



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA TIBOLONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES A
HORMONAS ESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

IÓSIF IVÁN BRIBIESCA CRUZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA OROZCO SUAREZ,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO,
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EFFECTO DE LA TIBOLONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES A
HORMONAS ESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

IÓSIF IVÁN BRIBIESCA CRUZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA OROZCO SUAREZ,
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO,
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de febrero de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **BRIBIESCA CRUZ ÍOSIF IVÁN** con número de cuenta **302287851**, con la tesis titulada **"EFECTO DE LA TIBOLONA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES A HORMONAS ESTEROIDES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA"**, realizada bajo la dirección del **DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA**:

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DRA. ANGELICA BERENICE COYOY SALGADO
Secretario: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO
Suplente: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA
Suplente: DRA. SANDRA OROZCO SUÁREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 16 de abril de 2015.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por brindarme la oportunidad de adquirir valiosas experiencias que me permitieron crecer en el ámbito académico y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por financiar económicamente mis estudios de maestría por medio de la beca número 508545.

Mi más infinito agradecimiento al comité tutor:

DR. CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA

DRA. SANDRA OROZCO SUAREZ

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

Porque mediante su seguimiento, paciencia y observaciones se logró la culminación de este estudio.

Agradecimientos

Dr. **CHRISTIAN HUMBERTO GUERRA ARAIZA** gracias por su paciencia y por haberme permitido ser parte de su grupo de trabajo, por las enseñanzas y consejos ¡muchas gracias doc!

Dra. **SANDRA OROZCO SUAREZ** le agradezco sus observaciones, comentarios y exigencias, su tiempo y consejos.

Dr. **IGNACIO CAMACHO ARROYO**, sin sus observaciones, comentarios y exigencias, este trabajo no se hubiera complementado, aprecio mucho sus consejos y su forma de exigir para mejorar.

Dra. **SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA** y Dr. **PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA**, les agradezco su revisión y comentarios para la culminación de la tesis así como su tiempo y amable atención.

Dra. **ANGELICA BERENICE COYOY SALGADO** le agradezco infinitamente sus comentarios y apoyos tanto en la teoría como en lo experimental.

Dra. Jaime Herrera, Dr. Salvador Montoya, Dr. Toño y al personal del bioterio del C.M.N. SXXI por su apoyo y siempre tener tiempo para ayudar y enseñarnos a cuidar a nuestros animales.

A todos mis compañeros de la unidad, gracias por su apoyo y confianza.

A todos y cada uno de los chicos del laboratorio de la UIMF. A todos ustedes que me han apoyado en la culminación de esta tesis mil gracias.

ÍNDICE

| | Páginas |
|--|---------|
| LISTA DE FIGURAS..... | i |
| LISTA DE CUADROS..... | ii |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| I. Introducción..... | 5 |
| II. Antecedentes | 7 |
| II.1 Hormonas esteroides y su biosíntesis | 7 |
| II.2. Menopausia..... | 10 |
| II.3. Estructura y función de la Tibolona..... | 13 |
| II.4 Efectos de la Tibolona en SNC | 16 |
| II.5. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides | 17 |
| II.6. Estructura general de los receptores nucleares..... | 22 |
| II.7. Receptor a estrógenos..... | 24 |
| II.8. Receptor a progesterona..... | 27 |
| II.9. Receptor a andrógenos | 30 |
| II.10. Regulación de los receptores por estradiol | 32 |

| | |
|--|----|
| II.11. Función de los receptores en el SNC..... | 32 |
| II.12. Distribución de los receptores en el SNC..... | 38 |
| III. Justificación | 39 |
| IV. Hipótesis | 40 |
| V. Objetivo general..... | 41 |
| VI. Objetivo particular | 41 |
| VII. Material y método | 42 |
| VIII. Resultados..... | 46 |
| IX. Discusión de resultados | 60 |
| X. Conclusiones | 65 |
| XI. Literatura citada..... | 66 |

LISTA DE FIGURAS

| NO. | TITULO | PÁGS. |
|------------|---|--------------|
| 1 | Esteroidogénesis..... | 9 |
| 2 | Ciclo menstrual..... | 11 |
| 3 | Estructura química de la Tibolona..... | 14 |
| 4 | Estructura química de los metabolitos de la Tibolona..... | 15 |
| 5 | Mecanismo de acción genómico y no genómico..... | 18 |
| 6 | Clases de receptores nucleares..... | 21 |
| 7 | Estructura de los receptores nucleares..... | 22 |
| 8 | Receptor a estrógenos..... | 24 |
| 9 | Receptor a progesterona..... | 28 |
| 10 | Receptor a andrógenos..... | 31 |
| 11 | Muestras representativas de la integridad del ARN..... | 46 |
| 12 | Expresión génica del RP en hipotálamo de la rata..... | 47 |
| 13 | Expresión génica del RE α en hipotálamo de la rata..... | 48 |
| 14 | Expresión génica del RA en hipotálamo de la rata..... | 49 |
| 15 | Expresión génica del RP en hipocampo de la rata..... | 50 |
| 16 | Expresión génica del RE α en hipocampo de la rata..... | 51 |
| 17 | Expresión génica del RA en hipocampo de la rata..... | 52 |
| 18 | Expresión génica del RP en corteza frontal de la rata..... | 53 |
| 19 | Expresión génica del RE α en corteza frontal de la rata..... | 54 |
| 20 | Expresión génica del RA en corteza frontal de la rata..... | 55 |
| 21 | Expresión génica del RP en cerebelo de la rata..... | 56 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 22 | Expresión génica del RE α en cerebelo de la rata..... | 57 |
| 23 | Expresión génica del RA en hipocampo de la rata..... | 58 |

LISTA DE CUADROS

| <i>NO.</i> | <i>TITULO</i> | <i>PÁGS.</i> |
|-------------------|---|---------------------|
| 1 | Porcentaje de afinidad de la Tibolona..... | 16 |
| 2 | Distribución de los RP, RE y RA en el SNC..... | 38 |
| 3 | Secuencias de oligonucleótidos..... | 44 |
| 4 | Resumen de resultados del efecto de diferentes dosis de Tibolona..... | 59 |

RESUMEN

En el Sistema Nervioso Central, las hormonas sexuales de origen gonadal regulan múltiples funciones, entre las cuales destacan: la reproducción, la conducta sexual, la memoria, el comportamiento y el sueño. Se ha descrito que las hormonas ejercen estos y otros efectos a través de la interacción con sus receptores nucleares específicos. También pueden incrementar o disminuir el número de sus respectivos receptores, regulando de esta manera sus vías de acción. Durante la menopausia estos procesos se ven alterados debido al cese en la secreción de las hormonas sexuales.

Diferentes fármacos han sido utilizados para contrarrestar los efectos adversos de la disminución de hormonas durante la menopausia, denominados terapias de reemplazo hormonal. Uno de estos fármacos es la Tibolona, la cual ha ayudado a mejorar los síntomas de la menopausia, además de corregir alteraciones en los procesos cognitivos como la pérdida de memoria. Sin embargo, y a pesar de los amplios beneficios que ejerce la Tibolona en el Sistema Nervioso Central, se desconoce el efecto sobre la expresión de los receptores a hormonas sexuales. Analizar esta regulación sería fundamental para llegar a identificar y establecer los posibles mecanismos de la actividad biológica de este fármaco en el cerebro. Por lo que en este proyecto se estudió el efecto de diferentes dosis de Tibolona sobre la expresión de los receptores a progesterona, a estrógenos alfa y andrógenos, en el hipotálamo, hipocampo, corteza frontal y cerebelo a nivel del ARNm de ratas ovariectomizadas. El análisis semi-cuantitativo de los transcritos se realizó mediante la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.

En el hipotálamo y corteza frontal de la rata ovariectomizada se observó un aumento en la expresión del receptor a progesterona con dosis de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg de Tibolona. Este efecto es semejante en el hipocampo de las ratas ovariectomizadas y tratadas con 1.0 y 10 mg/kg de Tibolona.

En el hipotálamo de la rata ovariectomizada se observó un aumento en la expresión del receptor a estrógenos alfa con dosis de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg de Tibolona, mientras que con dosis de 10 mg/kg se observó una disminución en la expresión del receptor a estrógenos alfa en el hipocampo, la corteza frontal y el cerebelo de ratas ovariectomizadas.

Se observó una disminución en la expresión del receptor a andrógenos con la dosis de 10 mg/kg de Tibolona en la corteza frontal y el cerebelo de ratas ovariectomizadas.

Estos resultados nos indican que la Tibolona regula de manera dosis dependiente y tejido-específica la expresión de los receptores a hormonas sexuales y nos sugiere que las acciones de esta hormona puedan estar mediadas por esta regulación en el Sistema Nervioso Central.

ABSTRACT

In the central nervous system, sexual hormones regulate gonadal origin multiple functions, among which are: reproduction, sexual behavior, memory, behavior and sleep. It described that these and other hormones exert effects via interaction with specific nuclear receptors. They can also increase or decrease the number of their respective receptors, thereby regulating their way of action. During menopause, these processes are altered due to the cessation of secretion of sex hormones.

Different drugs have been used to counteract the adverse effects of declining hormones during menopause, called hormone replacement therapies. One such drug is tibolone, which has helped improve the symptoms of menopause, and correct alterations in cognitive processes such as memory loss. However, whether despite the wider benefits that tibolone exerts on the central nervous system, the effect on the expression of sex hormone receptors it is unknown. Analyze this regulation would be essential in order to trace and establish the possible mechanisms of the biological activity of this drug in the brain. So in this project the effect of different doses of tibolone on the expression of the progesterone receptor was studied, alpha estrogens and androgens in the hypothalamus, hippocampus, frontal cortex and cerebellum at mRNA level of ovariectomized rats. The semi-quantitative analysis of transcripts was performed using the technique of reverse transcription coupled to polymerase chain reaction.

In the hypothalamus and frontal cortex of the rat ovariectomized an increase in progesterone receptor expression at doses of 0.1, 1.0 and 10 mg / kg of Tibolone was observed. This effect is similar in the hippocampus and ovariectomized rats treated with 1.0 and 10 mg / kg of Tibolone.

In the hypothalamus of ovariectomized rat increased receptor expression alpha estrogen doses of 0.1, 1.0 and 10 mg / kg of Tibolone was observed, while doses of 10 mg / kg decreased expression was observed estrogen receptor alpha in the hippocampus, frontal cortex and cerebellum of ovariectomized rats.

A decrease in the androgen receptor expression at the dose of 10 mg / kg of Tibolone in the frontal cortex and cerebellum of ovariectomized rats.

These results indicate that tibolone dose dependent manner regulated and tissue-specific expression of sex hormone receptors and suggests that the actions of this hormone may be mediated by this regulation in the central nervous system.

I. Introducción

En el sistema nervioso central (SNC) las hormonas sexuales de origen gonadal (progestágenos, estrógenos y andrógenos), se encuentran implicadas en la regulación de múltiples funciones, entre las cuales se destacan: la reproducción, la conducta sexual, la memoria, el comportamiento y el sueño (Guyton y Hall, 2011). Se ha descrito que las hormonas ejercen estos y otros efectos a través de la interacción con sus receptores nucleares específicos (Prieto *et al.*, 2003), y que estos a su vez pueden ser regulados por su ligando o por otro tipo de hormonas, por ejemplo los estrógenos aumentan la cantidad del receptor a progesterona, mientras que la progesterona disminuye la cantidad de los receptores a estrógenos, así al disminuir la actividad estrogénica la progesterona inhibe la producción de sus propios receptores regulando entre ellas sus efectos fisiológicos (Florez, 2008).

Por otro lado se ha descrito que la disminución de las hormonas sexuales durante la menopausia, puede provocar alteraciones en las funciones normales del SNC reflejándose principalmente en el deterioro de procesos cognitivos y alteraciones emocionales (Fernández *et al.*, 2000). Hoy en día existen diferentes alternativas que pueden mejorar o aminorar la sintomatología que conlleva el cese en la secreción de hormonas sexuales por parte del ovario, entre las más comunes y prescritas se encuentran aquellas que implican el consumo de hormonas sintéticas (estrógenos y/o estrógenos más gestágenos), denominadas terapias de reemplazo hormonal (TRH), las cuales han resultado ser muy efectivas (Gómez-Calcerrada 2012). Sin embargo, estudios clínicos realizados en más de 161 000 mujeres ha demostrado que este tipo de terapias aumenta el riesgo de padecer enfermedades como el cáncer Women's Health Initiative (2010), es por ello que se ha optado por el uso de fármacos que presentan las mismas ventajas y a su vez reduzcan el riesgo de padecer este tipo de patologías.

La Tibolona (TIB) es un fármaco utilizado como TRH que ha demostrado tener gran efectividad en aliviar los síntomas que acompañan a la menopausia, además en un estudio aleatorio con 4538 mujeres ancianas, disminuyó el riesgo de padecer cáncer de mama y cáncer de colon (Cummings et al., 2008). Después de la administración oral, la TIB es rápidamente convertida en sus tres metabolitos la 3α y 3β -hidroxitibolona (3α -OH TIB y 3β -OH TIB), los cuales se les han atribuido propiedades estrogénicas y el $\Delta 4$ -Tibolona ($\Delta 4$ -TIB), con propiedades androgénicas y progestágenas (Gooyer et al., 2003). Se ha reportado que la TIB mejora el déficit cognitivo en mujeres premenopáusicas Palomba 2008, mientras que en el modelo de la rata ovariectomizada (OVX), la administración crónica de TIB disminuye la ansiedad y mejora el aprendizaje (Espinoza-Raya et al., 2012). Por otro lado se ha reportado que la TIB tiene un efecto neuroprotector en el hipocampo de ratas expuestas a ozono, disminuyendo la muerte neuronal y atenuando el déficit cognitivo y colinérgico (Pinto-Almazán et al., 2014; Farfán-García et al., 2014). A nivel de SNC se ha reportado que los metabolitos de la TIB se distribuyen de manera diferencial en los tejidos cerebrales; siendo la 3α -OH TIB el metabolito más abundante en la corteza, el cerebelo, el hipocampo y el hipotálamo de primates no humanos (Verheul et al., 2007), sugiriendo que sus efectos benéficos en el SNC pudieran ser principalmente de tipo estrogénicos. Sin embargo aún se desconoce la forma en que la TIB regule la expresión de los receptores a estrógenos alfa, de los receptores a progesterona y de los receptores a andrógenos un dato fundamental para entender por qué mecanismo la TIB module sus efectos en el SNC.

II. Antecedentes

II.1 Hormonas esteroides y su biosíntesis

Las hormonas esteroides regulan múltiples procesos biológicos en los mamíferos, de ellos destacan la homeostasis hidroelectrolítica, las respuestas al estrés y la función reproductiva (Molenda *et al.*, 2003).

Existen cinco principales clases de hormonas esteroides: **testosterona** (andrógeno), **estradiol** (estrógeno), **progesterona** (progestágeno), **cortisol/corticosterona** (glucocorticoides) y **aldosterona** (mineralocorticoides). Todas estas hormonas son sintetizadas a partir de un esteroide común la pregnenolona, la cual es sintetizada a partir del colesterol. Las células y tejidos esteroideogénicos tienen el potencial de obtener el colesterol de cuatro fuentes:

- 1) Ser sintetizado de *novo* a partir del acetato.
- 2) Obtenerlo desde el plasma a partir de lipoproteínas de baja densidad por sus siglas en inglés (LDL) o de lipoproteínas de alta densidad (HDL).
- 3) A partir de la hidrólisis de esteres almacenados.
- 4) A partir del colesterol que se encuentra dentro de la membrana plasmática (Guyton y Hall, 2011).

El primer evento para que se lleve a cabo la esteroideogénesis (**Fig. 1**). Es la conversión del colesterol a pregnenolona vía la escisión del enlace entre los carbonos 20,22 esta reacción es mediada por el citocromo P450_{scc}, la cual toma lugar dentro de la mitocondria en donde el colesterol es internalizado por medio de la proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda (StAR) que es sintetizada por el

citoplasma una vez que la pregnenolona es formada puede ser metabolizada por dos vías diferentes:

- 1) La **ruta $\Delta 4$** , es la vía de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) enzima que se encuentra localizada en el retículo endoplásmico y es responsable de la formación de progesterona a partir de pregnenolona. La Progesterona es transformada en 17-Hidroxiprogesterona, está a su vez es convertida en Androstenediona por la acción de la 17, 20 liasa (P450c17). Esta vía la toman los esteroides que presentan un enlace de insaturación en el C-4 y un grupo ceto en el C-3 (Van Voorhis 1998).
- 2) La **ruta $\Delta 5$** , es la vía de la enzima citocromo P450, 17 hidroxilasa, 17,20 liasa (P450c17). La P450c17 se encuentra localizada en el retículo endoplasmático de las células esteroidogénicas y es la encargada de la conversión de pregnenolona a dehidroepiandrosterona (DHEA). Una vez formada la DHEA esta es transformada en androstenediona por la acción de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Esta vía la toman los esteroides que presentan un doble enlace en el C-5 y un grupo hidroxilo en el C-3 (Van Voorhis 1998). Una vez formada la androstenediona esta es transformada a testosterona por la acción de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la testosterona es aromatizada en estradiol por medio de la aromatasa P450 (Ying 1998).

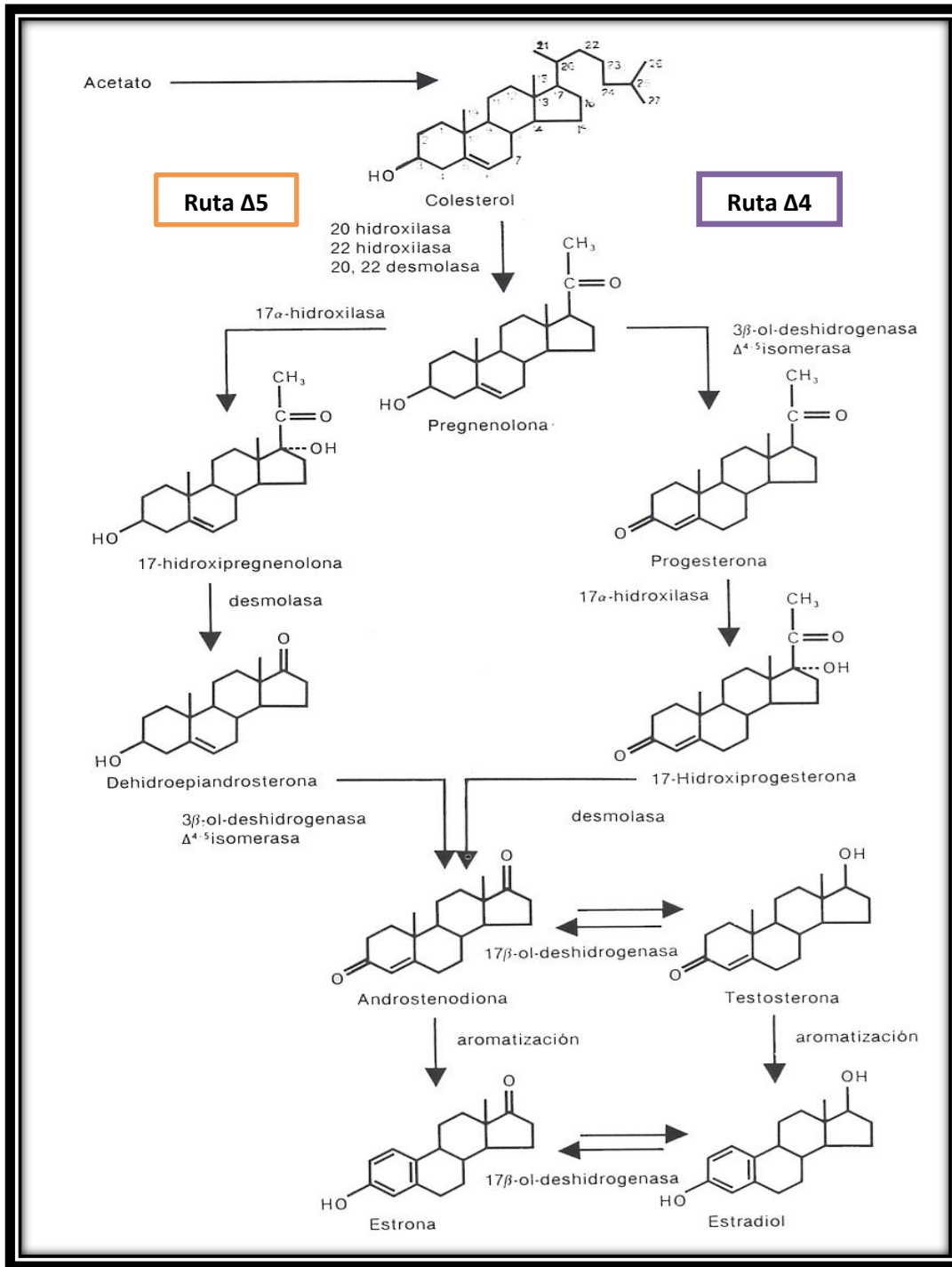


Figura 1. Esquema de los caminos de la esteroidogénesis ($\Delta 5$ o $\Delta 4$), modificado de Van Voorhis (1998).

II.2 Menopausia

La menopausia forma parte normal en el ciclo de vida de las mujeres, la organización mundial de la salud (OMS) define a la Menopausia natural como el cese permanente de la menstruación que resulta de la disminución o depleción de la actividad ovárica folicular.

Por otro lado para entender la fisiología de la menopausia es necesario explicar brevemente el ciclo menstrual y la función del ovario. El ovario produce una serie de hormonas desde la pubertad hasta la menopausia (estrógenos, progesterona y testosterona en pequeñas cantidades), que al actuar sobre diversos órganos, darán lugar al ciclo menstrual. Como resultado de esto se produce mensualmente la liberación de un óvulo fecundable, y si éste no es fecundado se producirá la menstruación (Palacios, 1992).

Las hormonas ováricas provocan una serie de estímulos que llegan al sistema nervioso central (SNC) donde tras su integración se emite unas señales periódicas al hipotálamo e hipófisis. El hipotálamo responde con la liberación cíclica de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) la cual llega a la hipófisis facilitando la liberación de la hormona estimuladora del folículo (FSH) y la hormona lutenizante (LH) (Conn 2000; Yen 2001). Ambas hormonas controlan directamente el crecimiento y desarrollo del folículo ovárico. Cuando se produce un aumento en sangre de estrógenos hasta una cifra conocida como “pico preovulatorio” provoca una señal en el hipotálamo informando de que el óvulo ya está preparado para la siguiente fase. La GnRH hipotalámica transfiere dicha información a la adenohipófisis para que produzca LH, finalizando así la etapa de maduración del óvulo, promoviendo la rotura folicular y la salida de éste. En este mismo momento se está produciendo el cuerpo lúteo (folículo sin huevo). A partir de ese momento el cuerpo lúteo asume la producción de estrógenos y progesterona durante unos 14

días. Durante estos días los niveles séricos de estas hormonas disminuyen provocando la menstruación que es la respuesta de la capa interna del útero (Palacios, 1992) (Fig. 2).

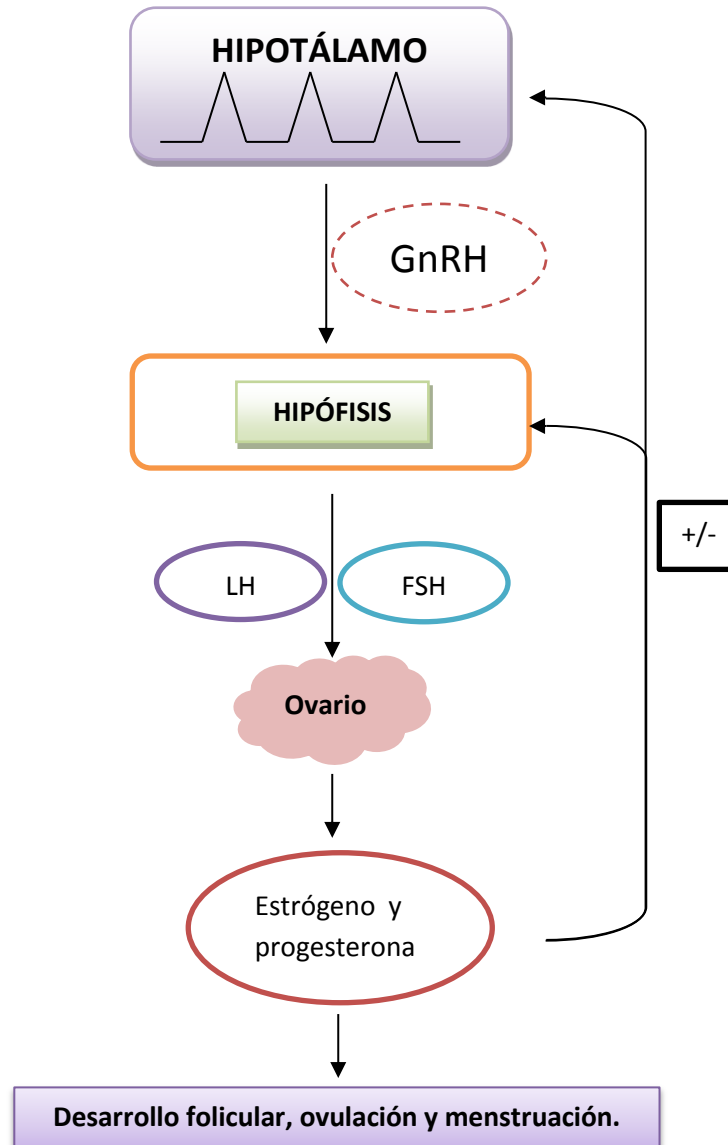


Figura 2. Esquema del ciclo menstrual. Se puede observar que las hormonas ováricas (estrógeno y progesterona) regulan de forma + o - la secreción de (GnRH, LH o FSH), modulando de forma cíclica los procesos de desarrollo folicular, ovulación y menstruación Modificado de Gómez-Calcerrada (2012).

A medida que van pasando los años, el ovario de una mujer almacena menor número de óvulos y de forma paralela disminuye la producción de hormonas. Así en torno a los 50 años la producción hormonal del ovario es tan baja que ya no puede seguir estimulando al endometrio, por tanto, desaparece la menstruación, dando paso a la menopausia (Gómez-Calcerrada 2012).

El déficit hormonal durante la menopausia tiene como consecuencia una serie de signos y síntomas entre los que destacan: sofocos, sudoraciones, atrofia urogenital, alteraciones de la piel, osteoporosis, cardiopatía isquémica, alteraciones del sueño y el deterioro cognitivo. Por otro lado, se ha reportado que durante la menopausia las mujeres presentan pérdida de la memoria y el aprendizaje, procesos que las hormonas como el estradiol, la progesterona y la testosterona regulan a través de la síntesis de neurotransmisores, la formación de dendritas, el aumento en el flujo sanguíneo y el mantenimiento neuronal (Gómez-Calcerrada 2012). En consecuencia el déficit hormonal durante la menopausia ocasiona alteraciones sobre el adecuado funcionamiento del SNC.

Por otro lado como norma general a las mujeres menopaúsicas se les trata con medicamentos. Entre los más recetados se encuentra la TRH, la cual consiste en la administración de estrógenos y/o la de estrógenos más gestágenos. (Cano, 1996; Palacios y Menéndez, 1998). El principio en el que se basa la TRH es el de suministrar hormonas cuando la producción natural de las mismas en las mujeres se va debilitando (Palacios y Menéndez, 1998). En las últimas décadas, la TRH ha sido considerada como la panacea universal y la solución a todos los problemas de la menopausia. Sin embargo, hay gran cantidad de estudios que señalan que al utilizar por periodos prolongados este tipo de fármacos, se podría incrementar hasta siete veces más la probabilidad de padecer cáncer de útero y aumentar considerablemente el riesgo de padecer cáncer de mama (Glenville, 1998; Palacios y Menéndez, 1998). Es por ello que se han desarrollado e implementado el uso de

fármacos alternativos a los convencionales uno de estos fármacos es la Tibolona (TIB), el cual es un esteroide sintético capaz de realizar simultáneamente las acciones de todas las hormonas sexuales. Por tanto, tienen acción estrogénica, progestágena y andrógena de forma débil. Se ha demostrado su eficacia a nivel de síntomas vasomotores, psíquicos y en la sexualidad (Fernández *et al.*, 2000; Carnicer *et al.*, 2002).

II.3 Estructura y función de la TIB

La TIB [(7 α , 17 α)-17-hidroxi-7-metil-19-norpregn-5(10)-en-20-in-3-ona] (**Fig. 3**). Es un fármaco utilizado para el alivio de los síntomas que derivan de la menopausia (Steckelbroeck *et al.*, 2004).

La TIB fue sintetizada por primera vez a finales de los 1960 y probada a principios de 1970, cuyos resultados revelaron actividades: androgénicas, estrogénicas y progestágenas (Reed y Kloosterboer, 2004).

La TIB, se administra vía oral con una dosis de 2.5 mg/día, se debe administrar preferentemente a la misma hora diariamente. En caso de olvido de una dosis, ésta debe tomarse tan pronto como se recuerde a menos que hayan pasado más de 12 horas de la hora habitual. En este último caso, debe omitirse la dosis olvidada y tomar la dosis siguiente a la hora habitual (Vadevecum, 2014).

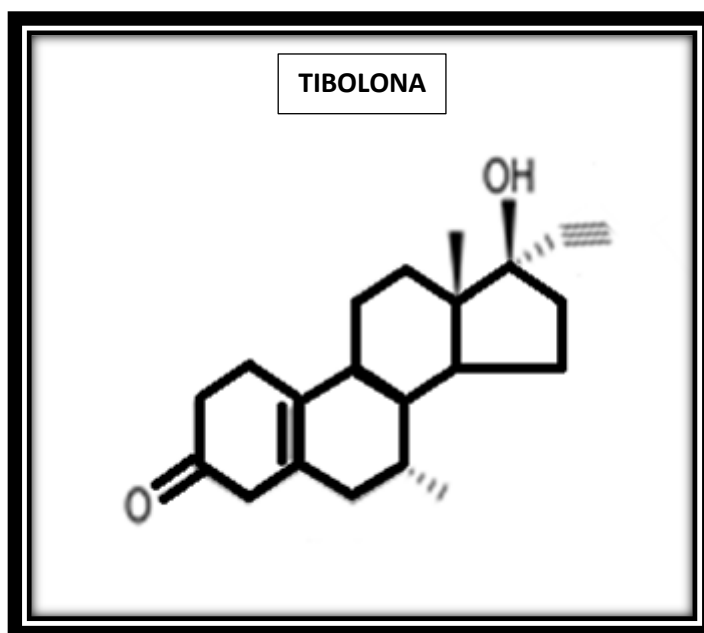


Figura 3. Estructura química de la TIB, modificado de Verheul *et al.*, (2007).

Después de la administración oral, la TIB es rápidamente convertida en sus tres metabolitos la 3α y 3β -hidroxi-Tibolona (3α -OH TIB y 3β -OH TIB), los cuales se les han atribuido propiedades estrogénicas y el $\Delta 4$ -Tibolona ($\Delta 4$ -TIB), con propiedades androgénicas y progestágenas (Gooyer *et al.*, 2003) (**Fig. 4**).

Se ha reportado que la conversión de la TIB en sus diferentes metabolitos depende en gran medida de la actividad enzimática específica de cada tejido blanco: La 3α -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3α HSD) y la 20α -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (20α HSD) regulan la conversión de TIB en 3α -OH TIB y 3β -OH TIB respectivamente, mientras que la 3β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β HSD) regula la síntesis de $\Delta 4$ -TIB (Steckelbroeck *et al.*, 2004). Por otro lado se ha reportado que la falta de actividad estrogénica de la TIB en glándula mamaria y endometrio es debido a que la actividad enzimática que regula la conversión de la TIB a $\Delta 4$ -TIB es mucho mayor en estos tejidos (Reed y Kloosterboer, 2004). Aunado a esto se ha descrito que la interacción de los metabolitos de la TIB con los

receptores nucleares de hormonas esteroides regula sus actividades biológicas (Palacios 2001).

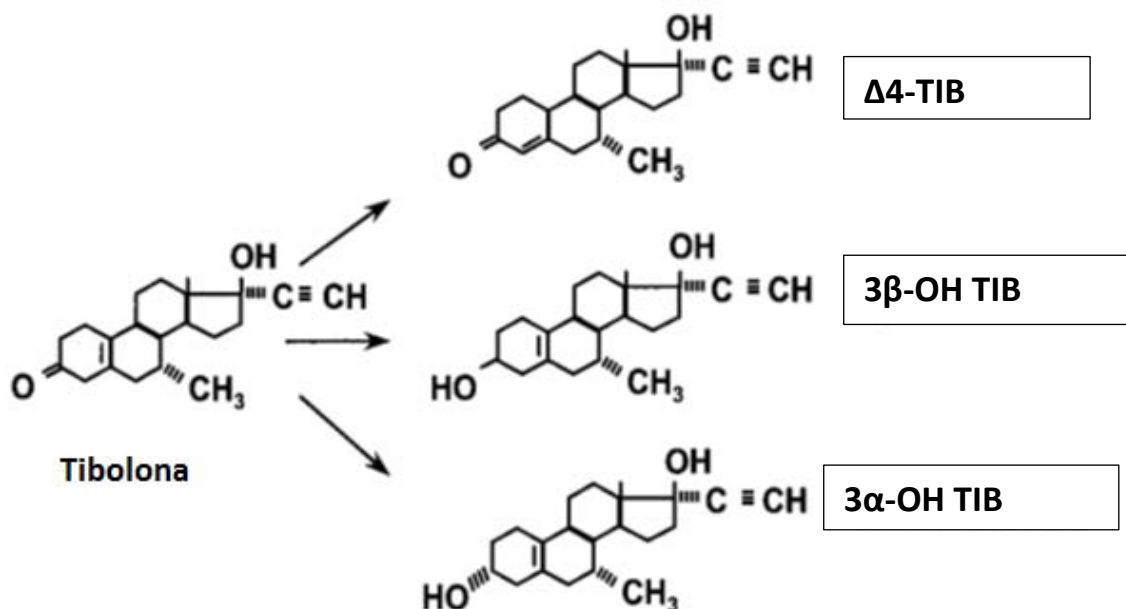


Figura 4. Estructura de los metabolitos de la TIB: 3 α -OH TIB, 3 β -OH TIB y Δ 4-TIB. Imagen modificada de Palacios (2001).

En el modelo de ratas ovariectomizadas, la TIB actúa manteniendo la masa ósea de forma similar al estradiol. Por otro lado en el mismo modelo, se ha reportado que este fármaco no tiene efectos adversos en endometrio, o en glándula mamaria (Palacios 2001; Reed y Kloosterboer, 2004).

La TIB, la 3 α -OH TIB y la 3 β -OH TIB interactúan con el receptor de estrógenos RE, mientras que la Δ 4-TIB se une al receptor de progesterona (RP) y al receptor de andrógenos (RA), esto hace que la actividad de la TIB y de sus metabolitos también dependa de la distribución de los receptores nucleares en cada tejido (Palacios 2001).

En conclusión la especificidad de la acción de la TIB depende de la transformación de esta en sus metabolitos en el órgano blanco (Palacios 2001), y la afinidad a sus receptores específicos (Gooyer *et al.*, 2003) **(Cuadro 1)**.

| | RE (Estradiol 100%) | RP (Progesterona 100%) | RA (DHT 100%) |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| TIB | 1.3 % | 4.9% | 3.2% |
| 3 α -OH TIB | 3.2% | sin afinidad | sin afinidad |
| 3 β -OH TIB | 1.7% | sin afinidad | sin afinidad |
| Δ 4-TIB | sin afinidad | 12.9% | 39.2% |

Cuadro 1. Se observa el porcentaje de afinidad de la TIB o sus metabolitos al RE al RP y al RA, tomando en cuenta la afinidad del 100% del estradiol al RE, la afinidad del 100% de la progesterona al RP y la afinidad del 100% de la Dihidrotestosterona (DHT) al RA.

II. 4 Efectos de la TIB en el SNC

En el SNC, se ha reportado que los metabolitos de la TIB se distribuyen de manera diferencial en los tejidos cerebrales; siendo la 3 α -OH TIB el metabolito más abundante en la corteza, el cerebelo, el hipocampo y el hipotálamo de primates no humanos (Verheul *et al.*, 2007). Son pocos los trabajos en los que se han analizado los efectos fisiológicos de la TIB sobre el SNC. Se ha descrito que la administración de TIB trae efectos benéficos sobre el déficit cognitivo de mujeres de edad avanzada, en apoyo a esta teoría el grupo de Palomba 2008, reporto que la TIB revierte el daño sobre la cognición en mujeres premenopáusicas. En otros estudios, realizados en ratas ovariectomizadas (OVX) jóvenes, adultas y envejecidas se observó que la

administración de TIB a corto plazo puede corregir el deterioro cognitivo en una tarea de evitación inhibitoria (De Aguilar *et al.*, 2006).

Por otro lado se ha observado que en la corteza y el hipocampo de ratas hembra ovariectomizadas jóvenes, adultas y envejecidas, la administración de TIB disminuye los niveles de lipoperoxidación y produce una alta capacidad antioxidante total (Aguilar *et al.*, 2008). Por otro lado se ha reportado que el tratamiento crónico de TIB en monos *Cynomologous* ovariectomizados regula a la alza la síntesis de acetilcolina, neurotransmisor fundamental en la regulación de procesos cognitivos (Gibbs *et al.*, 2002).

Particularmente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la administración crónica de TIB disminuyó el estrés oxidativo y la muerte neuronal, atenuando el déficit cognitivo y colinérgico en el hipocampo de ratas expuestas a ozono (Pinto-Almazán *et al.*, 2014; Farfán-García *et al.*, 2014). Además, en ratas OVX, la administración crónica de TIB disminuye la ansiedad y mejora el aprendizaje (Espinoza-Raya *et al.*, 2012). A pesar de los efectos benéficos de la TIB se desconoce qué efecto hormonal sea el predominante en el SNC y su efecto en cuanto a regulación de los receptores a hormonas sexuales.

II.5 Mecanismos de acción de las hormonas esteroides

Los efectos de las hormonas esteroides ocurren a corto, mediano y largo plazo debido a que tienen diversos mecanismos de acción: los mecanismos no genómicos (no clásicos) y el genómico o (clásico) (Prieto *et al.*, 2003; Wierman, 2006) **(Fig. 5)**.

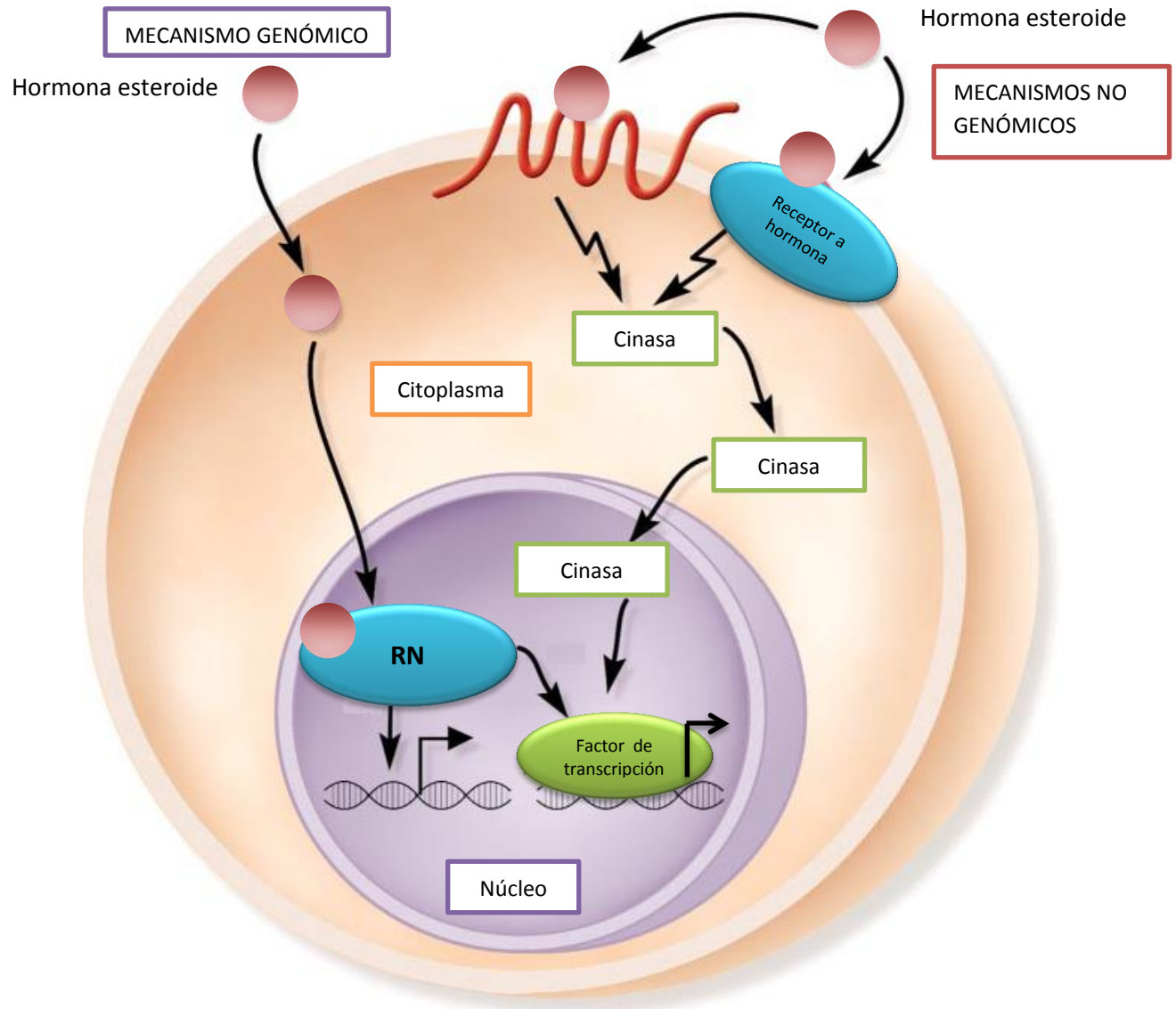


Figura 5. Modelo general de los mecanismos de acción genómico y no genómico de las hormonas esteroides. El mecanismo de acción genómico es mediado por la interacción de la hormona esteroide con su receptor nuclear (RN) lo que conlleva a la modificación en la expresión génica de la célula blanco. Mientras que el mecanismo no genómico es regulado por receptores acoplados a la membrana celular, la unión de la hormona a este tipo de receptores modifica la producción de

segundos mensajeros y la síntesis de cinasas, estos efectos pueden converger con el mecanismo clásico dando como resultado la modificación en la expresión génica de la célula blanco. Modificado de Wierman, (2006).

Los mecanismos no genómicos se caracterizan por: a) tener efectos muy rápidos (segundos o minutos); b) las acciones pueden ser producidas en presencia de inhibidores de la síntesis de ARN o de proteínas, y c) las acciones pueden ser reproducidas usando hormonas acopladas a moléculas impermeables a la membrana plasmática (Prieto *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción genómico de las hormonas esteroides está mediado por miembros de la superfamilia de los RN (Molenda *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2003). Los RN pueden ser divididos en tres clases de acuerdo con la organización de sus elementos de respuesta específica, su localización y su modo de acción (Griekspoor *et al.*, 2007; Aagaard *et al.*, 2010) **(Fig. 6)**.

Los RN de tipo I se unen como homodimeros a elementos de respuesta a hormonas (ERH) que consisten en dos hexanucleótidos, organizados en secuencias palíndromas o repeticiones palíndromas invertidas separados por 3 pares de bases (AGAACA_{nnn}TGTTCT, AGGTC_{nnn}TGACCT), estos incluyen a los receptores de hormonas esteroides clásicos: receptor a andrógenos (RA), receptor a estrógenos (RE), receptor a progesterona (RP), receptor a mineralocorticoides (RM) y receptor a glucocorticoides (RG) (Weigel, 1996; Wierman, 2006; Aagaard *et al.*, 2010; Bagamasbad y Denver 2011), en ausencia de su ligando este tipo de receptores generalmente se encuentran en el citoplasma (excepto el RE), formando complejos con proteínas de choque térmico (HSP) 90, 70 y 56 (Florez, 2008; Gardner y Shoback 2012). Una vez que se forma el complejo receptor-esteroide da lugar a un cambio conformacional y a la disociación del HSP, esto, a su vez, expone una señal de translocación nuclear iniciando el transporte del receptor al núcleo, donde se fija a

los ERH modificando la expresión génica (Molenda *et al.*, 2003; Aagaard *et al.*, 2010; Bagamasbad y Denver 2011).

Los RN de tipo II se unen a ERH como heterodimeros obligados al receptor retinoide X (RRX), estos heterodimeros reconocen ERH organizados como dos repeticiones directas de hexanucleotidos, separados por 1-5 pares de bases ACGGTCA1n-5nAGGTCA, (Aagaard *et al.*, 2010).

Este grupo de receptores incluyen al receptor de hormona tiroidea (RT), receptor a ácido retinoico (RAR) y receptor de vitamina D (RVD) (Bagamasbad y Denver 2011), predominantemente se encuentran en el núcleo, en ausencia de su ligando se encuentran asociados con correpresores lo que induce la represión de la transcripción, sin embargo bajo la unión de su ligando se favorece un cambio conformacional lo que produce un desplazamiento de los complejos correpresores y el reclutamiento de complejos coactivadores resultando en la activación transcripcional de sus genes blanco (Aagaard *et al.*, 2010).

Los RN huérfanos, se unen a ERH como monómeros, consisten en su mayoría en receptores huérfanos, son receptores a los cuales no se les ha identificado su ligando endógeno y entre ellos se encuentran los receptores relacionados a estrógenos (RRE) y factor esteroideogénico 1 (FS1) entre otros (Giguere, 1999).

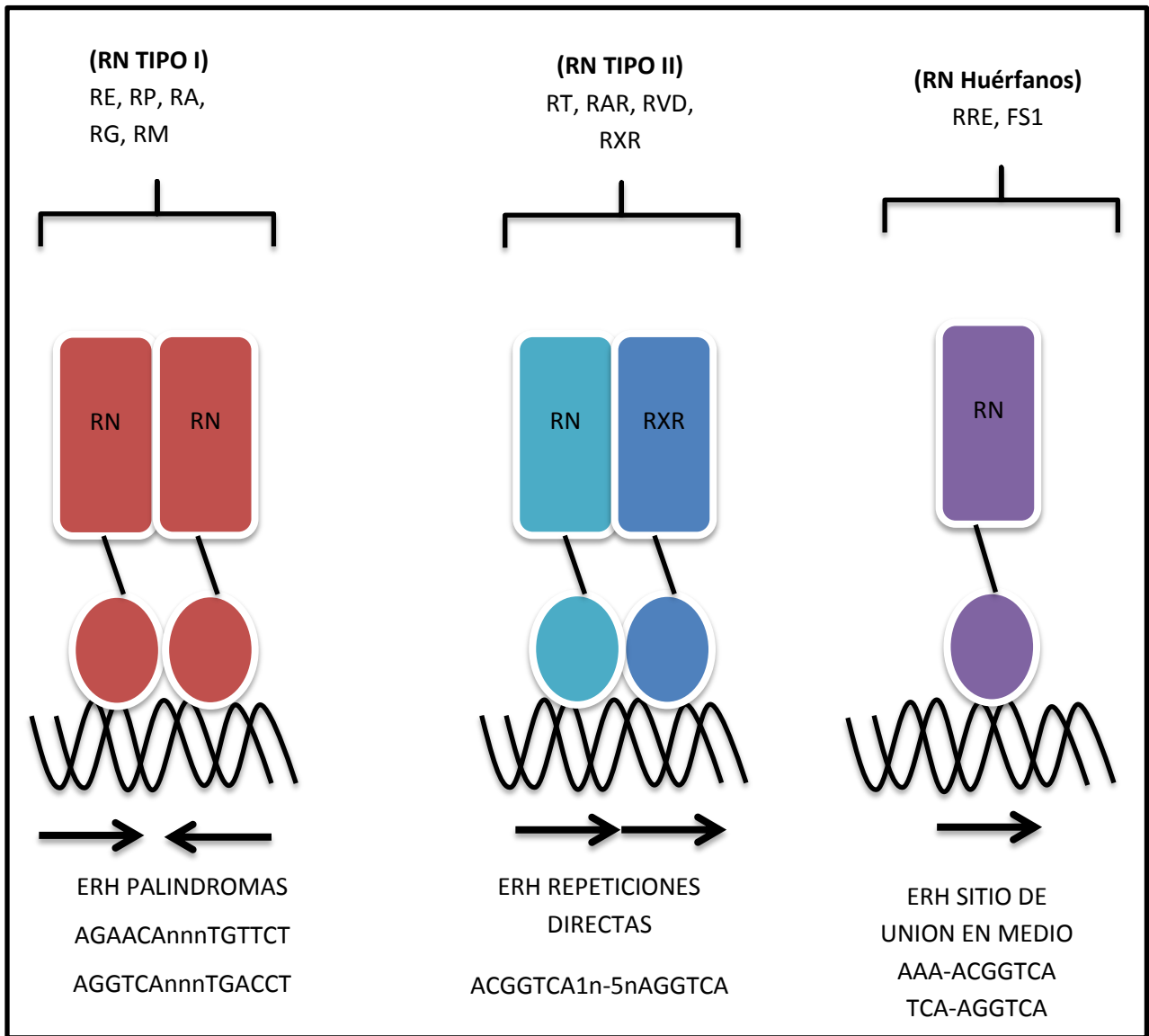


Figura 6. Esquema general de las 3 clases de receptores nucleares (RN), Se pueden observar los RN de tipo I, los cuales están organizados en secuencias palíndromas o separados por 3 pares de bases (AGAACA_nnnTGTTCT, AGGTCA_nnnTGACCT). Los RN de tipo II organizados como dos repeticiones directas de hexanucleótidos, separados por 1-5 pares de bases (ACGGTCA_{1n-5n}AGGTCA). Los RN huérfanos receptores a los cuales no se les ha identificado su ligando. Modificado de Wierman, (2007).

II.6 Estructura general de los receptores nucleares

Los miembros de la familia de receptores a hormonas esteroideas comparten una arquitectura modular similar que consiste, en un número de 5 - 6 dominios homólogos funcionales, designados de A-F (Griekspoor *et al.*, 2007) (**Fig. 7**).

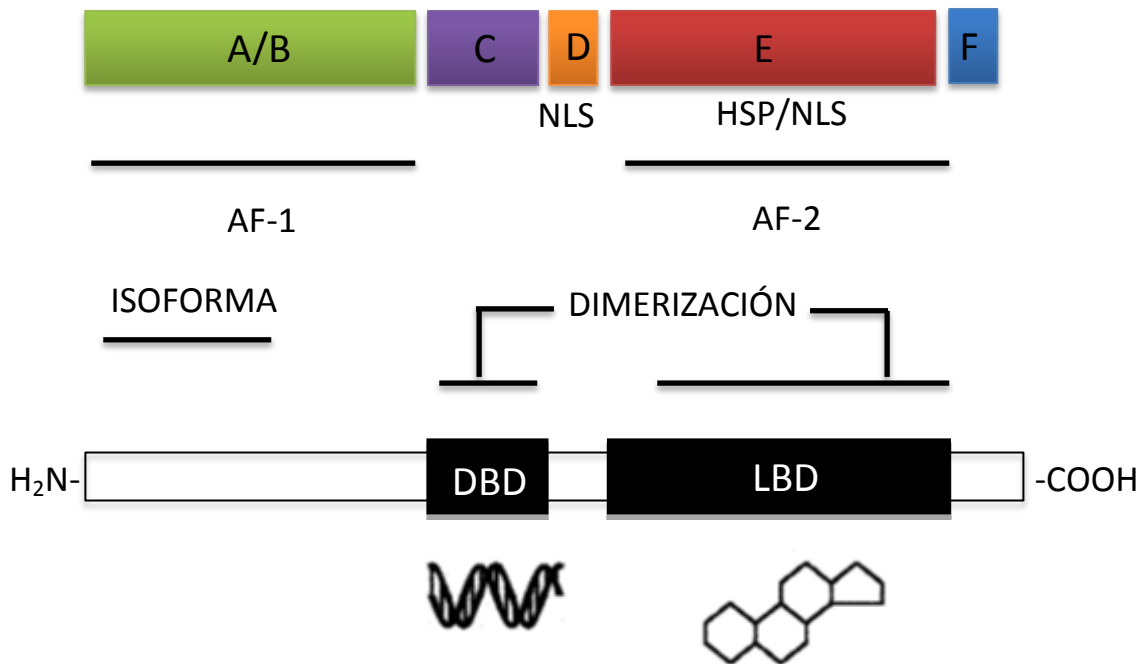


Figura 7. Estructura de los receptores nucleares. Se observan los seis dominios del A al F en la parte superior los cuales componen la estructura general. En la parte inferior sus funciones. AF: función de activación, DBD: dominio de unión al ADN y LBD: dominio de unión al ligando, modificado de Prieto *et al.*, (2003).

El dominio A/B es la región con mayor variabilidad entre los diferentes receptores, lo que permite diferenciar entre isoformas del mismo receptor, se encuentra ubicada en el extremo N-terminal y contiene la función de activación (AF-1), cuya actividad transcripcional puede ser autónoma o regulada por el ligando (Germain *et al.*, 2006).

En la región C, se encuentra el dominio de unión al ADN (DBD), el cual es el dominio más conservado entre los receptores, se encuentra conformado por un núcleo de 66 residuos constituido por dos dedos de zinc-cisteína, dos α -hélice y una extensión de un grupo carboxilo (Prieto *et al.*, 2003; Germain *et al.*, 2006).

La región D es un dominio pobremente conservado presenta una secuencia variable que funciona como bisagra entre el DBD y el LBD, facilitando la rotación del DBD, lo que le permite al receptor adoptar diferentes conformaciones, este dominio también alberga una señal de localización nuclear (NLS) (Prieto *et al.*, 2003; Germain *et al.*, 2006).

El dominio E, alberga al dominio de unión al ligando (LBD), la funcionalidad de este dominio es variable ya que regula la unión del receptor con su ligando, con proteínas de choque térmico, el proceso de dimerización, la interacción con cofactores y la actividad transcripcional. (Prieto *et al.*, 2003; Aagaard *et al.*, 2010).

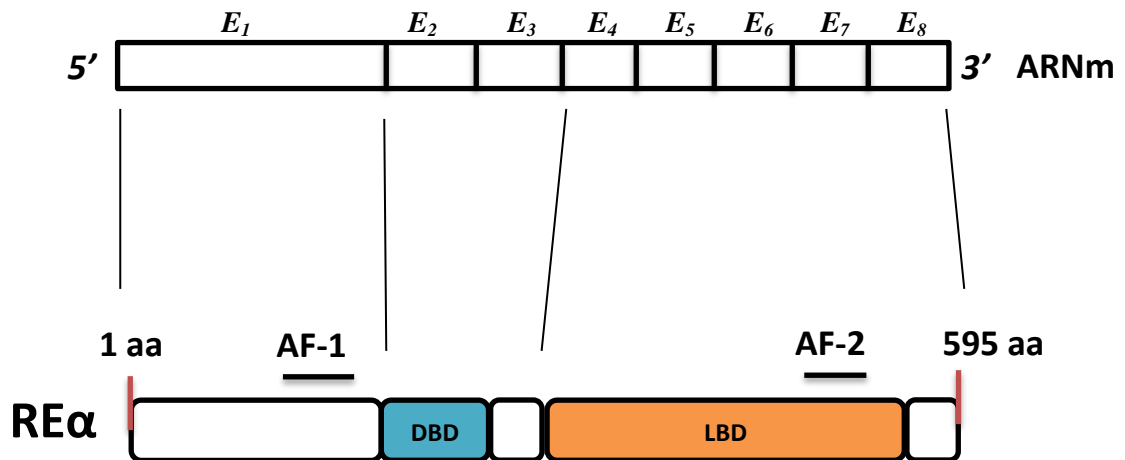
El LBD contiene cuatro superficies estructuralmente diferentes pero funcionalmente relacionadas: 1) superficie de dimerización, puede mediar la interacción con LBD asociadas, 2) el Bolsillo de unión a ligando (LBP), que interactúa con diversas moléculas lipófilas, 3) una superficie de unión a corre reguladores, que se une a complejos proteínicos, encargados de modular de forma positiva o negativa la actividad transcripcional, y 4) una función de activación (AF-2) dependiente de ligando, que regula la actividad transcripcional y el reclutamiento de cofactores (Pratt y Toft, 1997; Germain *et al.*, 2006).

En cuanto al dominio F, se ha sugerido que participa activamente en la función transcripcional del receptor y en su unión con diversos agonistas y antagonistas (Prieto *et al.*, 2003).

II.7 Receptor a estrógenos

El RE, es una fosfoproteína la cual actúa como un factor de transcripción nuclear activado por ligando, se une específicamente y con alta afinidad {kd: 1×10^{-10} M} al estradiol. En su estado inactivo se encuentra en complejos formados por el receptor y varias proteínas de unión como la HSP 90, HSP 70 y la inmunofilina (Webster *et al.*, 1988; Musgrove y Sutherland, 1994).

En la actualidad se han descrito dos subtipos del RE, el receptor a estrógenos subtipo-alfa (RE α) y el receptor a estrógenos subtipo-beta (RE β) (Fig. 8).



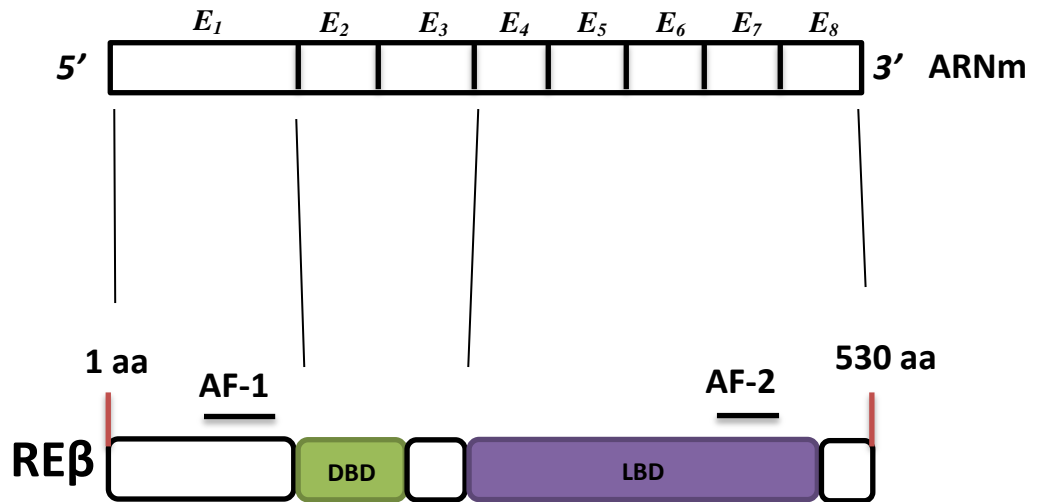


Figura 8. Los subtipos del receptor a estrógenos. Se observan el RE α constituido por 595 amino ácidos y el RE β constituido por 530 amino ácidos, así como los dos sitios con mayor homología entre ellos el DBD y LBD. En la parte superior se aprecian los genes que codifican el RE α y el RE β constituidos por 8 exones y localizados en el cromosoma 6 y el 14 respectivamente. Modificado de Griekspoor *et al.*, (2007).

Los subtipos del RE son codificados en cromosomas diferentes y con distribución tisular distinta (Griekspoor *et al.*, 2007; Higa y Fell 2013). El gen del RE α consta de 1785 nucleótidos que codifican un polipéptido de 595 aminoácidos con un peso molecular de 66.2 kDa (Walter *et al.*, 1985; Greene *et al.*, 1986). El gen del RE α se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 entre las regiones q24 y q27 (Gosden *et al.*, 1986). El gen que codifica el RE α mide aproximadamente 140 kb de longitud y consta de 8 exones que codifican seis dominios en la proteína, designados por las letras de la A-F (Ponglikitmongkol *et al.*, 1988). El LBD se encuentra en el dominio E, localizado en el extremo carboxilo-terminal, este dominio consta de unos 300 aminoácidos codificado por los exones del 4 al 8 (Evans, 1988). La región del DBD se encuentra en el dominio C cerca del extremo amino terminal, es codificada por los

exones 2 y 3, es altamente conservada entre los subtipos del RE y consta de 66 aminoácidos, con múltiples residuos de cisteína y un residuo de histidina en la parte central de la proteína, la conformación de estos residuos da como resultado una estructura en forma de dedo que es estabilizada por iones de zinc (dedo de zinc), esta configuración permite la interacción con una media vuelta del ADN y la coordinación con los elementos de respuesta específicos de los estrógenos (EREs). La diferencia en la secuencia de aminoácidos en los motivos de unión al ADN determina el elemento de respuesta que cada receptor de la superfamilia es capaz de reconocer (Mader *et al.*, 1989). El dominio D comprende una señal de localización nuclear de unos 50 aminoácidos que se ha denominado como región de “pinza” y es independiente de la unión con el ligando. El dominio AF1 posee la capacidad de activar la transcripción en ausencia del ligando y está definido por los dominios A y B en el extremo amino-terminal. El dominio AF2, situado en el dominio E, induce la transcripción de genes al unirse con muy alta afinidad a su ligando (Louredo-Mendez 2002).

Los grupos de Mosselman 1996 y Kuiper 1996, identificaron el RE β en el tejido prostático y ovárico de la rata. Mientras que Moore *et al.*, 1998, identificaron la expresión de este receptor en el timo, bazo, testículo y en células de la granulosa de seres humanos.

La comparación entre las secuencias de aminoácidos del RE α y RE β han demostrado un grado de conservación de alrededor del 96% en el DBD y un 58% en el LBD, sin embargo no se ha encontrado homología con el resto de los dominios funcionales. (Moore *et al.*, 1998). El RE β es activado por el 17- β estradiol e inhibido por el antagonista ICI-164384. Los grupos de Mosselman (1996) y Tsukamoto (1998) le asignaron al gen RE β el locus 14q, este consta de 8 exones con una extensión de 40 kb aproximadamente.

Por otro lado se ha reportado que la destrucción del gen que codifica para el RE α , trae consigo la falta desarrollo de las mamas y alteraciones del sistema reproductor en ratones hembras, así como cambios de conducta e infertilidad en ambos sexos (Lubahn *et al.*, 1993; Korach *et al.*, 1996). Mientras que la destrucción del gen RE β , en ratones hembra conlleva a alteraciones en la ovulación (Krege *et al.*, 1998). A su vez se ha reportado que los niveles circulantes de estrógenos, regulan la expresión de sus receptores (Alarid *et al.*, 1999). En apoyo a esta teoría se ha descrito que el tratamiento con estrógenos en líneas celulares de cáncer de mama, reduce de forma significativa el ARN mensajero de los RE, esta disminución también se ha observado en la glándula mamaria de ratones tratados con estradiol (Bagamasbad y Denver 2011).

II.8 Receptor a progesterona

El gen del RP se encuentra localizado en el cromosoma 11, entre las bandas q22-q23 (Rousseau *et al.*, 1987; Mattei *et al.*, 1988). Este gen codifica una proteína de alrededor de 933 aminoácidos con un peso molecular de 98,8 kDa (Misrahi *et al.*, 1987). La proteína del RP está constituida por varios dominios estructurales y funcionales designados con las letras de la A-E, codificados por 8 exones del gen. La región A/B ubicada en el extremo amino terminal posee dos funciones de activación transcripcional, AF-3 y AF-1 (Guerra-Araiza y Camacho Arroyo 2000). La región C constituye el dominio de unión al ADN, mientras que la región E situada en el extremo carboxilo-terminal contiene el dominio de unión al ligando y un dominio de activación transcripcional, denominado AF-2 (Kastner *et al.*, 1990). Se han descrito dos isoformas del RP el receptor a progesterona isoforma A (RPA) y el receptor a progesterona isoforma B (RPB) (Guerra-Araiza y Camacho Arroyo 2000).

El RPA corresponde a la forma truncada del RPB por delección de 164 aminoácidos en la región amino-terminal, ambas isoformas son codificadas por el mismo gen pero reguladas por distintos promotores bajo control estrogénico, el RPA se origina por inicio de la transcripción en AUG2 (codón 164) y el RPB en AUG1 (Kastner *et al.*, 1990; Guerra-Araiza y Camacho Arroyo 2000) (**Fig. 9**).

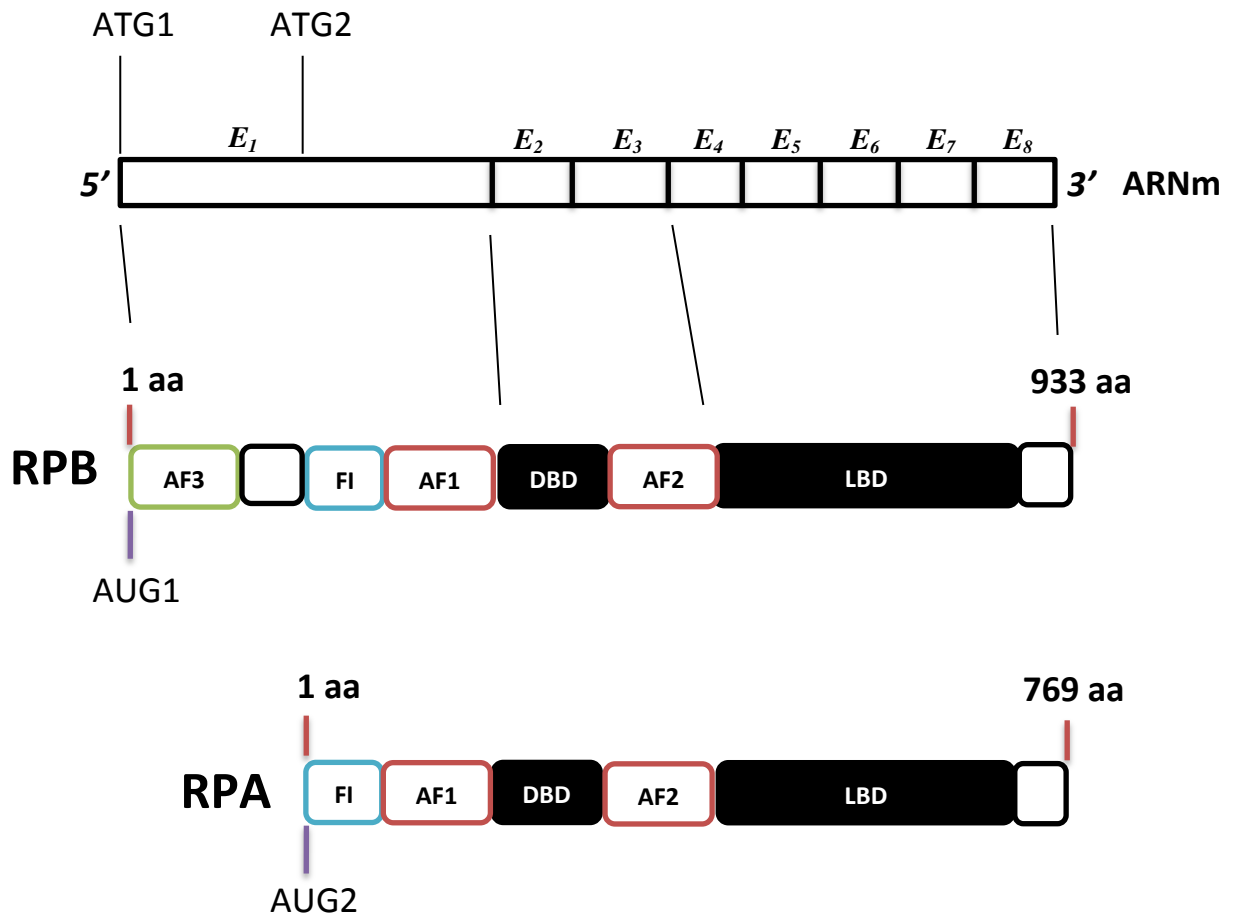


Figura 9. Isoformas del RP. En la parte superior se observan los 8 exones que codifican al RPB y al RPA. Se observan los dominios de activación (AF1, AF2 y AF3) y de inhibición (FI) de la transcripción, así como los dominios de unión al ADN (DBD) y de unión al ligando (LBD). Modificado de Guerra-Araiza y Camacho Arroyo (2000).

Se ha descrito que RPB funciona como un activador transcripcional de los genes en respuesta a la progesterona, mientras que el RPA es transcripcionalmente inactivo y funciona como represor de la actividad mediada por la isoforma B y la mayoría de los receptores nucleares, entre ellos RE y RA (Kraus *et al.*, 1995; Giangrande *et al.*, 1997; 2000; Gooyer *et al.*, 2003), esta diferencia en su funcionalidad puede deberse en parte a que ambas isoformas presentan afinidad diferente a diversos cofactores, tal es el caso del RPA el cual interactúa de manera eficiente con el SMRT (silenciador mediador para el receptor a hormonas tiroideas y ácido retinoico). Por otro lado, se ha reportado que a diferencia de RPB, RPA es incapaz de reclutar de manera eficiente coactivadores transcripcionales como GRIP-1 (proteína que interactúa con el receptor a glucocorticoides) y SRC-1 (coactivador de los receptores a hormonas esteroides). Debido a las características antes mencionadas se puede entender el papel activador de RPB y la actividad represora transdominante de RPA (Guerra-Araiza y Camacho Arroyo 2000).

Se ha reportado que el RPA puede ejercer un efecto represor no solo sobre el RPB sino que también sobre el RE (Chalbos y Galtier, 1994; Kraus *et al.*, 1995). El grupo de Wen (1994), realizó mutaciones en la región carboxilo-terminal y observaron que la represión inducida por el RPA sobre el RE depende de su expresión absoluta, de este modo, parece que la acción inhibitoria ejercida sobre el RE es la consecuencia de la interacción no competitiva del RPA con diferentes dianas celulares o con distintos sitios de contacto en la misma diana.

Por otro lado se ha reportado en ratones hembra con ablación selectiva del RPA o en knockout de ambas isoformas, infertilidad y alteraciones en su comportamiento (Lydon *et al.*, 1995; Mulac-Jericevic *et al.*, 2000).

II.9 Receptor a andrógenos

El gen que codifica el RA, se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma X, se divide en ocho exones con una longitud de alrededor de 2730 pares de bases. En el ser humano este receptor tiene una secuencia de 919 aminoácidos, con un peso molecular de 110 kDa, mientras que en la rata es de 902 aminoácidos (Chang *et al.*, y col. 1988; Lubahn *et al.*, 1988).

El RA como otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, puede ser dividido en 5 dominios funcionales: en el extremo amino-terminal esta codificado por el exón 1 el cual tiene un sitio de activación de la transcripción (AF-1), El sitio de unión a ADN (DBD), se encuentra codificado por los exones 2 y 3. El sitio de unión a ligando (LBD), se encuentra el segundo sitio de activación de la transcripción (AF-2) y es codificado por 5 exones (Kang y *et al.*, 2003).

El grupo de Wilson y McPhaul (1994) identificaron dos formas del RA en fibroblastos de piel genital de seres humanos: el receptor a andrógenos isoforma A (RA-A) y el receptor de andrógenos isoforma B (RA-B). El RA-A pesa aproximadamente 87 kDa, mientras que el RA-B pesa aproximadamente 110 kDa (Lee *et al.*, 2003).

Las isoformas del RA son semejantes a las del RP debido a que también son codificadas por un mismo gen y se diferencian por la ausencia o presencia de un segmento amino-terminal (**Fig. 10**). Debido a que las isoformas del RP A y B difieren en su capacidad de activar genes diana y están reguladas de forma distinta en diferentes tejidos. La identificación de formas similares en el RA planteó la posibilidad de que cada isoforma también tenga funciones diferentes y específicas.

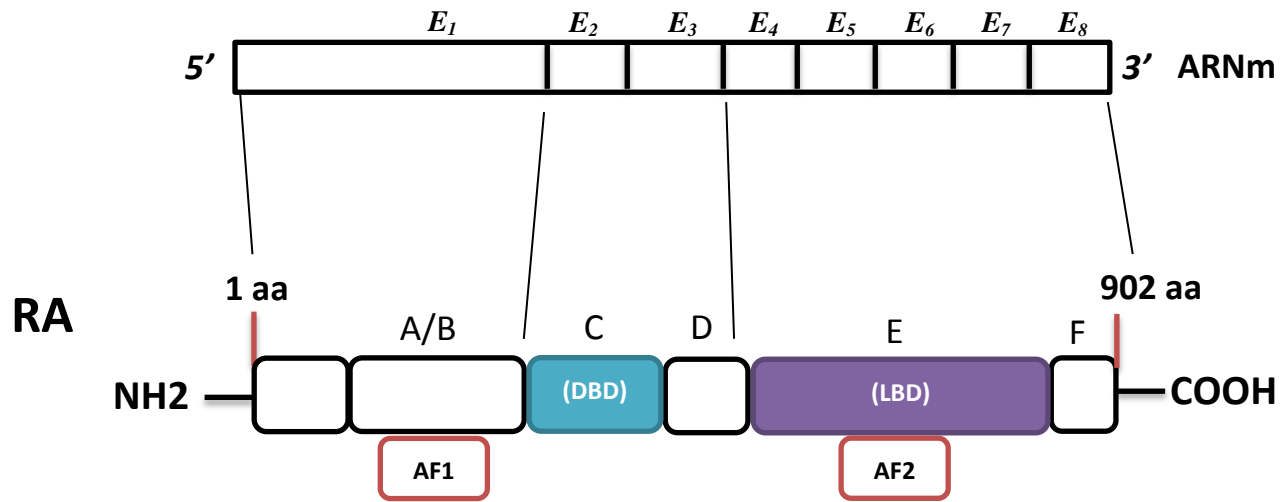


Figura 10. Esquema del RA. Se observan los dominios de activación (AF1, AF2), así como los dominios de unión al ADN (DBD) y de unión al ligando (LBD). En la parte superior se observan los 8 exones que codifican el RA. Modificado de Kang *et al.*, (2003).

Las mutaciones somáticas primarias en el gen de RA, han sido relacionadas con el desarrollo de tumores y cáncer de próstata encontrándose que alrededor del 44% de pacientes con esta afección tienen esta mutación (Kang *et al.*, 2003). Por otro lado los pacientes con mutaciones en este gen también pueden padecer infertilidad debido a alteraciones en la espermatogénesis (Tut *et al.*, 1997; Dowsing *et al.*, 1999).

Utilizando al ratón knockout para el RA como modelo de estudio, los grupos de Yeh (2002) y Sato (2003), observaron que los machos presentaban: feminización, obesidad, reducción en el tamaño de los testículos del 80%, disminución en las concentraciones de testosterona y reducción en el número de espermatozoides. Mientras que en las hembras hubo disminución en el número de crías por camada lo que sugiere alteraciones en la fecundación u ovulación.

II.10 Regulación de los receptores por estradiol.

Las hormonas pueden regular sus efectos modificando la cantidad de expresión de sus receptores por acción de ellas mismas o en conjunto con otras hormonas. Por ejemplo los estrógenos tanto naturales como sintéticos en general aumentan la cantidad del RP, mientras que la progesterona disminuye la cantidad del RE, así al disminuir la actividad estrogénica la progesterona inhibe la producción de sus propios receptores regulando entre ellas sus efectos fisiológicos aunado a esto también se ha observado que el estradiol aumenta la cantidad del RA (Florez, 2008).

Sin embargo, se debe tener en cuenta que la fina regulación de los estrógenos sobre sus receptores y los receptores de otras hormonas depende del tejido evaluado, del ambiente endocrino, de la etapa de desarrollo del organismo, el género de la especie utilizada, así como de la dosis de estrógenos y del periodo de duración del tratamiento (Simerly *et al.*, 1990; Shughrue *et al.*, 1997; Laflamme *et al.*, 1998; Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo 2000; Guerra-Araiza *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Mitra *et al.*, 2003; Brinton *et al.*, 2008).

II.11 Función de los receptores en el SNC.

El RE y su función.

Los estrógenos son hormonas esteroides que regulan múltiples procesos fisiológicos (Guyton y Hall, 2011), la actividad de estas hormonas está mediada a través de la interacción con los subtipos de su receptor: el RE α y el RE β (Florez, 2008).

Ambos receptores se encuentran ampliamente expresados en todo el cuerpo, pero presentan diferente distribución y funcionalidad en los tejidos (Delfosse *et al.*, 2015).

El RE α es expresado principalmente en el útero, el hígado, el riñón y el corazón, mientras que el RE β es expresado principalmente en el ovario, la próstata, el pulmón, el tracto gastrointestinal, la vejiga y en el SNC. Sin embargo, el RE α y el RE β son co-expresados en varios de tejidos, incluyendo el mamario, el tiroideo, las glándulas adrenales, el hueso y en algunas zonas del cerebro (Delfosse *et al.*, 2015).

Aunque el RE α y el RE β comparten mecanismos similares de acción, existen varias diferencias en las capacidades de transcripción de cada receptor y fenotipos distintos entre los animales que no tienen uno u otro gen han sido identificados, lo que sugiere que estos receptores pueden regular distintas vías celulares. Los respectivos roles funcionales del RE α y el RE β en la fisiología o en las enfermedades pueden ser el resultado de una compleja interacción entre los niveles de expresión de cada uno de ellos, la afinidad relativa para los elementos de respuesta específicos, la disponibilidad del ligando y cofactor, y la interacción con otros factores de transcripción (Levin y Pietras, 2008).

La función primaria de los estrógenos y sus receptores es regular la reproducción en las hembras. En las hembras estas hormonas juegan un papel clave en el crecimiento y mantenimiento de la glándula mamaria y el útero, promueven la formación de los caracteres sexuales secundarios, regulan los ciclos reproductivos y afectan el comportamiento sexual y maternal. Además, los RE tienen papeles reguladores pleiotrópicos en una amplia gama de tejidos, tales como el cardiovascular o el SNC, el hueso, la próstata y el tejido adiposo. Están involucrados en la regulación de la densidad ósea, niveles de lípidos en sangre, la deposición de grasa y las funciones cerebrales (Couse y Korach, 1999).

La importancia de los RE en fisiología se evidencia en las mujeres menopáusicas, cuyos niveles de estrógeno endógeno disminuyen, aumentando notablemente el riesgo de padecer osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y desordenes cerebrales (enfermedad de Alzheimer y Parkinson) entre otros (Delfosse *et al.*, 2015).

Estudios realizados tanto en ratonas como en ratas, por el grupo de Musatov en el 2007, mostraron que al silenciar focalmente el gen del RE α en el núcleo ventromedial del hipotálamo los animales presentaban un fenotipo característico del síndrome metabólico, caracterizado por obesidad, tolerancia alterada de la glucosa e hiperfagia, este fenotipo persistió a pesar de los niveles normales del RE α en otras partes del cerebro. Sugiriendo que el RE α en este núcleo del hipotálamo desempeña un papel esencial en el control de balance de energía y el mantenimiento de un peso corporal normal. Por otro lado el grupo de Glidewell-Kenney en el mismo año demostró en ratonas que el RE α es el encargado de regular la retroalimentación negativa en el hipotálamo por parte del estradiol.

Los RE se expresan de manera conjunta en el hipocampo, el cual es una de las áreas del cerebro más importante implicada en los mecanismos relacionados a los procesos de memoria y aprendizaje (Eichenbaum, 2004). Se ha descrito que una de las posibles vías en las que la memoria es consolidada es a través de la creación de nuevas conexiones entre las neuronas del hipocampo. La unión del estradiol con el RE α induce la expresión de los genes necesarios para la producción de nuevas espinas, modificando la morfología y densidad de las neuronas del hipocampo lo cual es correlacionado con un mejor desempeño en pruebas de memoria a largo plazo (Hojo *et al.*, 2009).

Otra de las áreas de suma importancia en la modulación de los procesos cognitivos es la corteza frontal cuya importancia se ha atribuido principalmente a la memoria a corto plazo, y al igual que en el hipocampo su función parece ser regulada por los estrógenos (Arevalo *et al.*, 2015).

El balance y la coordinación dos funciones reguladas por el cerebelo, han sido ampliamente estudiados en las mujeres menopaúsicas, debido a que la estabilidad y el equilibrio disminuyen con la edad (Hedges *et al.*, 2012). Hay estudios que demuestran que la administración de estradiol mejora la movilidad y el equilibrio en mujeres menopaúsicas, sugiriendo un papel neuroprotector de los estrógenos en la función del cerebelo (Hammar *et al.*, 1996). A pesar que se ha descrito que ambos subtipos de los RE se expresan en el cerebelo aún se desconoce por qué mecanismo los estrógenos actúan en el cerebelo y en las funciones que modula (Hedges *et al.*, 2012).

El RP y su función.

La progesterona es una hormona de tipo esteroide, que participa en la regulación de múltiples funciones, como la excitabilidad neuronal, la conducta sexual, el establecimiento y mantenimiento de la gestación y la protección al daño neuronal (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo 2000; Guyton y Hall, 2011). Los RP se expresan ampliamente en todo el cerebro, sin embargo, la expresión de las isoformas del RP (el RPA y el RPB), pueden variar dependiendo de la región del cerebro analizada y del estado hormonal (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo 2000; Guerra-Araiza *et al.*, 2002; 2003; Brinton *et al.*, 2008).

Los efectos de la progesterona son mediados en parte a través de su interacción con sus receptores nucleares específicos. Sin embargo, cada isoforma del RP modula de manera diferencial la expresión génica, por ejemplo el RPB es un activador

transcripcional de los genes, mientras que el RPA es un represor de la actividad transcripcional génica mediada por el RPB (Giangrande *et al.*, 1997).

A nivel del hipotálamo se ha demostrado la participación del RP en la inducción de la conducta sexual en la rata; así, en las ratas prepúberes que poseen un número reducido del RP, la conducta de lordosis inducida al administrar progesterona es menor en comparación con hembras adultas en estro que poseen un mayor número de RP (Camacho-Arroyo *et al.*, 1995).

Han sido pocos los estudios para determinar las acciones de la progesterona sobre los mecanismos involucrados en procesos cognitivos, tales como la plasticidad neuronal y la transmisión sináptica, además de contar con resultados contradictorios entre los autores (Brinton *et al.*, 2008). Entre estos modelos destaca la potenciación a largo plazo (LTP), uno de los mecanismos celulares principales que subyacen a los procesos de memoria y aprendizaje, donde algunos autores reportan que la progesterona no tiene efectos significativos sobre la inducción del LTP inducido en hipocampo (Ito *et al.*, 1999). Mientras que otros utilizando el mismo modelo, señalan que la progesterona aumenta el LTP, traducándose en una mejora en la transmisión sináptica (Edwards *et al.*, 2000).

El RA y su función.

En los mamíferos los andrógenos se encuentran implicados en funciones biológicas como: el desarrollo de caracteres sexuales, el aumento de masa muscular, el equilibrio electrolítico y la reproducción, entre otras (Guyton y Hall, 2011). Estos efectos biológicos son mediados en gran parte por su receptor nuclear (Callewaert *et al.*, 2003).

Para elucidar el posible papel de la variación genética en el RA, sobre los niveles de andrógenos en suero de mujeres premenopáusicas, el grupo de Westberg en el 2001 estudió el polimorfismo de repetición de citosina, adenina, guanina (CAG) del gen del RA, en una cohorte poblacional de 270 mujeres. Las mujeres con relativamente pocas repeticiones de CAG en el gen del RA, mostraron una mayor actividad transcripcional de este receptor, resultando en niveles altos de andrógenos séricos, pero con niveles relativamente bajos de LH en comparación con las mujeres con secuencias de repetición de CAG más largas. Concluyendo que los niveles séricos de andrógenos en las mujeres premenopáusicas pueden estar influidos por variantes del gen del RA.

Por otro lado para probar que una pubarquia precoz y las características posteriores de un hiperandrogenismo ovarico, podría relacionarse con la variación genética en la sensibilidad del RA, el grupo de Ibáñez en el 2003, comparó el número de repeticiones de CAG en las niñas españolas que presentaron pubarquia precoz contra los controles y examinaron la relación entre el número de CAG y fenotipos clínicos de hiperandrogenismo ovarico después de la menarquia. Encontrando que las niñas con pubarquia precoz tuvieron menor número de CAG que los controles, las niñas que presentaron una pubarquia precoz tuvieron niveles más altos de testosterona, presentaron acné, hirsutismo e irregularidades del ciclo menstrual. Concluyendo que un número corto de CAG en el gen del RA, es indicativo de una mayor sensibilidad de este receptor hacia los andrógenos.

Sin embargo, estudios realizados por Opher en 2004 encontraron que los ratones transgénicos con una repetición de 100-CAG en el gen del RA desarrollaron un fenotipo que era similar a la enfermedad neurodegenerativa de la atrofia muscular espino bulbar caracterizada por la destrucción progresiva de las neuronas motoras y de células nerviosas en el tallo cerebral y la médula espinal que controlan la actividad muscular.

II.12 Distribución de los receptores en el SNC.

La distribución de las isoformas del RP, de los subtipos del RE y del RA en el SNC, varía dependiendo del modelo de estudio ya sea en el animal OVX u OVX y tratado con estradiol (**Cuadro 2**).

| | ÁREAS | RECEPTORES A PROGESTERONA | | RECEPTORES A ESTRÓGENOS | | RECEPTOR A ANDRÓGENOS |
|----------------------|-----------------|---------------------------|-------|-------------------------|------------|-----------------------|
| | | RPA | RPB | RE α | RE β | RA |
| RATA OVX | HIPOTÁLAMO | + | ++ | + | | ----- |
| | HIPOCAMPO | + | ++ | + | ++ | ----- |
| | CORTEZA FRONTAL | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| | CEREBELO | ----- | ----- | - | +++ | ----- |
| RATA OVX + ESTRADIOL | HIPOTÁLAMO | ++ | | +++ | | ++ |
| | HIPOCAMPO | ++ | + | + | | + |
| | CORTEZA FRONTAL | + | + | - | | +++ |
| | CEREBELO | + | + | +++ | | - |

Cuadro 2. Se observa la distribución de los receptores a progesterona (RPA y RPB), estrógenos (RE α y RE β) y del receptor a andrógenos (RA). (----- sin datos, - no detectada, + densidad baja, ++ densidad moderada, +++ densidad alta). (Simerly *et al.*, 1990; Shughrue *et al.*, 1997; Laflamme *et al.*, 1998; Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo 2000; Brinton *et al.*, 2008).

III. Justificación

El cese en la secreción de hormonas sexuales durante la menopausia o en modelos animales gonadectomizados, trae consigo daños progresivos en diferentes zonas del organismo. En el SNC la disminución de hormonas sexuales se ha asociado a daño cognitivo, alteraciones en las funciones neurales, muerte neuronal, y alteraciones en procesos metabólicos. Hoy en día existen diferentes terapias de reemplazo hormonal (TRH), las cuales han resultado en la atenuación de la sintomatología causada por el descenso en la secreción de hormonas sexuales.

La TIB es una hormona sintética utilizada para aliviar los síntomas menopáusicos, por sí misma se encuentra desprovista de actividad biológica, pero tiene la característica sobresaliente de que en los tejidos se descompone en varios metabolitos provistos con características estrogénicas, progestagénicas y androgénicas conjuntas. Sus efectos clínicos, dependen del tejido blanco donde se metabolice, del estímulo enzimático y de la afinidad y potencia de dichos metabolitos con los receptores hormonales.

A nivel del SNC se ha descrito que el mayor metabolito encontrado es el 3 α -hidroxi-Tibolona cuyas propiedades son semejantes a los estrógenos. Sin embargo, actualmente no hay estudios del efecto de la TIB sobre la expresión de los receptores a hormonas sexuales en el SNC, un dato fundamental para llegar a identificar y establecer los posibles mecanismos de la actividad biológica de este fármaco en el cerebro. Por lo que en este proyecto se estudió el efecto de diferentes dosis de TIB sobre la regulación en la expresión de los receptores a hormonas sexuales en el hipotálamo, el hipocampo, la corteza frontal y el cerebelo a nivel del gen en ratas ovariectomizadas.

IV. Hipótesis

Si la TIB tiene efecto estrogénico, entonces su administración aumentará la expresión de los receptores de progesterona y de andrógenos y disminuirá la expresión del receptor a estrógenos alfa en el SNC de la rata ovariectomizada.

V. Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración de TIB sobre la expresión de los receptores a hormonas sexuales en diferentes áreas del SNC de ratas hembras ovariectomizadas.

VI. Objetivo particular

- Evaluar el efecto de la administración de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg de TIB sobre la expresión del RP, RE α y RA, en el hipotálamo, el hipocampo, la corteza frontal y el cerebelo de ratas ovariectomizadas.

VII. Material y método

Animales

Se utilizaron ratas hembra vírgenes de la cepa Sprague Dawley de (250-300g de peso) del bioterio de Centro Médico Nacional Siglo XXI, mantenidas en jaulas bajo condiciones controladas de iluminación 14 h de luz por 10 h de oscuridad (luces encendidas de 07:00 a 19:00h) y temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Los animales fueron distribuidos en forma de 5 individuos por caja, con agua y alimento *ad libitum*.

Ovariectomía

Los animales fueron anestesiados con Ketamina 80mg/kg y xilacina. Bajo estas condiciones se realizó incisión dorso lateral de 3 cm que abarcó piel y músculo se identificó el ovario se ligó arteria ovárica con material no absorbible (seda 1-0), se extirpo la gónada por encima de la ligadura y se efectuó hemoastasia por compresión simple, finalmente se suturo la herida.

Tratamientos

Diez días después de la cirugía, las hembras se asignaron al azar alguno de los siguientes grupos experimentales: 1) vehículo (agua), 2) 0.1 mg/kg, 3) 1.0 mg/kg y 4) 10 mg/kg de TIB. La TIB se administró vía esofágica con una cánula de acero. Cada grupo estuvo conformado por 7 animales. Las ratas se sacrificaron 24 h después de la administración de la TIB, y se disecaron el hipotálamo, el hipocampo, la corteza frontal y el cerebelo.

Obtención del ARN total.

Se realizó la extracción del ARN total de los tejidos disecados de las ratas, utilizando la técnica del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo y precipitación con isopropanol (Chomczynski 1987).

Integridad de ARN

Para conocer la integridad del ARN, se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.1% en condiciones desnaturalizantes. Solamente se utilizaron las muestras en las que el ARN se encontraba íntegro, es decir donde se observaran claramente las bandas correspondientes a los ARNs ribosomales 18S y 28S y no se encontrara RNA degradado, ni presencia de ADN.

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos nos apoyamos en el artículo de (Camacho-Arroyo *et al.*, 1998) para la amplificación por RT-PCR de un fragmento del receptor a progesterona (RP) de 517 pb y de un fragmento de 480 pb del gen que codifica para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), mientras que para el diseño de los oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 200 pb del receptor a estrógenos alfa (RE α) y de un fragmento de 198 pb del receptor a andrógenos (RA) nos basamos en el trabajo de (Huang-Ping Yu *et al.*, 2006). Las secuencias para los cuatro fragmentos fueron analizadas con el programa **Primer 3 plus** para determinar la presencia de secuencias homologas internas que formaran asas o se sobrelaparan, así como para que la temperatura de unión de los oligonucleótidos con el ADNc fuera la misma (60°C) para poder realizar la RT-PCR en condiciones iguales para los 4 genes. En el **Cuadro 3** se observan las secuencias.

| GENES | SECUENCIAS | |
|------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| RP | SENTIDO | 5'-[CTC CTG GAT GAG CCT GAT G]-3' |
| | ANTISENTIDO | 5'-[CCC GAA TAT AGC TTG ACC TC]-3' |
| REα | SENTIDO | 5'-[CTT CTG GAG TGT GCC TGG TT]-3' |
| | ANTISENTIDO | 5'-[CTT CTC CCT GCA GGT TCA TC]-3' |
| RA | SENTIDO | 5'-[CAA CTT GCA TGT GGA TGA CC]-3' |
| | ANTISENTIDO | 5'-[TGA GAA AGG TGC CTC ATC CT]-3' |
| GAPDH | SENTIDO | 5'-[CCT GCA CCA CCA ACT GC]-3' |
| | ANTISENTIDO | 5'-[CAA TCG CAG CCC CAG CA]-3' |

Cuadro 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de RP, RE α , RA y GAPDH.

Amplificación de RP, RE α , RA por la técnica de retro transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Una vez que se revisó la integridad del ARN se procedió a estandarizar las condiciones adecuadas para realizar la RT-PCR. Se realizó la PCR a 60 °C, se corroboró que el tamaño de los fragmentos amplificados fuera el adecuado de acuerdo a el diseño de los oligonucleótidos y que no se amplificaran bandas inespecíficas .

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, se observaron en un transiluminador de rayos UV y se digitalizó la imagen.

La intensidad de las bandas del RP, del RE α , del RA y de un control de carga (GAPDH) fue cuantificado mediante un análisis densitométrico usando el programa Kodak 1D.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando un Análisis de Varianza (ANOVA) seguido de una prueba post hoc de Tukey's. El programa Prism 5.0 fue utilizado para calcular la probabilidad de los valores.

En todos los casos se consideró como diferencia estadísticamente significativa aquellas cuya probabilidad sea menor o igual a 0.05.

VIII. Resultados

Se extrajo el RNA total del hipotálamo, el hipocampo, el cerebelo y la corteza frontal de los animales tratados con vehículo (VEH) o TIB, por el método de Trizol-cloroformo, para determinar la pureza de las muestras se determinó la relación de absorbancia A260/280, que debe estar entre 1.8 y 2.0, por medio del Sistema Espectrofotómetro de Micro-Volúmenes EPOCH, una vez realizada la evaluación de la pureza de ARN de cada muestra, se procedió a su cuantificación por medio del sistema anteriormente mencionado.

Para determinar el grado de integridad de las muestras se observaron las bandas ribosomales 28S y 18S en un gel de agarosa al 1.1% como bandas discretas (**Fig. 11**).

Integridad del ARN

Muestras representativas de la integridad del ARN.

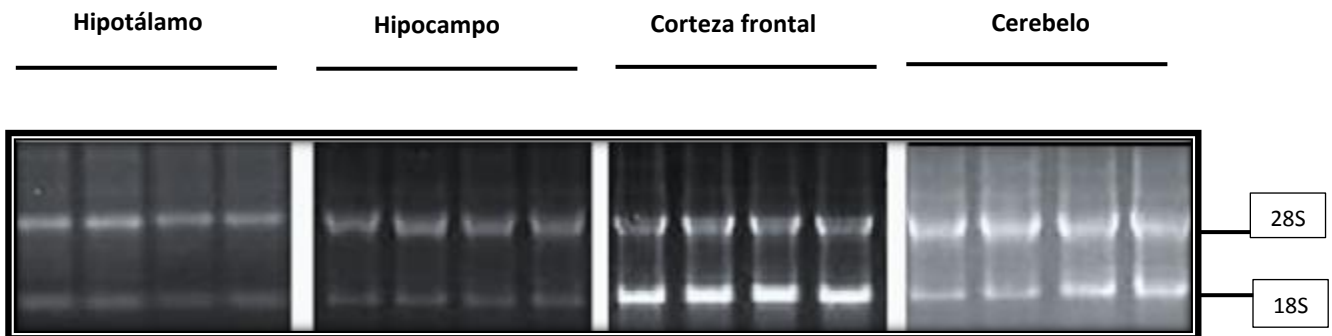
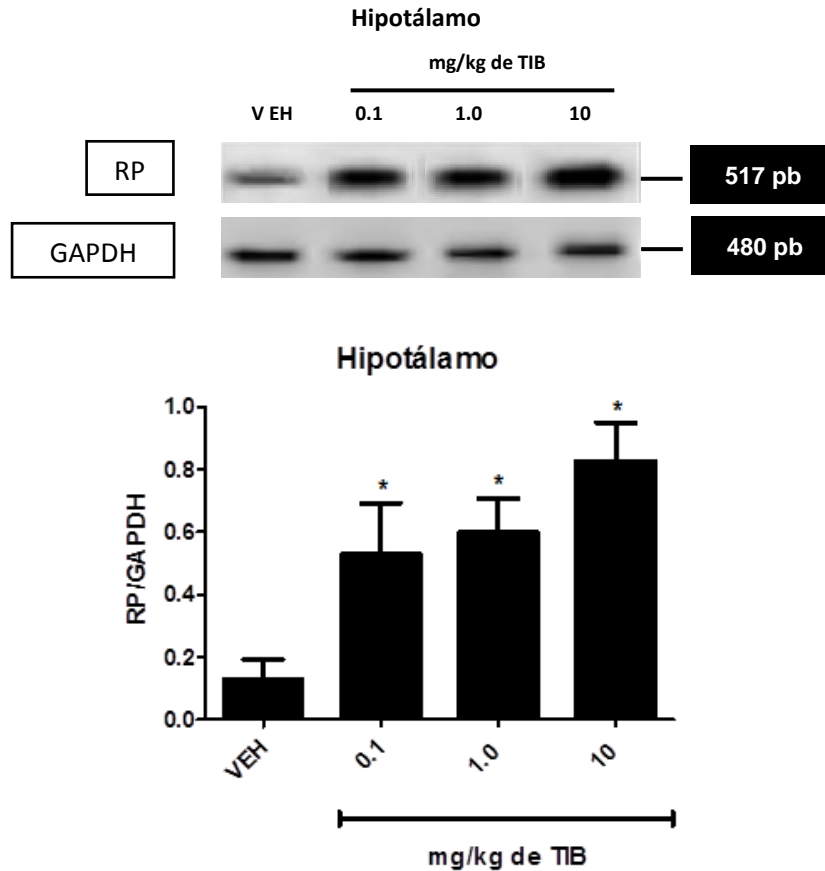


Figura 11. Muestra representativas de ARNs de hipotálamo, hipocampo, corteza frontal y cerebelo, se observan las bandas ribosomales 28S y 18S.

Expresión génica del RP en el hipotálamo de la rata OVX.

En el caso del hipotálamo los datos mostraron que las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg de TIB incrementaron de forma significativa la expresión del RP, en comparación al grupo con VEH (**Fig. 12**).

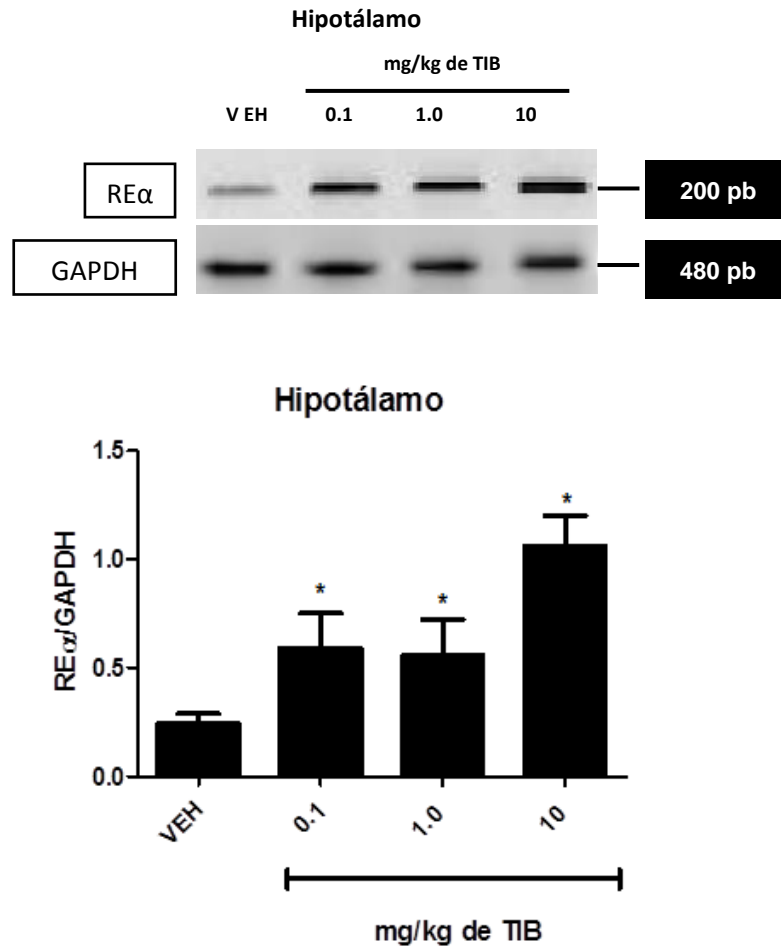


* $p < 0.05$ vs. su grupo con VEH (Prueba ANOVA, seguida de Tukey).

Figura 12. Expresión génica del RP en el hipotálamo de la rata. Experimento representativo del RP y GAPDH de RT-PCR a partir de ARN total del hipotálamo de ratas OVX tratadas con VEH o con dosis de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg de TIB. Media \pm E.E. de la expresión del RP en Hipotálamo de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB.

Expresión génica del RE α en el hipotálamo de la rata OVX.

En el hipotálamo los datos mostraron que las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg de TIB, incrementaron de forma significativa la expresión del RE α , respecto al grupo con VEH (**Fig. 13**).



* $p < 0.05$ vs. su grupo con VEH (Prueba ANOVA, seguida de Tukey).

Figura 13. Media \pm E.E. de la expresión del RE α en Hipotálamo de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RA en el hipotálamo de la rata OVX.

En el caso del hipotálamo los datos obtenidos indican que la administración de 0.1, 1.0 y 10mg/kg de TIB, no muestran diferencias significativas en la expresión del RA, respecto al grupo con VEH (**Fig. 14**).

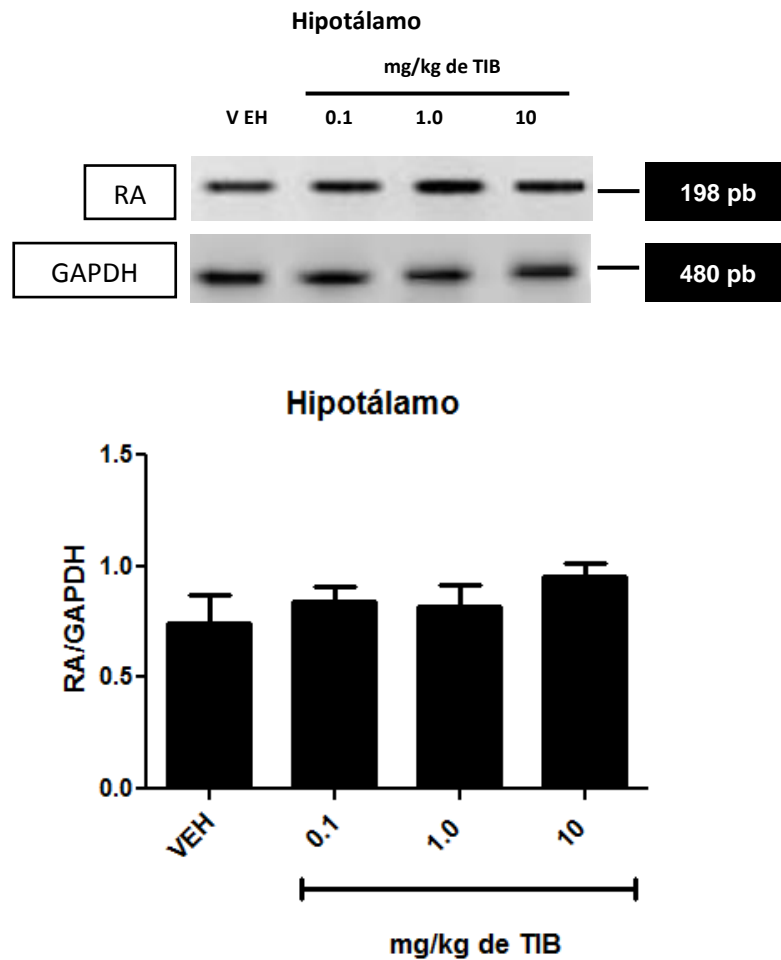
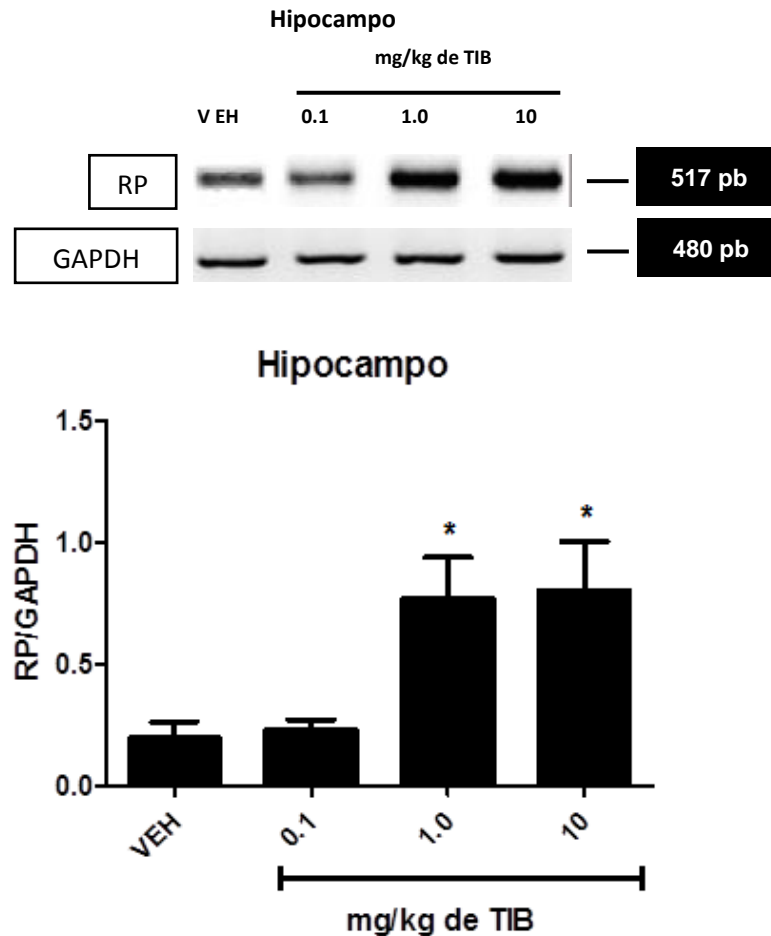


Figura 14. Media \pm E.E. de la expresión del RA en Hipotálamo de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RP en el hipocampo de la rata OVX.

En el caso del hipocampo los datos indican que las concentraciones de 1.0 y 10 mg/kg de TIB incrementan de forma significativa la expresión del RP, mientras que la dosis de 0.1, no mostró diferencias significativas, respecto al grupo con VEH (**Fig. 15**).

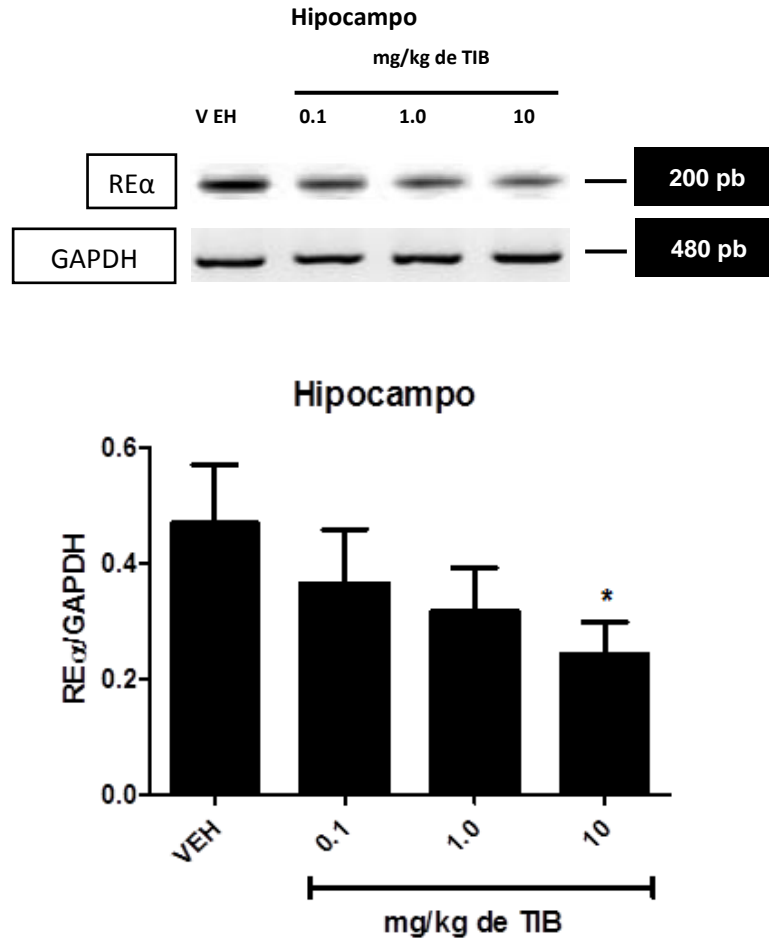


* $p < 0.05$ vs. su grupo con VEH (Prueba ANOVA, seguida de Tukey).

Figura 15. Media \pm E.E. de la expresión del RP en Hipocampo de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RE α en el hipocampo de la rata OVX.

En el caso del hipocampo los datos indican que la administración de 10mg/kg de TIB disminuye de forma significativa la expresión del RE α mientras que las dosis de 0.1 y 1.0 mg/kg TIB, no muestran diferencias significativas, respecto al grupo con VEH (Fig. 16).



* $p < 0.05$ vs. su grupo con VEH (Prueba ANOVA, seguida de Tukey).

Figura 16. Media \pm E.E. de la expresión del RE α en Hipocampo de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RA en el hipocampo de la rata OVX.

En el caso del hipocampo los datos obtenidos indican que la administración de 0.1, 1.0 y 10mg/kg de TIB, no modificaron de forma significativa la expresión del RA, respecto al grupo con VEH (**Fig. 17**).

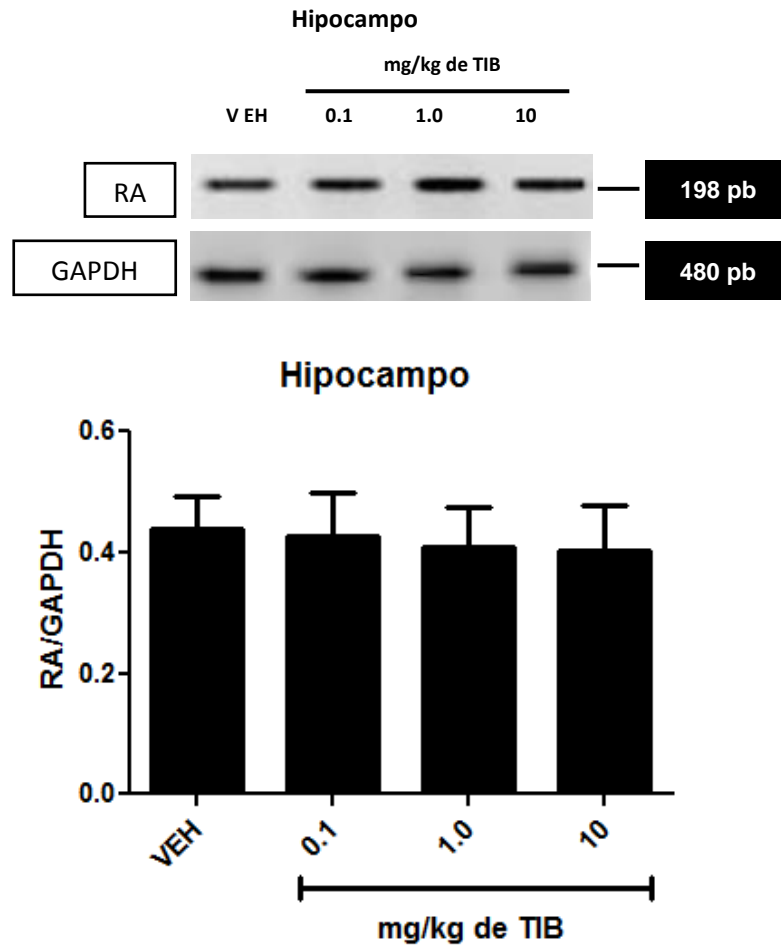
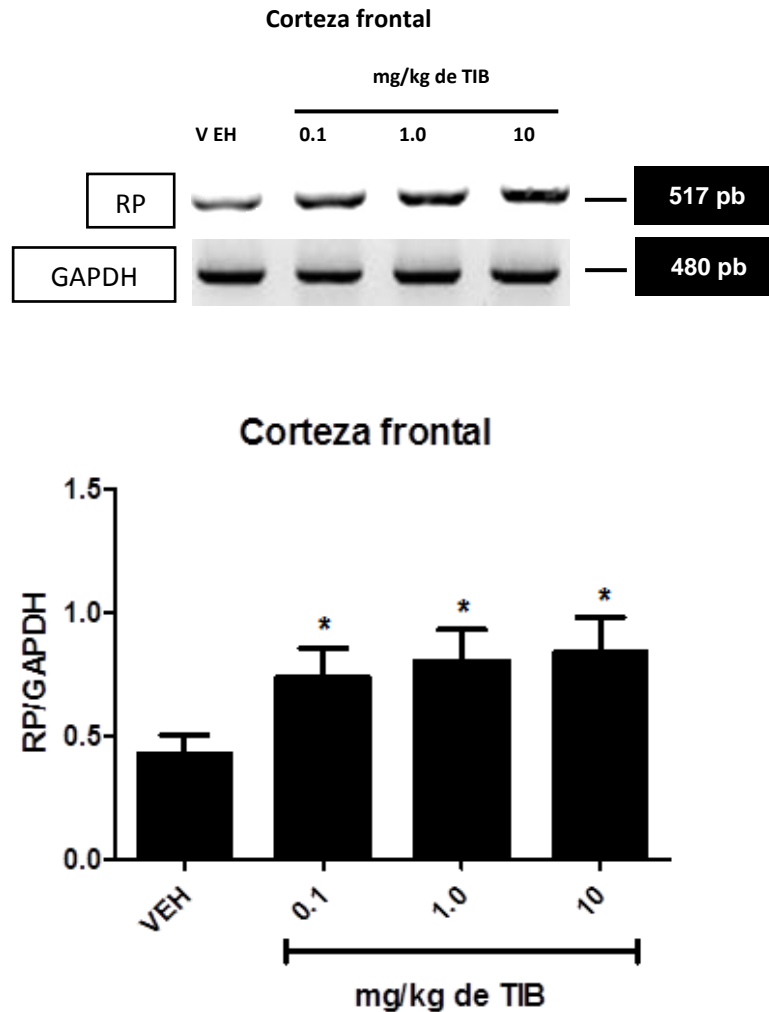


Figura 17. Media \pm E.E. de la expresión del RA en hipocampo de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RP en la corteza frontal de la rata OVX.

En el caso de la corteza frontal los datos indican que las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg de TIB incrementaron de forma significativa la expresión del RP, respecto al grupo con VEH (**Fig. 18**).

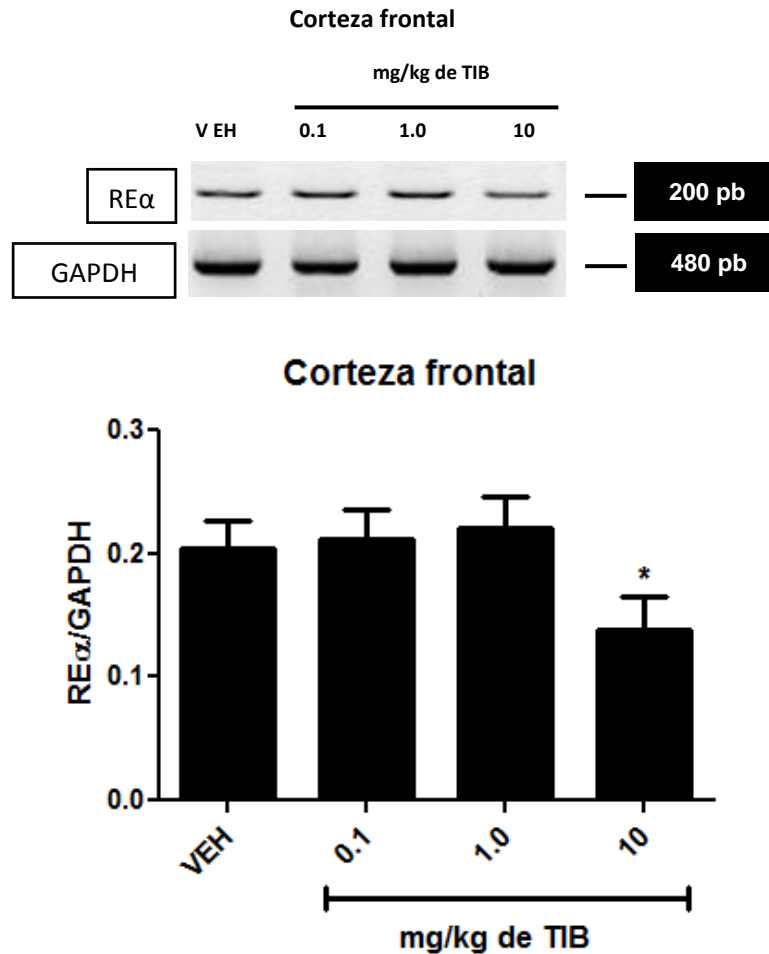


* $p < 0.05$ vs. su grupo con VEH (Prueba ANOVA, seguida de Tukey).

Figura 18. Media \pm E.E. de la expresión del RP en corteza frontal de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RP en la corteza frontal de la rata OVX.

En el caso de la corteza frontal los datos indican que la concentración de 10 mg/kg de TIB disminuyó de forma significativa la expresión del RP, respecto al grupo con VEH (**Fig. 19**).

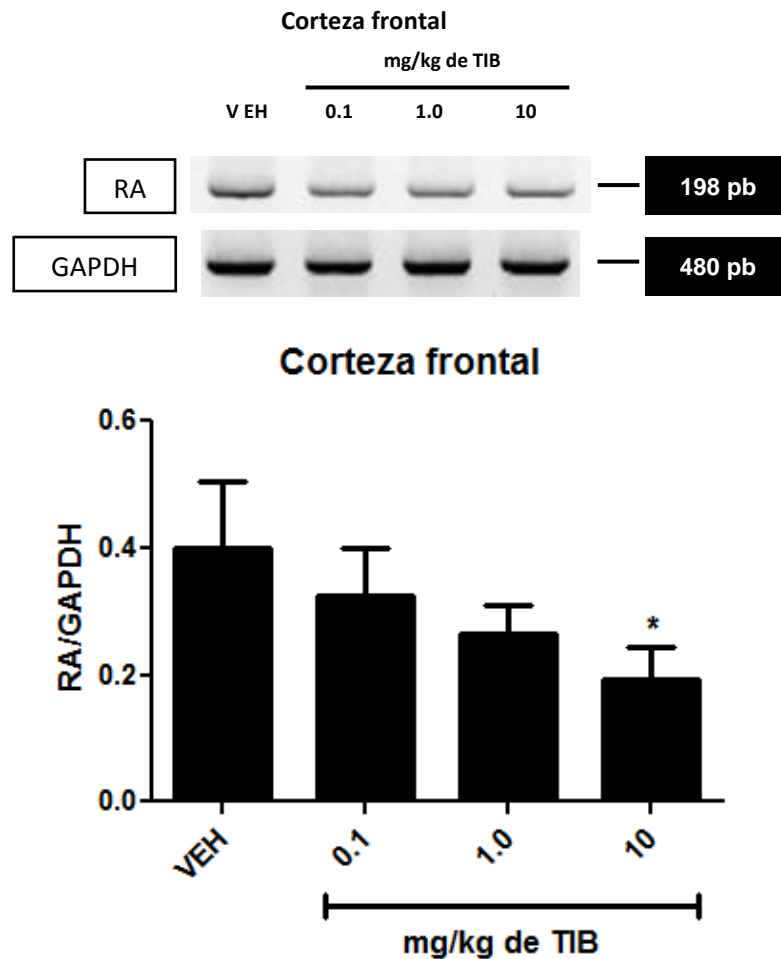


* $p < 0.05$ vs. su grupo con VEH (Prueba ANOVA, seguida de Tukey).

Figura 19. Media \pm E.E. de la expresión del RE α en corteza frontal de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RA en la corteza frontal de la rata OVX.

En el caso de la corteza frontal los datos obtenidos indican que la administración 10mg/kg de TIB disminuye de forma significativa la expresión del RA mientras que las dosis de 0.1 y 1.0 mg/kg TIB, no muestran diferencias significativas, pero si una tendencia a la baja respecto al grupo con VEH (**Fig. 20**).



* $p < 0.05$ vs. su grupo con VEH (Prueba ANOVA, seguida de Tukey).

Figura 20. Media \pm E.E. de la expresión del RA en corteza frontal de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RP en el cerebelo de la rata OVX.

Los datos obtenidos en cerebelo indican que las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg de TIB no modificaron la expresión del RP respecto al grupo con VEH (**Fig. 21**).

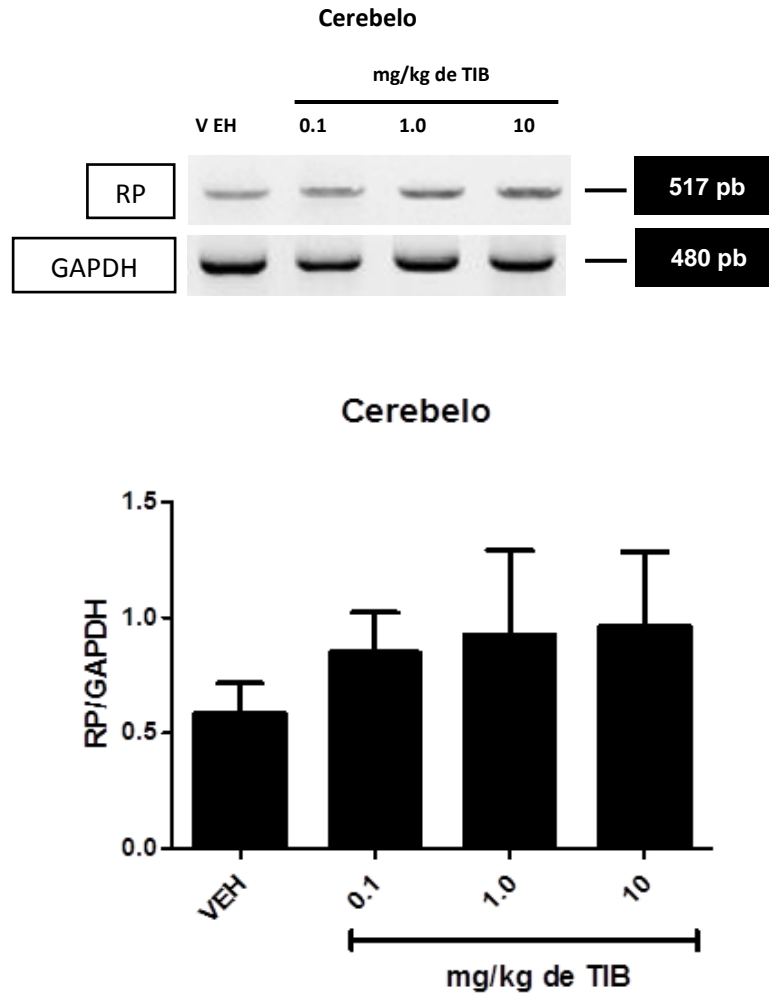
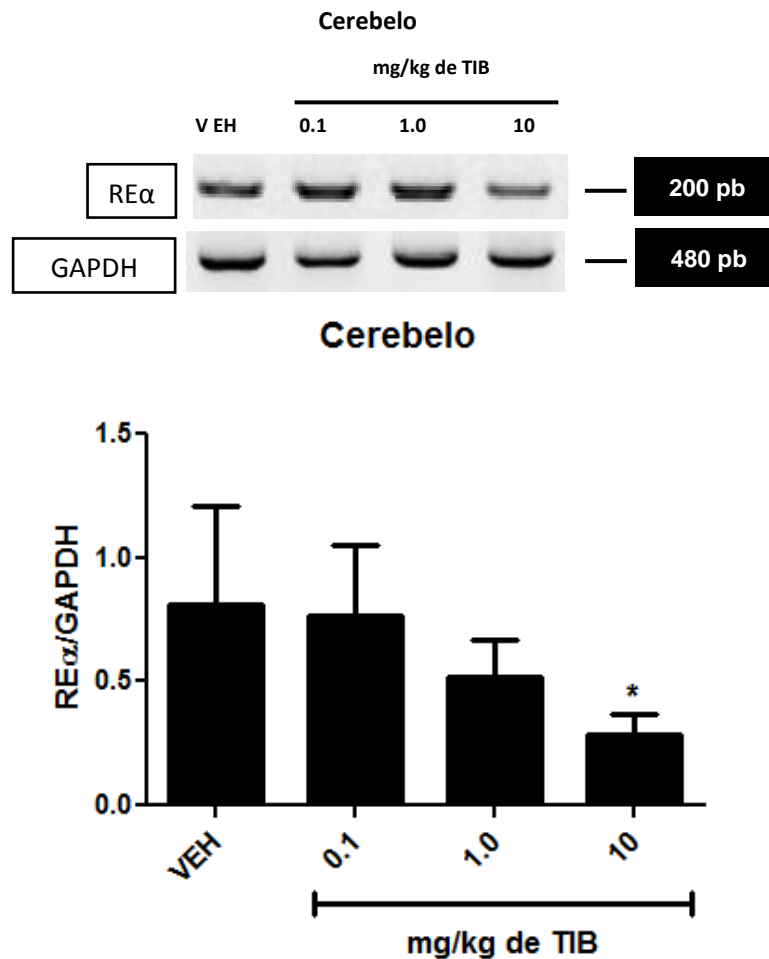


Figura 21. Media \pm E.E. de la expresión de RP en cerebelo de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RE α en el cerebelo de la rata OVX.

Los datos obtenidos en cerebelo indican que la administración de 10mg/kg de TIB disminuye de forma significativa la expresión de RE α al ser comparada con el VEH, mientras que las dosis de 0.1 y 1.0 mg/kg de TIB, no mostraron diferencias significativas (**Fig. 22**).



* $p < 0.05$ vs. su grupo con VEH (Prueba ANOVA, seguida de Tukey).

Figura 22. Media \pm E.E. de la expresión de RE α en cerebelo de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Expresión génica del RA en el cerebelo de la rata OVX.

Los datos obtenidos del cerebelo indican que la concentración de 10 mg/kg de TIB disminuye de forma significativa la expresión del RA al ser comparado con el VEH. (Fig. 23).

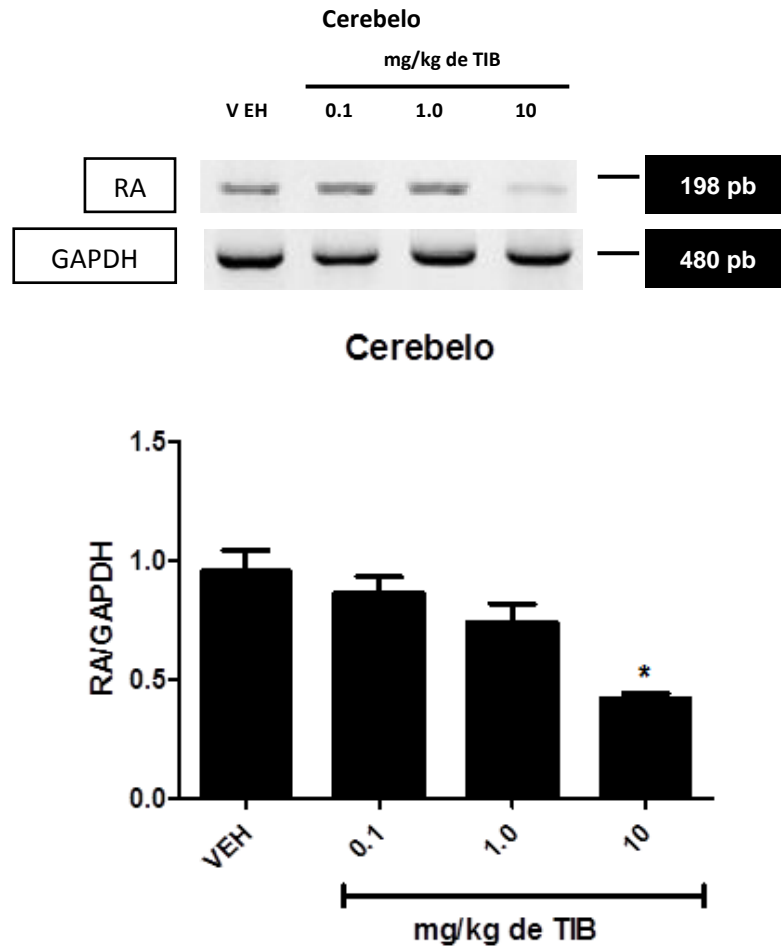


Figura 23. Media \pm E.E. de la expresión de RA en cerebelo de ratas tratadas con diferentes dosis de TIB, Vehículo (VEH), 0.1, 1.0 y 10 mg/kg.

Resumen de resultados

| ÁREA SNC | RP | | | RE α | | | RA | | |
|-----------------|-----------|-------|-------|-------------|-------|----|-----------|-------|-------|
| | TIB mg/kg | | | TIB mg/kg | | | TIB mg/kg | | |
| | 0.1 | 1.0 | 10 | 0.1 | 1.0 | 10 | 0.1 | 1.0 | 10 |
| HIPOTÁLAMO | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ | ----- | ----- | ----- |
| HIPOCAMPO | ----- | ↑ | ↑ | ----- | ----- | ↓ | ----- | ----- | ----- |
| CORTEZA FRONTAL | ↑ | ↑ | ↑ | ----- | ----- | ↓ | ----- | ----- | ↓ |
| CEREBELO | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ↓ | ----- | ----- | ↓ |

Cuadro 4. Resumen de resultados del efecto de diferentes dosis de TIB (0.1, 1.0 y 10 mg/kg) sobre la expresión de los receptores a hormonas sexuales (RP, RE α , RA). Evaluados en el SNC de la rata OVX. (-----) Indica que no hubo cambios, (↑) indica aumento en la expresión, (↓) indica disminución en la expresión.

IX. Discusión de resultados.

Regulación diferencial de los receptores a hormonas sexuales en el SNC de la rata.

En este proyecto se evaluó la expresión del RP, del RE α y del RA en el SNC de ratas OVX, tratadas con diferentes dosis de TIB, mediante el uso de la técnica de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los resultados del presente estudio muestran que la TIB regula de manera diferencial la expresión del RP, del RE α y del RA en el SNC de ratas OVX.

Las diferencias obtenidas en este trabajo se tratarán de explicar teniendo como premisa que la función de la TIB en el SNC es de tipo estrogénica debido a que el metabolito más abundante encontrado en las áreas analizadas en este estudio (hipotálamo, hipocampo, corteza frontal y cerebelo), es el metabolito 3 α -hidroxi-TIB cuyos efectos son semejantes a los estrógenos (Verheul *et al.*, 2007).

Por otro lado se ha reportado que la unión de los estrógenos a su receptor regulan la expresión tanto de las isoformas del RP, los subtipos del mismo RE, así como el RA (Simerly *et al.*, 1990; Shughrue *et al.*, 1997; Laflamme *et al.*, 1998; Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo 2000; Guerra-Araiza *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002; Mitra *et al.*, 2003; Brinton *et al.*, 2008).

Efecto de la TIB sobre la expresión del RP en el SNC de la rata OVX.

La progesterona tiene un amplio margen de actividad en el SNC, participa en procesos como la maduración, diferenciación y el funcionamiento óptimo de células nerviosas (Baulieu *et al.*, 1996). Por otro lado se ha señalado que esta hormona se encuentra implicada en el mantenimiento óptimo de procesos reproductivos,

particularmente la lordosis o implicada en procesos cognoscitivos (Gutiérrez-García *et al.*, 2000).

Se ha sugerido que para cumplir sus funciones fisiológicas la progesterona necesitan interactuar con sus receptores específicos, por ejemplo en la rata se ha demostrado la participación del RP en la inducción de la lordosis, en las ratas prepúberes que poseen un número reducido del RP, la conducta de lordosis inducida al administrar progesterona es menor en comparación con hembras adultas en estro que poseen un mayor número del RP (Camacho-Arroyo *et al.*, 1995).

Se ha descrito en diferentes estudios que los estrógenos en general regulan a la alza la expresión del RP en el cerebro de la rata (Guerra-Araiza y Camacho-Arroyo 2000; Guerra-Araiza 2002; Brinton *et al.*, 2008). En el presente estudio se observó que la TIB regula a la alza la expresión del RP en tres regiones del SNC (hipotálamo, hipocampo y corteza frontal), de la rata. Los hallazgos encontrados en nuestros experimentos nos permiten sugerir que la TIB en el SNC de la rata OVX tiene una actividad semejante al estradiol a pesar de la baja afinidad que tienen los metabolitos 3 α hidrox-TIB con el RE (3.2%).

Por otro lado aunque en el presente estudio retiramos el principal aporte de progesterona proveniente del ovario, no podemos descartar un efecto progestagénico en SNC mediado por la progesterona sintetizada en adrenales (Flórez *et al.*, 2008), o por el metabolito Δ 4-Tibolona, que aunque se ha reportado una bajo porcentaje de este en SNC (Verheul *et al.*, 2007), podría participar en la regulación de procesos neurales actuando sobre los RP.

Efecto de la TIB sobre la expresión del RE α en el SNC de la rata OVX.

El efecto de los estrógenos en SNC es uno de los más estudiados en procesos neuroprotectores, reproductivos y en procesos cognitivos (Arevalo *et al.*, 2015). La disminución de los niveles de estradiol séricos en rata o en ratona OVX, ha demostrado tener efectos negativos en procesos cognitivos, este efecto adverso también es observado en mujeres que atraviesan la menopausia (Arevalo *et al.*, 2015; Scott *et al.*, 2012). Por otro lado se ha reportado que la administración de estradiol o TIB en animales OVX mejora el déficit cognitivo y la memoria espacial (Espinoza-Raya *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

El grupo de Duval (2001), reportó que el estradiol disminuye de forma significativa la muerte neuronal en el modelo de isquemia por oclusión realizada en el ratón, en el mismo estudio la administración de bloqueadores selectivos para los RE comprobaron que el RE α parece estar regulando este efecto neuroprotector. Lo que nos permite observar la gran importancia no solo de los estrógenos en la regulación de procesos neuroprotectores si no la trascendencia de bajo que vía se están regulando.

Los resultados del presente estudio muestran que la TIB regula de manera diferencial la expresión del RE α en el SNC de la rata, aumentando la expresión en hipotálamo con dosis de 0.1 y 10 mg/kg y disminuyéndola en hipocampo y cerebelo con la dosis de 10 mg/kg.

El aumento del RE α en hipotálamo es acorde a lo reportado por Tena-Sampere 2001 quienes describieron un aumento en la expresión de las isoformas del RE por la administración aguda de estradiol. Se ha descrito que la principal función del RE α en el hipotálamo es la regulación de la supresión de la GnRH por la acción de los

estrógenos (Lindsey *et al.*, 1998). Lo que nos permite sugerir que la acción de la TIB en hipotálamo conlleva a la reactivación en la regulación neuroendocrina.

En hipocampo se ha reportado que los estrógenos modulan el desarrollo de espinas dendríticas y la plasticidad neuronal (Mcwen, 2002). Por otro lado se ha descrito que al parecer existe una relación directamente proporcional entre la concentración de estrógenos y la expresión del RE α en hipocampo, el aumento en las concentraciones de estradiol durante el proestro regula a la alza el RE α , mientras que la OVX disminuye la expresión de este receptor (Cardoso *et al.*, 2010). Sin embargo esta regla no se cumple en el modelo de la rata OVX + estradiol, ya que la implantación de un pellet de liberación prolongada de este fármaco no aumenta en general la expresión del RE, sugiriendo que en el microambiente de un animal OVX, el estradiol no es lo suficientemente efectivo como para regular a la alza el RE (Simerly *et al.*, 1990). En el presente estudio se observó que en el hipocampo la concentración de 10 mg/kg de TIB reguló a la baja la expresión del RE α , lo que nos permite sugerir que el microambiente del animal OVX sumado a las particularidades de la TIB puedan hacer que esta regule de manera diversa el RE α en esta área del SNC.

En el cerebelo de animales OVX y tratados con estradiol se ha reportado un aumento en la expresión del RE (Simerly *et al.*, 1990), mientras que en los resultados obtenidos en el presente experimento se observó una disminución del RE α con la administración de 10 mg/kg de TIB, sugiriendo que este fármaco regula de forma distinta a los estrógenos la expresión del RE α en hipocampo y cerebelo.

Efecto de la TIB sobre la expresión del RA en el SNC de la rata OVX.

En el presente estudio podemos proponer que la TIB no influye de forma significativa sobre el RA en la mayoría de áreas analizadas.

Por otro lado en corteza frontal se observó una disminución del RA con la dosis de 10 mg/kg efecto que difiere por lo descrito por el grupo de Simerly 1990, quienes observaron un aumento en la densidad del RA en corteza de animales ovariectomizados y tratados con estradiol, esta diferencia puede deberse a que la administración del fármaco fue de forma crónica.

X. Conclusiones.

- En el presente estudio se observó que la TIB se comporta de manera semejante a los estrógenos, incrementado en general la expresión del RP en el SNC de la rata.
- En el hipotálamo las dosis de Tibolona de 0.1 y 10 mg/kg aumentan la expresión del RE α .
- En el hipocampo las dosis de Tibolona de 1.0 y 10 mg/kg aumentan la expresión del RP.
- En el hipocampo las dosis de Tibolona de 10 mg/kg disminuye la expresión del RE α .
- En la corteza frontal las dosis de Tibolona de 0.1, 1.0 y 10 mg/kg aumentan la expresión del RP.

XI. Literatura citada

- ∞ Aagaard NM, Siersbæk R, Mandrup S. (2011). Molecular basis for gene-specific transactivation by nuclear receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1812: 824-835.
- ∞ Aguiar RB, Dickel OE, Cunha RW. (2008). Estradiol valerate and tibolone: Effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats. *Biogerontology*. 9:285-98
- ∞ Akwa Y, Sananes N, Guezou M, Robel P, Baulieu E, Goascogne C (1993). Astrocytes and neurosteroids: metabolism of pregnanolone and dehydroepiandrosterone regulation by cell density. *J cell boil*. 1:135-143.
- ∞ Alarid ET, Bakopoulos N, Solodin N. (1999). Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Molecular endocrinology*. 9, 1522-1534.
- ∞ Arevalo M, Azcoitia I, Garcia-Segura M. (2015). The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. *Nature Reviews Neuroscience*.16: 17-29.
- ∞ Baulieu E, Schumacher M, Koenig H, Jungtestas I, Akwa Y. (1996). Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system. *Cell mol neurobiol*. 16(2):143-154.
- ∞ Bagamasbad P and Denver R J. (2011). Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation. 1, 3-17.

- ∞ Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido M. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiology Pharmacology Latinoamerican*. 40: 1-17.
- ∞ Brinton R, Thompson R, Foy M, Baudry M, Wang J, Finch C, Morgan T, Stanczyk F Pike C, and Nilsen J (2008). Progesterone receptors: Form and function in brain. *Front Neuroendocrinol*. (2): 313-339.
- ∞ Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C, Cerbón M. (1998). Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport*. 9(18):3993-6.
- ∞ Cardoso C, Proença V, Frussa-Filhoc R, Portob C, Abdallaa F. (2010). Effects of 17 β -estradiol on expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes and estrogen receptor α in rat hippocampus. *Endocrine Pharmacology*. 634: 192-200.
- ∞ Chalbos D, Galtier F. (1994). Differential effect of forms A and B of human progesterone receptor on estradiol dependent transcription. *J Biol Chem* 269: 23007-23012.
- ∞ Chomczynski, P. Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. *Anal. Biochem*. 162:156-159.
- ∞ Conn P & Freeman E. (2000). The hypothalamus as an endocrine organ: the science of neuroendocrinology. En *neuroendocrinology in physiology and medicine* (Edits) M. P. Conn and M. E. Freeman. Humana Press Pp. 8.

- ∞ Dubal, D. B. (2001). Estrogen receptor α , not β , is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 1952–1957.
- ∞ Evans R. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240: 889-894.
- ∞ Espinosa-Raya, Neri-Gómez T, Orozco-Suárez S, Campos MG, Guerra-Araiza C. (2012). Chronic administration of tibolone modulates anxiety-like behavior and enhances cognitive performance in ovariectomized rats. *Horm Behav.* 1:76-83.
- ∞ Fernández E, Magnani E, Fernández M, Fernández-Arcilla. (2000). *Menopausia ¿Qué es?* Madrid: Lilly.
- ∞ Flores A, Gallegos A, Velasco J, Mendoza F, Montiel C, Everardo P, Cruz M, Domínguez R. (2008). The acute effects of bilateral ovariectomy or adrenalectomy on progesterone, testosterone and estradiol serum levels depend on the surgical approach and the day of the estrous cycle when they are performed. *Reproductive Biology and endocrinology.* 6:48.
- ∞ Florez J y Amado JA. (2008). *Hormonas sexuales: estrógenos, géstagenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales.* Farmacología Humana Elsevier Masson quinta edición. España.
- ∞ Gardner G y Shoback D. (2012). *Endocrinología básica y clínica.* México: Mc Graw Hill. 18- 19.

- ∞ Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. (2006). overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*. 58: 685-704.

- ∞ Giangrande PH, Kimbrel EA, Edwards DP, McDonnell DP. (2000). The opposing transcriptional activities of the two isoforms of the human progesterone receptor are due to differential cofactor binding. *Molec. Cell. Biol.* 20: 3102-3115.

- ∞ Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP. (1997). Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 32889-32900.

- ∞ Gibbs RB, Nelson D, Anthony MS, Clarkson TB. (2002). Effects of long-term hormone replacement and of tibolone on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the brains of ovariectomized, cynomologus monkeys. *Neuroscience*.113:907-14

- ∞ Giguere V. (1999). Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocrine Reviews* 5, 689-725.

- ∞ Giguere V, Yang N, Segui P, Evans RM. (1988) Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature*. 331, 91-94.

- ∞ Gooyer M, Deckers G, Schoonen W, Verheul H, Kloosterboer H. (2003). Receptor profiling and endocrine interactions of tibolone. *Steroids* 68 21-30.
- ∞ Gomez-Calcerrada S. (2000). Tesis doctoral tratamiento cognitivo-conductual en la menopausia. UCM, Facultad de psicología
- ∞ Gosden JR, Middleton PG, Rout D. (1986). Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24-q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 43: 218-220.
- ∞ Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 320:134-139.
- ∞ Griekspoor A, Zwart W, Neefjes J, Michalides R. (2007). Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nuclear Receptor Signaling*. 5, e003.
- ∞ Guerra-Araiza C, Camacho-Arroyo I. (2000). Las isoformas del receptor a progesterona: función y regulación. *Rincón del residente*. 5, 686-691.
- ∞ Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, Camacho-Arroyo I. (2002). Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res Bull*. 59(2):105-9.
- ∞ Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I. (2003). Changes in progesterone receptor isoforms

content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol.* (10):984-90.

∞ Guyton AC. (2011). Fisiología femenina antes de la gestación y hormonas femeninas. En: *Tratado de Fisiología Médica*. 12^a. Edición. Editorial Elsevier. España. Cap. 81. Pp. 991-1001.

∞ Hampson E. (1990). Estrogen-related variations in human spatial and articulatory-motor skills. *Psychoneuroendocrinology.* 15:97-111.

∞ Higa GM and Fell RG. (2013). Sex Hormone Receptor Repertoire in Breast Cancer. *International Journal of Breast Cancer.* 14

∞ Huang-Ping Yu, Mashkoor A. Choudhry, Tomoharu Shimizu, Ya-Ching Hsieh, Martin G. Schwacha, Shaolong Yang, and Irshad H. Chaudry. (2006). Mechanism of the salutary effects of flutamide on intestinalmyeloperoxidase activity following trauma-hemorrhage: up-regulation of estrogen receptor- β -dependent HO-1. *Journal of Leukocyte Biology.* Volume 79, 277

∞ Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. (1990). Two distinct estrogenregulatedpromoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 9. 1603-1614.

∞ Korach KS. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science.* 1524-1527.

- ∞ Kraus WL, Weis KE, Katzenellenbogen BS. (1995). Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist and antagonist-occupied progestin receptors. *Mol. Cell Biol.* 15, 1847-1857.
- ∞ Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95, 15677-15682.
- ∞ Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996). Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 5925-5930.
- ∞ Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S. (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: Anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol* 36: 357-378.
- ∞ Louredo M. (2002). Valor pronóstico de los factores clínicos e inmunohistoquímicos en la recidiva precoz del carcinoma ductal infiltrante de mama. Tesis de doctorado. UCM. Facultad de medicina.
- ∞ Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90, 11162-11166.

- ∞ Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 9, 2266-2278.

- ∞ Liu X, Wang L, Peng D, Wang Y, Ren M. (2014). Effects of estrogen replacement therapy on cognitive function of ovariectomized rats. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 49(1):42-7.

- ∞ Mader S, Kumar V, de Verneuil H, Chambon P. (1989). Three amino acids of the estrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* 338: 271-274.

- ∞ Mcewen Bruce and Alves Stephen. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocrine Reviews* 20(3): 279–307.

- ∞ Mcewen Bruce. (2002). Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog. Horm. Res.*, 57, pp. 357–384

- ∞ Molenda HA, Kilts CP, Allen RL, Tetel MJ. (2003). Nuclear receptor coactivator function in reproductive physiology and behavior. *Biol. Reproduction.* 5, 1449–1457.

- ∞ Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Kliewer SA, Lehmann JM, Willson TM. (1998). Cloning and

characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 75-78.

∞ Mosselman S, Polman J, Dijkema R. (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392, 49-53.

∞ Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. (2000). Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science.* 289, 1751-1754.

∞ Musgrove EA, Sutherland RL. (1994). Cell cycle control by steroid hormones. *Semin Cancer Biol.*; 5: 381-389.

∞ Palacios, S. (1992). *Climaterio y menopausia*. Madrid: Mirpal.

∞ Pinto-Almazán R, Rivas-Arancibia S, Farfán-García ED, Rodríguez-Martínez E, Guerra-Araiza C. (2014). Neuroprotective effects of tibolone against oxidative stress induced by ozone exposure. *Rev Neurol.* 16; 58(10):441-8.

∞ Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. (1988). Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J* 7: 3385-3388.

∞ Pratt WB and Toft DO. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews.* 18, 1-55.

- ∞ Prieto AG, Salces VO, M. Gomez T, Almaraz A, Molina I, Rodriguez H, Camacho-Arroyo I. (2003). ¿Cómo actúan las hormonas esteroides? *Educación Química*, 14, 196-20.
- ∞ Raval A, Borges-Garcia R, Moreno W, Perez-Pinzon M, Bramlett H. (2013). Periodic 17 β -estradiol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via estrogen receptor- β . *Plos One* Volume 8.
- ∞ Rosa-E-Silva A., Guimaraes MA., Padmanabhan V., Lara HE. (2003). Prepubertal Administration of valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: Role of sympathetic innervation. *Endocrinology*. 144: 4289-4297.
- ∞ Rousseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Milgrom E, Berger R. (1987). Localization of the human progesterone receptor gene to chromosome 11q22-q23. *Hum Genet*. 77, 280-282.
- ∞ Sherwin BB. (1994). Estrogenic effects on memory in women. *Ann NY Acad Sci* 743:213-231
- ∞ Shughrue PJ, Ilane MV, and Merchenthaler I. (1997). Comparative Distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. *The journal of comparative neurology* 388:507-525
- ∞ Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, and Swanson IW. (1990). Distribution of Androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain and in situ hybridization study. *The journal of comparative: neurology* 294~76-95.

- ∞ Scott RE, Wu-Peng XS, Pfaff DW. (2002). Regulation and expression of progesterone receptor mRNA isoforms A and B in the male and female rat hypothalamus and pituitary following oestrogen treatment. *J. Neuroendocrinol.* 14, 175–183.

- ∞ Scott E, Zhang, Q G, Wang, R, Vadlamudi, R, Brann D. (2012). Estrogen neuroprotection and the critical period hypothesis. *Front. Neuroendocrinol.* 33, 85–104.

- ∞ Sladek R, Bader JA, Giguere V. (1997). The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Molecular Cell Biol.* 17, 5400-5409.

- ∞ Smith S. (1991). The effects of oestrogen and progesterone on GABA and glutamate responses at extrahypothalamic sites. In: Costa E, Paul SM (eds) *Neurosteroids and Brain Function*. Thieme Medical, New York, pp 87–94.

- ∞ Tsukamoto K, Inoue S, Hosoi T, Orimo H, Emi M. (1998). Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus. *J Hum Genet* 43: 73-74.

- ∞ Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M. (1985). Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 7889-7893.

- ∞ Weigel NL. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem. J.* 319, 657-667.
- ∞ Wen DX, Xu YF, Mais DE, Goldman ME, McDonnell DP. (1994). The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. *Mol Cell Biol.* 14: 8356-8364.
- ∞ Wierman M. (2007). Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *The American Physiological Society.* 31, 26–33.
- ∞ Wilson, C. M., McPhaul, M. J. (1994). A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 1234-1238.
- ∞ [Women's Health Initiative](https://www.nhlbi.nih.gov/whi/) (2010). <https://www.nhlbi.nih.gov/whi/>
- ∞ Vadevecum (2014). <http://www.vademecum.es/principios-activos-tibolona-G03CX01>
- ∞ Van Voorhis J. B. (1998). Follicular development. En: *Encyclopedia of Reproduction* Knobil E, Neill JD. (Eds.). Academic Press. Vol. 2 Pp. 388,391-
- ∞ Verheul HA, van Iersel MLPS, Delbressine LPC, and Kloosterboer HJ. (2007). Selective tissue distribution of tibolone metabolites in mature ovariectomized female cynomolgus monkeys after multiple doses of Tibolone. *Drug Metab Distribution.* 35:1105–11.

- ☞ Yen SSC. (2001). Neuroendocrinología de la reproducción In: Yen SSC, Jaffe RB, editors. Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 4ta. Edición. Editorial. Medica Panamericana. Pp. 37, 38, 46.
- ☞ Ying Y.S & Zhang Z. (1998). Ovarian hormones, overview. En: Encyclopedia of Reproduction Knobil E, Neill JD. (Eds.). Academic Press. Vol. 3 Pp. 578,579.