Milgromm E, Mauvais-Jarvis P (eds) Progesterone and progestins. *Raven Press, New York.* pp 219-229.
- Rowan B, Garrison N, Weigel NL, O'Malley BW. 2000. Progesterone receptor coactivators. ***Mol. Cell. Biol.*** 20:8720-8730.
- Ruiz Durá. M.F. 1988. Fundamentos de Embriología y Fisiología de la Reproducción. F.Ciencias, UNAM. 374 pp.

- Runnebaum, B., Rabe, T. New Progestogens in oral contraceptives. *Am. J Obstet Gynecol* 1987; 157(4 pt 2):1059-63.
- Sartorius CA, Groshong SD, Miller LA, Powell RL, Tung L, Takimoto GS, Horwita KB., 1994. New T47-D breast cancer cell lines for the independent study of progesterone B and A receptors: only antiprogestin occupied B receptors are switched to transcriptional agonist by cAMP. *Cancer Res.* 54:3868-3877.
- Savouret JF, Misrahi M, Milgrom E., 1990. Molecular action of progesterone. *Int. J. Biochem.* 22:579-594.
- Schaeffer C, Roos J. Aron C. 1990. Lordosis behavior in intact male rats: effects of hormonal treatment and/or manipulation of the olfactory system. *Horm. Behav.* 24:50-61.
- Schoonen WG, Dijkema R, de Ries RJ, Wagenaars JL, Joosten JW, de Gooyer ME, Deckers GH, Kloosterboer HJ., 1998. Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells. II. Comparison of binding transactivation and ED50 values of several synthetic (anti) progestagens in vitro in CHO and MCF-7 cells and in vivo in rabbits and rats. *J. Steroids Biochem. Mol. Biol.* 64:157-170.
- Schowalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson ADW, Soneely , O'Malley BW, Toft DO., 1991. Characterization of progesterone receptor binding to the 90 and 70-kDa heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 266:21165-21173.
- Schrader WT, Birnbaumer ME, Hughes MR, Weigel NL, Grody W W, O'Malley BW., 1981. Studies on the structure and function of the chicken progesterone receptor. *Recent. Prog. Horm. Res.* 37:583-633.
- Searle, G.D. 1957. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 1123.
- Sherwin BB. 1996. Hormones, mood, and cognitive functioning in postmenopausal women. *Obstet. Gynecol.* 87(2 Suppl):20S-26S.

- Sondheimer, Klibansky. 1959. **Tetrahedron** 5, 15.
- Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, et al. 1997. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. **Nature**. 389: 194-198.
- Sterner DE, Berger SL. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. **Microbiol Mol Biol Rev**. 64(2):435-59.
- Sturgis, S.H., Albright, R. Mecanism of estrin therapy in the relief of dismenorrhoea. **Endocrinol** 1940; 26:68-73.
- Susuki T, Sasano H, Kimura N, Tamura M, Fukaya T, Yajima A, Nagura H. 1994. Immunohistochemical distribution of progesterone, androgen and oestrogen receptor in human ovary during the menstrual cycle: relationship to expression of steroidogenic enzymes. **Hum. Reprod**. 9:1589-1595.
- Szabo M, Kilen SM, Nho SJ, Schwartz NB. 2000. Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. **Biol. Reprod**. 62:95-102.
- Turner C. 1977. Progesterone and progestins in the male reproductive system. **Ann. N.Y. Acad. Sci**. 286:313-20.
- Tesarik J, Mendoza C, Moos J, Fenichel P, Fehlmann M., 1992. Progesterone action through aggregation of a receptor on the sperm plasma membrane. **FEBS Lett**. 1308:116-120.
- Theveny B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E., 1987. Association of DNA-bound progesterone receptors. **Nature**. 329:79-81.
- Topper YJ, Freeman CS. 1980. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. **Physiol. Rev**. 60:1049-1060.

- Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P., 1988. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. **Nature**. 333:185-188.
- Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horowitz KB. 1993. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. **Mol. Endocrinol.** 7:1256-1266.
- Ukena K, Kohichi C, Tsutsui K. 1999. Expression and activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase in the rat Purkinje neuron during neonatal life. **Endocrinology**. 140:805-813.
- Vandenbroucke, J.P., Bloemenkaamp, K.W.M., Helmerhorst, F.M., Rosendaal, F.R. Risk of oral contraceptives and recency of market introduction. (Letter) **Contraception** 1997; 55:191-192.
- Vegeto E. Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP., 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. **Mol. Endocrinol.** 7:1244-1255.
- Vongher JM, Fry CA. 1999. Progesterone in conjunction with estradiol has neuroprotective effects in an animal model of neurodegeneration. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 64:777-785.
- Wagner BL, Norris JD, Knotts TA, Weigel NL, McDonnell DP. 1998. The nuclear corepressors NCoR and SMRT are key regulators of both ligand- and 8-bromo-cyclic AMP-dependent transcriptional activity of the human progesterone receptor. **Mol Cell. Biol.** 18:1369-1378.
- Warembourg M, Jolivet A, Milgrom E., 1989. Immunohistochemical evidence the presence of estrogen and progesterone receptors in the same neurons of the guinea-pig hypothalamus and preoptic area. **Brain Res.** 480:1-15.

- Wei LL, Leach MW, Miner RS, Demers LM. 1993. Evidence for progesterone receptors in human osteoblast-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195:525-532.
- Weisz J, Ward IL. 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology.* 106:306-316.
- Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP., 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol. Cell. Biol.* 14:8356-8364.
- Wilde MI, Balfour JA. 1995. Gestodene. A review of its Pharmacology, Efficacy and Tolerability in Combined Contraceptive Preparations. *Drugs.* 50(2):364-395.
- Ylikomi T, Gasc JM, Isola J, Baulieu EE, Tuohimäki P., 1985. Progesterone receptor in the chick bursa of Fabricius: characterization and immunohistochemical localization. *Endocrinology.* 117:155-160.
- Zhang X, Jeyakumar M, Bagchi M. 1996. Ligand-dependent cross-talk between steroid and thyroid hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 271:14825-14833.
- Zwain IH, Yen SS. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology.* 140:3843-3852.

11 Apéndice

11.1 Reactivos

11.2 Soluciones

TBS

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
* pH 7.5	

Solución de corrida

Tris	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1 %
* pH 8.3	

Solución de transferencia 4X

Tris	153.6 mM
Glicina	0.73 M

Solución de transferencia 1X

Tris	38 mM
Glicina	180 mM
metanol	20 %

Solución de bloqueo

leche descremada en polvo	5 %
---------------------------	-----

albúmina	0.5 %
----------	-------

* preparar en TBS 7.5

Buffer de lisis

DTT	1 mM
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
Glicerol	30 %
Leupeptina	4 µg/ml
Aprotinina	22.5 µg/ml
PMSF	1 mM
Ortovanadato	1 mM
Azida	15 mM
Tritón	1 %

*Preparar en TBS pH 7.5

Buffer de carga

Tris	50 mM
SDS	2 %
Mercapto	5 %
Bromofenol	0.1 %
Glicerol	10 %

11.3 Preparación de las hormonas

11.3.1 Preparación de la Progesterona (P₄)

Se disolvieron 12 mg de P₄ en etanol absoluto al 10% (200 µl) más 2 ml de propilenglicol.

11.3.2 Preparación del Estradiol (E₂)

Se disolvieron 6 mg de 17β estradiol en etanol absoluto al 10% (300 µl) más 3 ml de propilenglicol, y ésta se diluye para tener una concentración total de 10 µg/200 µl.