



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES
MEMBRANALES A PROGESTERONA (mPRS) α , β Y γ EN
TEJIDO NEURONAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

TANIA DE LOURDES OCHOA MERCADO



MÉXICO, D.F.

2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

VOCAL: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SECRETARIO: DR. JORGE MORALES MONTOR

1er. SUPLENTE: DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA

2º SUPLENTE: DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MENDEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. JORGE MORALES MONTOR

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. KAREN ELIZABETH NAVA CASTRO

SUSTENTANTE:

TANIA DE LOURDES OCHOA MERCADO

ABREVIATURAS

Ácido γ -aminobutírico	GABA
Alopregnenolona	DHT
Células presentadoras de antígenos	APC
Células T de Helper	Th
Colesterol lipoproteico de baja densidad	LDL
Componente 1 del receptor membranal a progesterona	PGRMC1
Dehidroapiandrosterona	DHEA
Dihidroprogesterona	DHP
Dominio de unión al DNA	DBD
Dominio de unión al ligando	LBD
Dominios de activación	AF
Eje hipotálamo-pituitaria-testículos	HPT
Hormona foliculo-estimulante	FSH
Hormona liberadora de adrenocorticotropina	ACTH
Hormona liberadora de gonadotropinas	GnRH
Hormona luteinizante	LH
Líquido cefaloraquídeo	LCR
Progesterona	P4
Prostaglandinas	PGE 2
Receptor a progesterona isoforma A	PR-A
Receptor a progesterona isoforma B	PR-B
Receptor a progesterona isoforma C	PR-C
Receptor intracelular específico	hRP
Receptor membranal a progesterona isotipo α	mPR α
Receptor membranal a progesterona isotipo β	mPR β
Receptor membranal a progesterona isotipo γ	mPR γ
Receptor olfativo	OR
Receptores membranales a progesterona	mPR
Receptores nucleares o clásicos a progesterona	PR
Sistema Endócrino	SE
Sistema Inmune	SI
Sistema Nervioso Central	SNC
Sistema Neuroendócrino	SNE
Tetrahidroprogesterona	THP

ÍNDICE

Resumen	6
Introducción	
1. La red neuroinmunoendócrina	7
2. Sistema nervioso central	9
2.1 Tipos celulares del sistema nervioso central	11
2.1.1 Neuronas	11
2.1.2 Neuroglia	13
2.2 Hipotálamo	15
2.3 Hipocampo	16
2.4 Bulbo olfatorio	18
2.5 Corteza cerebral	18
2.6 Área preóptica	19
3. Eje HPG (hipotálamo-pituitaria-gónadas)	20
3.1 Eje hipotálamo-pituitaria-testículos	21
3.2 Eje hipotálamo-pituitaria-ovarios	22
4. El sistema endócrino y las hormonas	23
4.1 Secreción hormonal	25
4.2 Circulación y transporte hormonal	25
5. Hormonas esteroides	26
6. La progesterona	27
6.1 Síntesis	27
6.1.1 Síntesis en las glándulas adrenales	28
6.1.2 Síntesis ovárica	30
6.1.3 Síntesis neuronal	31
6.2 Efectos de la progesterona en tejidos reproductivos	33
6.3 Receptores a progesterona	36
6.3.1 Receptores nucleares	36
6.3.1.1 Cascada de señalización	38
6.3.1.2 Expresión de los receptores nucleares a progesterona	39
6.3.2 Receptores membranales	40
6.3.2.1 Cascada de señalización	42
6.3.2.2 Expresión de los receptores membranales a progesterona	43
7. Efectos de la progesterona en tejidos no reproductivos	45
7.1 Efectos de la progesterona en células del sistema inmune	45
7.2 Efectos de la progesterona sobre el SNC	46
7.2.1 Neuroprotección	48
7.2.2 Memoria y aprendizaje	50
7.2.3 Estado de ánimo	50
7.2.4 Regulación de la función glial	51
7.2.5 Regulación del comportamiento reproductivo	52
7.3 Expresión de los receptores a progesterona en SNC	54
7.3.1 Los receptores nucleares a progesterona	54
7.3.2 Expresión de los receptores membranales	

RESUMEN

La progesterona es una hormona esteroide que participa en la regulación de diversas funciones de los sistemas reproductivo, nervioso e inmunológico en los vertebrados. En el sistema nervioso central (SNC) se le ha relacionado con funciones como la excitabilidad neuronal, la neuroprotección, la memoria, el aprendizaje y la regulación del estado de ánimo. La progesterona y sus derivados, actúan a través de receptores nucleares clásicos (PR), pero también inducen respuestas rápidas no genómicas a través de receptores de membrana (mPRs). Se han descrito 5 subtipos de mPR: α , β , γ , δ y ϵ . Por otra parte, existen pocos estudios que describen la expresión de estos receptores en el SNC, sin embargo, su expresión diferencial entre hembras y machos, por edad e incluso en las diferentes áreas del SNC, no se han definido claramente.

En el presente estudio, caracterizamos por citometría de flujo por medio de una tinción intracelular, la expresión de los subtipos α , β y γ en el hipocampo, hipotálamo, la corteza frontal, la corteza lateral, el bulbo olfatorio y el área preóptica de ratones hembras y macho prepúberes y adultos. Los resultados obtenidos mostraron que el mPR β es el más expresado dentro del SNC, siendo las hembras adultas las de mayor expresión, además se observó que la expresión del mPR α no está influenciada por la carga hormonal de los animales y finalmente, el mPR γ se expresa únicamente en animales prepúberes. Adicionalmente los resultados obtenidos en los animales gonadectomizados arrojaron que en todas las áreas del SNC β , tiene un porcentaje de expresión mayor, así como una mayor intensidad de fluorescencia media en los animales sham (animales sometidos a una cirugía simulada), respecto a los mPR α y mPR γ . El subtipo α , se expresa poco dentro del SNC, pero tiene presencia en todas las áreas. Finalmente, el subtipo " γ " únicamente se expresa en los machos sham. Nuestros resultados demuestran que la expresión de los mPRs dentro del SNC depende de diversos factores como la edad y el sexo. Sin embargo, son necesarios más estudios para comprender mejor como se regula la expresión de estos receptores en el SNC.

INTRODUCCIÓN

1. LA RED NEUROINMUNEONDÓCRINA

En vertebrados superiores, particularmente mamíferos, existen diversos mecanismos homeostáticos que regulan múltiples aspectos fisiológicos, tales como la temperatura corporal, el balance electrolítico, el intercambio de gases (oxígeno), diversos procesos anabólicos-catabólicos, entre otros. Sin embargo, estos mecanismos se encuentran regulados a su vez, a través de sistemas homeostáticos más complejos, entre los cuales destacan por su importancia el Sistema Endócrino, el SNC y el Sistema Inmune. Estos sistemas tienen influencias reguladoras entre sí, para que las reacciones fisiológicas no se extralimiten. Además, captan las informaciones de ambiente animado e inanimado como base para la respuesta correspondiente, ya sea en forma de reacción (defensa, huida, enfrentamiento) o de adaptación a la situación. Estas interrelaciones se ven reflejadas en los ritmos circadianos y su influencia en la patología del estrés, en la inmunidad o en el metabolismo¹.

El SNC está constituido por el encéfalo y la médula espinal. Su función principal es la de recibir estímulos internos y externos, interpretarlos y coordinar una respuesta precisa por medio de distintos órganos efectores. El encéfalo, se compone principalmente de dos tipos celulares: neuronas y células gliales. Las principales funciones de las células gliales (neuroglia), son las de proveer soporte y nutrición a las neuronas, así como la generación de nuevos cuerpos neuronales. Las neuronas, por su parte, están a cargo de la recepción de estímulos, tanto internos como externos, y la pronta orquestación de una respuesta a través de la transmisión del impulso nervioso por medio de potenciales de acción y neurotransmisores. A través de cientos de conexiones axonales, las neuronas se comunican entre sí, formando una compleja pero eficiente red de procesamiento de información que regula y mantiene la homeostasis del organismo².

El sistema endócrino constituye otro de los sistemas homeostáticos más importantes de los mamíferos. Su función principal es la de comunicar a las

distintas células, tejidos, órganos y sistemas de un organismo a través de la secreción de hormonas o mensajeros químicos. Las hormonas de naturaleza química esteroide o proteínica, son sintetizadas y liberadas por células especializadas en respuesta a un estímulo. Estas células se concentran en el hipotálamo, la hipófisis, la glándula tiroides y paratiroides, las adrenales, ovarios y testículos entre otros. Las hormonas secretadas por las glándulas, son depositadas en el torrente sanguíneo a través del cual pueden ser transportadas y encontrar a su célula blanco², aún en órganos sumamente alejados de la glándula donde originalmente se sintetizó la hormona. Las hormonas esteroides, como el 17 β -estradiol, la progesterona, la dehidroepiandrosterona, la testosterona, la aldosterona, el cortisol, y sus metabolitos) y las hormonas proteínicas (hormona liberadora de corticotropina, hormona leutinizante, hormona folículo estimulante, tiroxina, prolactina, oxitocina, y hormona del crecimiento, entre otras) mantienen una permanente comunicación entre el SNC y el sistema endócrino, constituyendo al sistema neuroendócrino (SNE), de bien sabida importancia en procesos tales como crecimiento, diferenciación, y reproducción³.

El sistema inmune constituye un sistema vital en el mantenimiento de la homeostasis interna de un organismo, particularmente cuando ésta se ve amenazada por un agente invasor como pueden ser virus, bacterias y parásitos, entre otros. Este sistema está conformado por una gran variedad de tipos celulares, entre los cuales destacan los linfocitos T colaboradores o helpers, por sus siglas en inglés (Th0, Th1, Th2, Th3, Th17, Th33), T citotóxicos, T γ/δ , T reguladores; linfocitos B, así como células presentadoras de antígenos (APC's por sus siglas en inglés), como los macrófagos y células dendríticas, y otros tipos de granulocitos (eosinófilos, basófilos, mastocitos y neutrófilos). En su conjunto, todos estos tipos celulares constituyen la respuesta inmunológica que, dependiendo del estímulo antigénico, puede ser innata o adaptativa².



Figura 1. Interrelaciones entre el SNC, sistema endócrino y el sistema inmune.

Como resultados de esta comunicación multidireccional entre el SNC, el sistema endócrino e inmune, se tiene una compleja red de interacciones neuroinmunoendócrinas (figura 1), que es fundamental para mantener la homeostasis durante el proceso salud-enfermedad del organismo humano.

2. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal (figura 2). El encéfalo se ubica dentro del cráneo; la médula espinal se ubica en el conducto raquídeo, extendiéndose desde el agujero occipital hasta la segunda vértebra lumbar⁴.

En términos generales, el encéfalo se puede subdividir en cerebro, cerebelo y tronco encefálico. Según las formaciones embrionarias de las cuales deriva o se forma, el SNC se divide en tres partes principales: Romboencéfalo, mesencéfalo y prosencéfalo. Clásicamente, el romboencéfalo incluye el bulbo raquídeo, el puente y cerebelo. En conjunto, el bulbo raquídeo, el puente y el mesencéfalo forman el

tronco encefálico⁴. El prosencéfalo comprende el diencefalo (el tálamo y el hipotálamo) y el telencéfalo (hemisferios cerebrales).

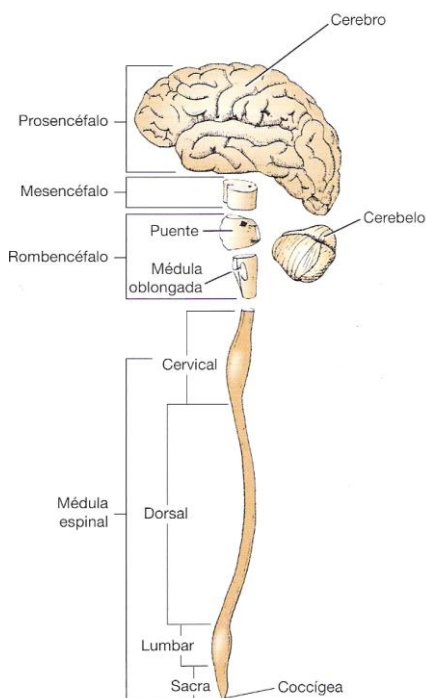


Figura 2. División del SNC (<http://consorciodeneuropsicologia.org/>)

Los hemisferios cerebrales son con diferencia, las partes más grandes del encéfalo humano, rodean y cubren tanto el diencefalo como el mesencéfalo. La superficie de los hemisferios cerebrales presenta una serie de giros o circunvoluciones, separadas por surcos o fisuras⁴.

El SNC se encuentra protegido no solo por el cráneo y la columna vertebral, sino también por capas de membranas llamadas meninges y está bañado por el líquido cefaloraquídeo. Este líquido rodea al encéfalo y la médula espinal y circula por canales y ventrículos, lleva nutrientes a diferentes partes del SNC, y además, actúa como amortiguador de impactos; mientras que la barrera hematoencefálica regula el pasaje de sustancias desde la circulación sanguínea al tejido nervioso y al líquido cefaloraquídeo, proveyendo una protección adicional al sistema⁵.

2.1 Tipos celulares del SNC

A pesar de su extrema complejidad, el SNC se basa en células especializadas, las cuales pueden dividirse en dos amplias categorías: las células nerviosas (o neuronas) y células de sostén llamadas glía (neuroglia). Las neuronas, están especializadas en el señalamiento eléctrico en largas distancias. Por el contrario, las células de sostén no pueden efectuar el señalamiento eléctrico, no obstante, tienen varias funciones esenciales en el encéfalo en desarrollo y del adulto.

2.1.1 Neuronas

Las neuronas y la glía, al igual que otras células, contienen retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, las mitocondrias y distintas estructuras vesiculares. La organización celular básica de las neuronas se asemeja a la de otras células. Sin embargo, se distinguen con claridad por la especialización para la comunicación intercelular. El signo más evidente de especialización neuronal para la comunicación a través del señalamiento eléctrico es la ramificación extensa de las neuronas, las dendritas, que surgen del cuerpo de la célula neuronal. Estas ramificaciones son el blanco primario de las eferencias sinápticas desde otras neuronas⁶.

La información transmitida por la sinapsis a las dendritas neuronales (figura 3) es procesada en el origen del axón, porción de la célula nerviosa especializada en la conducción de señales hacia el sitio siguiente de interacción sináptica. Muchas células nerviosas del encéfalo humano (y de otras especies) tienen axones cuya longitud no es superior a unos milímetro y algunas no tienen ningún axón⁶.

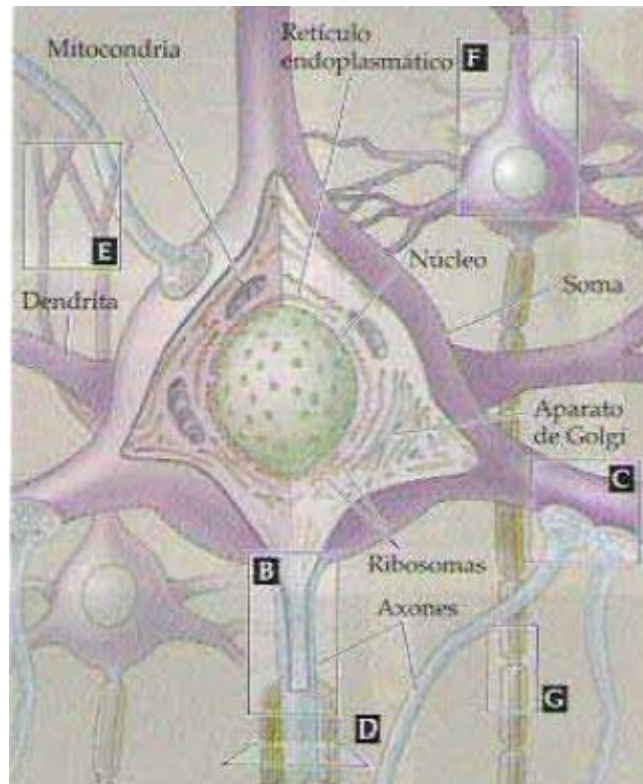


Figura 3. Diagrama de células nerviosas y sus componentes. **B.** Segmento inicial del axón (azul) que entra en la vaina de mielina (dorado). **C.** Botones terminales (azul) cargado con vesículas sinápticas que forman sinapsis con una dendrita (púrpura). **D.** Corte transversal de axones (azul) envainado por las prolongaciones de los oligodendrocitos (dorado). **E.** Dendritas atípicas (púrpura) de las células piramidales corticales. **F.** Cuerpos de células nerviosas (púrpura) ocupadas por grandes núcleos redondos. **G.** Porción del axón mielinizado (azul) que ilustra los intervalos entre segmentos adyacentes de mielina (dorado) denominados nodos de Ranvier (Purves, 2007).

El cuerpo celular (soma) (figura 3) es la región dilatada de la neurona que contienen un núcleo grande con un nucléolo prominente y el citoplasma perinuclear circundante, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, microtúbulos, neurofilamentos y microfilamentos de actina. Las neuronas son muy activas en la síntesis proteica y por lo tanto tienen un retículo endoplásmico rugoso extenso y bien desarrollado⁷.

Las neuronas transmiten señales a otras neuronas y a células efectoras como las musculares y las glandulares a través de uniones conocidas como sinapsis. La comunicación rápida que ofrecen las neuronas y su disposición en

redes organizadas con la clave de la integración y el control centralizado que sustenta el estilo de vida activa de los animales.

Dentro del SNC existen tres tipos de neuronas⁵:

1. Las interneuronas, que transmiten señales dentro del SNC y forman circuitos neuronales.
2. Las neuronas de proyección, que transmiten señales desde un punto a otro dentro del SNC.
3. Las neuronas motoras, que transmiten señales fuera del SNC hacia las células efectoras: músculos y glándulas. Estas neuronas son eferentes, de modo que llevan señales hacia la periferia, a diferencia de las neuronas sensoriales que son aferentes, que transmiten información del sistema nervioso periférico hacia el SNC.

2.1.2 Neuroglia

Las células neurogliales, son muy diferentes de las células nerviosas. Son más numerosas que las neuronas en el encéfalo, a las que superan en número en una relación tal vez de 3 a 1. La distinción principal es que las células de la glía no participan directamente en las interacciones sinápticas y en el señalamiento eléctrico, aunque sus funciones de sostén ayudan a definir contactos sinápticos y a mantener la capacidad de señalización de las neuronas. Aunque las células gliales también tienen prolongaciones complejas que se extienden desde sus cuerpos celulares, por lo general son menos sobresalientes que las ramificaciones neuronales, y no cumplen los mismos propósitos que los axones y las dendritas⁶.

Las funciones bien establecidas de las células gliales son: mantener el medio iónico de las células nerviosas, modular la velocidad de propagación de las señales nerviosas, modular la acción sináptica al controlar la captación de neurotransmisores en la hendidura sináptica o cerca de ella y proporcionar un

andamiaje para ciertos aspectos del desarrollo neural y ayudar en la recuperación de la lesión neural (o en algunos casos impedirla).

Dentro del SNC maduro existen tres tipos de células gliales⁶ (figura 4):

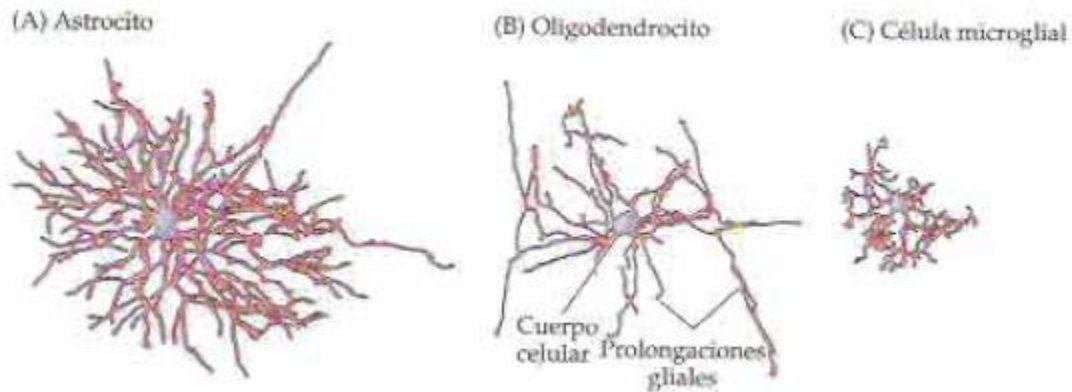


Figura 4. Variedades de células neurogliales. Trazados de un astrocito (A), un oligodendrocito (B) y una célula microglial (C) (Purves, 2007).

1. Los astrocitos, que están limitados al encéfalo y la médula espinal. Tienen prolongaciones locales elaboradas que brindan a estas células un aspecto estrellado. Una función importante de los astrocitos es mantener de distintas formas, un entorno químico apropiado para el señalamiento⁶.
2. Los oligodendrocitos, que también están restringidos al SNC, depositan una envoltura laminada y rica en lípidos llamada mielina alrededor de algunos axones, pero no de todos. La mielina también tiene efectos importantes sobre la velocidad de la transmisión de señales eléctricas⁶.
3. Las células microgliales derivan en mayor medida de células precursoras hematopoyéticas (aunque algunas pueden derivar directamente de células precursoras neurales). Estas células comparten muchas propiedades con los macrófagos que se encuentran en otros tejidos, y son fundamentalmente células limpiadoras que eliminan los restos celulares de sitios de lesión o de recambio celular normal. Además, secretan moléculas

de señalización (principalmente citosinas) que pueden modular la inflamación local e influir en la supervivencia o la muerte celular. Luego del daño encefálico, la cantidad de células microgliales en el sitio de la lesión aumenta de forma espectacular⁶.

2.2 Hipotálamo

El hipotálamo se localiza en la base del encéfalo anterior, forma el piso y las paredes laterales del tercer ventrículo y se continúa a través del tallo infundibular con la hipófisis posterior. El hipotálamo puede dividirse en una porción anterior, la región quiasmática, el hipotálamo central que incluye el infundíbulo (el tallo que conecta la hipófisis con el hipotálamo) y la porción posterior, el área mamilar. Los lados derecho e izquierdo del hipotálamo tienen un área hipotalámica media, que contiene muchos núcleos, y un área hipotalámica lateral⁶.

Aunque el hipotálamo es pequeño, tiene importantes funciones reguladoras, las cuales se describen en la siguiente tabla⁶:

Función	Descripción
Alimentación	El centro de la alimentación localizado en el hipotálamo lateral evoca el comportamiento de la ingesta. Un centro de saciedad en el núcleo ventromedial detiene el hambre e inhibe el centro de alimentación si se alcanza un nivel alto de glucosa en sangre después de ingerir alimentos.
Función autónoma	Las áreas posterolaterales y dorsomedial de hipotálamo funcionan como una región de activación simpática (catecolaminas), en tanto que un área anterior funciona como región de activación parasimpática.
Temperatura corporal	Cuando algunas áreas del hipotálamo se estimulan de manera adecuada, evocan respuestas autónomas que provocan la pérdida, conservación o producción de calor corporal. Por lo

	normal, el punto fijo o termostato hipotalámico se encuentra justo por debajo de 37°C de temperatura corporal.
Equilibrio de agua	La influencia hipotalámica en la secreción de vasopresina dentro de la hipófisis posterior se activa por los osmorreceptores en el hipotálamo, en particular en las neuronas dentro del “centro de la sed”.
Función de la hipófisis anterior	El hipotálamo ejerce una influencia directa en las secreciones de la hipófisis anterior y una indirecta en las secreciones de otras glándulas endócrinas al liberar o inhibir hormonas transportadoras por los vasos portales hipofisarios. Regula funciones endócrinas incluyendo la reproducción, conducta sexual, secreciones tiroideas y de la corteza suprarrenal y crecimiento. En las mujeres controla los ciclos menstruales, el embarazo y la lactancia
Ritmo circadiano	Las células del núcleo supraquiasmático muestran ritmos circadiano en la actividad metabólica y eléctrica y en la síntesis de neurotransmisores, y parecen mantener al resto del cerebro en un ciclo de día y noche.
Expresión de la emoción	El hipotálamo participa en la expresión de ira, temor, aversión, conducta sexual y placer.
Control del flujo sanguíneo	Promueve adaptaciones del volumen minutos, el tono vasomotor, la osmolaridad sanguínea y la depuración renal, y al motivar la ingestión de líquidos y el consumo de sal

Tabla 1. Descripción de las funciones del hipotálamo

2.3 Hipocampo

El hipocampo es un área cerebral clave para el aprendizaje y la memoria en los vertebrados, es la parte más grande del sistema límbico, la cual está constituida por el hipocampo propio (asta de Ammon), fimbria del hipocampo (cuerpo franjeado) y la circunvolución dentada⁸.

En los seres humanos el hipocampo se activa durante ciertos tipos de tareas de memoria, mientras que en los roedores, las neuronas del hipocampo sólo disparan potenciales de acción cuando un animal está en ciertas localizaciones. Estas “células de lugar” parecen codificar las memorias espaciales, interpretación apoyada por la falta de eficiencia en las tareas de aprendizaje espacial en ratas con daño del hipocampo⁶.

Existen diversas teorías sobre el papel del hipocampo en la memoria, en las cuales consideran a esta estructura crítica para la memoria episódica⁹.

- La teoría declarativa. El hipocampo, es crucial para todas las formas de los procesos de memoria conscientemente accesibles (episódica y semántica, el recogimiento y la familiaridad), por un período de tiempo limitado.
- Teoría de huella múltiple. Los recuerdos episódicos siguen dependiendo del hipocampo durante la vida y se hace más resistente al daño parcial, mientras que las memorias semánticas se vuelven independientes del hipocampo y se almacenan en otras regiones del cerebro en el tiempo.
- Teoría de doble Proceso. El hipocampo es importante para el recuerdo episódico de los detalles contextuales de un evento.
- Teoría relacional. El hipocampo permite la asociación flexible de la información en módulos neocorticales que no podían comunicarse de otra manera. Esto permite que las relaciones entre los elementos de una escena o un evento a ser recuperada o utilizado para la inferencia en situaciones nuevas.
- Teoría mapa cognitiva. Una función principal del hipocampo de mamíferos es construir y almacenar representaciones de lugares en el medio ambiente para ayudar a la navegación flexible, por ejemplo, a partir de una nueva posición de partida. En los seres humanos estos procesos predominantemente espaciales se han desarrollado para apoyar el contexto espacio-temporal de los recuerdos episódicos.

2.4 Bulbo olfatorio

Toda la información que un organismo posee sobre el mundo entero se obtiene a través de sus sistemas sensoriales. Para muchos animales, el olfato juega un rol en diversos aspectos de la vida incluyendo reconocimiento, interacciones madre-hijo y detección de depredadores. Los roedores han demostrado una habilidad excepcional de aprender rápidamente, recordar y discriminar olores¹⁰, donde el bulbo olfatorio es la estación central para el procesamiento de la información quimiosensitiva que surge en las neuronas receptoras en la cavidad nasal⁶.

La percepción de estímulos olfativos comienza con la unión de moléculas odorantes al receptor olfativo (OR) proteínas localizadas en neuronas sensoriales olfativas (OSN por sus siglas en inglés) en el epitelio nasal. La transducción de la señal olfativa comienza cuando las moléculas odorantes se unen a las OR e inician cascadas químicas dentro de las neuronas receptoras que generan los potenciales en los axones que viajan al bulbo olfativo a través de los axones OSN. Cada OSN responden a la superposición de conjuntos odorizantes con odorantes individuales capaces de activar más de un tipo de receptor. Por lo tanto, los diferentes olores se codifican a nivel epitelial por el subconjunto de neuronas receptoras activadas. Este conjunto único de neuronas receptoras activadas forma la base de un código de identidad de olor que se proyecta para el bulbo olfatorio. Por lo tanto, la exposición a un odorante específico sería estimular un subconjunto específico de neuronas receptoras, que, a su vez, activan un grupo de glomérulos formando un patrón espacial con base a las características moleculares de la odorantes¹⁰.

2.5 Corteza cerebral

La corteza cerebral contiene tres tipos principales de neuronas dispuestas es una estructura de capas: células piramidales (con forma triangular, con un dendrita apical); neuronas estelares (en forma de estrella, con dendritas que se

proyectan en todas direcciones); y neuronas fusiformes (que se encuentran en las capas más profundas, con una dendrita de gran tamaño que asciende hacia la superficie de la corteza. La corteza cerebral es la cubierta exterior de la materia gris en los hemisferios. Ciertas regiones corticales tienen funciones algo más sencillas, denominada las cortezas primarias. Éstas incluyen áreas que reciben directamente la información sensorial (visión, audición, sensación somática) o directamente involucrados en la producción de las extremidades o de los movimientos oculares. Las regiones de la corteza de asociación están al lado de las cortezas primarias, estas áreas son importantes en funciones más complejas incluyendo la memoria, el lenguaje, la abstracción, la creatividad, el juicio, la emoción y la atención. También están involucrados en la síntesis de los movimientos.

2.6 Área preóptica

El área preóptica, aunque funcionalmente forme parte del hipotálamo (y del diencefalo), embrionariamente deriva del telencéfalo. Está compuesta sobre todo por los núcleos preópticos medial y lateral. El núcleo preóptico medial contiene neuronas que fabrican hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Esta sustancia se transporta a lo largo del fascículo tuberoinfundibular hasta los capilares del sistema porta hipofisario y, desde allí, hasta el lóbulo anterior de la hipófisis, donde provoca la liberación de las gonadotropinas (hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante). Dado que esta liberación es continua en los hombres y cíclica en las mujeres, el núcleo preóptico medial del varón tiende a ser más activo y, por consiguiente, mayor que el de la mujer. Así pues, a menudo se le denomina núcleo sexualmente dimórfico del área preóptica. También influye sobre los comportamientos relacionados con la alimentación, las actividades reproductoras y la locomoción. El núcleo preóptico lateral se localiza inmediatamente rostral a la zona hipotalámica lateral. Aún no se ha determinado totalmente su función; sin embargo, por sus conexiones con el pálido ventral, puede tomar parte en la regulación de la locomoción¹¹.

Por otra parte, la región preóptica contiene neuronas que son sensibles a cambios sutiles en la temperatura hipotalámica. Las neuronas termosensibles preópticas también reciben una gran cantidad de información somatosensorial de la piel y termorreceptores espinales. De esta manera, las neuronas preópticas comparan e integran información térmica central y periférica. Como resultado de esta integración sensorial y su control sobre las zonas efectoras más bajas, la región preóptica provoca las respuestas termorreguladoras que son los más apropiados para ambas condiciones térmicas (internas y ambientales)¹².

3. EJE HPG (HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADAS)

En animales dotados de reproducción sexual, la transmisión genética requiere la fusión previa de la información complementaria de dos gametos diferentes.

La determinación del genotipo sexual en la concepción, seguida por el desarrollo fisiológico y endocrinológico, provocan múltiples diferencias entre machos y hembras en las especies sexualmente dimórficas (condición de especies animales que presentan dos aspectos anatómicos diferentes). Empezando desde la infancia y a lo largo de la edad reproductiva, se presentan diferencias basadas en la producción, secreción y concentraciones circulantes de estrógenos, progesterona y testosterona. La base de estas diferencias se encuentra principalmente en la función y desarrollo de eje HPG, que es el responsable, tanto en el macho como en la hembra, del control final de todos los aspectos del proceso reproductor. Ejercerá para ello dos funciones primordiales: esteroidogénesis y gametogénesis. La organización funcional de este eje es similar en ambos sexos, aunque existen algunos aspectos que difieren de forma importante¹³.

El control primario del eje es ejercido por la GnRH, producido por neuronas hipotalámicas, y es liberada a la circulación portal hipotálamo-hipófisis, una vez que llega a la hipófisis anterior (adenohipófisis), estimula la síntesis y liberación de

dos hormonas glicoproteicas: la FSH (hormona folículo-estimulante) y LH (hormona luteinizante). Ambas son sintetizadas por las células gonadotrópicas, la FSH y la LH son liberadas a la circulación general y actúan sobre las gónadas (ovario y testículo) ejerciendo el control de la esteroidogénesis y gametogénesis¹³.

3.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Testículos

La puesta en marcha y el mantenimiento subsiguiente de la función testicular depende de la adecuada secreción pulsátil de GnRH por parte del gonadostato hipotalámico, que a su vez determina la liberación pulsátil de las gonadotropinas hipofisarias, FSH y LH, hacia el torrente sanguíneo desde donde alcanzan el testículo. A este nivel la acción combinada de las gonadotropinas pone en marcha la espermatogénesis y la androgénesis, además de estar regulados hormonalmente por el eje HPT, dependen también de una compleja serie de interacciones locales de tipo autócrinas y parácrinas¹³.

El mantenimiento de la función normal depende pues de la secreción hipotalámica pulsátil de GnRH, que a su vez activa la secreción (también pulsátil) de LH y FSH. Ambas gonadotropinas actúan sobre el testículo (figura 5) iniciando la espermatogénesis (FSH) y la producción de testosterona (LH). A su vez, el testículo ejerce una retroalimentación negativa sobre la producción de FSH y LH. Este lazo de regulación negativa tiene como blanco principal el hipotálamo. La retroalimentación negativa por testosterona no se ejerce directamente sobre las neuronas productoras de GnRH sino sobre otros grupos neuronales sensibles a hormonas esteroides y que su vez se proyectan sobre las neuronas del generador de pulsos de GnRH.

La secreción de FSH en el macho es inhibida tanto por la testosterona como por el estradiol. Sin embargo, existe un regulador negativo específico de la secreción de FSH (producido en el testículo y en el ovario), la inhibina que es una hormona glicoproteica que además también es producida a nivel local en la

hipófisis, donde ejercen acciones de tipo parácrino, modulables además por la GnRH, por el estradiol y por la testosterona.

3.2 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovarios

El funcionamiento de este eje es similar, en cuanto a diseño y organización general, al eje hipotálamo-hipófisis-testículo, aunque con algunas particularidades que lo hace más complejo, y que vienen dictadas por el carácter cíclico de su funcionamiento. En la especie humana, en condiciones normales, los ovarios producen un único folículo dominante y por consiguiente una única ovulación en cada ciclo menstrual¹³. En el ciclo menstrual humano se designa como día 1 del ciclo el primer día de sangrado, es en este momento cuando los folículos tienen un tamaño pequeño y las células foliculares producen pequeñas cantidades de estradiol. En consecuencia existe un bajo nivel de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis, es aquí donde las concentraciones de la FSH están ligeramente elevadas, lo que causa una producción folicular de estradiol que incrementa la retroalimentación negativa (figura 5), como consecuencia de esto la secreción pulsátil de LH se enlentece, pero a medida que el folículo crece aparece un retroalimentación positiva del estradiol que ocasiona un aumento en la liberación de GnRH, así como un pico liberador de LH. Esto provoca la disolución de la pared folicular y la ovulación. La progesterona y el estradiol ejercen un efecto de retroalimentación negativa en el hipotálamo y la hipófisis por lo que se enlentece la frecuencia de pulsos de la LH. En ausencia de estimulación el cuerpo lúteo se atrofia espontáneamente, lo que causa una disminución de la secreción de progesterona y estradiol que provoca una disminución en las señales de retroalimentación negativa al hipotálamo y la hipófisis, lo que permite un nuevo aumento de la secreción de LH y FSH. La disminución de la progesterona constituye la supresión del soporte por parte de esta hormona para el endometrio uterino y es eliminado con lo que comienza el ciclo de nuevo¹⁴.

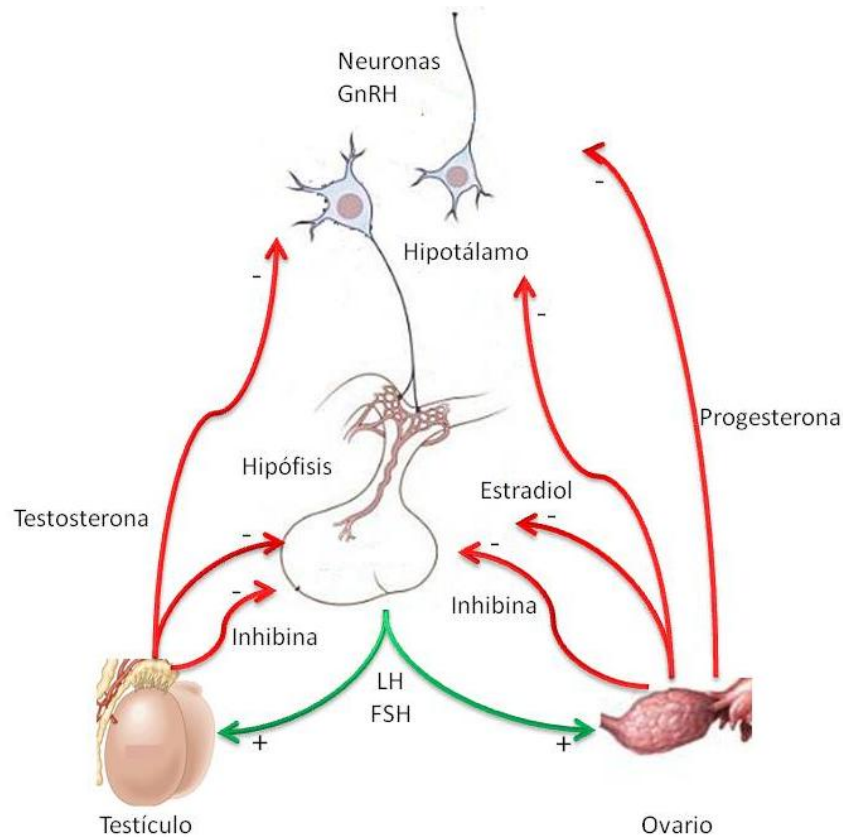


Figura 5. Diagrama del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Se muestran la retroalimentación de las hormonas esteroides gonadales a nivel del hipotálamo y la hipófisis. FSH: hormona folículo estimulante; LH: Hormona leutinizante (Kronenberg *et al.* 2009).

4. EL SISTEMA ENDÓCRINO (SE) Y LAS HORMONAS

El SE comprende el conjunto de órganos y tejidos que forman hormonas, estos órganos o tejidos funcionan como glándulas, que secreta una o varias hormonas. No hay relación anatómica entre las diversas glándulas endócrinas, pero entre algunas existen ciertas relaciones hormonales de interdependencia, control, es aquí cuando hablamos de ejes endócrinos, por ejemplo, SNC-hipotálamo-hipófisis-gónadas¹.

Las hormonas, auténticos mensajeros químicos; son sustancias orgánicas producidas por las glándulas y tejidos endócrinos que, por lo general, pasan a la circulación general y ejercen su acción en otros tejidos distantes del lugar de

secreción, de esta manera una de las clasificaciones de estos mensajeros químicos, es de acuerdo con la distancia sobre la que actúan (figura 6):

1. Endócrinos: que actúan sobre células distantes del sitio de liberación, por ejemplo la insulina y la adrenalina.
2. Parácrinos: (también llamados mediadores locales) actúan sobre células próximas a la célula que las libera.
3. Autócrinos actúan sobre las mismas células que las libera.

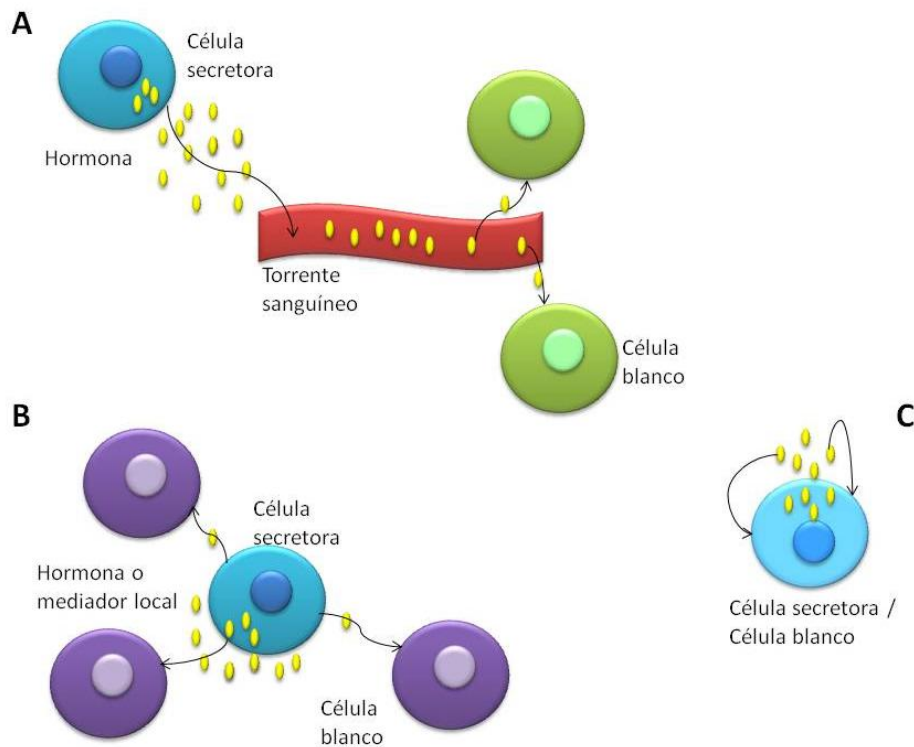


Figura 6. Clasificación de los mensajeros químicos de acuerdo a la distancia a la que actúan, (A) endócrino, (B) parácrino, (C) autócrino.

Las hormonas pueden poseer una estructura proteínica, esteroide, o ser aminas o ácidos grasos cíclicos. Las hormonas proteicas están constituidas por polipéptidos de pocos aminoácidos (menos de 15), como la somastatina y la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH); de un número medio de aminoácidos (aa), como la insulina (51 aa), el glucagon (29 aa); o de muchos,

como la hormona del crecimiento (191 aa). Las hormonas esteroides derivan del núcleo del colestano y son características de las glándulas suprarrenales y de las gónadas. Son consideradas aminas las catecolaminas, la serotonina, la melatonina, etc. Las prostaglandinas también consideradas hormonas, están constituidas por ácidos grasos de 20 carbonos con un pentaciclo¹.

4.1 Secreción Hormonal

La secreción hormonal no tiene lugar de forma continua y uniforme, sino pulsátil, con periodos de secreción (pulsos) y otros de reposo. En los pulsos se distinguen un pico, un nadir, una amplitud y una frecuencia, su característica es que pueden variar a lo largo del día, o en diversas circunstancias fisiológicas o patológicas. Cuando la secreción varía ostensiblemente a lo largo del día se habla de ritmo circadiano, que puede presentar su máxima secreción en uno u otro momento del día¹.

4.2 Circulación y transporte hormonal

Por lo general, las hormonas polipeptídicas pueden circular libres en plasma, mientras que las esteroides necesitan proteínas transportadoras que faciliten su circulación en el medio acuoso que es el plasma sanguíneo, ejemplo de esto es el cortisol transportado por la globulina transportadora de cortisol o las hormonas sexuales testosterona y estradiol, cuya proteína transportadora es común y se denomina TeBG o globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG), aunque en parte pueden unirse a otras proteínas. El transporte también impide su metabolización o su filtración renal en algunos casos, de forma que para actuar en las células sensibles hace falta que vuelvan a quedar libres para poder unirse a los receptores de membrana, del citosol o del núcleo. Generalmente una pequeña fracción hormonal (2-5%) circula libre y aumenta en circunstancias patológicas de hiperproducción¹.

5. HORMONAS ESTEROIDES

Los esteroides adrenocorticales median una amplia variedad de funciones metabólicas. Estos se producen en la corteza suprarrenal, donde se sintetizan al menos 50 esteroides adrenocorticales. Ésos se clasifican de acuerdo con la respuesta fisiológica que provocan¹:

- Los glucocorticoides afectan el metabolismo de los carbohidratos, las proteínas y el metabolismo lipídico en forma casi opuesta a la de la insulina e influyen en una amplia variedad de otras funciones vitales, incluidas reacciones inflamatorias y la capacidad de hacer frente al estrés. Los glucocorticoides más comunes son el cortisol (hidrocortisona) y la corticoesterona.
- Los mineralocorticoides regulan principalmente la excreción de sal por el riñón, por ejemplo la aldosterona.
- Los andrógenos y los estrógenos afectan el desarrollo y la función sexual, los cuales son sintetizados en grandes cantidades por las gónadas.
- La progesterona, que en los ovarios se sintetiza en el cuerpo amarillo y se secreta a nivel de las células de la granulosa del folículo. La progesterona se secreta durante el embarazo, en los ciclos menstruales y en el periodo de actividad sexual¹⁵.

Las gónadas (testículos en los machos y ovarios en las hembras), además de producir espermatozoides y óvulos, secretan hormonas esteroides (andrógenos y estrógenos) que regulan la diferenciación sexual, la expresión de caracteres sexuales secundarios y los patrones de comportamiento sexual. Ambos esteroides son sintetizados por testículos y ovarios, aunque en diferentes cantidades; los primeros secretan predominantemente andrógenos, por lo que se conocen hormonas sexuales masculinas, mientras que los ovarios secretan en mayor medida estrógenos, que en consecuencia se denominan hormonas sexuales femeninas.

6. LA PROGESTERONA

La progesterona, la progestina más abundante, está compuesta de C₂₁ es un precursor de los glucocorticoides, los mineralocorticoides y la testosterona; esta hormona esteroidea está involucrada en la regulación de diversas funciones en los vertebrados, actúa de forma conjunta con los estrógenos, ya que produce un endometrio secretor que conduce a la preparación y posteriormente, el mantenimiento del embarazo. En el tejido mamario, induce el desarrollo alveolar preparando la glándula para la lactancia¹⁶. Sin embargo, ésta hormona también participa en procesos no reproductivos muy diversos, como la regulación de la excitabilidad neuronal, la memoria y el aprendizaje, la neuroprotección, la proliferación de distintos tumores (Camacho-Arroyo, 2003), la ventilación pulmonar y la respuesta inmunológica. Desde hace más de 70 años, Hans Seyle reportó que la progesterona producía efectos anestésicos, después se demostró que la progesterona se metaboliza en distintas regiones del sistema nervioso para formar alopregnenolona y tetrahidroprogesterona (THP), las cuales se unen al receptor GABA_A para producir somnolencia y sedación¹⁶.

6.1 Síntesis

La progesterona se sintetiza principalmente en el ovario, la glándula adrenal, la placenta y el SNC¹⁷. El ovario representa, en condiciones normales, la fuente principal de las hormonas esteroides sexuales presentes en la circulación. La función esteroidogénica del ovario se encuentra regulada por las gonadotropinas hipofisarias. La capacidad del ovario para sintetizar las diferentes hormonas sexuales esteroides varía en las diferentes etapas de la vida. A diferencia de la gónada masculina, el ovario es inactivo en cuanto a la producción de hormonas durante la vida intrauterina, y es hasta la pubertad cuando adquiere su capacidad esteroidogénica¹⁶.

La síntesis de la progesterona y otros esteroides (el estradiol, androstendiona, la testosterona, y la 17- β -hidroxiprogesterona) se encuentra determinada por tres factores principales:

1. Las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH)
2. La presencia de receptores específicos para LH y FSH, en las membranas de las células esteroideogénicas
3. La disponibilidad de los sustratos necesarios para su síntesis
4. De los productos hormonales del ovario, la progesterona y el estradiol son los más importantes.

La esteroideogénesis es similar en las adrenales y las gónadas, pero con las diferencias enzimáticas inherentes a cada glándula y a cada zona de la corteza adrenal¹.

6.1.1 Síntesis en las glándulas adrenales

La biosíntesis de la progesterona y de las demás hormonas esteroides, en las adrenales, es a partir del colesterol, cuya fuente principal es el colesterol circulante captado por los receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL); en menor proporción derivada del colesterol sintetizado en las propias células a partir del acetato o del colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL) captado por receptores diferentes.

A partir del colesterol se forma la 5-pregnenolona. Primero el colesterol pasa al interior de las mitocondrias, luego se hidroxila y se escinde la cadena; todo ello está regulado por una sola enzima: CYP11A1, esta vía está estimulada por la ACTH (hormona liberadora de adrenocorticotropina) y la angiotensina II. De la 5-pregnenolona se originan los demás progestágenos. Por la acción de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, δ 5, δ 4-isomerasa (3 β -HSD-II) se convierte en progesterona. Sobre la pregnenolona y la progesterona actúa la 17 α -hidroxilasa (17 α -OH)/17-20 liasa (P450c17) para formar respectivamente 17 α -

hidroxipregnenolona y 17 α -hidroxiprogesterona. La progesterona es el principal precursor de mineralocorticoides, mientras que la 17-hidroxiprogesterona lo es de los glucocorticoides¹.

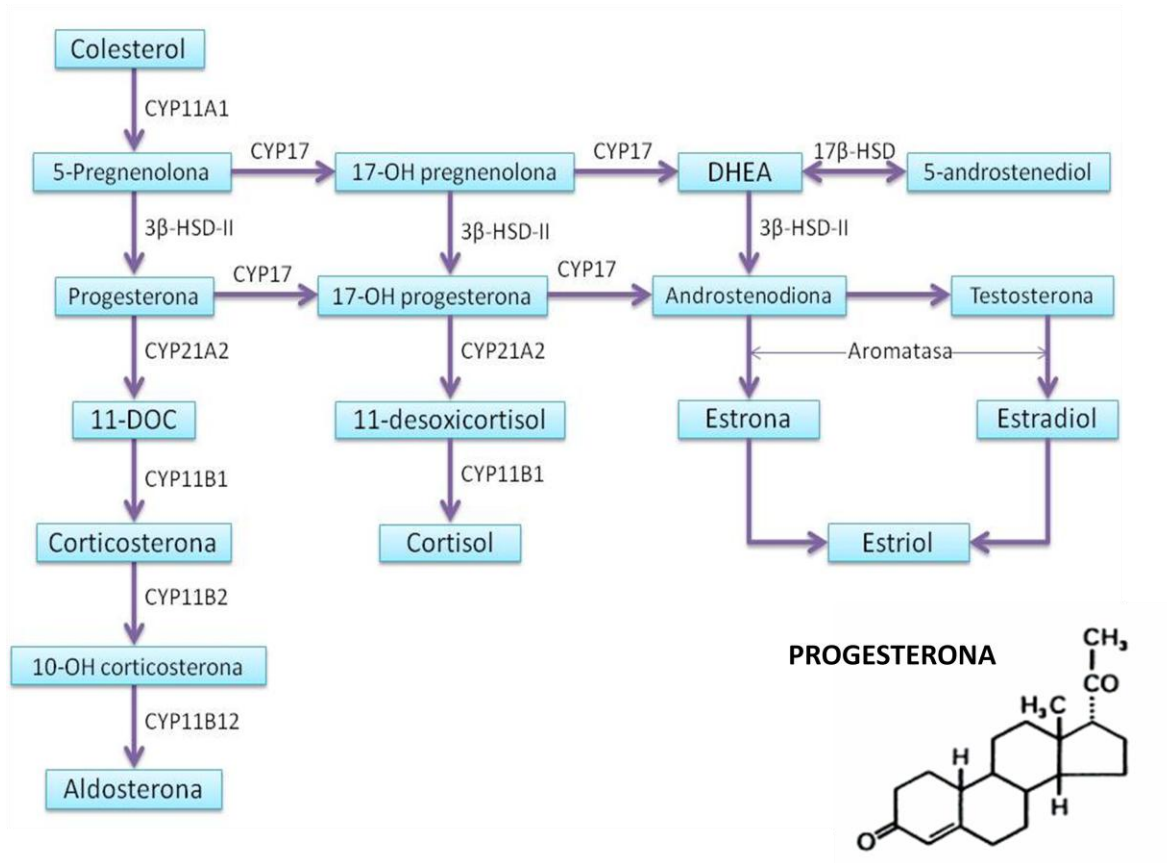


Figura 7. Representación esquemática de la esteroidogénesis adrenal.

La progesterona (figura 7) se hidroxila por la 21-hidroxilasa (CYP21A2) lo que da origen a la 11-desoxicorticosterona (DOC) y luego actúa una sola enzima (aldosterona sintasa o CYP11B2) con acción hidroxilasa seguida de 10-metiloxidasa para formar aldosterona. El cortisol proviene de la 17 α -hidroxiprogesterona por la acción sucesiva de la 21-hidroxilasa (21-OH o CYP21A2, que forma 11-desoxicortisol) y de la 11 β -hidroxilasa, que confiere al cortisol el grupo típico 11-hidroxilasa (11-OH o CYP11B1). Los andrógenos se forman a partir de los progestágenos; en primer lugar actúa la 17 α -OH, seguida de la actividad de 17,20-liasa (ambos componentes de la enzima P450c17). Así surge

la DHEA desde la 17α -hidroxipregnenolona y la 4-androstenediona a partir de la 17α -hidroxiprogesterona. Posteriormente sobre ambas actúa la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) para formar, respectivamente, 5 androstenediol y testosterona (figura 7)¹.

6.1.2 Síntesis ovárica

La fuente principal del colesterol utilizado por el ovario para la esteroidogénesis deriva de la captación del colesterol lipoprotéico de baja densidad (LDL); un porcentaje es sintetizado *in situ* por las células a partir de la acetilcoenzima A. El ingreso de la LDL a la célula se realiza a través de un proceso de endocitosis mediado por un receptor. El destino del colesterol intracelular puede ser la esterificación con ácidos grasos para formar ester-colesterol y almacenarse como gotas de lípidos o bien ser transportados al interior de la mitocondria para ser utilizados en la síntesis de hormonas. En la membrana interna de la mitocondria se encuentra la primera enzima P450_{scc} (*side chain cleavage*), que oxida al carbono 20 y desprende la cadena lateral como ácido isocaproico. El producto que se forma es la pregnenolona, es el precursor necesario de todos los esteroides sexuales ováricos¹.

Una vez formada la pregnenolona, existen dos alternativas enzimáticas¹:

1. La ruta de la 3β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3β -HSD), que conduce a la formación de progesterona.
2. Hidroxilación en posición 17, que origina, 17-hidroxipregnenolona, la cual a su vez puede romper la unión entre los carbonos 17 y 20 y originar dehidroepiandrosterona. Esta ruta conduce la síntesis de andrógenos y estrógenos, pero más adelante se encontrará con parte de la 3β -HSD.

Para la síntesis de la progesterona, la pregnenolona es llevada hasta el retículo endoplásmico donde la 3β -HSD (mediante la deshidrogenación del grupo hidroxilo, su conversión a grupo cetónico y la isomerización del doble enlace C-5-C-6 a C-

4.C-5 cataliza la transformación de pregnenolona en progesterona. La mayor parte de la progesterona sintetizada pasa a la sangre y una pequeña parte se queda en C-17, que da lugar a androstenediona.

6.1.3 Síntesis Placentaria

La placenta humana tiene la función de mantener el embarazo. En las mitocondrias de este tejido se sintetiza la pregnenolona a partir de colesterol a través de una cadena de transporte compuesta por la adrenodoxina, la adrenodoxina reductasa y el citocromo P450 que rompe la cadena lateral del colesterol (P450_{scc}). La pregnenolona se transforma rápidamente en progesterona dentro de la mitocondria por el complejo enzimático de la 3 β -OH-esteroide-deshidrogenasa-D5-6-isomerasa. Sin embargo, a la fecha no se conoce qué hormona(s) o sustancia(s) son las responsables de modular la transformación de colesterol en progesterona durante el embarazo. Incluso se han aislado proteínas comunes que participan en la transferencia de colesterol en los ovarios, los testículos y en las glándulas suprarrenales que no se han detectado en la placenta, lo que indica que este tejido tiene propiedades esteroideogénicas únicas¹⁸.

6.1.4 Síntesis neuronal

Es bien sabido que el SNC es un blanco de los efectos endócrinos de las hormonas esteroideas provenientes de glándulas esteroideogénicas periféricas. Sin embargo, el sistema nervioso también controla de una manera parácrina y autócrina los esteroides sintetizados directamente por las neuronas y las células gliales, llamados neuroesteroides¹⁹. Estos neuroesteroides están dentro de la familia de esteroides neuroactivos, donde se incluyen esteroides hormonales, neuroesteroides y esteroides sintéticos, los cuales pueden regular diversas funciones neuronales.

La síntesis y el metabolismo de los esteroides neuroactivos ocurre en las células gliales y en las neuronas²⁰. La esteroidogénesis tiene como paso inicial la translocación del colesterol del citoplasma a la membrana mitocondrial. Este paso está limitado y mediado hormonalmente por StAR y la proteína translocadora 18 kDa. En la mitocondria. La enzima P450_{scc} convierte al colesterol en pregnenolona, que es transformada en progesterona o DHEA en el retículo endoplásmico²¹. Estas moléculas ejercen efectos sobre el SNC *per se*, pero pueden sufrir transformaciones metabólicas que las conducen a la formación de metabolitos neuroactivos. Debido a su naturaleza lipófila, los esteroides neuroactivos se mueven de una célula a otra. Esto afecta en gran medida su metabolismo, que se rige por el repertorio enzimático que expresan los diferentes tipos celulares. Por ejemplo la DHEA puede ser convertida en androstenediol, y posteriormente en testosterona o en androstenediona en todas las células del SNC²¹. En las neuronas, la androstenediona, así como la testosterona pueden ser convertidas por la enzima P450 aromatasa (ARO) a estrona y 17 β -estradiol, respectivamente. Esto también ocurre en los astrocitos, esto también ocurre en los astrocitos, los cuales muestran ARO, pero no en la microglia²². En las neuronas, así como en los astrocitos, la progesterona y la testosterona pueden ser metabolizadas por el complejo enzimático formado por la 5 α -reductasa (5 α -R) y la 3 α -hidroxiesteroide dehidrogenasa (3 α -HSD) en dihidroprogesterona (DHP) y tetrahidropogesterona (THP), también conocida como alopregnenolona (DHT) y 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (3 α -Diol) respectivamente²¹. Aunque esta vía es compartida con la microglía, este tipo celular no es capaz de producir pregnenolona o progesterona. Además expresa 17 β -HSD, que sintetiza androstenediol a partir de la DHEA²³ y la testosterona a partir de la androstenediona. Finalmente, las células de la microglia no expresan ARO, así que producen estradiol solamente de estrona y no de testosterona (figura 8)²⁴.

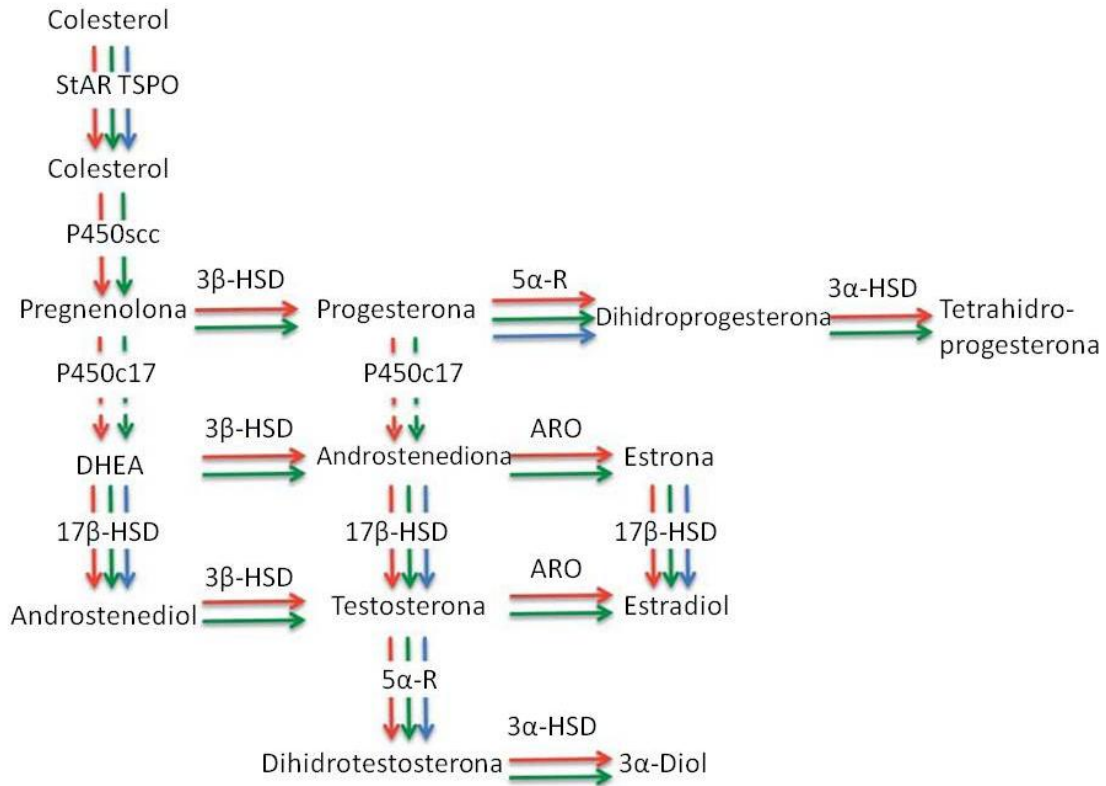


Figura 8. Representación esquemática de la neuroesteroidogénesis. Las flechas representan la localización celular en neuronas (rojo), astrocitos (verde), microglia (azul).

6.2 Efectos de la Progesterona en tejidos reproductivos

La progesterona participa en procesos reproductivos, como la maduración del ovocito e implantación del ovocito fecundado. En los humanos y otros vertebrados, la actividad biológica de la progesterona es mediada por varios mecanismos²⁵ que por un lado modulan cascadas de señalización intracelular (mecanismo no genómico) y por otro, modifican la actividad y el patrón de expresión génica (mecanismo genómico) de las células.

En el ovario, los receptores a progesterona (PR) juegan un papel importante en la función ovárica, se demostró que la antiprogesterina RU486 inhibe la ovulación y que la hormona leutinizante (LH), la señal primaria para la ruptura de los folículos ováricos preovulatorios, puede estimular la expresión transitoria de

ARNm de PR y en las células de la granulosa^{26,27}, En ratones que carecen de ambas isoformas de los PR dejan de ovular, incluso en respuesta a la inducción de la ovulación. Después de la ovulación, la progesterona promueve su propia secreción e inhibe la proliferación celular y la apoptosis en células de la granulosa luteinizadas²⁷. La mucosa uterina es el principal objetivo de las hormonas esteroides ováricas. El aumento posterior a la ovulación en los niveles circulantes de progesterona inhibe la actividad proliferativa del endometrio humano estimulado de estrógenos e induce una remodelación de tejidos para la preparación de la implantación del embrión y formación de la placenta. El efecto antiproliferativo de la progesterona es, al menos en las células epiteliales, mediado por la inhibición de múltiples genes. Además, la progesterona inicia un programa de diferenciación caracterizada inicialmente por el crecimiento de arterias espirales, transformación secretora de las glándulas, afluencia de células inmunes, las células asesinas naturales uterina (uNK) y posteriormente por decidualización del compartimiento del estroma. La transformación de los fibroblastos del estroma en células deciduales-epiteliales secretoras durante la fase secretora tardía del ciclo otorga algunas características únicas sobre el endometrio, esenciales para la invasión coordinada del trofoblasto en caso de embarazo²⁷.

En la placenta las concentraciones elevadas de la progesterona durante todo el embarazo son críticas para mantener el miometrio humano es un estado de reposo. Al igual que la ovulación y la menstruación, el parto es un proceso inflamatorio que abarca las membranas fetales, la decidua, miometrio y el cuello uterino. La progesterona se considera generalmente un esteroide anti-inflamatorio, por la inhibición de la expresión de la cicloxigenasa II (COX-2), una enzima implicada en la biosíntesis de prostaglandinas, y hasta por la regulación de deshidrogenasa 15-prostaglandina, un enzima catabolizante de prostaglandina^{28,29}. A diferencia de la mayoría de los mamíferos, el parto en los seres humanos no está precedido por una caída de los niveles circulantes de progesterona maternos. El inicio del parto se piensa que es el resultado de una disminución de la capacidad de respuesta del miometrio a progesterona, comúnmente conocida como "retiro de la progesterona funcional". Incrementando la expresión de las

proteínas contráctiles asociadas, los llamados CAPs, (por ejemplo COX-2) que transforma al miometrio en un estado de reposo²⁷.

En el espermatozoide humano, la progesterona induce la entrada rápida de Ca^{2+} en cuestión de segundos o incluso milisegundos que están implicados en la quimiotaxis y la orientación de los espermatozoides²⁸. La progesterona también provoca la hiperactivación del espermatozoide y la reacción del acrosoma que son procesos críticos para la función espermática. Los efectos rápidos de la progesterona sobre el espermatozoide humano deben ser transmitidos de una manera no genómica ya que el ADN de espermatozoide no es accesible para la transcripción y los espermatozoides carecen de la maquinaria de traducción funcional³⁰.

Aunque la glándula mamaria no es un órgano reproductivo, se describirán en esta sección los efectos que la progesterona ejerce en este órgano ya que en crecimiento y diferenciación de las mamas está influenciada por la etapa fisiológica en la que se encuentra el organismo.

Durante el ciclo menstrual, la glándula mamaria pasa a través de las ondas secuenciales de la proliferación y la apoptosis. A diferencia del endometrio, la proliferación del epitelio mamario humano es considerablemente mayor en la fase lútea, alcanzando un máximo alrededor del día 24 del ciclo. Por otra parte, el índice de proliferación en la mama se correlaciona con las concentraciones circulantes de progesterona. Sin embargo, sólo una menor población de las células epiteliales luminales expresan PR y receptores a estrógenos. Estas células a menudo no se dividen, pero por lo general se encuentran adyacentes a la proliferación de células. Sugiriendo que la progesterona conduce a la proliferación de células con PR-negativo mediante la promoción de la expresión de factores de crecimiento estimulante, tales como factor de crecimiento insulínico II (IGF-II) o factor de crecimiento de hepatocitos²⁷.

Los cambios proliferativos en la mama femenina premenopáusica son controlados principalmente por los estrógenos y la progesterona, otras hormonas, como la prolactina y los factores de crecimiento también ejercen un rol importante. En la menopausia, donde la concentración de estrógenos es muy baja y los de

progesterona ausente, la actividad mitótica es menor. También se ha demostrado que el efecto de la administración de progestágenos en forma cíclica o continua sobre la mama es diferente. En un estudio realizado por Groshong *et al.*, en células mamarias in vitro, mostraron que los progestágenos administrados en forma cíclica aumentan la síntesis de DNA y la progresión del ciclo celular, mientras que las células son inhibidas durante la administración continua³¹.

6.3 Receptores a Progesterona

La gran diversidad de las acciones de la P4 está relacionada con sus múltiples mecanismos de acción, que se llevan a cabo mediante la unión de la progesterona con su receptor. Se han determinado dos principales tipos de receptores mediante los cuales ejerce su acción, los receptores nucleares que actúan modificando la transcripción de genes, y los receptores membranales, que tienen efecto mediante la activación de cascadas de señalización.

6.3.1 Receptores nucleares

El receptor de progesterona (PR) fue el primero donde se descubrió que existían dos isoformas de su receptor PR-A (94 kDa) y PR-B (116 kDa)³². Ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero se transcriben a partir de dos secuencias promotoras distintas. Se ha demostrado que estas dos isoformas no son equivalentes y que las diferencias en secuencias N-terminales de ambas isoformas son importantes en la selectividad de unión a sitios blanco. Los receptores nucleares a progesterona son miembros de la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción³³.

Las características generales de los PRs que son responsables de estas actividades están bien definidas (figura 9). La región amino terminal o A/B de los PRs es la más hipervariable tanto en términos del tamaño y la secuencia de aminoácidos entre los miembros de la superfamilia. Esta región contiene dominios de transactivación (AF-1 y AF-2) que modulan al promotor y al nivel de

especificidad de la activación del gen blanco, así como un dominio inhibido (ID) responsable para el reclutamiento de proteínas inhibidoras correpressoras transcripcionales. La región más conservada (C) es el dominio de unión al DNA (DBD) que, en caso de los PRs, está localizada centralmente. Este dominio consiste de aproximadamente 66-68 aminoácidos. Un dominio de unión a ligandos es altamente conservado (LBD) está localizado en el carboxilo terminal de la DBD. Además de su función de unión a la progesterona, esta región contiene un dominio de transactivación adicional (AF-2) requerido para el reclutamiento coactivador dependiente de hormonas, las secuencias importantes para la interacción de los receptores inactivos con proteínas de choque de calor y para la dimerización del receptor (DIM)³³.

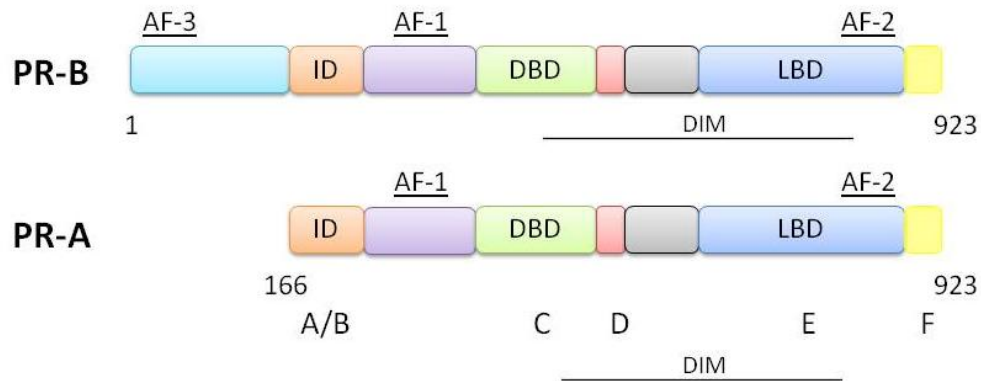


Figura 9. Organización estructural de las isoformas del receptor nuclear a progesterona A y B humanos. Los números denotan la posición del aminoácido en cada proteína. AF-1, AF-2 y AF-3 son dominios de activación; DBD es el dominio de unión al DNA; LBD el sitio de unión al ligando; ID el dominio inhibitorio; DIM son las secuencias importantes para la dimerización del receptor (modificado de Mulac-Jericevic y Conneely 2004).

Existe, además de las isoformas A y B; una isoforma C (60 kDa) que tiene un truncamiento N-terminal aún más grande que interrumpe el dominio de unión al DNA (DBD)³². Por lo tanto solo el PR-A y el PR-B contienen los componentes críticos para la función del receptor nuclear, incluyendo el dominio de unión al ligando (LBD), la región bisagra (H), el dominio de unión al ADN, y dos de los tres dominios de activación (AF). Aunque el PR-C no es un factor de transcripción

funcional, actúa para inhibir la transactivación en el útero del PR-B³⁴ o potenciar los efectos transcripcionales de las otras isoformas de PR en la mama³⁵.

6.3.1.1 Cascada de señalización

La progesterona actúa en el útero de manera simultánea y previa a la acción de estrógenos que controlan la síntesis de receptores citosólicos de progesterona. Su mecanismo de acción es semejante al de otros esteroides, mediado por receptores intracelulares y sobre la expresión de genes específicos, similar al de estrógenos y andrógenos.

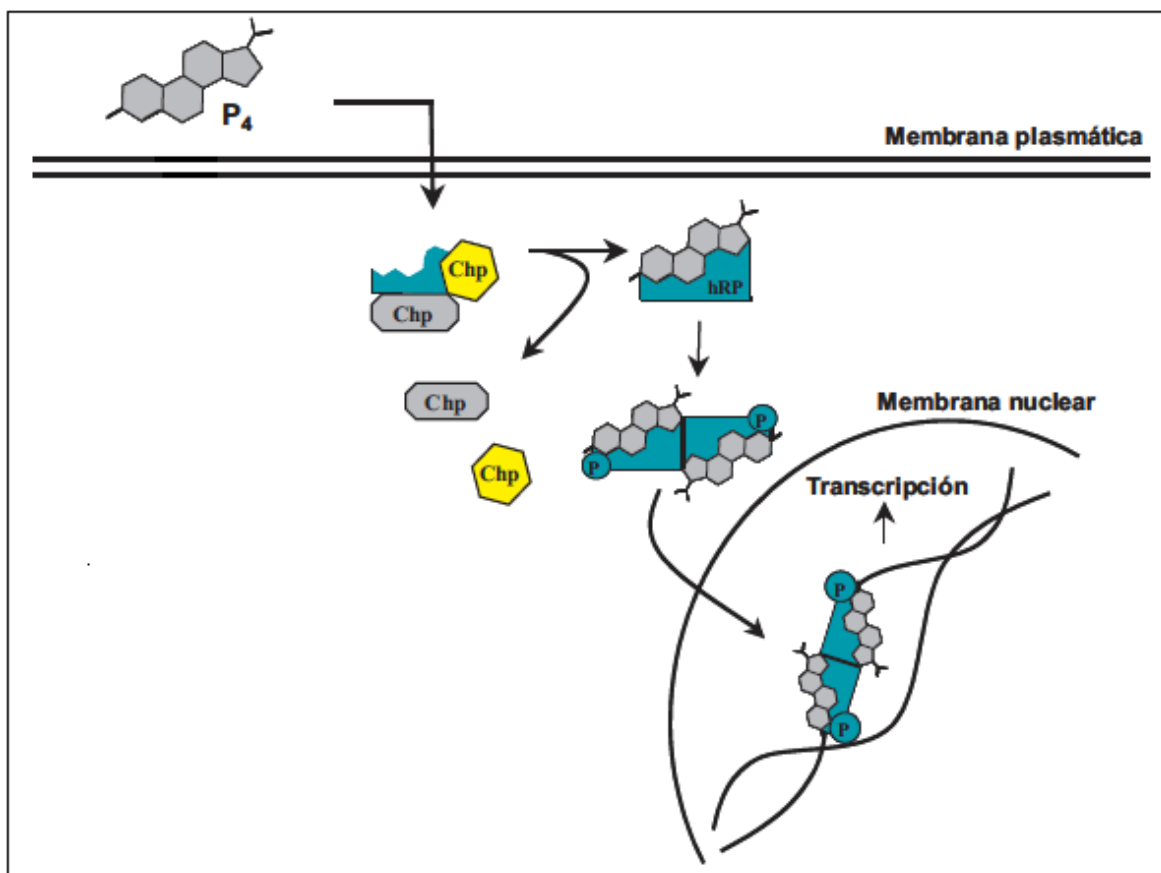


Figura 10. Mecanismo de acción de la progesterona. Formación del complejo hormona-receptor, dimerización e interacción con el DNA sobre elementos de respuesta a progesterona para iniciar la transcripción; chaperonas (Chp), fosfatos (P) (modificado de Barrera *et al.* 2007).

La progesterona atraviesa la membrana plasmática de las células blanco y se internaliza en el citoplasma para interactuar con su receptor intracelular específico (hRP) (figura 10). La progesterona al unirse con su receptor en el dominio de unión al ligando (LBD) induce un cambio conformacional que permite separar las moléculas chaperonas (hsp90, hsp70, hsp40, Hop y p23) que se encuentran unidas al hRP y favorece la fosforilación del receptor para iniciar su dimerización. Posteriormente el complejo hormona-receptor se une a los elementos de respuesta a progesterona en el DNA y se acoplan los factores de transcripción necesarios para que la polimerasa se una al promotor e inicie la transcripción de genes específicos. La expresión de genes blanco es modulada a través del efecto de coactivadores o correpresores (figura 10)^{36,37}.

6.3.1.2 Expresión de los receptores nucleares a Progesterona

Está demostrado que la ablación del PR-A (en ratones knockout) resulta en infertilidad y deterioro severo de la ovulación, lo que indica que la expresión de la proteína A es esencial para la función normal del ovario³⁸. Estudios adicionales con ratones knockout demostraron que la progesterona antagoniza proliferación epitelial inducida por los estrógenos y las unidades de diferenciación de las células del estroma depende estrictamente de la activación del PR-A. Los ratones hembra que carecen de esta isoforma de receptor son estériles debido a la ovulación defectuosa, implantación y deciduización³³.

En el endometrio la señalización de los PR es importante para asegurar la relajación del miometrio durante el embarazo. En los seres humanos, PR-B parece ser importante para mantener el miometrio en un estado de reposo, mientras que en los ratones knockout PR-B³⁸ el parto ocurre con normalidad. Otros mecanismos que explican el comienzo del parto incluyen la inducción de isoformas truncadas PR y la expresión alterada de mPRs²⁷.

Es importante destacar que la progesterona produce ramas laterales y desarrollo lobular-alveolar en ratones knockout PR-A, mientras que éste no es el caso para animales deficientes de la isoforma PR-B. Por lo tanto, en contraste con el tracto reproductivo femenino inferior, la expresión de PR-B es a la vez suficiente e indispensable para las acciones de la progesterona sobre la proliferación y diferenciación de la glándula mamaria^{33,38}.

6.3.2 Receptores membranales

La progesterona y sus metabolitos tiene efectos de latencia corta a través de la modulación de receptores presentes en la superficie celular, que activan cascadas de segundos mensajeros o cascada de señalización citoplasmática que son independientes de la transcripción. La identificación de dos nuevo tipos de proteínas membranales no relacionadas con los receptores nucleares clásicos (PR), los receptores membranales de progesterona (mPR) y el componente 1 del receptor membranal a progesterona (PGRMC1) sugiere la posibilidad de estas proteínas en la mediación de estos efectos³⁹. Los mPRs, originalmente descubiertos en los ovarios teleostéos y posteriormente en oveja, ratón, rata y humano, son receptores acoplados a proteína G, que pertenecen a la reciente definida familia de receptores a progestinas y adiponectina Q⁴⁰, con 7 dominios transmembranales, y está compuesta al menos de 5 subtipos: α , β , γ , δ y ϵ . Los tres genes que codifican para los subtipos de mPR (mPR α (PAQR VII), mPR β (PAQR VIII) y mPR γ (PAQR V)) (figura 11)^{40,41}.

La familia PAQR consiste en tres grupos: los relacionados con mPR (receptores de Clase II), los relacionados con adipoR (receptores de Clase I) y los relacionados con los miembros de la familia hemolisina III (receptores de Clase III)⁴². Es importante destacar que, a pesar de los estudios computacionales que confirman que las proteínas de Clase I proteínas se componen de siete dominios transmembranales, se predice que las proteínas de la Clase II cuentan con ocho dominios transmembranales. Un estudio en levaduras reveló que el C-terminal de

los mPRs no pasa a través del lumen del retículo endoplásmico y por lo tanto, junto con los N-terminales, se prevé que se encuentren en el plasma independientemente de si estos receptores se encuentran en el retículo endoplásmico o la membrana plasmática²⁷.

Sin embargo, algunos estudios argumentan en contra de que los mPRs estén acoplados a proteínas G (i) el dominio conservado de los 8 dominios transmembranales de todos los miembros de la clase II, (ii) la capacidad de los mPRs para responder a la progesterona cuando se expresa en la levadura (estudio realizado por Smith *et al.*, 2008), incluso con supresión del C-terminal de los receptores y (iii) su capacidad para transmitir las respuestas de progesterona en cepas de levadura que carecen de las proteínas G⁴².

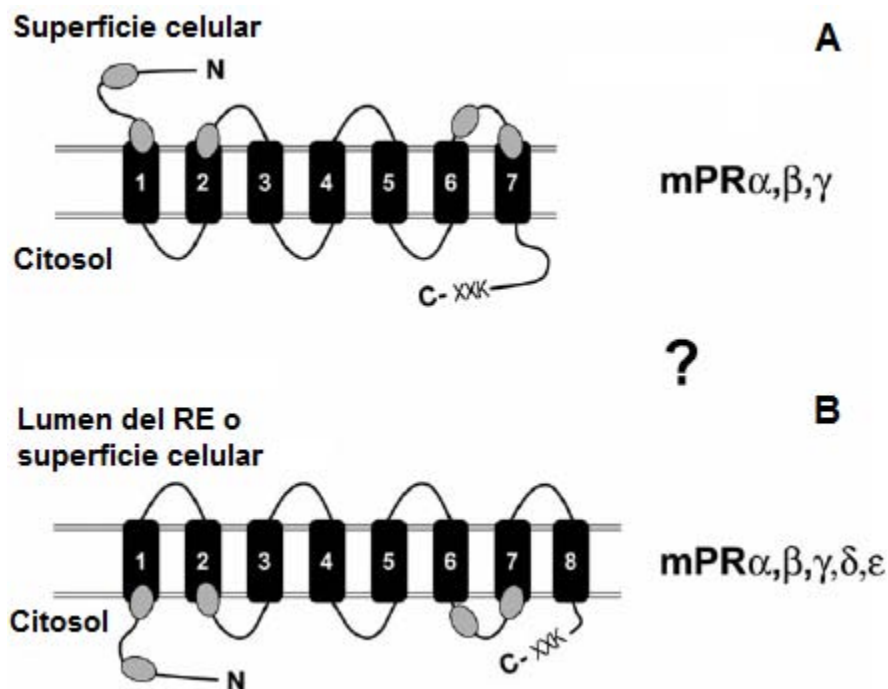


Figura 11. Posibles estructuras del receptor membranar de progesterona, miembro de la familia PAQR. mPR α , β y γ acopladas a proteína G, con una estructura de 7 dominios transmembranales, con el extremo N-terminal hacia el espacio extracelular (A). mPRs (α , β , γ , δ y ϵ) de la subfamilia de clase II de PAQRs con 8 dominios transmembranales (B). Las posiciones de los residuos más altamente conservados en toda la familia PAQR se indican mediante óvalos sombreados. (KXX) motivo de retención putativa para C-terminal (modificado de Gellersen *et al.* 2009).

Los sitios de unión a progesterona fueron detectados y posteriormente clonados, encontrándose dos receptores membranales de progesterona PGRMC (componente del receptor membranal de progesterona) 1 y 2³⁰. El PGRMC1 (25Dx), una proteína transmembranal aislada originalmente de los microsomas de hígado porcino que reside principalmente en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. La expresión de PGRMC 1 y PGRMC 2 parece estar regulada por los esteroides ováricos. El estudio del PGRMC1 reveló la presencia de tres uniones de interfaces para dominios homólogos Src, incluyendo dos SH2 y uno SH3. Por lo tanto, en analogía a PR-B, PGRMC1 podría estar involucrado en la transmisión de acciones de la progesterona a través de la activación de MAPK²⁷.

6.3.2.1 Cascada de Señalización

El mecanismo de acción de los receptores membranales involucra la acción de la progesterona sobre la membrana plasmática, lo que ocasiona cascadas de señalización como la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la inducción de segundos mensajeros. Hasta el momento no se ha descrito completamente el mecanismo no genómico, sin embargo se sabe que la progesterona interactúa con receptores membranales específicos (mPR), lo cual activa diferentes vías de señalización que modifican el flujo de calcio intracelular y la conductancia de cloro, la regulación de la proteína dependiente de AMPc, la activación de la cinasa C, así como la inducción de la fosforilación de proteínas (figura 12)⁴³.

En resumen, los mecanismos mediante los cuales puede actuar la progesterona uniéndose a receptores membranales son los siguientes^{30,37}:

1. Estimulan la vía de MAPK.
2. Inducen la síntesis de AMPc y PKA que activan la transcripción del receptor nuclear para progestinas.
3. Se unen a las proteínas G que incrementan los niveles intracelulares de calcio.

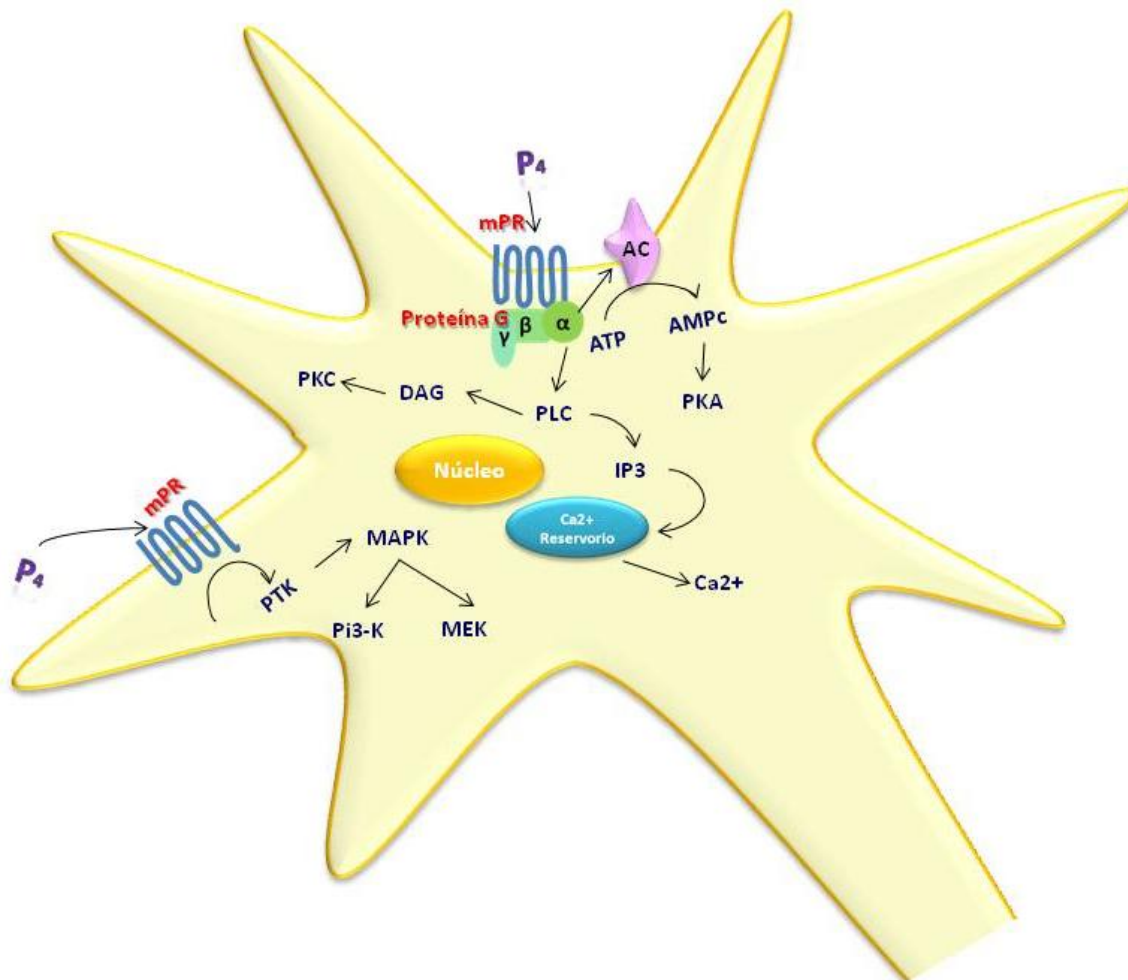


Figura 12. Mecanismo de acción no genómico de la progesterona. En la membrana se presentan los receptores cuya activación inicia cascadas de señalización mediante la generación de segundos mensajeros intracelulares. P₄: progesterona, mPR: receptor membranal de progesterona, α, β, γ: subunidades de proteína G, AC: adenilato ciclasa, ATP: adenosin trifosfato, AMPc: adenosin monofosfato cíclico, PKA: proteína cinasa A, PLC: fosfolipasa C, IP₃: inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteína cinasa C, PTK: proteína tirosina cinasa, MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos, Pi3-K: fosfoinositol 3-cinasa, MEK: cinasa de MAPK/ERK, Ca²⁺: ion calcio (modificado de Cabrera-Muñoz *et al*, 2011).

6.3.2.2 Expresión de los receptores membranales a Progesterona

Así como el mPR es crítico para la función de los gametos en los peces y en los anfibios³⁸, en humanos se han identificado las tres subtipos del mPR, α, β y γ, las cuales muestran algunas diferencias en los niveles de expresión en los

tejidos, se encontró que el mPR α se expresa altamente en los ovarios y la placenta, indicando que este subtipo puede mediar las funciones reproductivas⁴¹, así como en testículos de ratón e implicada en la motilidad del espermatozoide³⁷. El mPR α fue localizado en la pieza intermedia y los flagelos de espermatozoides humanos, estas dos estructuras trabajan en conjunto para impulsar la movilidad del espermatozoide, por lo que la localización del mPR α en estas estructuras sugiere una conexión entre el mPR y la hipermotilidad, es decir, los espermatozoides con una baja motilidad expresaban bajos niveles de mPR⁴⁰.

Los estudios donde se involucran a los mPRs en machos son pocos, sin embargo, se han examinado estos receptores en mayor cantidad sobre la función reproductiva de las hembras. Los mPRs están expresados en múltiples tejidos reproductivos y son regulados hormonalmente en el folículo ovárico y cuerpo lúteo, así como en las trompas de Falopio, endometrio, miometrio y tejidos fetales⁴⁰.

Se han identificado los mPR en el cuerpo lúteo de la oveja y de la rata, esta expresión está regulada durante el ciclo estral y el embarazo. En la rata la expresión de cada isoforma del mPR está regulada durante el embarazo. El mPR α tiene un pico a lo largo del embarazo y declina al final de este, de igual manera sucede con el mPR β . De manera alternativa, la expresión del mPR γ incrementa a lo largo del embarazo. La regulación de los mPRs en las ratas durante el embarazo parece estar bajo el control de la prolactina, donde esta hormona regula positivamente al mPR α y mPR β pero de una manera negativa al mPR γ ⁴⁴.

Los mPRs también activan la señalización de la proteína G en múltiples tejidos del tracto reproductivo incluyendo, trompas de Falopio, endometrio, miometrio y tejidos fetales. Tanto mPR β como mPR γ se expresan en las células ciliadas que recubren las trompas de Falopio de ratones y humanos; se cree que estos dos receptores trabajan en conjunto para controlar el movimiento de la cilia y transportación de los gametos cuando la concentración de progesterona se eleva⁴⁰.

Las dos proteínas del PGRMC (1 y 2) son expresadas en diversos tejidos humanos incluyendo el corazón, el hígado y la placenta. En 2004 se describió la

expresión del PGRMC 1 y 2 en los espermatozoides humanos^{45,46}. El PGRMC 1 es altamente expresado en diferentes tipos de cáncer incluido el de pulmón, mama y ovario y se ha reportado como un mediador de la acción antiapoptótica de la progesterona en célula de la granulosa^{47,48}. Además el PGRMC I se encontró en la membrana acrosómica interior de los espermatozoides porcinos, y la forma fosforilada del PGRMC I se localizó en el núcleo de las células HeLa²⁷.

7. EFECTOS DE LA PROGESTERONA EN TEJIDOS NO REPRODUCTIVOS

La progesterona, además de efectos sobre tejidos reproductivos como los ovarios y la placenta, modula funciones neuroendócrinas en el SNC así como funciones sobre la respuesta inmune y sobre la glándula mamaria.

7.1 Efectos de la progesterona en células del Sistema Inmune

La progesterona tiene efectos funcionales en una amplia variedad de subtipos de células del sistema inmune, incluyendo monocitos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos⁴⁰. En monocitos y macrófagos murinos activados por lipopolisacáridos (LPS) *in vitro*, la progesterona disminuye la producción de óxido nítrico así como la expresión de la óxido nítrico sintasa, IL-6 e IL-12. Además induce apoptosis en monocitos humanos activados con LPS e incrementa la expresión de la citosina proinflamatoria TNF- α ^{49,50}. También se ha observado la disminución de la expresión de citosinas en células dendríticas activadas de ratas, ratones y humanos en respuesta a tratamiento de progesterona⁵¹.

Durante el embarazo, la producción de progesterona inhibe la actividad de las células asesinas naturales (Natural Killers, NK) e incrementa la producción de anticuerpos asimétricos por las células B, estas moléculas bloquean la unión de anticuerpos funcionales hacia sus antígenos^{52,53}. Además la progesterona influye en la polarización de las células T de Helper (Th). Las células Th se diferencian en Th1 o Th2, cada subpoblación se caracteriza por la expresión diferente de

citocinas. Los linfocitos Th1 promueven la inmunidad mediada por células, mientras que los linfocitos Th2 promueven la inmunidad humoral. La progesterona inhibe *in vitro* la generación de células Th1 e incrementa las Th2 murinos y humanos (figura 13). Se sugiere que la capacidad de la progesterona de inducir una respuesta Th2 tiene relevancia en el mantenimiento del embarazo⁴⁰.

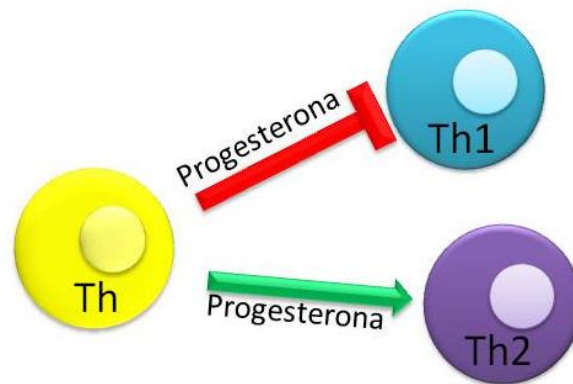


Figura 13. Diferenciación de las células Th mediada por progesterona. La progesterona favorece la expresión de las células Th2 e inhibe la expresión de Th1.

La progesterona, pero no otros esteroides sexuales inhiben directamente los canales de calcio y potasio. Chien et al., demostraron que la progesterona incrementa el calcio intracelular en células T de sangre periférica de humanos, junto con un decremento concomitante en el pH intracelular debido a que la progesterona actúa sobre el transportador I de Na^+/H^+ ^{54,55}.

7.2 Efectos de la progesterona sobre el SNC

La progesterona tiene múltiples funciones en el sistema nervioso, incluyendo la regulación del estado de ánimo y la cognición, neuroprotección y neuroregeneración. Si bien estos efectos se producen a través de un receptor a progesterona clásico (PR) se ha postulado que dentro de estas acciones otras proteínas y receptores en el SNC juegan un papel importante. La progesterona y

sus derivados se unen a las membranas celulares de diversos tejidos cerebrales de rata, sugiriendo mecanismos de acción no clásicos. Se han observado efectos no genómicos y de rápida acción de la progesterona en el SNC, incluyendo: efectos sobre el transporte de iones, la liberación de neurotransmisores, actividad de la proteína cinasa y la translocación nuclear⁴⁰. Estos efectos ocurren a través de tres principales mecanismos que son la regulación de genes, modulación de los sistemas neurotransmisores y activación de cascadas de señalización³⁷.

Los efectos de la progesterona sobre el SNC se han atribuido a su acción sobre ciertos receptores específicos intracelulares. La naturaleza lipofílica del esteroide le permite penetrar libremente en la célula a través de la membrana plasmática, y difundirse con facilidad al citoplasma, por lo que su efecto biológico ocurre típicamente en periodos relativamente largos. La rapidez con la que se llevan a cabo ciertas acciones de la progesterona sobre el SNC sugiere que son ajenas al genoma, esto condujo a las primeras especulaciones sobre la identidad del receptor de los efectos no genómicos de la progesterona en el cerebro condujo al descubrimiento de un sitio de unión de esteroides en el complejo receptor de canal de cloruro GABA (ácido γ -aminobutírico) / benzodiazepina en cerebros de rata⁵⁶, es decir, que ocurren sobre los receptores de membrana mediante enlaces de alta afinidad con receptores GABA_A membranales, ubicados en diversas regiones cerebrales, lo que señala que la progesterona participa en las funciones relacionadas con el GABA⁵⁷. La unión de esteroides a este receptor conduce a la mejora del flujo de cloro inducida por GABA. Este sitio de unión tiene afinidad por múltiples metabolitos de hormonas esteroides, incluyendo el derivado de la progesterona, el derivado 3 α -hidroxi-dihidroprogesterona que se encuentra en la sangre y el cerebro⁵⁸.

7.2.1 Neuroprotección

Se ha establecido que la progesterona tiene efectos neuroprotectores que probablemente estén involucrados diferentes mecanismos de acción. Los efectos ansiolíticos son una manera por la cual la progesterona puede reducir el daño neuronal. Además en cultivos neuronales, la progesterona activa las vías de señalización MAPK/ERK y Akt, las cuales están asociadas con neuroprotección³⁷ (figura 14). En modelos de isquemia cerebral, los efectos protectores de la progesterona son atribuidos, en parte, a la supresión de respuestas inflamatorias y la expresión de la óxido nítrico 2-sintasa⁵⁹. Además tiene efectos indirectos actuando sobre poblaciones celulares no neuronales, por ejemplo, la progesterona reduce las fugas de la barrera hematoencefálica, disminuye la activación de las células gliales e incrementa la mielinización. Jiang *et al* observaron que la administración de progesterona antes de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) daba lugar a una marcada reducción de en el infarto cerebral⁶⁰. Adicionalmente, Stein *et al* mediante un modelo de lesión cerebral traumática (TBI, por sus siglas en ingles), mostraron que la administración de una sola dosis de progesterona atenúa el edema cerebral cuando se administra durante las primeras 24 horas después de la TBI en ratas, mientras que los 5 días de la inyección de progesterona resultaron en un mejor rendimiento del aprendizaje espacial y reduce la negligencia sensorial, estudios adicionales por otros grupos de estudio demostraron que la progesterona incrementa la acumulación de microglia activada en el cerebro y reduce la citocinas inflamatorias en la corteza frontal medial^{37,60}. Además en experimentos realizados en machos esta hormona disminuye la peroxidación de lípidos cuando es administrada después de la TBI⁶¹. Por otra parte, la regulación de la progesterona de la señalización a través de los canales de calcio neuronal dependientes de voltaje puede ser la base de los efectos neuroprotectores de concentraciones terapéuticas de la progesterona⁶².

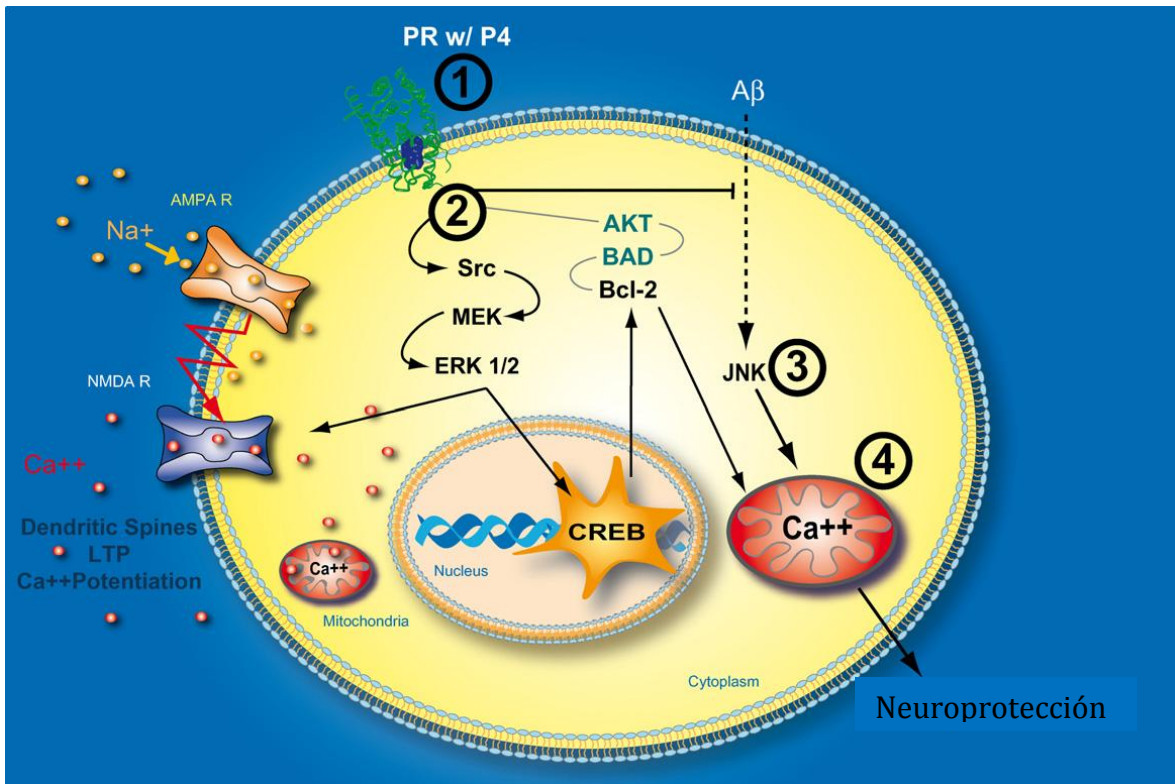


Figura 14. Modelo de la progesterona induciendo una señalización neuroprotectora. El progestágeno evita la disfunción sináptica asociada con el envejecimiento y la neurodegeneración a través de (1) la activación de un ligando del receptor a progesterona, (2) que inicia cascadas de señalización de segundos mensajeros, (3) promover la supervivencia neuronal. Estas cascadas de señalización convergen en la función mitocondrial para proteger contra los insultos tóxicos e incluyen la vía de señalización de prevención indirecta y la vía de señalización de protección directa. En la vía de señalización de prevención indirecta, las vías de ERK/CREB/bcl-2 y Akt se activan simultáneamente, lo que mejora (4) la función mitocondrial y permite a las neuronas para soportar mejor los insultos neurodegenerativas. La vía de la protección directa actúa para bloquear la activación de JNK inducida por A β y la disfunción mitocondrial (modificado de Brinton *et al.* 2008).

La influencia de la progesterona en la señalización de calcio puede dar cuenta de algunos de los beneficios terapéuticos de la progesterona, incluyendo la reducción de la inflamación y el edema, la prevención de la degradación de la mielina, y la reducción de la muerte neuronal excitotóxica. Informes recientes probaron directamente, que la influencia de la progesterona en la señalización del calcio subyace en la inhibición de la muerte neuronal por excitotoxicidad⁶².

7.2.2 Memoria y aprendizaje

En un estudio en mujeres sanas, la capacidad de la progesterona de influir en la cognición y la memoria de estímulos biológicamente sobresalientes, donde una sola dosis de progesterona (administrada por vía oral) disminuye la precisión de reconocimiento sin afectar los tiempos de reacción (mediante resonancia magnética nuclear)⁶³.

Por otra parte, se describió un efecto benéfico de la progesterona en una tarea de colocación de objeto con respecto a los controles ovariectomizados. Curiosamente, como se ha visto con el estradiol, la eficacia de la progesterona requiere de una ventana biológica que puede ser dependiente del tiempo o la edad, que puede regular la LTP (potenciación a largo plazo, modelo biológico de la formación de memoria en el cerebro). En contraste con el efecto benéfico de la progesterona se describió que la administración de progesterona a ratas ovariectomizadas no tuvo efecto sobre el aprendizaje espacial en relación con sus controles ovariectomizados tratados donde se compararon con ratas de la misma edad⁶⁰. Además se ha descrito que la ovariectomía de ratas de edad avanzada no deteriora la memoria espacial, sino que la mejora. En general, estos estudios subrayan la complejidad por la que la progesterona puede influir en la función cognitiva como una función de la edad. Sin embargo, en estudios que han evaluado efectos de la progesterona sobre la función cognitiva en modelos experimentales de neurodegeneración acelerada y/o deterioro cognitivo (modelo de la enfermedad de Alzheimer) o el modelo de deterioro de la memoria por la escopolamina, se ha observado un efecto benéfico por parte de la progesterona, ya que ayuda a preservar el rendimiento cognitivo⁶⁰.

7.2.3 Estado ánimo

Se han realizado investigaciones clínicas para entender el efecto de la progesterona en los estados de ánimo asociados con el trastorno disfórico premenstrual (TDPM), el cual se define como un conjunto de síntomas de ánimo

negativos y síntomas físicos que se producen durante la fase lútea del ciclo menstrual (cuando los niveles de progesterona y alopregnenolona son altos) y desaparecen varios días después de la aparición de la menstruación (cuando los niveles de progesterona y alopregnenolona son bajos) (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales)³⁷. Las concentraciones de progesterona (medidos a través de radioinmunoensayo) en la amígdala, el cerebelo y el hipotálamo son significativamente superiores en las mujeres fértiles en la fase lútea de la menstruación que en los controles posmenopáusicas. Por otra parte, en las mujeres fértiles, las concentraciones de alopregnenolona son más altas en la sustancia nigra y el hipotálamo basal, lo que sugiere que el patrón de secreción de esteroides durante el ciclo menstrual se refleja en los tejidos cerebrales específicos⁶⁴.

7.2.4 Regulación de la función glial

La progesterona regula respuestas en la glia (astrocitos, microglia, oligodendrocitos). El tamaño de los astrocitos está fuertemente asociada con la expresión de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), que varía durante el ciclo estral en el giro dentado del hipocampo. La administración de progesterona (y su metabolito dihidroprogesterona) indujeron una elevación significativa de los niveles de GFAP mRNA en astrocitos pocas horas después (6 y 2 horas respectivamente). Adicionalmente, la progesterona regula la producción de múltiples proteínas que están involucradas en la plasticidad sináptica como ApoE (secretada por astrocitos) y que puede estar implicada en el remodelamiento sináptico. También se ha observado que la progesterona incrementa la secreción de ApoE en los macrófagos (la microglia también expresa apoE mRNA) por acción sobre el carbono terminal lipídico del dominio de unión de ApoE que bloquea la degradación intracelular³⁷.

Dentro del SNC la progesterona y sus metabolitos promueven funciones gliales tales como la síntesis de proteínas de la mielina. En cultivos de células

gliales preparadas a partir de cerebro de rata neonatal, la progesterona aumentó el número de oligodendrocitos que expresan la proteína básica de la mielina y el nucleótido-30-fosfodiesterasa 20,30-cíclico (CNPasa), la tercera proteína de mielina más abundante en el SNC⁶⁵.

7.2.5 Regulación del comportamiento reproductivo

La progesterona modula funciones neuroendócrinas en el SNC, resultando en la integración de la reproducción y de los comportamientos reproductivos en mamíferos hembras. Aunque es ampliamente reconocido que los efectos que tiene la progesterona en el comportamiento sexual femenino son mediados por los PR que funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando. De igual manera, los receptores membranales a progesterona que implican vías de señalización también convergen con las vías de transcripción dependientes de PR para regular el comportamiento reproductivo³⁹.

Se sabe que la GnRH y las prostaglandinas (PGE 2) influyen en el comportamiento sexual independientes de progesterona, y que además un gran número de hormonas peptídicas como la oxitocina, la hormona estimulante de melanocitos, la prolactina, la hormona adrenocorticotrópica; neurotransmisores (por ejemplo, noradrenalina, dopamina, acetilcolina, ácido γ -aminobutírico) también facilitan el comportamiento sexual femenino. En este contexto, es interesante observar que los niveles de GnRH hipotalámica, PGE 2, la oxitocina y dopamina presentan un pico en ratas en celo al mismo tiempo que aumentan los niveles de progesterona, es decir, en la época en que el animal presenta un comportamiento sexual. Sin embargo, estos agentes no se unen a los PR, sino que actúan sobre receptores de membrana para elevar los niveles hipotalámicos de segundos mensajeros (AMP cíclico, GMP cíclico, calcio). Ahora sabemos que estos segundos mensajeros pueden sustituir a la progesterona en la facilitación de la conducta sexual femenina. La activación no clásica de vías de señalización citoplasmáticas, mediadas por cinasas, ya sea iniciada por agentes no esteroides

progestinas pueden actuar a través de la cinasa Src e interactuar con los PR extranucleares para activar la cascada de la MAPK. Los neuropéptidos, nucleótidos, factores de crecimiento, GnRH, y PGE 2 pueden actuar a través de diversos receptores y/o segundos mensajeros (AMPc, GMPc, NO) y transmitir señales a los RP nucleares u otros factores de transcripción. Las interacciones entre múltiples vías pueden servir como un mecanismo de amplificación para converger en factores y/o coactivadores para regular la transcripción de genes y la traducción de transcripción nucleares, para facilitar el comportamiento sexual femenino (figura 15)³⁹.

7.3 Expresión de los receptores a progesterona en SNC

Actualmente es evidente que las funciones de las hormonas esteroides gonadales, tales como la progesterona se extienden más allá de la reproducción. Múltiples regiones del SNC, más allá del hipotálamo; son objetivos de la progesterona, ejerciendo su efecto mediante la unión a su receptor, ya sea membranal o nuclear.

7.3.1 Los receptores nucleares a progesterona

Los receptores de progesterona, son en general expresados a lo largo del cerebro, sin ninguna restricción aparente de los tipos celulares. Aunque la expresión de los PR puede variar dependiendo de la región del cerebro o tipo celular, estado hormonal³⁷. Ambas isoformas del receptor clásico a progesterona (PR A y PR B) están expresadas en el hipocampo y la corteza frontal de la rata (figura 16). La inmunoreactividad del PR es especialmente alta en el núcleo de la cama de la estría terminal (BST). En la amígdala, la expresión del PR es prominente en la parte posterodorsal del núcleo amigdalino medial, en estas regiones no se han observado diferencias en la expresión dependientes del sexo. La inmunorreactividad del PR está presente en las neuronas noreprinérgicas del

núcleo del tracto solitario, la región de la que surgen las proyecciones a los núcleos supraóptico del hipotálamo. En los roedores, los PR están presentes en el hipotálamo ventromedial. Auger *et al* han informado la inmunoreactividad de PR en células en el área preóptica de células, hipotálamo ventromedial y dorsomedial y en núcleo arqueado de la rata hembra⁶⁶.

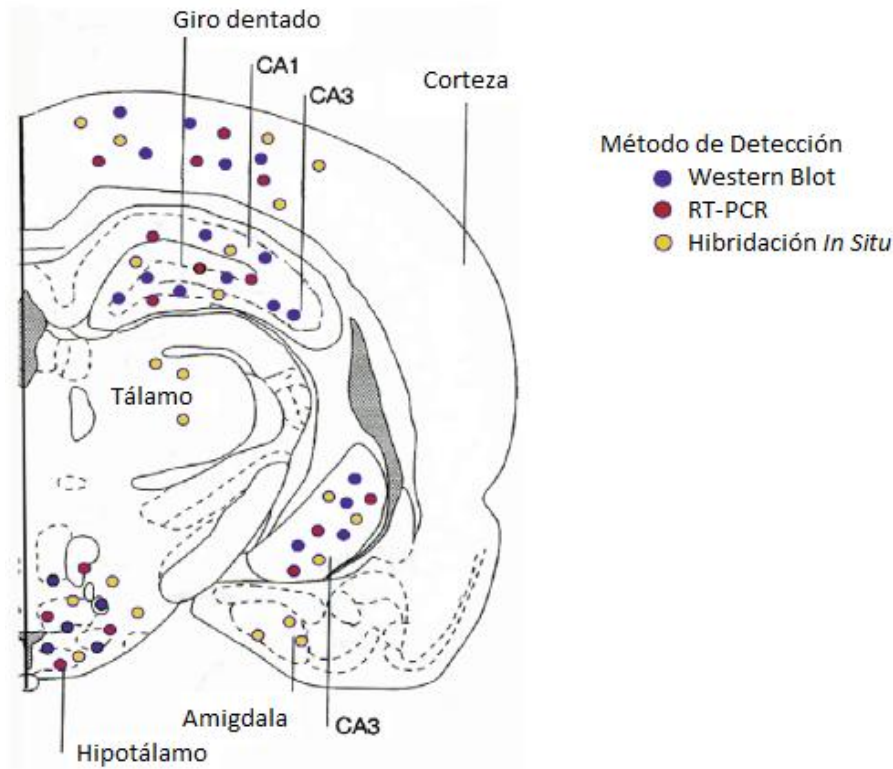


Figura 16. Distribución de los PR en el cerebro de rata, así como el método de detección utilizado (modificado de Brinton *et al.*, 2008).

7.3.2 Expresión de los receptores membranales a progesterona

Zhu *et al.*, mostraron la expresión de mPR β , pero no así para α o γ , dentro del SNC, incluyendo la medula espinal, corteza cerebral, cerebelo, tálamo, glándula hipófisis y el núcleo caudado. Tang *et al.*, encontraron mRNA para los tres mPRs (α , β y γ) en cerebros humanos. En roedores, los niveles de mPR β en el cerebro de ratón son bajos. Los tres subtipos se expresan en el área mediobasal del hipotálamo, además de los receptores clásicos PR-A y PR-B en

ratas y ratones. Así como en el tracto reproductivo, la presencia de mPR α y mPR β en el cerebro varía respecto a los cambios hormonales durante el ciclo estral, con una elevada expresión de estos mPR durante el proestro, sugiriendo que el receptor sufre de una regulación positiva por estrógenos y una regulación negativa por la progesterona⁴⁰.

La presencia de las subtipos α y β en el hipotálamo mediobasal tiene una posible participación en los efectos de la retroalimentación negativa de la progesterona en la secreción de la GnRH. Los niveles de mPR α y mPR β , pero no mPR γ , son elevados en el hipotálamo medio basal, de roedores, en la tarde del proestro, alrededor del pico preovulatorio de progesterona en ratas cicladas⁴¹.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta la fecha, sólo se ha caracterizado parcialmente la expresión del subtipo β del mPR en distintas especies, sin embargo se desconoce aún la expresión y distribución de los subtipos α y γ en el SNC de ambos sexos.

JUSTIFICACIÓN

Los receptores membranales de progesterona influyen en la regulación de algunas funciones del SNC, por ello es importante caracterizar su expresión tanto en machos como en hembras, así como su regulación por esteroides.

HIPÓTESIS

Los receptores membranales a progesterona se expresan diferencialmente en diversas áreas del cerebro de ratones BalbC de manera dependiente del sexo y la edad del organismo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la expresión diferencial de los mPR α , β y γ en diversas áreas del cerebro del ratón hembra y macho.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar en ratones machos prepúberes la expresión de los subtipos (α , β y γ) del mPR por citometría de flujo en el hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza lateral, corteza frontal, y área preóptica .
2. Determinar en ratones machos adultos, la expresión de las subtipos (α , β y γ) del mPR por citometría de flujo en el hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza lateral, corteza frontal, y área preóptica de ratones hembras y machos.
3. Evaluar el efecto de la gonadectomía prepuberal sobre la expresión de los subtipos (α , β y γ) del mPR por citometría de flujo en el hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza lateral, corteza frontal y área preóptica de ratones machos.

4. Analizar en ratones hembras prepúberes la expresión de los subtipos (α , β y γ) del mPR por citometría de flujo en el hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza lateral, corteza frontal, y área preóptica .
5. Observar en ratones machos adultos, la expresión de los subtipos (α , β y γ) del mPR por citometría de flujo en el hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza lateral, corteza frontal, y área preóptica de ratones hembras y machos.
6. Estudiar el efecto de la gonadectomía prepuberal sobre la expresión de los subtipos (α , β y γ) del mPR por citometría de flujo en el hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza lateral, corteza frontal y área preóptica de ratones machos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para este estudio se utilizaron ratones de la cepa BalbC hembras y machos, los cuales tuvieron acceso al agua y alimento *ad libitum*, ciclos de luz/oscuridad de 12h y cambio de cama con regularidad. Respecto a la caracterización de la expresión de los mPRs en animales prepúberes y adultos los animales se sacrificaron a las 4 y 10 semanas de edad respectivamente; mientras que para la evaluación del efecto de la gonadectomía prepuberal en la expresión de los mPRs, los ratones se gonadectomizaron a las 4 semanas, bajo anestesia de una mezcla ketamina (Anesket®, 60mg/Kg)/xilacina (Porcin® 5mg/Kg, ambos de PiSA® agropecuaria) y se suturaron con hilo reabsorbibles (calibre 3-0; Atramat®). Otro grupo de animales recibió cirugía simulada, bajo las mismas condiciones que los animales gonadectomizados, y además de un grupo control (intacto). Después de un mes de recuperación los animales fueron sacrificados. En ambos diseños experimentales los animales se sacrificaron con una sobredosis por inhalación con Sevorane® (sevoflurano, abbot®), además en cada set experimental se realizó por triplicado con tres animales cada uno, dando una n = 9 por cada grupo (protocolo aceptado por el comité de bioética del IIB).

2. ANTICUERPOS

En la detección de los mPRs se realizó una tinción intracelular con anticuerpo primario y secundario. Como anticuerpo primario se utilizó un anti-mPR para cada subtipo (α , β y γ) policlonales de cabra (Santa Cruz Biotechnology®) en una dilución 1:100. El anticuerpo secundario que se utilizó fue un anticuerpo de conejo anti-cabra acoplado al fluorocromo Alexa 647 (invitrogen®) en una dilución 1:300.

3. INSTRUMENTOS

En la disección del cerebro y gonadectomías se utilizó el siguiente equipo de disección (el material empleado en las gonadectomías se utilizó estéril):

- Tijeras
- Bisturí
- Navaja de bisturí No. 15
- Espátula
- Pinzas
- Tijeras
- Bisturí
- Porta agujas
- Pinzas
- Sutura, gasas, algodón
- Jeringa de insulina (1ml)

4. OBTENCIÓN Y DISGREGACIÓN DE TEJIDO CEREBRAL

Se sacrificaron a los animales por una sobredosis de Sevoflurano® inhalado, y se procedió a la disección del cerebro. Una vez colocado el cerebro sobre una base fría y manteniendo el tejido viable mediante la adición de PBS, se extrajeron las 6 áreas del cerebro (figura 17), bulbo olfatorio, corteza frontal, corteza lateral, área preóptica, hipotálamo e hipocampo. Para cada tejido se realizó un pool de 3 animales. Los tejidos se colocaron tubos eppendorf de 1.5 ml que contenían 500 µl medio RPMI sin SFB (Gibco®), posterior a esto, se adicionó colagenasa II (200µg/µl; Gibco®) a cada tubo y se incubó durante 15 minutos a 37°C, pasado este tiempo se disgregó el tejido con un pistilo y se incubó nuevamente por 15 minutos a 37°C. Terminada la incubación de la colagenasa IV se adicionaron 500 µl de medio RPMI (Gibco®) al 10% de SFB para detener la reacción de la colagenasa, a continuación se recogió únicamente la suspensión celular y se centrifugaron las muestras 3 minutos a 2000 rpm y finalmente las células fueron resuspendidas en 300 µl de amortiguador de FACS para su posterior tinción.

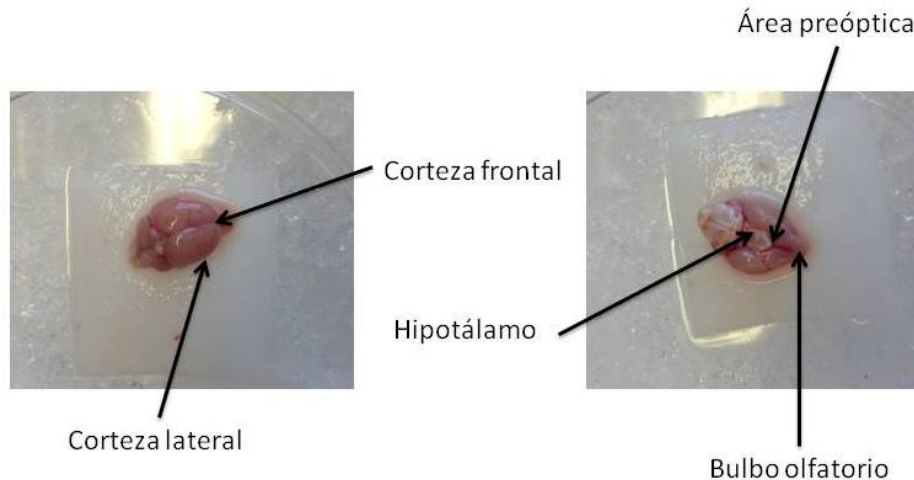


Figura 17: Cerebro de ratón, Se muestran las áreas del que fueron extraídas: corteza frontal, corteza lateral, hipotálamo, área preóptica y bulbo olfatorio.

5. TINCIÓN CON ANTICUERPOS

En una placa para citometría de 96 pozos fondo U se colocaron 25 μ l de la suspensión celular anterior, para cada área se utilizaron 5 pozos, que corresponden a las células sin teñir (control de autofluorescencia), células con anticuerpo secundario (pegado inespecífico), y uno para cada una de los subtipos del receptor (α , β y γ). Las células se fijaron con paraformaldehído 10 minutos a 37°C, después se permeabilizaron con 150 μ l de metanol frío a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm durante 3 minutos y lavadas con amortiguador de FACS, mediante una nueva centrifugación. Una vez lavadas las células se adicionaron 25 μ l del anticuerpo primario anti- α , β o γ según corresponda y se incubaron durante 20 minutos a 4°C, transcurrido este tiempo, se adicionaron 150 μ l de amortiguador de FACS y se procedió a una centrifugación bajo las mismas condiciones, una vez retirado el sobrenadante, se adicionan 25 μ l del anticuerpo secundario a los pozos marcados como secundario, α , β y γ , se incubaron nuevamente 20 minutos a 4°C alejadas de la luz, se adicionan 150 μ l de amortiguador de FACS y centrifugaron, finalmente las células se resuspendieron

en 200 µl de amortiguador de FACS y se conservaron en obscuridad hasta su captura por el citómetro.

Se realizó la captura de datos en el citómetro FACS Calibur (BD biosciences), los datos fueron analizados usando el software FlowJo 7 y en análisis estadístico se realizó mediante el programa Prisma 6 (ANOVA de 2 vías seguida de una prueba de Tukey).

6. GONADECTOMÍAS

Como se mencionó con anterioridad se administró una mezcla de ketamina/xilacina como anestésico, además se comprobó la profundidad de la anestesia mediante la respuesta de los animales a una suave presión sobre las patas traseras⁶⁷. En las hembras se cortó el pelo sobre la columna lumbar y se limpió la piel con etanol al 70%, en los machos solamente se limpió la bolsa escrotal. Antes de comenzar las cirugías se limpió la mesa del quirófano con etanol.

6.1 Ovariectomía

Para la ovariectomía se colocó al ratón sobre su parte ventral (espalda expuesta) y se realizó una ligera incisión en la parte dorsal entre la mitad de la espalda y la base de la cola (justo debajo de la caja torácica), observándose los músculos espinales, posteriormente se deslizó la piel sobre el dorso del animal para localizar uno de los ovarios, los cuales se encuentran rodeados de grasa (uno de cada lado del animal, por lo que el siguiente procedimiento se realizó dos veces) donde se hizo una segunda incisión y poder entrar a la cavidad peritoneal, enseguida se retrajo la grasa ovárica y se expusieron los oviductos, después se realizó una ligadura alrededor del oviducto (para prevenir sangrado) y se extirparon los ovarios cortando el oviducto. Finalmente el cuerno uterino y la parte

restante del oviducto se introdujeron de nuevo en la cavidad abdominal y se realizó la sutura (dos puntos) con hilo reabsorbible (Atramat®) (figura 18).

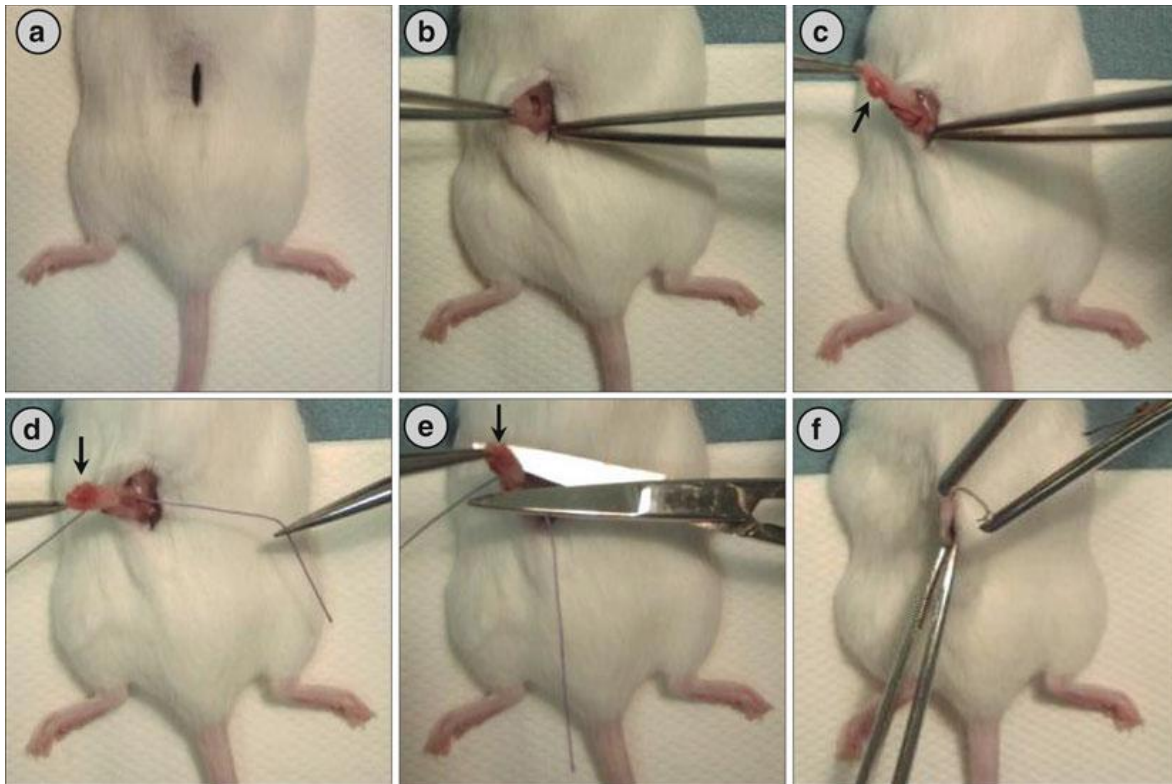


Figura 18. Ovariectomía en ratón. **(A)** Marca donde se realizó la incisión; **(B)** ubicación de la grasa gonadal y del ovario; **(C)** identificación del ovario (flecha negra); **(D)** ligadura alrededor del oviducto; **(E)** extirpación del ovario; **(F)** sutura de la incisión inicial (Idris, 2012).

6.2 Orquiectomía

Con el ratón recostado sobre su espalda (parte dorsal), se realizó una ligera incisión en la parte ventral del escroto dejando al descubierto el tejido conectivo subcutáneo y los testículos junto con la grasa gonadal, dentro del saco muscular, donde se hizo una segunda incisión, seguido de una ligera presión debajo del estómago para poder exponer los testículos, donde también se expusieron el epidídimo, conducto deferente y los vasos sanguíneos. Los testículos se ligaron alrededor de los vasos sanguíneos (para prevenir el sangrado) y se extirparon

cortando los vasos sanguíneos. Finalmente se regreso el contenido restante al saco testicular y se cerró la piel con sutura reabsorbible (Atramat®) (figura 19).

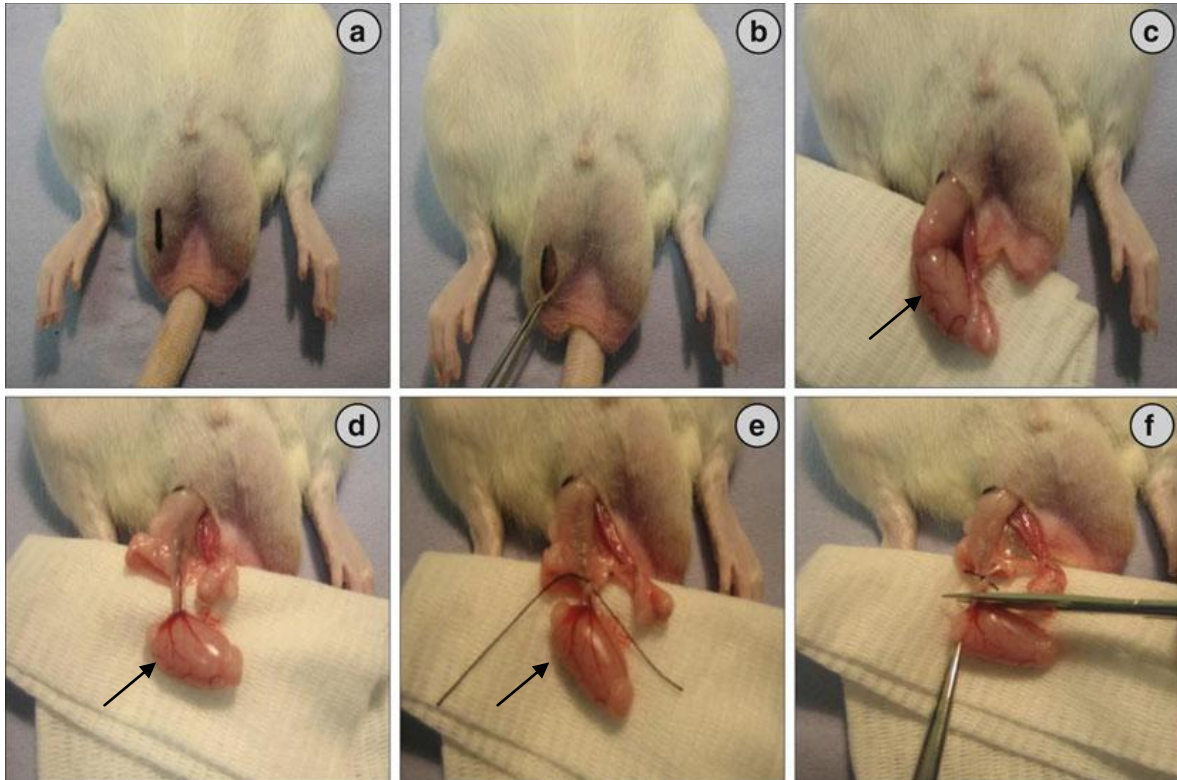


Figura 19. Orquiectomía en rata. **(A)** marca de la incisión en la bolsa escrotal; **(B)** corte del escroto; **(C)** exposición de los testículos (flecha negra); **(D)** separación de la grasa gonadal; **(E)** ligadura del testículo; **(F)** extirpación del testículo (Idris, 2012).

RESULTADOS

A continuación se muestran las fotos de la suspensión celular del tejido cerebral después de la disgregación, donde es posible observar a las neuronas del hipocampo (figura 20-A y B).

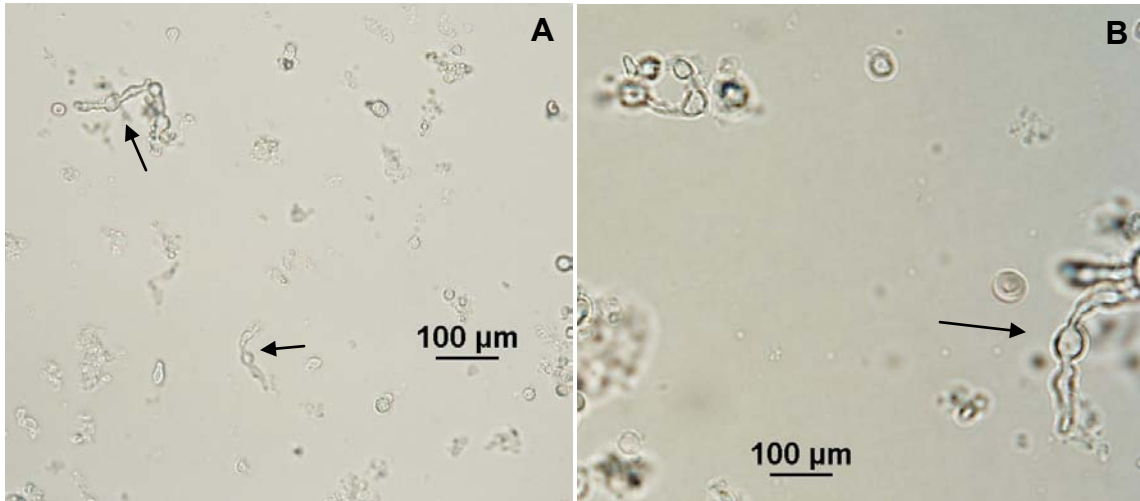


Figura 20. Neuronas del hipocampo vistas al microscopio óptico (flecha), preparación en fresco (fotos cortesía de QFB Rosalía Hernández).

1. CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar la citometría de flujo en tejido cerebral primero se realizó una comparación entre diferentes tejidos y el cerebro para descartar la presencia de otros tipos celulares.

1.1 Citometría de flujo (dot plots) comparativa de diferentes tejidos

En las siguientes gráficas de puntos (dot plots) es evidente las diferencias de tipos celulares que están presentes en diversos tejidos (las figuras 21-A, B y C corresponden a tejidos de hembras y las figuras 21-D, E, F a tejidos de machos). En el bazo (figuras 21-A y D) es posible apreciar dos poblaciones celulares de

distinto tamaño, esto se observa de igual manera en el útero y en los testículos (figuras 21-B y 21-E). Sin embargo, en los tejidos neuronales, área preóptica (figura 21-C) e hipocampo (figura 21-F) se observa una sola población celular con tamaño y complejidad similares.

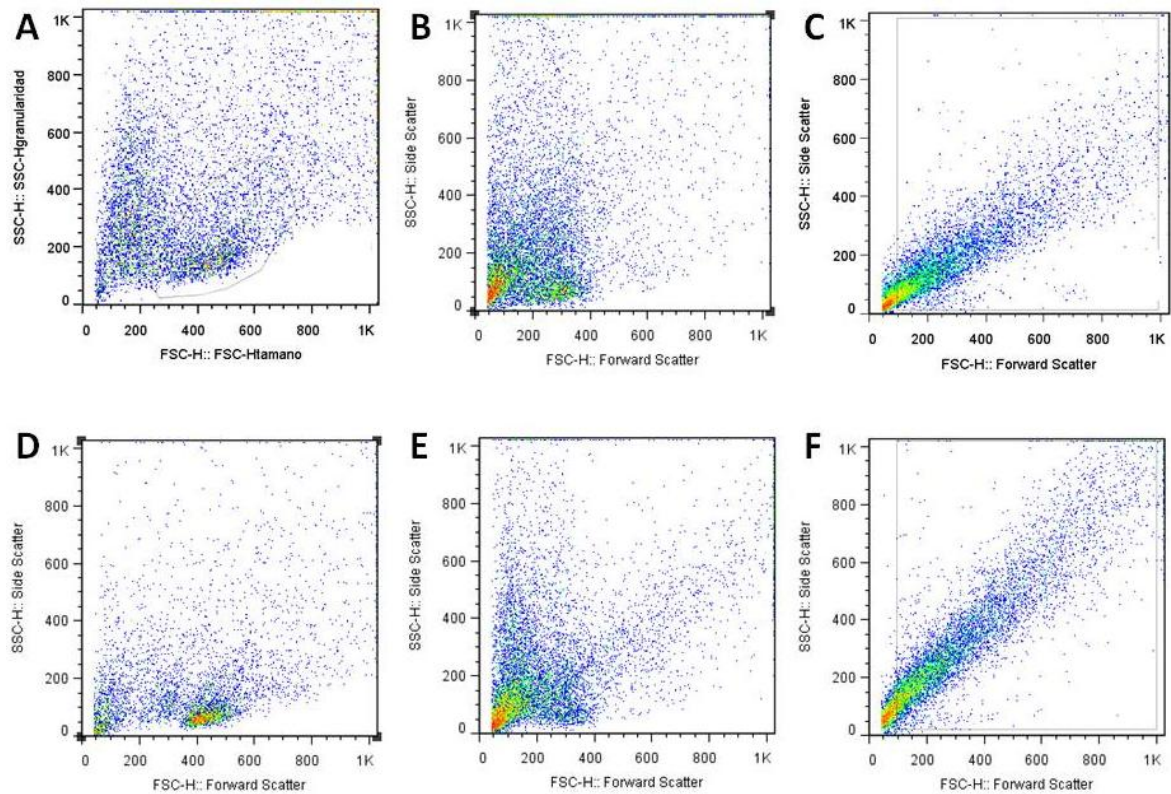


Figura 21. Dot plots (gráficas de puntos), tamaño vs granularidad (FSC vs SSC), las gráficas mostradas corresponden a células totales en cada tejido marcadas con anticuerpos para mPR α . (A) Bazo (hembra); (B) útero (hembra de 10 semanas); (C) área preóptica (hembra 4 semanas); (D) bazo (macho); (E) testículo (macho 4 semanas); (F) hipocampo (macho 4 semanas).

1.2 Dot plots de tejido neuronal

Se muestran los dot plots del área preóptica de ratonas hembras de 4 semanas de edad, (figura 22), se observan las células sin teñir, las células marcadas con anticuerpo secundario y las marcadas con anticuerpos para mPR α , β y γ . Donde además se encuentra marcada la parte de la población utilizada, marcada como “Teñidas”.

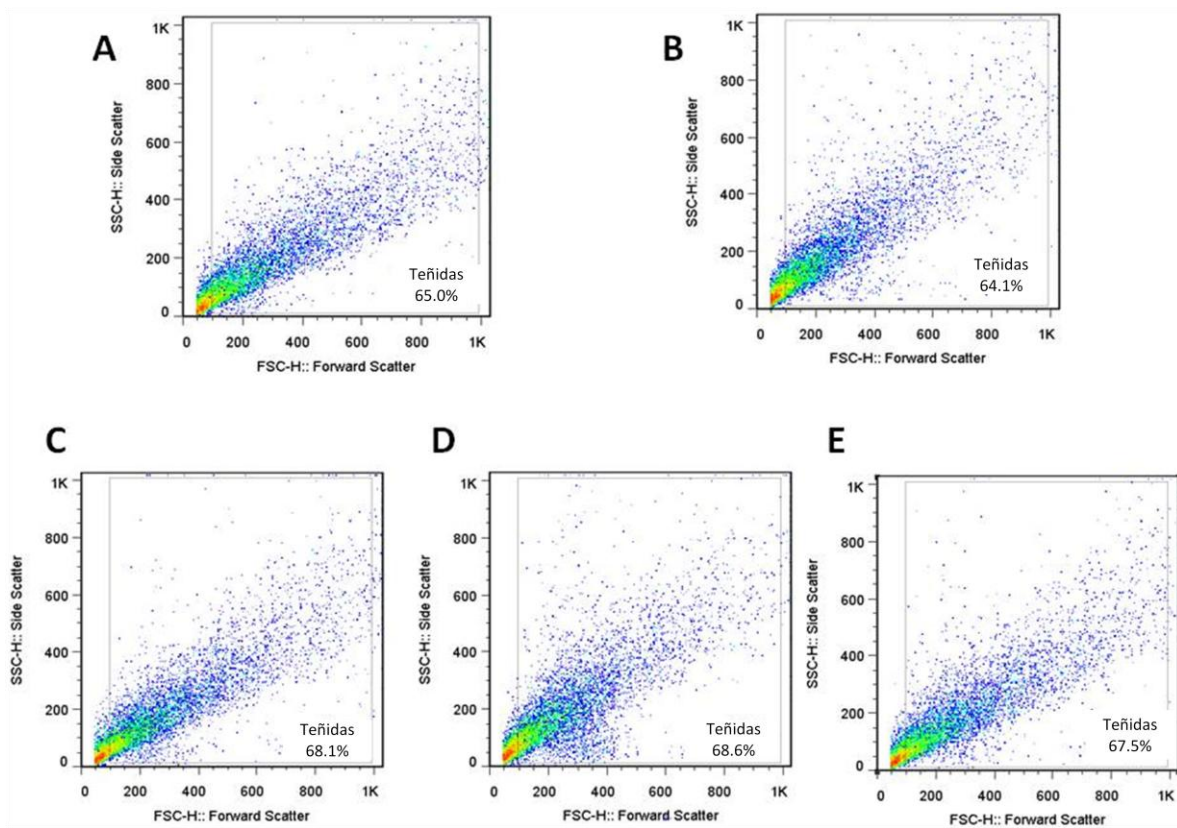


Figura 22. Dot plot de células neuronales del área preóptica de cerebros de ratonas hembras a las 4 semanas de edad, marcadas con anti-mPR. Las figuras C, D y E están marcadas con el anti-mPR y con el anticuerpo secundario. **(A)** Células sin teñir que corresponden al control de autofluorescencia, **(B)** células marcadas únicamente con el anticuerpo secundario como control de pegado inespecífico del anticuerpo, **(C)** células marcadas con anti-mPR α , **(D)** células marcadas con anti-mPR β y **(E)** células marcadas con anti-mPR γ .

1.3 Histogramas de tejido neuronal

Posteriormente la población seleccionada del dot plot se graficó en histogramas (figura 23) para hacer visible la expresión del receptor mediante el desplazamiento de la gráfica. Este desplazamiento indica la expresión del receptor en la superficie celular, en cual se indica como porcentaje (mPR+).

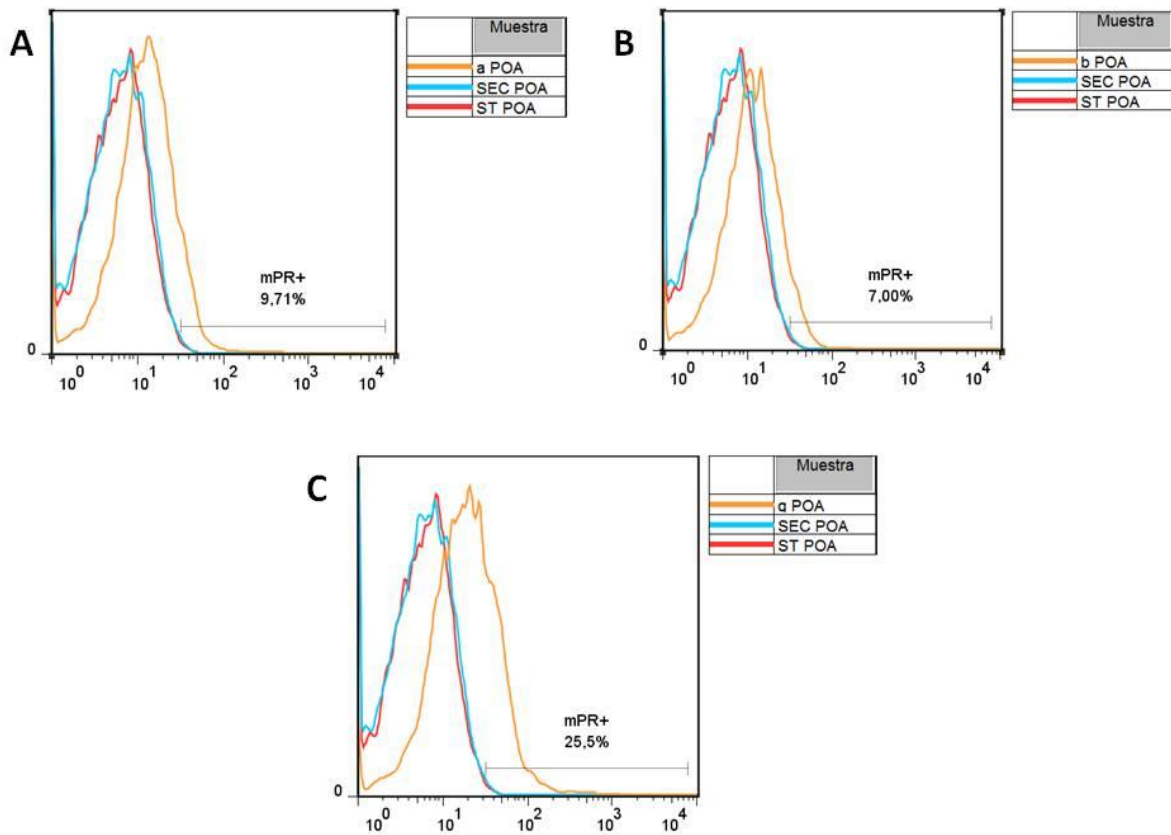


Figura 23. Histogramas del área preóptica de ratones hembras de 4 semanas de edad. La línea roja corresponde a células sin teñir, la azul a células marcadas únicamente con anticuerpo secundario y la naranja al receptor marcado. **(A)** mPR α , **(B)** mPR β , **(C)** mPR γ .

2. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS mPRS EN TEJIDO CEREBRAL DE RATONES HEMBRAS Y MACHOS PREPÚBERES Y ADULTOS.

Se presentan las gráficas de la caracterización de la expresión de los mPRs en tejido cerebral a las edades de 4 semanas (4s) y 10 semanas (10s) de edad tanto en hembras como en machos; donde las barras naranjas corresponden a las hembras y las barras verdes a los machos. Las gráficas que corresponden al porcentaje de expresión del mPR, se refieren a las células positivas, es decir, las células que en su superficie celular expresan al mPR; mientras que las gráficas mostradas como intensidad media de fluorescencia, indican una medida relativa de la intensidad (cantidad) de receptores presentes en la membrana celular. Finalmente se marcan como ND (no detectado) a los subtipos de mPR que no se expresaron en la superficie celular.

Por otra parte, se observa que el subtipo γ solamente se expresa en etapas tempranas del desarrollo (4 semanas), ya que a la edad de 10 semanas, es decir, en animales adultos no es posible detectarlo tanto en hembras como en machos en ninguna de las 6 áreas evaluadas. Respecto al mPR α , aunque no se observa diferencia en cuanto a su expresión e intensidad de la expresión es evidente que está presente en hembras y machos prepúberes y adultos en todas las áreas del cerebro. En general, el mPR β se expresa en una proporción mayor en las áreas del cerebro estudiadas en comparación con los otros dos subtipos del mPR, además se observa que la cantidad (relativa) de receptores presentes en la superficie celular es más alta en este subtipo en comparación con el α y con el γ .

2.1 Bulbo Olfatorio

En el bulbo olfatorio se observa que el mPR β tiene una expresión mayor (células positivas) (figura 24-A) en las hembras adultas (10 semanas) y en los machos prepúberes (4 semanas) respecto a las hembras de 4 semanas. Sin embargo, las hembras de 10 semanas presentan una intensidad en la expresión significativamente diferente (figura 24-B) en comparación con las hembras de 4 semanas, es decir, la intensidad de expresión del mPR β es mayor en las hembras de 10 semanas que en las de 4 semanas, mientras que la intensidad entre los machos y hembras de 4 semanas no es diferente.

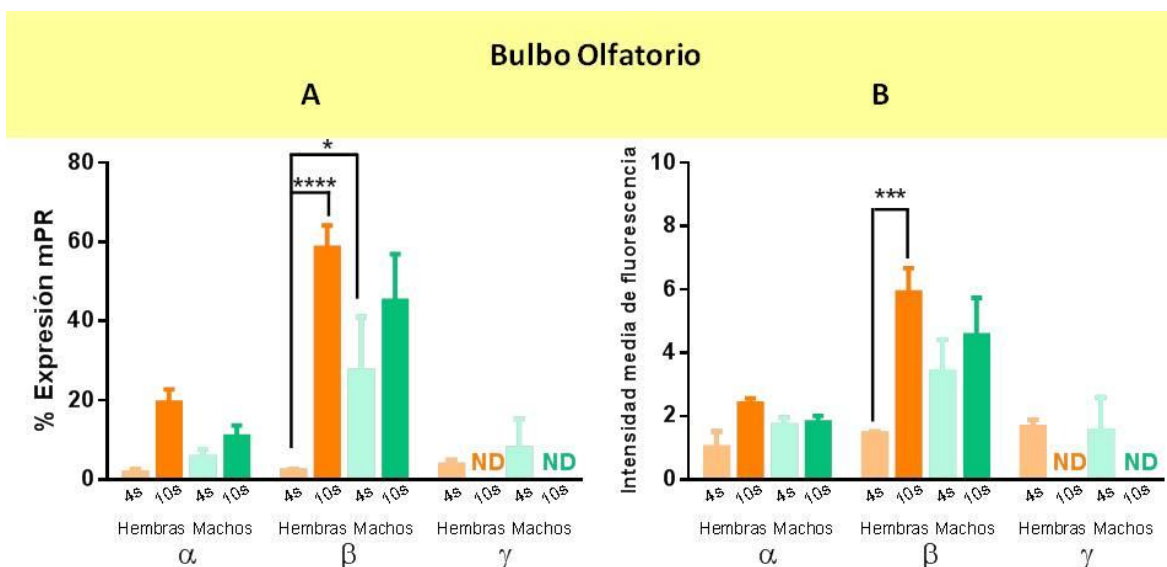


Figura 24. Bulbo olfatorio. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs **(A)** e intensidad media de fluorescencia **(B)**. Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, 4s: 4 semanas o prepúberes, 10s: 10 semanas o adultos, ND: no detectado.

2.2 Corteza Frontal

En la corteza frontal únicamente existe diferencia significativa entre las hembras de 4 semanas y 10 semanas de edad tanto en la expresión (figura 25-A) como en la intensidad de fluorescencia (figura 25-B) en el mPR β siendo mayor esta en las hembras adultas, mientras que entre los machos no se observa diferencia alguna en ninguna de las variables evaluadas, ni tampoco al comprar hembras con machos de la misma edad. En los mPR α y γ no se observa diferencia significativa en ninguna de las variables evaluadas.

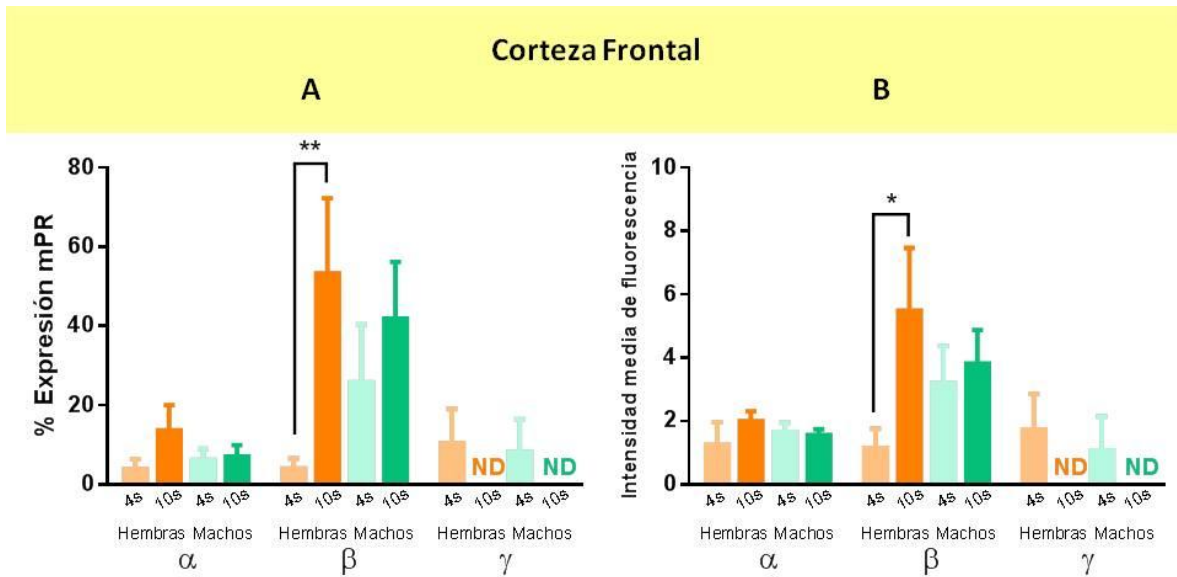


Figura 25. Corteza frontal. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (**A**) e intensidad media de fluorescencia (**B**). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, 4s: 4 semanas o prepúberes, 10s: 10 semanas o adultos, ND: no detectado.

2.3 Corteza Lateral

En la corteza cerebral no se observó diferencia significativa entre hembras ni machos ni tampoco entre las edades de los ratones tanto en el porcentaje de expresión (figura 26-A) como en la intensidad media de fluorescencia (figura 26-B) para ninguno de los subtipos del mPR (α , β y γ). Aunque se observa, en general, que sigue siendo mayor la expresión del mPR β respecto al mPR α y al mPR γ y que la intensidad con la que se expresa el mPR α es la misma en hembras y machos, además, comparando la corteza lateral con otras áreas, como el bulbo olfatorio o el área preóptica, la intensidad de fluorescencia media del mPR β es menor.

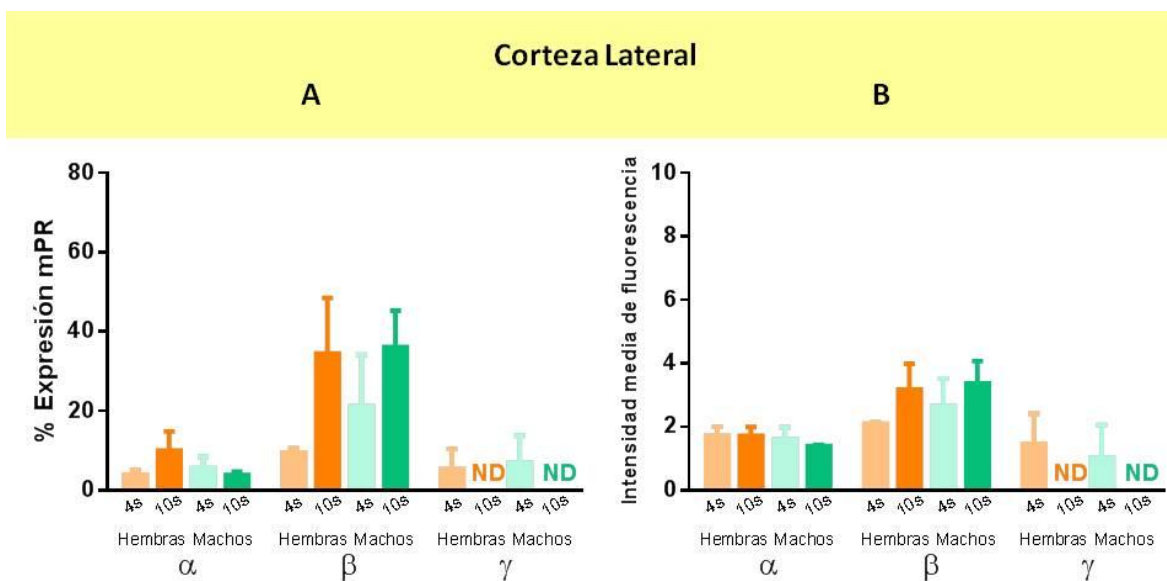


Figura 26. Corteza lateral. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (**A**) e intensidad media de fluorescencia (**B**). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, 4s: 4 semanas o prepúberes, 10s: 10 semanas o adultos, ND: no detectado.

2.4 Área Preóptica

El mPR β se expresa más en células del área preóptica de las hembras (figura 27-A) de 10 semanas, al igual que una intensidad significativamente diferente respecto a las hembras de 4 semanas (figura 27-B). Sin embargo, respecto a los machos adultos no se observa diferencia significativa. Observándose además, que la intensidad en la expresión del mPR α es igual en ambos sexos de los ratones a diferentes edades. Adicionalmente, así como en las áreas del cerebro descritas arriba, la expresión del mPR γ se observa únicamente en animales prepúberes.

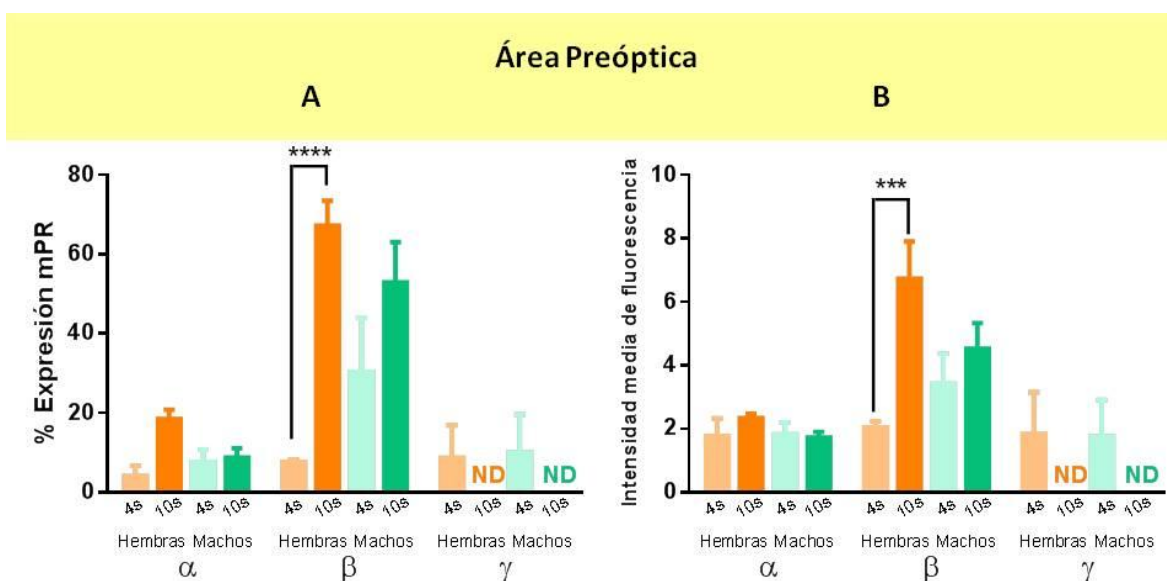


Figura 27. Área preóptica. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (**A**) e intensidad media de fluorescencia (**B**). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, ***p<0.001, ****p<0.0001. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, 4s: 4 semanas o prepúberes, 10s: 10 semanas o adultos, ND: no detectado.

2.5 Hipotálamo

Al igual que en la corteza lateral, en el hipotálamo no existe diferencia significativa en cuanto a la expresión de los mPRs (figura 28-A), así como tampoco respecto a la intensidad de la expresión de estos (figura 28-B). Pero se observa nuevamente que el mPR β está presente en la superficie de células del hipotálamo tanto en hembras como en machos en una proporción mayor. Además se sigue el mismo comportamiento en la expresión del mPR α y el γ que en las otras áreas del cerebro. Por otra parte, aunque en las hembras de 4 semanas el porcentaje de expresión del mPR α y γ es bajo, la intensidad con la que el receptor está presente en la superficie celular se encuentra dentro del rango que se aprecia en las áreas del cerebro descritas arriba.

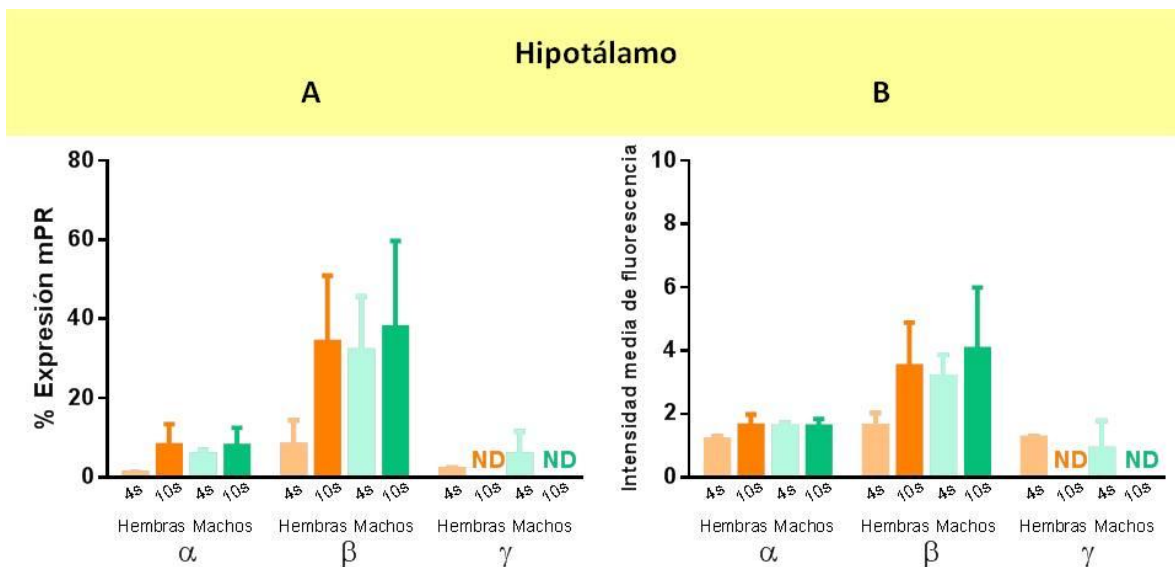


Figura 28. Hipotálamo. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (**A**) e intensidad media de fluorescencia (**B**). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, 4s: 4 semanas o prepúberes, 10s: 10 semanas o adultos, ND: no detectado.

2.6 Hipocampo

La expresión del mPR α en el hipocampo (figura 29-A) es menor esta área evaluada, sin embargo, la intensidad con la que se expresan en la superficie celular (figura 29-B) es elevada. Respecto al mPR β , solamente existe diferencia significativa en la intensidad media de fluorescencia entre las hembras de 4 semanas y las de 10 semanas (figura 29-B), siendo mayor en las hembras adultas. Al igual que en las 5 regiones anteriores el subtipo γ solamente se expresa en animales prepúberes.

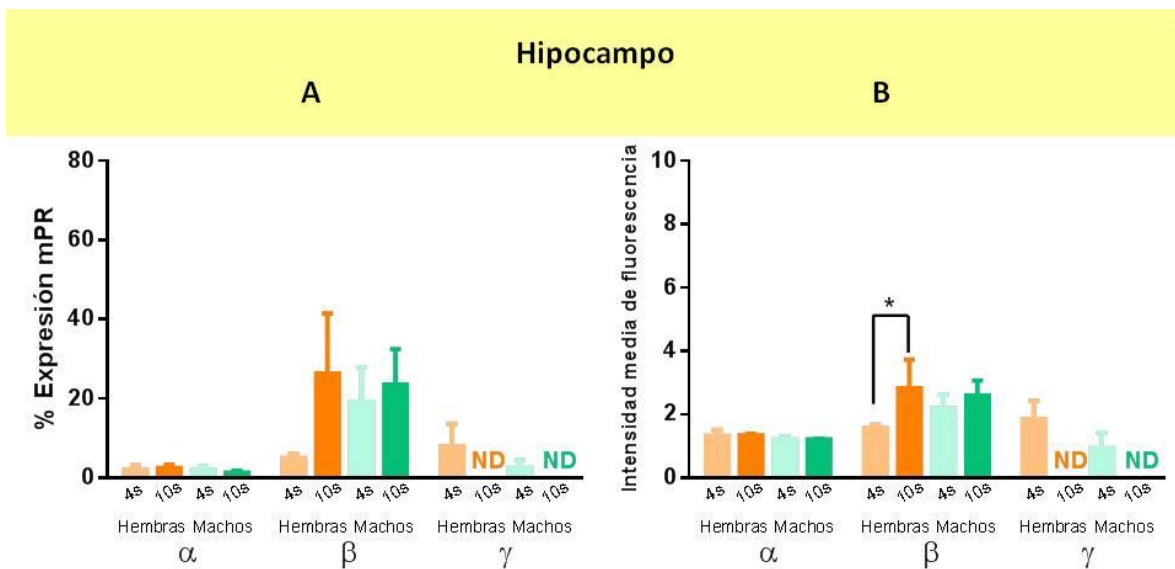


Figura 29. Hipocampo. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (**A**) e intensidad media de fluorescencia (**B**). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, * $p < 0.05$. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, 4s: 4 semanas o prepúberes, 10s: 10 semanas o adultos, ND: no detectado.

3. EFECTO DE LA GONADECTOMÍA PREPUBERAL EN LA EXPRESIÓN DE LOS mPRS EN TEJIDO CEREBRAL DE RATONES HEMBRAS Y MACHOS

A continuación se muestran las gráficas de la evaluación del efecto de la gonadectomía prepupal de ratones hembras y machos en la expresión de los mPRs. Las gráficas que corresponden al porcentaje de expresión del mPR, se refieren a las células positivas, es decir, las células que en su superficie celular expresan al mPR; mientras que las gráficas mostradas como intensidad media de fluorescencia, indican una medida relativa de la intensidad (cantidad) de receptores presentes en la membrana celular. Las barras naranjas corresponden a las hembras y las barras verdes a los machos. Las abreviaturas corresponden a Ctrl: control, Sh: sham (cirugía simulada), Gx: gonadectomizados (ovariectomía en hembras y orquiectomía en machos) y ND: no detectado (subtipos de mPR que no se expresaron en la superficie celular).

En general, se observa que el mPR β es el subtipo más expresado en la superficie de las células del tejido cerebral, mientras que el mPR α se expresa en menor proporción. Sin embargo, el mPR γ no se expresa en hembras ni machos bajo ningún tratamiento ni en ninguna área del cerebro evaluada, con excepción de los machos sham, y en los cuales se expresa en las seis áreas evaluadas. Cabe resaltar, que en las hembras gonadectomizadas no se expresa ningún mPR en ninguna de las regiones cerebrales que se estudiaron. Además, en la mayoría de las regiones cerebrales se observó que en los animales sham se incrementa la expresión de los mPR.

3.1 Bulbo Olfatorio

En el bulbo olfatorio existe diferencia significativa entre los animales sham y los gonadectomizados (hembra y machos) ya que en los ratones sham el porcentaje de células teñidas para el mPR α (figura 30-A) es mayor. Respecto a la intensidad del receptor únicamente se observa diferencia significativa entre las hembras sham y gonadectomizadas, donde las sham tienen mayor intensidad en

la expresión del receptor; mientras que entre las hembras y machos gonadectomizados (figura 30-B), donde en estos últimos la intensidad de media de fluorescencia del receptor es mayor. Para el mPR β , las hembras control y los machos gonadectomizados tienen mayor expresión de este subtipo en comparación con las hembras gonadectomizadas, en donde es nula la presencia del receptor en la superficie celular (figura 30-A). De igual manera, estas diferencias se observan en la intensidad de fluorescencia media del mPR β , adicionalmente se observa diferencia entre los machos gonadectomizados y controles, donde los animales control tienen mayor intensidad de fluorescencia media (figura 30-B). El mPR γ solamente se expresa en machos gonadectomizados.

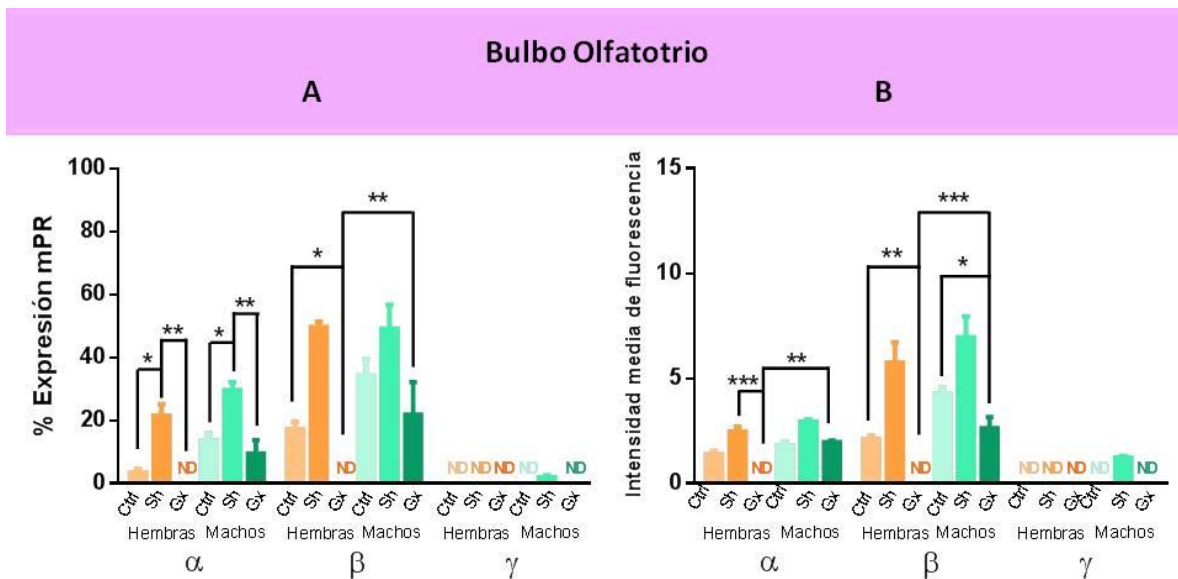


Figura 30. Bulbo olfatorio. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs **(A)** e intensidad media de fluorescencia **(B)**. Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, Ctrl: control, Sh: sham, Gx: gonadectomizado, ND: no detectado. **Las siguientes diferencias entre los grupos del mPR β no se muestran en las gráficas:** **Figura A:** hembras Ctrl vs hembras Sh (**** $p < 0.0001$), hembras Sh vs hembras Gx (**** $p < 0.0001$), machos Sh vs machos Gx (**** $p < 0.0001$). **Figura B:** hembras Ctrl vs hembras Sh (**** $p < 0.0001$), hembras Sh vs hembras Gx (**** $p < 0.0001$), machos Ctrl vs machos Sh (** $p < 0.001$), machos Sh vs machos Gx (**** $p < 0.0001$).

3.2 Corteza Frontal

Respecto al porcentaje de expresión (figura 31-A) en el mPR α no se observa diferencia significativa entre los grupos ni tratamientos. Sin embargo, en la intensidad de fluorescencia media existe diferencia entre las hembras sham y las gonadectomizadas (figura 31-B). En el porcentaje de expresión del mPR β es mayor en hembras y machos sham respecto a los animales control y gonadectomizados, en donde es menor y nula, respectivamente (figura 31-A). Por otro lado las hembras gonadectomizadas no presentan intensidad de fluorescencia media, la cual es significativamente diferente de las hembras control así como de los machos gonadectomizados (figura 31-B). Sin embargo, el mPR γ solamente se expresa en machos sham.

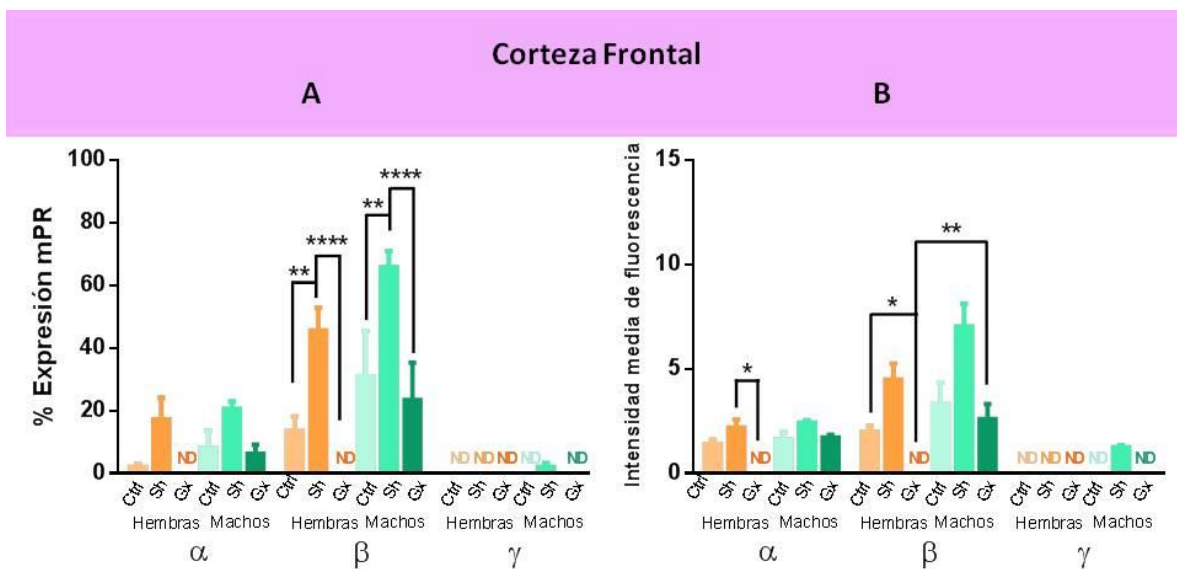


Figura 31. Corteza frontal. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (A) e intensidad media de fluorescencia (B). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, Ctrl: control, Sh: sham, Gx: gonadectomizado, ND: no detectado. **Las siguientes diferencias ente los grupos del mPR β no se muestran en las gráficas:** Figura B: hembras Ctrl vs hembras Sh (**p<0.01), hembras Sh vs hembras Gx (****p<0.0001), hembras Sh vs machos Sh (**p<0.01), machos Ctrl vs machos Sh (****p<0.0001), machos Sh vs machos Gx (****p<0.0001).

3.3 Corteza Lateral

Respecto al mPR α en la corteza lateral no se observa diferencia significativa en el porcentaje de expresión de este subtipo (figura 32-A). Sin embargo, en la intensidad de fluorescencia medial se aprecia que las hembras gonadectomizadas, que no expresan el receptor, son diferentes de las hembras sham y de los machos gonadectomizados (figura 32-B). Por otra parte, los animales sham (hembras y machos) son significativamente diferentes de los animales gonadectomizados en cuanto a la expresión del mPR β , donde se observa que los animales que se sometieron a la cirugía simulada presentan un porcentaje en la expresión del mPR mayor (figura 32-A), mientras que en la intensidad de fluorescencia las hembras gonadectomizadas son diferentes de las hembras control, así como de los machos gonadectomizados (figura 32-B).

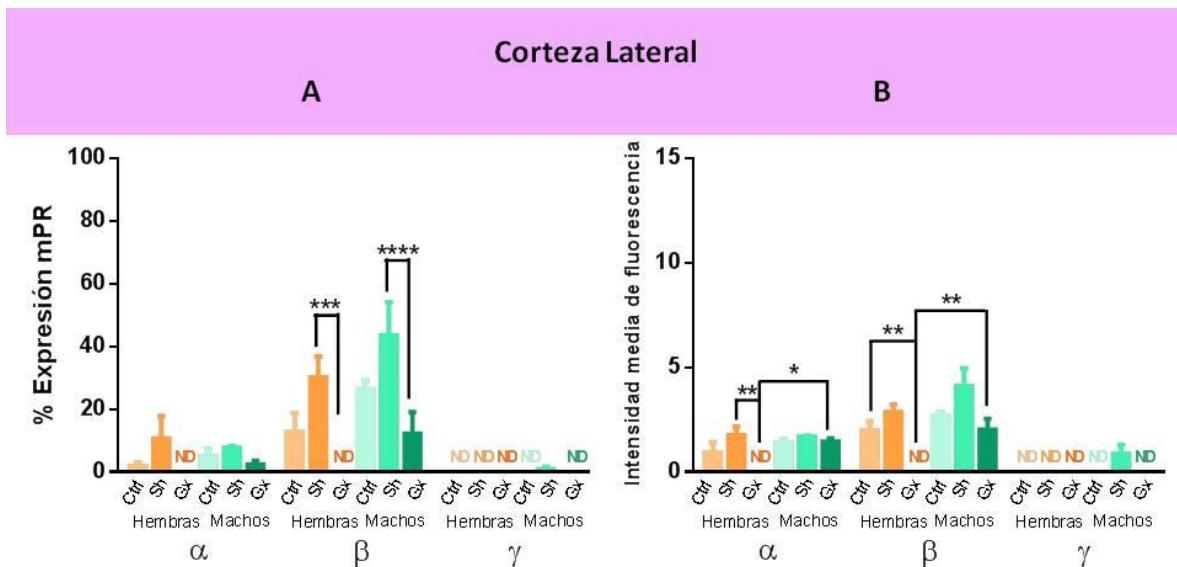


Figura 32. Corteza lateral. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (A) e intensidad media de fluorescencia (B). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, Ctrl: control, Sh: sham, Gx: gonadectomizado, ND: no detectado. **Las siguientes diferencias ente los grupos del mPR β no se muestran en las gráficas:** Figura B: hembras Sh vs hembras Gx (****p<0.0001), machos Ctrl vs machos Sh (*p<0.05), machos Sh vs machos Gx (**p<0.01).

3.4 Área preóptica

En el área preóptica el porcentaje de expresión del mPR α no presentó diferencia alguna entre las condiciones experimentales evaluadas (figura 32-A). Sin embargo, en la intensidad de fluorescencia las hembras sham tienen una intensidad de fluorescencia mayor respecto a las hembras gonadectomizadas, las cuales no expresan al mPR α , por lo que tampoco tienen intensidad de fluorescencia (figura 32-B). Respecto al mPR β se observa que las hembras gonadectomizadas, que no presentan la expresión del mPR, son diferentes de las hembras control, así como a los machos gonadectomizados (figura 33-A), de igual manera, estas misma diferencias se observan en la intensidad media de fluorescencia (figura 33-B).

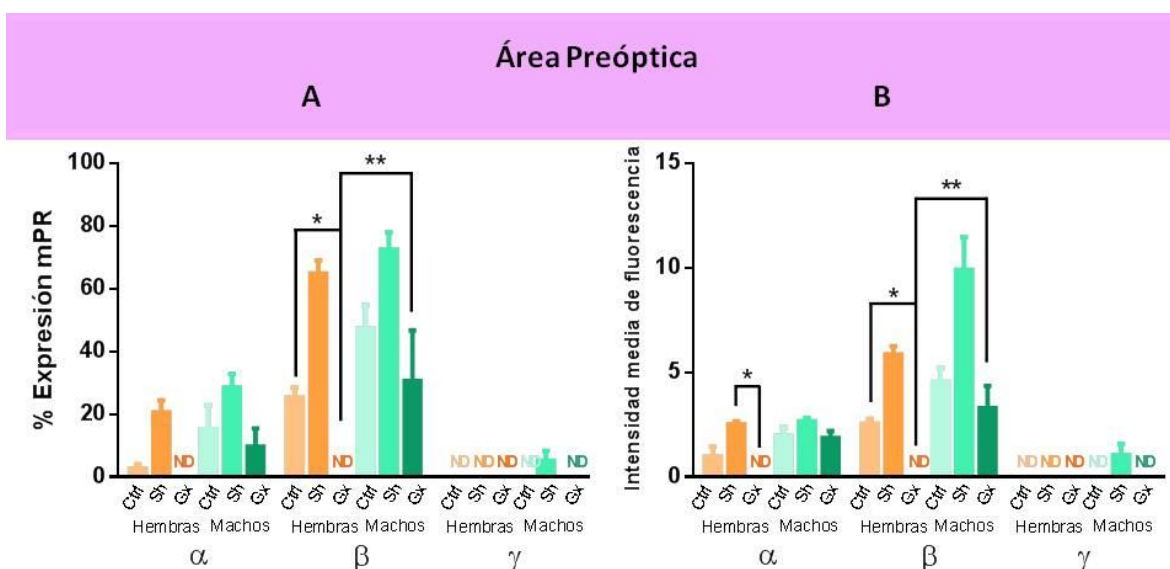


Figura 33. Área preóptica. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (A) e intensidad media de fluorescencia (B). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, Ctrl: control, Sh: sham, Gx: gonadectomizado, ND: no detectado. **Las siguientes diferencias ente los grupos del mPR β no se muestran en las gráficas:** **Figura A:** hembras Ctrl vs hembras Sh (**** $p < 0.0001$), hembras Sh vs hembras Gx (**** $p < 0.0001$), machos Ctrl vs machos Sh (* $p < 0.05$), machos Sh vs machos Gx (**** $p < 0.0001$). **Figura B:** hembras Ctrl vs hembras Sh (** $p < 0.01$), hembras Sh vs hembras Gx (**** $p < 0.0001$), hembras Sh vs machos Sh (**** $p < 0.0001$), machos Ctrl vs machos Sh (** $p < 0.001$), machos Sh vs machos Gx (**** $p < 0.0001$).

3.5 Hipotálamo

En el hipotálamo solo existe diferencia significativa tanto en el porcentaje de expresión, así como en la intensidad media de fluorescencia del mPR β . Se observa una diferencia entre los animales control y los animales gonadectomizados (tanto hembras como machos), donde estos últimos tienen una menor expresión del mPR β (o nula en el caso de las hembras) respecto a los a los controles (figura 34-A). Respecto a la intensidad en la expresión de este receptor, existe diferencia entre las hembras gonadectomizadas y las hembras control y los machos gonadectomizados (figura 34-B).

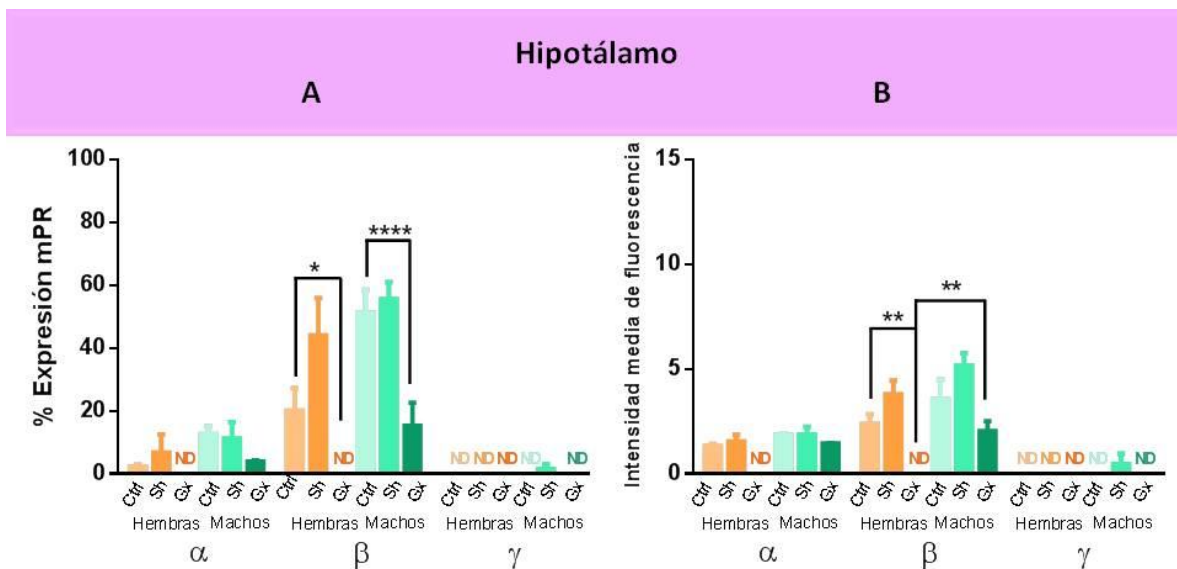


Figura 34. Hipotálamo. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (**A**) e intensidad media de fluorescencia (**B**). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p > 0.0001$. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, Ctrl: control, Sh: sham, Gx: gonadectomizado, ND: no detectado. **Las siguientes diferencias entre los grupos del mPR β no se muestran en las gráficas:** **Figura A:** hembras Ctrl vs hembras Sh (* $p < 0.05$), hembras Sh vs hembras Gx (**** $p < 0.0001$), machos Sh vs machos Gx (**** $p < 0.0001$). **Figura B:** hembras Sh vs hembras Gx (**** $p < 0.0001$), machos Sh vs machos Gx (**** $p < 0.0001$).

3.6 Hipocampo

Al igual que en hipotálamo, en el hipocampo solamente se observa diferencia significativa en cuanto a la expresión e intensidad media de fluorescencia del mPR β . El porcentaje de expresión del mPR β es menor en los machos gonadectomizados en comparación con los machos control (figura 35-A). Sin embargo, en la intensidad de fluorescencia media (figura 34-B) las hembras sham tienen una mayor intensidad que las hembras gonadectomizadas (***p<0.001, no mostrada), al igual que los machos gonadectomizados tienen una mayor intensidad respecto a las hembras gonadectimizadas (las cuales no expresan el receptor, y por lo tanto, tampoco presentan intensidad de fluorescencia). También se observa que las hembras control son significativamente diferentes de las hembras gonadectomizadas en cuanto a la intensidad de fluorescencia.

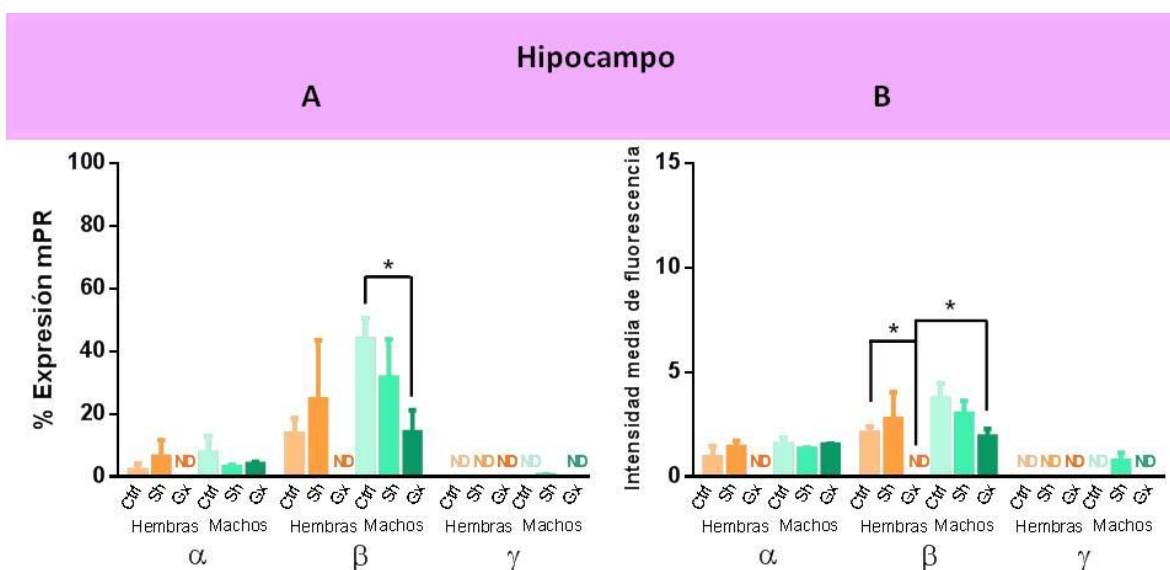


Figura 35. Hipocampo. Se muestra el porcentaje de expresión de los mPRs (**A**) e intensidad media de fluorescencia (**B**). Se observa el error estándar, con una N=3 en cada grupo experimental, *p<0.05. Barras naranjas corresponden a hembras y barras verdes a machos, Ctrl: control, Sh: sham, Gx: gonadectomizado, ND: no detectado.

DISCUSIÓN

Es importante destacar que con la citometría es posible conocer si las células expresan en la superficie celular el receptor (células positivas) y la intensidad media de fluorescencia (medida relativa de la cantidad de receptores presentes en la superficie celular) que a diferencia de técnicas como RT-PCR, que nos indica si está presente o no el mRNA, no su expresión; podemos caracterizar la expresión del mPR en la superficie celular. Existen diversos estudios donde evaluaron diferentes órganos y tejidos con técnicas como RT-PCR para determinar donde se podían expresar los mPRs⁴⁰, estos estudios se realizaron tanto en tejido de rata y ratón así como en tejidos de humanos, en los cuales se incluyen diversas áreas de cerebro como hipotálamo y la corteza cerebral. Por otro lado, algunos estudios de distribución neuroanatómicos utilizando hibridación *in situ*³⁹ demostraron baja y homogénea expresión de mPRs en el hipotálamo y sólida expresión en los núcleos del tálamo y de la corteza de estradiol, pero en este caso de ratas hembras ovariectomizadas tratadas con estradiol. Ninguno de estos estudios hace una comparación entre hembras y machos o entre diferentes etapas de los animales, aunque existen reportes de que los tres subtipos se expresan tanto en ratas como ratones y que esta expresión varía a lo largo del ciclo estral⁴⁰ en las hembras.

Aunque existen variaciones en la expresión de los receptores dentro del SNC, tanto en hembras como en machos, se observa en general que el mPR β es el más expresado en tejido neuronal. Sin embargo, en las áreas donde más se expresa son el bulbo olfatorio, la corteza frontal y el área preóptica, mostrando así que este subtipo de receptor puede estar implicado en las diversas funciones que se llevan a cabo en estas regiones cerebrales. Por otro lado el mPR γ está presente únicamente en los animales prepúberes y con la misma intensidad y porcentaje de expresión que el mPR α , aunque este último se expresa tanto en animales prepúberes y adultos en las seis áreas del cerebro (bulbo olfatorio, corteza frontal, corteza lateral, área preóptica, hipotálamo e hipocampo), esta expresión diferencial de la expresión e intensidad de los receptores puede tener

influencia en el comportamiento y la conducta sexual, memoria, efectos neuroprotectores, estado de ánimo, entre otros.

Como es posible observar en las gráficas de bulbo olfatorio (figura 24), corteza frontal (figura 25) y área preóptica (figura 27) el mPR β se expresa en mayor proporción en las hembras de 10 semanas en comparación con las hembras prepúberes, esto puede deberse a que la expresión de los mPRs, al igual que la expresión de los PR y mPRs en el tejido reproductivo, está regulada por los cambios hormonales del ciclo estral, y se sabe que a la edad de 4 semanas las hembras aún no están sexualmente maduras a diferencia de las hembras de 10 semanas, en las cuales la carga hormonal cambia dependiendo de la fase del ciclo en la que se encuentre, donde en el proestro los mPRs tienen una regulación positiva por estrógenos y una regulación negativa por progesterona⁴⁰. Aunque en el hipotálmo la presencia de los subtipos α y β tiene una posible participación en los efectos de la retroalimentación negativa de la progesterona en la secreción de la GnRH, no se observó diferencia significativa entre las hembras de 4 y 10 semanas (figura 28). Mientras que en el hipocampo (figura 29) únicamente se observa diferencia en la intensidad media de fluorescencia entre hembras de 4 y 10 semanas, estos nos indica que las hembras adultas tienen una mayor cantidad de mPR β expresado en la membrana de células del hipocampo.

En los animales machos se observa una amplia expresión del mPR β en el SNC, sin embargo, no se encontró diferencia significativa en los niveles de expresión entre animales prepúberes y adultos, ya que los machos no presentan ciclos hormonales¹³, es decir, la cantidad de hormona circulante en el organismo o sintetizada es la misma a lo largo del día, semanas o meses, aunque hormonalmente entre animales prepúberes y adultos si existen niveles diferentes de hormonas basadas en la producción, secreción y concentraciones circulantes en el organismo, esta diferencia podría no influir en la expresión del mPR β dentro del SNC.

Haciendo una comparación de la expresión entre hembras y machos de las mismas edades no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos,

pero es posible observar que el porcentaje de expresión y la intensidad media de fluorescencia del mPR β es similar tanto en hembras como en machos a las 10 semanas de edad, en esta etapa los animales ya alcanzaron la madurez sexual, razón por la cual se expresa en la misma intensidad este subtipo del receptor.

De igual manera, se caracterizó la expresión del mPR α dentro del SNC, encontrándose que se expresa en el bulbo olfatorio, la corteza frontal, la corteza lateral, el área preóptica, el hipotálamo y el hipocampo, pero en ninguna de estas se observó diferencia significativa en la expresión ni tampoco en la intensidad media de fluorescencia haciendo comparaciones entre sexo o entre edades de los animales. Sin embargo, se observa que este receptor se expresa dentro del SNC de ratones hembras y machos, algo que hasta el momento ha sido pobremente reportado en la literatura. Con estos resultados obtenidos es probable que la expresión del mPR α no esté influenciada⁴⁰, por la fase del ciclo estral o esta influencia sea mínima de modo que no tiene consecuencia alguna en la expresión.

Aunque se sabe muy poco acerca de la expresión mPR γ dentro del SNC, se ha reportado la presencia de mRNA de este receptor en cerebros humanos⁴⁰, sin embargo, existen pocos estudios donde se reporte ampliamente la expresión del mPR γ en tejido neuronal. En el presente estudio se realizó la caracterización de la expresión de este subtipo dentro del SNC, encontrándose que se expresa en todas las áreas evaluadas, pero únicamente en el cerebro de animales prepúberes (hembras y machos), esto puede ser consecuencia de la carga hormonal que presentan los animales en la edad adulta, ocasionando una retroalimentación negativa en el receptor, suprimiendo así su expresión.

En resumen, el mPR β es el más expresado dentro del SNC, encontrándose que únicamente existen diferencias entre hembras de 4 y 10 semanas de edad; la expresión del mPR α no está influenciada por la carga hormonal de los animales ya que el nivel de expresión es similar tanto hembras como machos, así como entre animales prepúberes y adultos, y finalmente, el mPR γ se expresa únicamente en animales prepúberes, suponiendo que la carga hormonal de los animales adultos tiene un efecto negativo sobre el mPR γ . En general la expresión diferencial en las

regiones del cerebro puede tener influencias en el comportamiento sexual, memoria y aprendizaje, entre otros.

Como ya se describió anteriormente, la síntesis de la progesterona y otras hormonas esteroideas se lleva a cabo no sólo en las gónadas o en la glándula adrenal, sino también en el cerebro, sin embargo no se conoce ampliamente como es que puede estar influenciada esta síntesis y mucho menos se sabe cómo se regula la expresión de los mPRs dentro del cerebro, y una manera de explicar un poco esta incógnita fue realizando la caracterización de la expresión de los mPRs en tejido cerebral en animales que fueron gonadectomizados prepuberalmente, donde se encontraron cuatro patrones de expresión relevantes en las seis áreas analizadas, 1) las hembras gonadectomizadas no expresan ninguna de los subtipos de los mPRs; 2) en los animales sham se incrementa la expresión de los mPRs; 3) el mPR β tiene mayor expresión dentro del SNC y 4) los machos gonadectomizados si expresan los tres subtipos de los mPRs.

Se sabe que los esteroideos libres son capaces de difundir a través de la barrera hematoencefálica para unirse a los receptores de membrana y a los receptores intracelulares. Así los niveles en el cerebro de un esteroide en particular están compuestos de esteroideos provenientes de la periferia y de esteroideos sintetizados dentro del SNC. Por otro lado existen estudios donde se muestra que el estradiol regula positivamente la síntesis de progesterona dentro del SNC y de igual manera la expresión de los PR.⁶⁸

En el hipotálamo, el estradiol produce una retroalimentación positiva en la síntesis de la neuroprogesterona en la regulación del ciclo estral de las ratas en las neuronas hipotalámicas, donde se observó que en los astrocitos post-puberales cultivados de ratas hembras expresan ARNm de RNASTAR, P450scc y 3-HSD así como también la síntesis neuroprogesterona, además de que en cultivos de astrocitos tratados con estradiol se induce la síntesis de neuroprogesterona. Esta acción fue mediada a través de los receptores a estrógeno (ER). Tanto el receptor intracelular como los receptores asociados a membrana ER α y ER β fueron localizados en los astrocitos que sugieren dos posibles mecanismos para la

regulación del estradiol en la síntesis de neuroprogesterona: aumento de los niveles de las proteínas implicadas en neurosteroidogénesis o el aumento de la actividad de estas proteínas⁶⁸.

Con base a lo anterior, el retiro de las gónadas provocó en las hembras la pérdida de la fuente principal de estrógenos, los cuales regulan la síntesis de la neuroprogesterona así como la interrupción en los ciclos estrales. Esta pérdida en la regulación de la síntesis de la progesterona en el SNC y la disminución y/o pérdida de la síntesis de la progesterona tiene como resultado que los mPRs no se expresen en la superficie de la membrana de células cerebrales (figuras 31-36). Sin embargo, las gónadas no son la única fuente de hormonas esteroides, ya que también se sintetizan en glándula adrenal, pero en menor proporción, y son utilizadas para regular otras funciones dentro del organismo ya que su concentración en plasma es menor y no son suficientes para poder llegar al SNC.

Por otro lado, se observa que los machos gonadectomizados si expresan los mPRs dentro del SNC, esto nos indica que en los machos la síntesis de progesterona y mPRs no se ve afectada por la eliminación de las gónadas, es decir, las hormonas sintetizadas dentro del SNC no dependen de la regulación por hormonas provenientes de la periferia como en el caso de las hembras (figuras 31-36).

Al igual que en los animales prepúberes y adultos, en los animales gonadectomizados, machos y hembras, (con excepción de las hembras gonadectomizadas), los animales sham y los control, la expresión del mPR β es mayor en el tejido cerebral de los animales, respecto a los otros dos subtipos del mPR (figuras 31-36) por lo que se pone en evidencia que este subtipo estaría implicado en diversas funciones fisiológicas que se llevan a cabo en cada una de las diferentes áreas del cerebro, no sólo en la regulación de las funciones reproductivas. Respecto a las hembras gonadectomizadas, estas no expresan ningún subtipo de mPR en las células de tejido neuronal (figuras 31-36), esto puede ser consecuencia de que la síntesis neuronal en las hembras adultas este regulada por las gónadas y los cambios en las concentraciones circulantes de

hormonas durante los ciclos estrales, ya que al retirar los ovarios se elimina la regulación hormonal de la síntesis de progesterona y otras hormonas, aunque en la glándula adrenal también se sintetiza progesterona, la producción es mucho menor.

Respecto a la expresión del mPR γ , los machos sham son los únicos que expresan este subtipo del receptor (figuras 31-36). En este sentido observamos que los animales sham (hembras y machos) expresan en mayor proporción los subtipos α y β en casi todas las áreas del cerebro, esto puede ser consecuencia de que algunos neuroesteroides, como la progesterona y derivados de ésta, son liberados durante el estrés fisiológico⁶⁹. Aunque se sabe que los niveles en plasma y cerebro de la alopregmolona aumentan rápidamente después de un estrés agudo⁶⁹, este incremento podría mantenerse durante un periodo de tiempo prolongado, es decir, estrés crónico e inducir la expresión de los mPRs.

En resumen, en todas las áreas del SNC evaluadas en el presente trabajo se observa que el subtipo β , tiene un porcentaje de expresión mayor, así como una mayor intensidad de fluorescencia media en los animales sham, respecto a los mPR α y mPR γ . Es evidente que el subtipo α , se expresa poco dentro del SNC, pero tiene presencia en todas las áreas. Sin embargo, el subtipo γ únicamente se expresa en los machos sham, esto indica que este mPR podría estar relacionado con el estrés en los machos, esto puede ser consecuencia del incremento de las concentraciones de alopregmolona en el cerebro debido a un estrés crónico. De igual manera el mPR β , podría estar relacionado con el estrés, además de otras funciones fisiológicas.

CONCLUSIONES

- ⊙ Los mPRs se expresan ampliamente dentro del SNC de ratones hembras y machos.
- ⊙ En las hembras, la expresión del mPR β en el bulbo olfatorio, corteza frontal y área preóptica es dependiente de la edad.
- ⊙ La expresión del mPR γ dentro del SNC es dependiente de la edad del organismo, tanto en los ratones macho como en las hembras.
- ⊙ El estrés influye en la expresión de los receptores en ratones macho y hembra.
- ⊙ En los machos, el estrés induce la expresión del mPR γ .
- ⊙ En las hembras es necesaria la presencia de los esteroides sexuales para la expresión de los mPRs en el cerebro.
- ⊙ En los machos los esteroides gonadales no influyen en la expresión de los mPRs dentro del SNC.

REFERENCIAS

1. Jara-Albarrán, A. *Endocrinología*. 1190 (Médica Panamericana, 2010).
2. Escobedo, G. *et al.* in *Integración Neuroinmunoendócrina* (eds. Morales-Montor, J. & Velázquez Moctezuma, J.) 403 (Universidad Nacional Autónoma de México, 2010).
3. Besedovsky, H. O. & del Rey, A. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. *Endocr. Rev.* **17**, 64–102 (1996).
4. Nieuwenhuys, R., Voogd, J. & van Huijzen, C. *El Sistema Nervioso Central Humano*. 988 (Médica Panamericana, 2009).
5. Curtis, H., Schnek, A. & Massarini, A. *Curtis. Biología*. 1160 (Médica Panamericana, 2008).
6. Purves, D. *et al.* *Neurociencia*. 912 (Médica Panamericana, 2007).
7. Hill, R. W., Wyse, G. A. & Anderson, M. *Fisiología Animal*. (Médica Panamericana, 2006).
8. Ruiz-Liard, A. & Latarjet, M. *Anatomía Humana*. 928 (Médica Panamericana, 2006).
9. Bird, C. M. & Burgess, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 182–94 (2008).
10. Fletcher, M. L. & Bendahmane, M. *Visualizing olfactory learning functional imaging of experience-induced olfactory bulb changes. Progress in brain research* **208**, 89–113 (Elsevier B.V., 2014).
11. Haines, D. E. *Principios de Neurociencia*. 504 (Elsevier, 2013).
12. Boulant, J. a. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin. Infect. Dis.* **31 Suppl 5**, S157–61 (2000).
13. Casabiell, X. in *Endocrinología* (eds. Arce, V. M., Catalina, P. F. & Mallo, F.) 417 (Universidad de Santiago de Compostela, Universidad de Vigo, 2006).
14. Kronenberg, H. M., Melmed, S., Polonsky, K. S. & Larsen, P. R. in *Williams Tratado de Endocrinología* (Elsevier, 2009).
15. Fernández-Cid, A. in *Mastología* 59 (2000).

16. Lemini-Guzmán, C. & Canchola-Martínez, E. in *Farmacología Médica* (ed. Mendoza-Patiño, N.) 1008 (Médica Panamericana, 2008).
17. Camacho-Arroyo, I., Hernández-Molina, V. I., Rivas-Suárez, M., Guerra-Araiza, C. & Mar, Â. Changes in progesterone receptor isoforms content in the brain of immature, mature and aged male and female chickens. *Gen. Comp. Endocrinol.* **150**, 381–5 (2007).
18. Martínez, F. *et al.* Metabolismo energético y esteroidogénico de la placenta humana. *Rev. Fac. Med. UNAM* **44**, (2001).
19. Baulieu, E. E. Neurosteroid: A novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* **23**, 963–87 (1998).
20. Giatti, S., Boraso, M., Melcangi, R. C. & Viviani, B. Neuroactive steroids, their metabolites, and neuroinflammation. *J. Mol. Endocrinol.* **49**, R125–34 (2012).
21. Melcangi, R. C., Garcia-Segura, L. M. & Mensah-Nyagan, A. G. Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 777–97 (2008).
22. Garcia-Segura, L. M., Veiga, S., Sierra, A., Melcangi, R. C. & Azcoitia, I. Aromatase: a neuroprotective enzyme. *Prog. Neurobiol.* **71**, 31–41 (2003).
23. Jellinck, P. H. *et al.* Selective conversion by microglia of dehydroepiandrosterone to 5-androstenediol-A steroid with inherent estrogenic properties. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **107**, 156–62 (2007).
24. Gottfried-Blackmore, A., Sierra, A., Jellinck, P. H., McEwen, B. S. & Bulloch, K. Brain microglia express steroid-converting enzymes in the mouse. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **109**, 96–107 (2008).
25. Camacho-Arroyo, I., Guerra-Araiza, C. & Cerbón, M. A. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* **9**, 3993–3996 (1998).
26. Conneely, O. M. & Lydon, J. P. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* **65**, 571–7 (2000).
27. Gellersen, B., Fernandes, M. S. & Brosens, J. J. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum. Reprod. Update* **15**, 119–38 (2009).
28. Graham, J. D. & Clarke, C. L. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* **18**, 502–19 (1997).

29. Hardy, D. B., Janowski, B. a, Corey, D. R. & Mendelson, C. R. Progesterone receptor plays a major antiinflammatory role in human myometrial cells by antagonism of nuclear factor-kappaB activation of cyclooxygenase 2 expression. *Mol. Endocrinol.* **20**, 2724–33 (2006).
30. Wendler, A., Albrecht, C. & Wehling, M. Nongenomic actions of aldosterone and progesterone revisited. *Steroids* **77**, 1002–6 (2012).
31. Hómez de Delgado, B. Hormonas en la mama: de la fisiología a la enfermedad. *Rev. Venez. Endocrinol. y Metab.* **6**, 9–14 (2008).
32. Hagan, C. R., Faivre, E. J. & Lange, C. a. Scaffolding actions of membrane-associated progesterone receptors. *Steroids* **74**, 568–72 (2009).
33. Mulac-Jericevic, B. & Conneely, O. M. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* **128**, 139–46 (2004).
34. Wei, L. L., Norris, B. M. & Baker, C. J. An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **62**, 287–97 (1997).
35. Condon, J. C., Hardy, D. B., K., K. & Mendelson, C. R. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboringmyometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol. Endocrinol.* **62**, 287–97 (1997).
36. Barrera, D., Avila, E. & Díaz, L. Papel inmunológico de la progesterona en el mantenimiento del embarazo. 139–145 (2007).
37. Brinton, R. D. *et al.* Progesterone receptors: form and function in brain. *Front. Neuroendocrinol.* **29**, 313–39 (2008).
38. Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B. & Lydon, J. P. Progesterone-dependent regulation of female reproductive activity by two distinct progesterone receptor isoforms. *Steroids* **68**, 771–778 (2003).
39. Mani, S. K. & Blaustein, D. Neural Progestin Receptors and Female Sexual Behavior. 152–161 (2012). doi:10.1159/000338668
40. Dressing, G. E., Goldberg, J. E., Charles, N. J., Schwertfeger, K. L. & Lange, C. a. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids* **76**, 11–7 (2011).

41. Zuloaga, D. G. *et al.* Distribution and estrogen regulation of membrane progesterone receptor- β in the female rat brain. *Endocrinology* **153**, 4432–43 (2012).
42. Smith, J. L. *et al.* Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids* **73**, 1160–73 (2008).
43. Cabrera-Muñoz, E., Zamora-Chávez, J., Fuentes-Romero, L. & Camacho-Arroyo, I. in *Efectos no reproductivos de hormonas esteroideas* (eds. Camacho-Arroyo, I., Morales-Montor, J. & Javier, V.-M.) 155–172 (Universidad Autónoma Metropolitana, 2011).
44. Cai, Z. & Stocco, C. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology* **146**, 5522–32 (2005).
45. Falkenstein, E. *et al.* Specific Progesterone Binding to a Membrane Protein and Related Nongenomic Effects on Ca²⁺-Fluxes in Sperm. *Endocr. Rev.* **140**, 5999–6002 (1999).
46. Lösel, R., Breiter, S., Seyfert, M., Wehling, M. & Falkenstein, E. Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm. Metab. Res.* **37**, 10–4 (2005).
47. Peluso, J. J. Progesterone signaling mediated through progesterone receptor membrane component-1 in ovarian cells with special emphasis on ovarian cancer. *Steroids* **76**, 903–9 (2011).
48. Thomas, P. & Pang, Y. Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology* **96**, 162–71 (2012).
49. Thongngarm, T., Jenkins, J. K., Ndebele, K. & McMurray, R. W. Estrogen and Progesterone Modulate Monocyte Cell Cycle Progression and Apoptosis. *Am. J. Reprod. Immunol.* **49**, 129–138 (2003).
50. Jain, S. K., Kannan, K., Prouty, L. & Jain, S. K. Progesterone, but not 17beta-estradiol, increases TNF-alpha secretion in U937 monocytes. *Cytokine* **26**, 102–5 (2004).
51. Butts, C. L. *et al.* Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int. Immunol.* **19**, 287–296 (2007).
52. Szekeres-Bartho, J., Par, G., Szereday, L., Achatz, I. & Smart, C. Y. Progesterone and Non-specific Immunologic Mechanisms in Pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* **38**, 176–182 (1997).

53. Druckmann, R. & Druckmann, M.-A. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **97**, 389–396 (2005).
54. Chien, E. J. *et al.* The non-genomic effects on Na⁺/H⁺-exchange 1 by progesterone and 20alpha-hydroxyprogesterone in human T cells. *J. Cell. Physiol.* **211**, 544–50 (2007).
55. Chien, E. J., Chang, C.-P., Lee, W.-F., Su, T.-H. & Wu, C.-H. Non-genomic immunosuppressive actions of progesterone inhibits PHA-induced alkalinization and activation in T cells. *J. Cell. Biochem.* **99**, 292–304 (2006).
56. Lan, N. C., Bolger, M. B. & Gee, K. W. Identification and Characterization of a Pregnane Steroid Recognition Site That is Functionally Coupled to an Expressed GABAA Receptor. *Neurochem. Res.* **16**, 347–356 (1991).
57. Gutiérrez-garcía, A. G., Contreras, C. M. & Díaz-meza, J. L. Cómo actúa la progesterona sobre el sistema nervioso central. (2000).
58. McEwen, B. S. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 141–147 (1991).
59. Gibson, C. L., Constantin, D., Prior, M. J. W., Bath, P. M. W. & Murphy, S. P. Progesterone suppresses the inflammatory response and nitric oxide synthase-2 expression following cerebral ischemia. *Exp. Neurol.* **193**, 522–30 (2005).
60. Singh, M. & Su, C. Progesterone and neuroprotection. *Horm. Behav.* **63**, 284–90 (2013).
61. ROOF, R. L. & HALL, E. D. Gender Differences in Acute CNS Trauma and Stroke: Neuroprotective Effects of Estrogen and Progesterone. *J. Neurotrauma* **17**, 367–388 (2009).
62. Luoma, J. I., Stern, C. M. & Mermelstein, P. G. Progesterone inhibition of neuronal calcium signaling underlies aspects of progesterone-mediated neuroprotection. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **131**, 30–6 (2012).
63. Wingen, G. van, Verkes, F. van B. R. J., Bäckström, K. M. P. T., Buitelaar, J. & Fernández, G. How Progesterone Impairs Memory for Biologically Salient Stimuli in Healthy Young Women. *J. Neurosci.* **27**, 11416–11423 (2007).
64. Bixo, M., Andersson, A., Winblad, B., Purdy, R. H. & Bäckström, T. Progesterone, 5α-pregnane-3,20-dione and 3α-hydroxy-5α-pregnane-20-one in specific regions of the human female brain in different endocrine states. *Brain Res.* **764**, 173–178 (1997).

65. Baulieu, E.-E. & Schumacher, M. Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids* **65**, 605–6012 (2000).
66. Auger, C. J. & De Vries, G. J. Progestin Receptor Immunoreactivity Within Steroid-Responsive Vasopressin-Immunoreactive Cells in the Male and Female Rat Brain. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 561–567 (2002).
67. Idris, A. I. Bone Research Protocols. **816**, 545–551 (2012).
68. Micevych, P. & Sinchak, K. Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* **290**, 44–50 (2008).
69. Reddy, D. S. Neurosteroids: Endogenous Role in the Human Brain and Therapeutic Potentials. *Prog. Brain Res.* **186**, 113–137 (2010).