



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Efecto de la tibolona en la regulación de la expresión de los receptores a hormonas esteroides en la lesión traumática de médula espinal en rata

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

XIMENA FREYERMUTH TRUJILLO

ASESOR

Dra. Angélica Berenice Coyoy Salgado

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2020



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.

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres Adolfo y Adriana, por la comprensión y apoyo incondicional que me han brindado toda la vida.

A mi hermano Adolfo que siempre estuvo dispuesto a ayudar.

A mis amigos Mariana, Max, Eugenio, Gaby, Amy, Andrea y Rodrigo que fueron fuente de motivación.

Agradecimientos

Dra. Angélica Berenice Coyoy Salgado, le agradezco infinitamente todo el apoyo, la enseñanza y la paciencia que me mostró a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Dr. Christian Humberto Guerra Araiza y **Dra. Gabriela Morali de la Brena**, gracias por la ayuda y la confianza que tuvieron en mí.

M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez, gracias por su apoyo y sus consejos.

Gracias también a todo el personal del **Bioterio del C.M.N. SXXI** por la ayuda que aportaron.

ÍNDICE

Índice de Figuras	5
Índice de Tablas	6
Abreviaturas	7
Resumen	8
1. Marco Teórico	9
1.1. Sistema Nervioso	9
1.1.1. Anatomía de la Médula Espinal	11
1.2. Lesión Traumática de Médula Espinal (LTME)	15
1.2.1. Epidemiología y Etiología de la LTME	15
1.2.2. Fisiopatología de la LTME	17
1.2.2.1. Lesión Primaria	18
1.2.2.2. Lesión Secundaria	18
1.2.2.2.1. Fase Inmediata	18
1.2.2.2.2. Fase Aguda Temprana	19
1.2.2.2.3. Fase Subaguda	19
1.2.2.2.4. Fase Intermedia	20
1.2.2.2.5. Fase Crónica	20
1.2.3. Eventos Bioquímicos en la LTME	21
1.2.3.1. Desregulación Iónica y Excitotoxicidad	21
1.2.3.2. Estrés Oxidativo	21
1.2.3.3. Inflamación	23
1.2.3.4. Muerte Celular Apoptótica y Necrótica	25
1.3. Hormonas Esteroides	26
1.4. Acción Neuroprotectora de las Hormonas Sexuales	29
1.5. Hormonas Sexuales en el Tratamiento de la LTME	32
1.6. Tibolona en el Sistema Nervioso Central	34
1.7. Receptores Nucleares Hormonales	36
1.7.1. Estructura de los Receptores Nucleares (NHR)	37
1.7.2. Categorización de los Receptores Nucleares (NR)	40
1.7.3. Regulación de los Receptores Nucleares	41
1.7.4. Receptor a Estrógenos (RE)	43

1.7.5. Receptor a Progesterona (RP)	46
1.7.6. Receptor a Andrógenos (RA)	48
1.7.7. Autorregulación y Regulación Cruzada de Receptores Nucleares	50
2. Justificación	53
3. Hipótesis	54
4. Objetivos	55
5. Materiales y Métodos	56
5.1. Animales	56
5.2. Lesión Traumática de Médula Espinal	57
5.3. Tratamientos	58
5.4. Extracción y Cuantificación de RNA	58
5.5. Integridad de RNA	60
5.6. Estandarizaciones	60
5.7. Amplificación de RPT, RPB, RE α , RE β , RA y 18S Mediante la Técnica de Retrotranscripción Acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	61
5.8. Análisis Estadístico	62
6. Resultados	63
6.1. Integridad de RNA	63
6.2. Estandarizaciones	63
6.3. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RPT en la Médula Espinal con LTME	65
6.4. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RPB en la Médula Espinal con LTME	66
6.5. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RE α en la Médula Espinal con LTME	68
6.6. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RE β en la Médula Espinal con LTME	70
6.7. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RA en la Médula Espinal con LTME	71
7. Análisis de Resultados y Discusión	74
8. Conclusión	80
9. Perspectivas	81
10. Referencias	82
11. ANEXO	92
11.1 Rutas de Señalización de interés	92

Índice de Figuras

Figura 1. Neurona y células gliales en el Sistema Nerviosos Central.....	9
Figura 2. Anatomía macroscópica de la médula espinal.....	12
Figura 3. Sección transversal de la médula espinal torácica.....	14
Figura 4. Agentes inflamatorios y apoptóticos en fase aguda temprana.....	24
Figura 5. Ruta de Biosíntesis de esteroides.....	27
Figura 6. Mecanismos clásicos y no clásicos de la señalización del estradiol.....	31
Figura 7. Estructura de la Tibolona y sus metabolitos.....	35
Figura 8. Características y funciones de los dominios estructurales de los Receptores Nucleares.....	38
Figura 9. Familias de receptores nucleares y sus elementos de respuesta hormonal (HRE)....	40
Figura 10. Representación esquemática del gen para el receptor a estrógenos y los dominios estructurales del receptor a estrógenos α (RE α) y β (RE β).....	45
Figura 11. Representación esquemática del gen para el receptor a progesterona y los dominios estructurales del receptor a progesterona isoforma B (RPB) e isoforma A (RPA).....	48
Figura 12. Representación esquemática del gen para el receptor a andrógenos y los dominios estructurales del receptor a andrógeno.....	49
Figura 13. Mecanismos moleculares para la regulación de la expresión de receptores nucleares.....	51
Figura 14. Imagen representativa de la integridad del RNA de las muestras.....	63
Figura 15. Amplificación de genes con 1 μ g de RNA.....	64
Figura 16. Curvas para estandarización de PCR.....	64
Figura 17. Imagen representativa de la expresión del RPT.....	65
Figura 18. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RPT en LTME en rata.....	66
Figura 19. Imagen representativa de los resultados de la PCR para RPB.....	67
Figura 20. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RPB en LTME en rata.....	67

Figura 21. Imagen representativa de los resultados de la PCR para RE α	68
Figura 22. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RE α en LTME en rata.....	69
Figura 23. Imagen representativa de los resultados de la PCR para RE β	70
Figura 24. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RE β en LTME en rata.....	71
Figura 25. Imagen representativa de los resultados de la PCR para RA.....	72
Figura 26. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RA en LTME en rata.....	72

Índice de Tablas

Tabla 1. Fases de la LTME y sus eventos patológicos principales.....	17
Tabla 2. Condiciones de la PCR.....	61
Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de RPT, RPB, RE α , RE β , RA y 18S.....	62

Abreviaturas

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AP-1: Proteína activadora-1
APO-1: Antígeno apoptótico 1
ARE: Elemento de respuesta a andrógenos
CD95: Grupo de diferenciación 95
Cyp17: Citocromo p450 17 α -hidroxilasa
DBD: Dominio de unión a DNA
DEPC: Dietilpircarbonato
DHEA: Dehidroepiandrosterona
DHP: Dihidroprogesterona
DHT: Dihidrotestosterona
DNA: Ácido desoxiribonucleico
DOC: Desoxicorticosterona
ERE: Elemento de respuesta a estrógenos
ERR: Receptor relacionado con el estrógeno
E2: Estradiol
FXR: Receptor farnesoide X
GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoide
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HRE: Elemento de respuesta hormonal
HSD: Hidroxiesteroide deshidrogenasa
Hsp: Proteínas de shock de calor
IFN: Interferón
IL-1 β : Interleucina 1 β
IL-6: Interleucina 6
JNK: cinasa c-Jun N-terminal
LBD: Dominio de unión a ligando
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LTME: Lesión traumática en médula espinal
LXR: Receptor X del hígado
MBP: Proteína básica mielínica
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGFI-B: Factor de crecimiento de nervios inducido -B
NHR: Receptores nucleares hormonales

NLS: Secuencia de localización de nuclear
NMDA: N-metil-D-aspartato
NO: Óxido nítrico
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal
NR: Receptores nucleares
NRA: Complejo hormona-NR
PGE₂: Prostaglandina E2
PLP: Proteína proteolípídica
PPAR: Receptor activado por proliferador de peroxisoma
PRE: Elemento de Respuesta a Progestágenos
P38 MAPK: Proteincinasa activada por mitógenos p38
PXR: Receptor de pregnano X
P4: Progesterona
RA: Receptor a andrógenos
RAR: Receptor de ácido retinoico
RE: Receptor a estrógenos
RevERB: NR subfamilia 1, grupo D, miembro 2
RE α : Receptor a estrógenos α
RE β : Receptor a estrógenos β
RG: Receptor a glucocorticoides
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
RP: Receptor de progesterona
RPA: Receptor de progesterona A
RPB: Receptor de progesterona B
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RXR: Receptor X retinoide
SF-1: Factor esteroideogénico-1
SHR: Receptores a hormonas esteroides
SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
SOD: Superóxido dismutasa
SR: Receptor a esteroide
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α
TR: Receptor a hormona tiroidea
VDR: Receptor a vitamina

Resumen

La Lesión Traumática en Médula Espinal (LTME) es una patología considerada irremediable para la cual aún no existe tratamiento. Las hormonas sexuales pueden ser una opción en el tratamiento de la LTME ya que tienen propiedades neuroprotectoras y neuroregenerativas (Bansal, et al., 2018). Desafortunadamente, el uso terapéutico de hormonas esteroides, puede promover el desarrollo de cáncer de mama, de ovario y de endometrio (Chuffa, et al., 2016). Es por esto que se propone el uso de tibolona, un esteroide sintético que imita las acciones neuroprotectoras de hormonas sexuales sin ejercer los efectos secundarios indeseables (Crespo, et al., 2018).

En el presente trabajo se estudió el efecto que tiene la tibolona a diferentes dosis, sobre la expresión de los receptores a progesterona, estrógenos y andrógenos en la médula espinal de ratas Sprague-Dawley, usada como modelo de LTME. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observa que la tibolona regula la expresión de los receptores a hormonas esteroides en la médula espinal en un modelo de lesión traumática y esta regulación es dosis dependiente.

La LTME ocasionó una disminución en la expresión del receptor a estrógenos α y receptor a estrógenos β . La administración de tibolona aumentó la expresión de los receptores a estrógenos, compensando el efecto que tiene la LTME, a una dosis de 0.1 y 2.5 mg/Kg para el receptor a estrógenos α y a una dosis de 2.5 mg/Kg para el receptor a estrógenos β . El aumento de la expresión del receptor a estrógenos provocada por la administración de tibolona puede tener efectos benéficos en la LTME al mejorar la señalización de estrógenos y de tibolona, permitiendo que realicen su comportamiento neuroprotector. Por otro lado, la expresión del receptor a progesterona total no se modificó significativamente con ninguno de los tratamientos, sin embargo, la expresión del receptor a progesterona B disminuyó su expresión en la LTME. En los grupos a los que se les administró dosis de tibolona a 2.5 y 10 mg/Kg, no se observa dicha disminución. Este comportamiento sugiere que la tibolona altera la razón receptor a progesterona A:receptor a progesterona B, afectando la expresión de genes proinflamatorios los cuales a su vez influyen la expresión de los receptores a progesterona. La expresión del receptor a andrógenos no se modificó por la LTME, pero presentó un marcado incremento en su expresión al administrar tibolona a una dosis de 0.1 mg/Kg.

1.Marco Teórico

1.1. Sistema Nervioso

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC), que consiste en el cerebro y la médula espinal, y en sistema nervioso periférico (SNP), formado por los nervios craneales y espinales. El sistema nervioso está formado por neuronas y células gliales (**Fig. 1**). Las neuronas contienen un cuerpo celular, una extensión celular denominada axón, que manda los impulsos electroquímicos lejos del cuerpo celular y también contienen dendritas; prolongaciones citoplasmáticas que tienen la capacidad de generar y transmitir los impulsos hacia el cuerpo celular (Scanlon & Sanders, 2007).

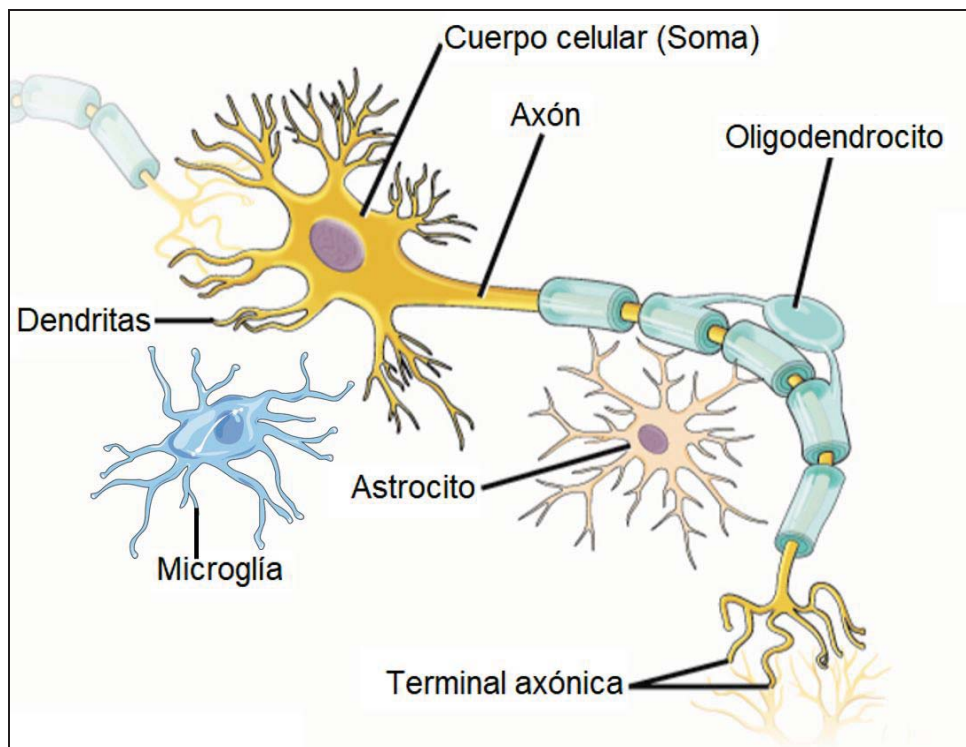


Figura 1. Neurona y células gliales en el Sistema Nerviosos Central. La neurona tiene dendritas y axones. También se muestran tres tipos de células gliales: los astrocitos; que regulan el ambiente químico de la célula nerviosa, los oligodendrocitos; que aíslan el axón para que el impulso nervioso eléctrico se transfiera con más eficacia, y la microglía; macrófagos del SNC. Modificada de Molnar & Gair (2013).

El lugar donde se encuentran dos neuronas se llama sinapsis, este es un espacio que existe entre ambas neuronas. El impulso eléctrico que avanza mediante la membrana celular de una neurona no puede cruzar la sinapsis. La continuación de la transmisión del impulso requiere que neurotransmisores presentes en vesículas salgan mediante exocitosis del nudo sináptico; el extremo terminal del axón presináptico. Los neurotransmisores liberados en la sinapsis se combinan con receptores específicos de la membrana celular postsináptica generando un nuevo impulso eléctrico que será cargado por el axón de la siguiente neurona hasta llegar a su respectivo nodo sináptico, de esta manera se permite la comunicación entre neuronas (Scanlon & Sanders, 2007).

La envoltura de mielina es una membrana plasmática modificada que envuelve al axón en forma de espiral. La mielina se origina y forma parte de las células de Schwann en el SNP y de oligodendrocitos en el SNC. La mielina tiene interrupciones periódicas donde pequeñas porciones del axón quedan descubiertas y se llaman nodos de Ranvier. Los segmentos mielinizados de los axones se llaman internodos. La mielina es un aislante eléctrico que mejora la conductividad eléctrica de los axones (Quarles, Macklin & Morell., 1999).

La mielina *in situ* tiene un contenido de agua de aproximadamente 40%. La masa seca de la mielina se caracteriza por una elevada proporción de lípidos (70 al 80%) y una baja proporción de proteína (15 al 30%). Los cerebrósidos son los lípidos típicos de la mielina, además de estos, otros componentes lipídicos de la mielina son el colesterol y plasmalógenos que contienen etanolamina. La lecitina también es un constituyente principal de la mielina y los esfingolípidos son un componente relativamente menor. Componentes menores de la mielina incluyen al menos tres ácidos grasos ésteres de cerebrósidos y dos lípidos basados en glicerol; diacil gliceril-galactósido y monoalquil monoacil gliceril-galactósido, colectivamente llamados galactosil diglicérido. La composición proteica de la mielina es más sencilla que aquella en otras membranas del cerebro. En la mielina del SNC predominan dos proteínas, la

proteína básica mielínica (MBP) y la proteína proteolipídica (PLP) (Quarles, et al., 1999).

Si un nervio periférico es cortado y unido de manera precisa mediante microcirugía, los axones y dendritas pueden regenerarse mediante túneles formados por el neurilema, constituido por células de Schwann (Scanlon, et al., 2007). También se cree que las células de Schwann producen factor de crecimiento que estimula la regeneración. Gracias a esto, los nervios pueden eventualmente reestablecer sus conexiones y el individuo puede recuperar sensación y movimiento en el miembro que fue cortado. El SNC carece de neurilema al estar sus vainas de mielina formadas por oligodendrocitos, una de las células gliales del SNC. La ausencia de células del neurilema, disminuye la regeneración de las neuronas, de tal manera que en una lesión traumática, la recuperación funcional es muy compleja (Scanlon, et. al., 2007).

Otro tipo de célula glial son los astrocitos, cuyas extensiones rodean a los capilares cerebrales, contribuyendo a la barrera hematoencefálica que previene que desechos potencialmente peligrosos en la sangre entren al tejido cerebral por difusión. El tercer tipo de célula glial es la microglía que tiene la importante función de fagocitar células dañadas y patógenos, por lo cual se encuentran en constante movimiento (Scanlon, et al., 2007).

1.1.1. Anatomía de la Médula Espinal

La médula espinal está alojada en el conducto vertebral de la columna vertebral. Los ligamentos vertebrales, las meninges y el líquido cefalorraquídeo constituyen una protección adicional. Las meninges son tres capas de tejido conectivo que revisten al SNC. Las meninges espinales rodean a la médula (**Fig. 2**) y continúan con las meninges craneales, las cuales envuelven al encéfalo. La más superficial de las tres meninges espinales es la duramadre, compuesta por tejido conectivo denso irregular. La médula espinal también se encuentra protegida por un colchón de grasa y de tejido

conectivo que se localiza en la cavidad epidural, comprendido entre la duramadre y la pared del conducto vertebral (Tortora & Derrickson, 2011).

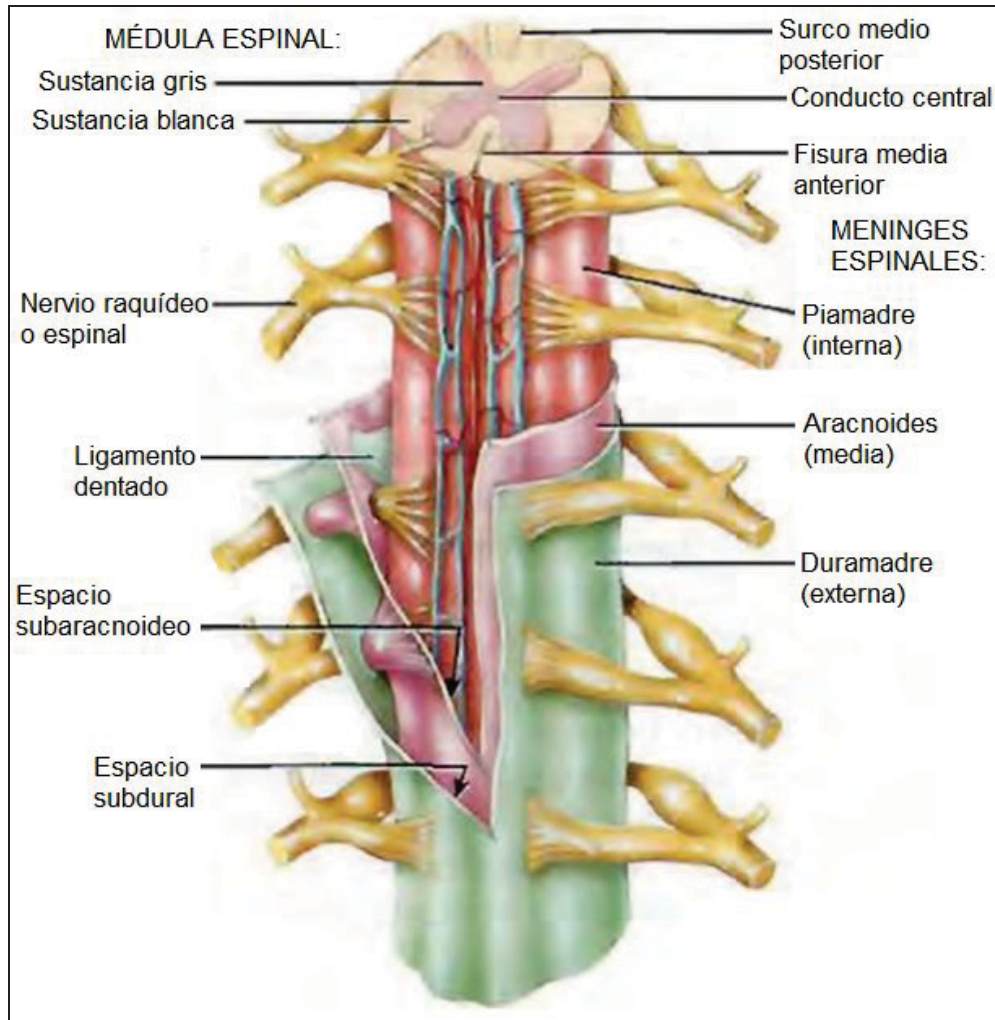


Figura 2. Anatomía macroscópica de la médula espinal. Vista anterior y sección transversal de la médula espinal. Modificada de Tortora, et al. (2011).

La meninge media es una membrana avascular denominada aracnoides por la predisposición similar a la de una tela de araña que presentan las fibras de colágeno y algunas fibras elásticas que la componen. Entre la duramadre y la aracnoides se halla el estrecho espacio subdural, que contiene líquido intersticial. La más interna de las meninges es la piamadre, una fina y transparente capa de tejido conectivo que se adhiere a la superficie de la médula y al encéfalo. Está compuesta por manojos

intercalados de fibras colágenas y algunas fibras elásticas. En la piamadre hay una gran cantidad de vasos sanguíneos que abastecen de oxígeno y nutrientes a la médula espinal. Entre la aracnoides y la piamadre se encuentra el espacio subaracnoideo que contiene líquido cefalorraquídeo (Tortora, et al., 2011).

La médula espinal es casi cilíndrica, pero presenta un ligero aplanamiento antero-posterior. En los adultos se extiende a partir del bulbo raquídeo, hasta el borde superior de la segunda vértebra lumbar. En los humanos, durante la niñez temprana, la médula espinal y la columna vertebral crecen en longitud como parte del desarrollo de todo el cuerpo. El alargamiento de la médula espinal se detiene alrededor del cuarto o quinto año de vida, pero la columna vertebral sigue creciendo. De esta manera la médula espinal no ocupa toda la longitud de la columna vertebral en el adulto. La longitud de la médula espinal de un adulto es de unos 42 a 45 cm. Su diámetro se aproxima a los 2 cm en la región torácica media, es algo más ancha en la región cervical baja y la región lumbar media, y algo menos en su segmento inferior (Tortora, et al., 2011).

La médula espinal está constituida por materia gris y materia blanca. Dos surcos se introducen en la sustancia blanca de la médula espinal y la dividen en dos sectores, uno derecho y otro izquierdo (**Fig. 3**). La sustancia gris de la médula espinal tiene forma de mariposa y se halla rodeada de sustancia blanca. La sustancia gris consiste en dendritas, cuerpos neuronales, axones amielínicos y células gliales. La sustancia blanca está constituida principalmente por haces de axones neuronales mielínicos. En el centro de la comisura gris se encuentra un pequeño espacio llamado conducto central que se extiende a lo largo de toda la médula y está lleno de líquido cefalorraquídeo (Tortora, et al., 2011).

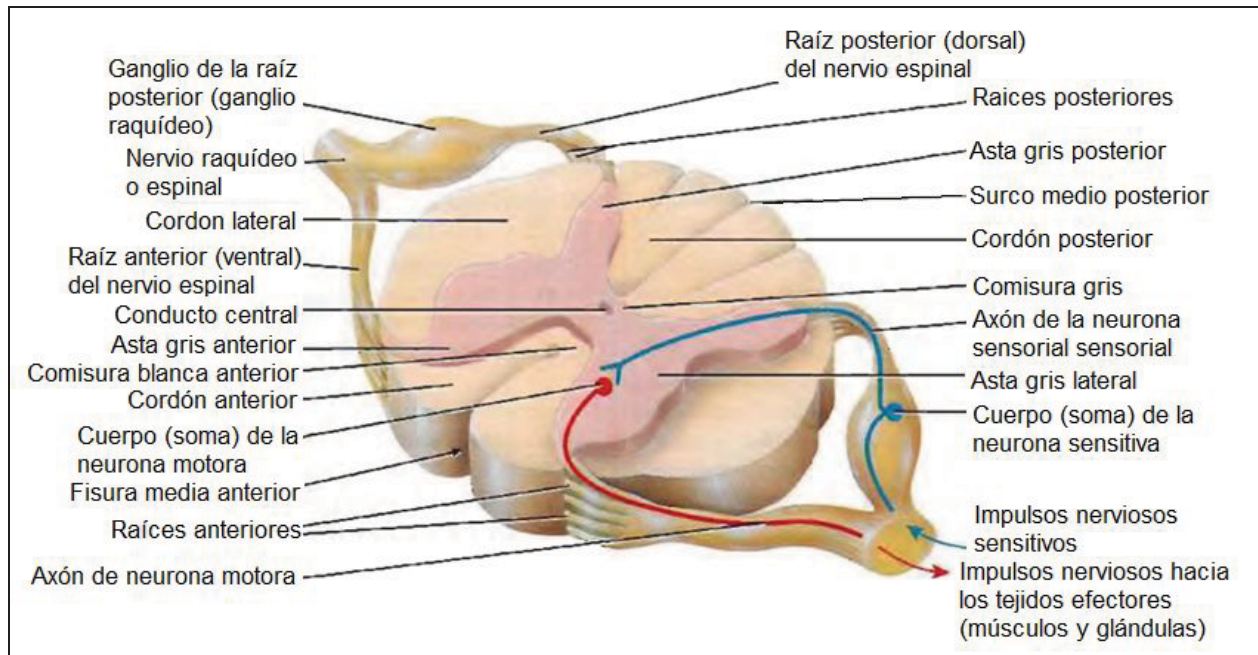


Figura 3. Sección transversal de la médula espinal torácica. Se muestra la anatomía interna de la médula espinal y la organización de la sustancia gris y de la sustancia blanca. Las flechas azules y rojas indican la dirección en la que se propagan los impulsos nerviosos. Modificada de Tortora, et al. (2011).

En la sustancia gris de la médula y del encéfalo, los agrupamientos de cuerpos neuronales forman grupos funcionales conocidos como núcleos. Los núcleos sensitivos reciben información de los receptores correspondientes por medio de las neuronas sensitivas, y los núcleos motores envían información a los tejidos efectores a través de las neuronas motoras. La sustancia gris a cada lado de la médula espinal se halla dividida en regiones llamadas astas. Las astas grises anteriores contienen los núcleos motores somáticos, que generan impulsos nerviosos para la contracción de los músculos esqueléticos. Las astas grises posteriores contienen los núcleos sensitivos somáticos y autónomos. Entre las astas anteriores y posteriores se hallan las astas grises laterales en los segmentos torácicos bajo, lumbar y sacro de la médula espinal. Las astas laterales contienen los núcleos motores autónomos que regulan la actividad de los músculos lisos, el músculo cardíaco y las glándulas (Tortora, et al., 2011).

La sustancia blanca, al igual que la sustancia gris, está organizada en regiones. Las astas anteriores y posteriores dividen a la sustancia blanca de cada lado en tres áreas anchas denominados cordones (anteriores, posteriores y laterales). Cada cordón, contiene fascículos de axones que tienen un origen o un destino en común y que lleva información similar. Pueden extenderse a distancia hacia arriba o hacia abajo en la médula espinal y se denominan tractos. Los tractos son manojos de axones en el SNC. Los tractos sensoriales (ascendentes), consisten en axones que envían impulsos nerviosos hacia el cerebro. Los tractos que envían impulsos nerviosos desde el cerebro se denominan tractos motores (descendentes). Los tractos motores y sensitivos de la médula espinal se continúan con los tractos motores y sensitivos del encéfalo (Tortora, et al., 2011).

1.2. Lesión Traumática de Médula Espinal (LTME)

1.2.1. Epidemiología y Etiología de la LTME

La médula espinal es un órgano indispensable para que el cerebro pueda comunicarse con el resto del cuerpo y consecuentemente permite, entre varias otras cosas, el movimiento voluntario de músculos esqueléticos. Desafortunadamente la médula espinal puede lesionarse comprometiendo sus diversas funciones. La Lesión Traumática en Médula Espinal (LTME) es un problema de salud muy serio ya que puede provocar paraplejía o cuadriplejía, impidiendo a los individuos realizar sus actividades cotidianas. Existen aproximadamente 2.5 millones de personas en el mundo que padecen de una LTME y este número aumenta 130 000 al año (Jiang, Li, He, Bian, He, Wang, Yao & Zhu., 2016). La ocurrencia de este padecimiento tiene una distribución de edad bimodal, donde uno de los picos se encuentra entre las edades de 15 a 29 años y el segundo pico se encuentra arriba de los 65 años. La LTME ocurre más comúnmente en hombres y la mayoría de las lesiones se producen en la zona cervical (Ludwig, Patil, Chamczuk & Agrawal., 2017).

Las causas principales de la LTME en orden descendiente son; accidentes en vehículos de motor (50 %), caídas y lesiones relacionadas con el trabajo (30 %), heridas de bala o por crimen violento (11 %) y accidentes por deportes (9 %) (Ludwig, et al., 2017; Rowland, Hawryluk, Kwon & Fehlings., 2008). En Latinoamérica el 16.8 % de las lesiones están asociadas a armas de fuego, en Brasil 42 %, Turquía 25 %, Sudáfrica 21 %, en Estados Unidos de América 11.7 %, Europa occidental 4 % y Canadá 2 % (Zárate, Jiménez, Reyes, Robles, Cabrera & Rosales., 2016). En Pakistán, la causa principal de LTME en niños ocurre por armas de fuego, en muchos casos la causa son explosiones de bombas, esto es rara vez reportado en otros países (Darain, Arsh, Zeb, Ilyas, Muhammad & Khan., 2018).

En México el grupo más afectado son los hombres con una edad media de 37 años y se cree que las caídas son la causa principal (Rodríguez, Paredes, Grijalva & Rojano., 2016). La causa principal de LTME en EUA son accidentes automovilísticos y caídas de altitudes elevadas. La mayoría de las veces ocurre en hombres con edad media de 41 años. La mortalidad promedio anual se aproxima a 40 por millón de personas y 12 000 por año (Xun, Mamat, Guo, Mamati, Sheng, Zhang, Xu, Liang, Cao & Sheng., 2017). En el 2010 se reportó que la incidencia en los Estados Unidos de América varía al año entre 25 a 29 casos nuevos por millón de habitantes, esto significa que en dicho año hubo aproximadamente 12 400 nuevos casos de LTME (Devivo, 2012).

Se ha estimado que 282 000 ciudadanos estadounidenses viven actualmente con incapacidades relacionadas a una LTME. El costo del manejo del cuidado de dichos pacientes se aproxima a los 10 billones de dólares al año (Brau, Acevedo & Giovannetti., 2018). Los gastos médicos acumulados a lo largo de la vida de un paciente varían entre 500 000 a 2 millones de dólares (Kong & Gao, 2017).

1.2.2. Fisiopatología de la LTME

Dependiendo en la severidad de la lesión, los pacientes pueden incurrir en déficits neurológicos que van desde parálisis, pérdida del funcionamiento del intestino y de la vejiga, pérdida de sensaciones y del funcionamiento sexual, disfunción autonómica e incluso puede provocarles la muerte. Además, la secuela de la discapacidad ocasiona complicaciones sistémicas que incluyen neumonía, dependencia de ventilador, entre otras (Ludwig, et al., 2017). La patofisiología de la LTME se describe como bifásica; se divide en etapa primaria y etapa secundaria. Los mecanismos de la etapa secundaria pueden a su vez ser divididos en fases contiguas: la inmediata, aguda, intermedia y crónica (Rowland, et al., 2008). Las fases de la LTME y sus eventos patológicos principales son resumidos en la siguiente tabla.

Tabla 1. Fases de la LTME y sus eventos patológicos principales (Rowland, et al., 2008; Baptiste & Fehlings, 2006).

Tiempo después de la LTME				
Inmediato	≤2 Horas	≤48 Horas	≤14 Días	≤6 Meses
Lesión primaria	Lesión Secundaria			
	Fase Inmediata	Fase Aguda Temprana	Fase Subaguda	Fase Intermedia y crónica
<ul style="list-style-type: none"> ● Compresión ● Contusión ● Laceración ● Rotura ● Estiramiento agudo ● Aceleración/ desaceleración ● Desplazamiento de hueso o disco ● Fractura-dislocación ● Fractura por estallido ● Ruptura traumática de axones 	<ul style="list-style-type: none"> ● Hemorragia de materia gris ● Necrosis hemorrágica ● Activación de microglía ● Liberación de IL-1β, IL-6, TNF-α, entre otros 	<ul style="list-style-type: none"> ● Edema vasogénico y citotóxico ● Producción de ROS (peroxidación lipídica) ● Citotoxicidad mediada por glutamato ● Hemorragia ● Invasión de neutrófilos ● Desmielinización temprana ● Muerte neuronal ● Hinchamiento axonal ● Eventos sistémicos (Shock sistémico, Hipertensión, Hipoxia) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Infiltración de macrófagos ● Inicia cicatrización astrogial ● Reparación de la barrera hematoencefálica ● Resolución del edema 	<ul style="list-style-type: none"> ● Continúa formación de cicatrización glial ● Formación de quistes ● Estabilización de la lesión ● Degeneración Walleriana prolongada

1.2.2.1. Lesión Primaria

La lesión primaria se refiere al daño mecánico instantáneo que genera una lesión inicial. La fractura o dislocación de la espina dorsal imparte fuerza directamente en la médula espinal irrumpiendo los axones, vasos sanguíneos y membranas celulares. Los mecanismos físicos de la lesión primaria incluyen rotura, laceración, estiramiento agudo y lesiones por aceleración y desaceleración repentinas (Rowland, et al., 2008). El mecanismo de lesión primaria más común causante de parálisis ocurre por la compresión de la médula espinal debido al desplazamiento de hueso o discos en la columna vertebral durante la fractura-dislocación o fractura por estallido de la espina dorsal (Baptiste, et al., 2006).

Los mecanismos de la lesión primaria rara vez disrumpen completamente la continuidad anatómica de la médula. Comúnmente se encuentran axones que atraviesan el sitio de lesión. La existencia de estos axones cruzando la zona de la lesión es altamente significativo en términos terapéuticos y representa el blanco de varias estrategias terapéuticas emergentes (Rowland, et al., 2008).

1.2.2.2. Lesión Secundaria

1.2.2.2.1. Fase Inmediata

La fase inmediata comienza al momento de la lesión y dura 2 horas (Norenberg, Smith & Marcillo., 2004). Esta fase se caracteriza por los resultados inmediatos del evento causante de la lesión: los cortes traumáticos de los axones, la muerte inmediata de neuronas y glía y el fenómeno de shock espinal (Ditunno, Little, Tessler & Burns., 2004). El resultado es pérdida de función instantánea. El primer cambio patofisiológico detectable es hinchazón generalizado de la médula espinal, comúnmente acompañado de hemorragia en la materia gris central, donde las células inmediatamente comienzan a sufrir muerte necrótica causada por la disrupción mecánica directa de membranas

celulares o por la isquemia provocada por la disrupción vascular (Rowland, et al., 2008).

En esta fase se inician diversos procesos patofisiológicos, por ejemplo, se activan las células microgliales casi instantáneamente posterior a la lesión (Donnelly & Popovich, 2007), incrementa la producción de citocinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (Pineau & Lacroix., 2007), y la concentración de glutamato extracelular alcanza niveles citotóxicos (Wrathall, Teng & Choiniere., 1996).

1.2.2.2.2. Fase Aguda Temprana

La fase aguda se divide en la fase aguda temprana y fase subaguda. La fase aguda temprana es la fase blanco para intervenciones neuroprotectoras al ser en esta fase cuando los pacientes generalmente buscan ayuda hospitalaria para recibir tratamiento (Rowland, et al., 2008). Se considera que la fase aguda temprana dura de 2 a 48 horas posterior a la lesión y se caracteriza por hemorragia continua, edema creciente e inflamación. Adicionalmente marca el inicio de la producción de radicales libres, desregulación iónica, excitotoxicidad mediada por glutamato y neurotoxicidad asociada al sistema inmune (Tator & Koyanagi., 1997).

1.2.2.2.3. Fase Subaguda

La fase subaguda comienza dos días después de la lesión y perdura hasta dos semanas. En esta fase la respuesta fagocítica se encuentra en su punto máximo, removiendo residuos celulares del área de lesión y puede promover crecimiento axonal mediante la remoción de residuos de mielina que se comportan como inhibidores de crecimiento (Donnelly, et al., 2007).

1.2.2.2.4. Fase Intermedia

La fase intermedia corresponde de dos semanas a seis meses posteriores a la LTME, se caracteriza por la maduración continua de la cicatriz astrogial y por brotes de regeneración axonal. Los axones del tracto corticoespinal brotan de 3 semanas a 3 meses después de la lesión en un modelo de LTME en rata, mientras que las fibras reticuloespinales brotan de 3 a 8 meses después de la lesión (Hill, Beattie & Bresnahan., 2001).

1.2.2.2.5. Fase Crónica

La fase crónica inicia 6 meses después de la LTME y perdura a lo largo de toda la vida del paciente. Esta fase se caracteriza por la maduración y estabilización de la lesión. Se forma una cicatriz continua, quistes y/o siringomielia. También se observa una degeneración Walleriana que constituye el rompimiento axonal, desmielinización y remoción de residuos que ocurre distal a la lesión (Barton, St John, Clarke, Wright & Ekberg., 2017).

No se sabe cómo se inicia la degeneración Walleriana (Finn, Weil, Archer, Siman, Srinivasan & Raff., 2000), sin embargo, la degeneración intrínseca de los axones distales desprendidos se ha identificado como un evento clave en la degeneración Walleriana al provocar una cascada de respuesta celulares no neuronales, que provocan la limpieza de residuos inhibitorios en el nervio periférico y la generación de un ambiente que apoya la regeneración axonal meses después de la lesión (Gaudet, Popovich & Ramer 2011). Las citocinas juegan un papel crítico durante la fase temprana de degeneración Walleriana ya que facilitan la invasión de macrófagos y remueven residuos axonales y de mielina, esta es una precondition importante para la regeneración axonal (Dubový, 2017).

Se considera que 1 a 2 años después de la LTME, la lesión ha madurado completamente; desafortunadamente, no se mantiene estática y la formación de un

siringe puede causar disfunción neurológica retardada, como parálisis ascendente y dolor neuropático, hasta en 30 % de los pacientes (Stoodley, 2000).

1.2.3. Eventos Bioquímicos en la LTME

1.2.3.1. Desregulación Iónica y Excitotoxicidad

La pérdida de homeostasis iónica que ocurre posterior a una LTME está estrechamente ligada con la excitotoxicidad y contribuyen de manera significativa a la propagación de la lesión celular que ocurre después de la lesión (Schanne, Kane, Young & Farber., 1979). Posterior a la lesión, los niveles extracelulares de glutamato se elevan rápidamente debido al daño celular y por la falla de transportadores dependientes de energía, como lo es el transportador de membrana $\text{Na}^+ \text{K}^+$ adenosina trifosfatasa que en condiciones normales funciona para regular concentraciones extracelulares de iones, glutamato y otras moléculas. La excitotoxicidad es el resultado de la activación excesiva de receptores de glutamato, generando el influjo de Na^+ y Ca^{2+} a través de receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y a ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) (Lipton & Rosenberg., 1994). La desregulación de iones Ca^{2+} es un elemento común en la muerte celular (Schanne, et al., 1979) y provoca el inicio de varios procesos dañinos incluyendo la activación de calpaínas, disfunción mitocondrial y producción de radicales libres que culminan en la muerte celular (Lipton, et al., 1994).

1.2.3.2. Estrés Oxidativo

La generación de radicales libres alcanza su punto más alto aproximadamente 12 horas después de la lesión y se mantiene elevada por una semana aproximadamente, regresando a sus niveles basales 4 a 5 semanas después de la lesión (Rowland, et al., 2008). Los radicales libres, especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), están balanceadas mediante los antioxidantes; sistemas enzimáticos como superóxido dismutasa (SOD), catalasa,

glutación peroxidasa y antioxidantes no enzimáticos como Vitamina A, E, C, glutación, carotenoides y flavonoides. En la LTME se pierde el equilibrio oxido-reducción y genera estrés oxidativo (Anwar, Al Shehabi & Eid., 2016).

La microglía y leucocitos (macrófagos y neutrófilos) son una de las principales fuentes de ROS, cuyos componentes principales son superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos (OH^\cdot), los cuales se producen mediante la reacción Fenton donde reacciona un ion ferroso (Fe_2^+) y H_2O_2 , óxido nítrico (NO) y peroxinitritos ($ONOO^-$). Las ROS son sintetizados por sistemas enzimáticos como mieloperoxidasas, ciclooxigenasas, entre otros (Anwar, et al., 2016).

El NO actúa como mediador de procesos fisiológicos y patofisiológicos. Es sintetizado a partir de la arginina mediante la enzima óxido nítrico sintasa, esta enzima tiene tres diferentes isoformas; neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). iNOS está implicada de forma importante en procesos inflamatorios ya que produce cantidades excesivas de NO, que reaccionan con radicales superóxidos para generar RNS. La generación de RNS provoca peroxidación lipídica, fragmentación del ácido desoxiribonucleico (DNA), bloqueo de la respiración mitocondrial y consecuentemente degeneración celular (Anwar, et al., 2016). El estrés oxidativo contribuye de manera importante a la lesión secundaria ya que mediante la peroxidación lipídica favorece la disrupción axonal y la muerte de neuronas y glía. La peroxidación lipídica causa daño membranal, provoca lisis celular, disfunción de organelos y contribuye a la pérdida de homeostasis de calcio mediante la oxidación de lípidos membranales (Xiong, Rabchevsky & Hall., 2007).

El peroxinitrito generado por la reacción de óxido nítrico y el radical superóxido, es un mediador clave de la lesión mediada por ROS y se ha asociado directamente con la inducción de apoptosis en neuronas en la LTME de rata (Bao & Liu., 2003). Los radicales derivados de peroxinitrito (OH^\cdot , NO_2^- y CO_3^-) pueden iniciar daño celular por

lipoperoxidación atacando ácidos grasos o causando carbonilación proteica, al reaccionar con aminoácidos susceptibles. Los productos de la lipoperoxidación: malondialdehído y 4-hidroxinonenal, pueden a su vez unirse a proteínas celulares, comprometiendo su estructura e integridad funcional. Adicionalmente, NO_2^- puede nitrar la posición 3 de residuos de tirosina en proteínas, generando acumulación de 3-Nitrotirosina (Xiong, et al., 2007).

1.2.3.3. Inflamación

En la primera semana posterior a la LTME, los eventos inflamatorios tempranos generan un micro-ambiente hostil para una variedad de tratamientos. Durante las fases aguda y crónica ocurren reacciones inflamatorias sistémicas y locales, las cuales favorecen la formación de la cavidad y cicatrización glial en el parénquima medular, generando muerte neuronal y glial (Kong, et al., 2017). La inflamación puede ser dividida en las siguientes fases: Estimulación inmediata de microglía residente e invasión de neutrófilos que ocurre en los días 0-2 posterior a la lesión; reclutamiento de monocitos sanguíneos a la lesión en los días 3-7; y la formación de cicatriz por macrófagos antiinflamatorios y crecimiento axonal que ocurre posterior al día 7 (Faden, Wu, Stoica & Loane., 2016).

Los procesos inflamatorios en la LTME son altamente complejos e involucran numerosas poblaciones celulares además de varios mediadores no celulares incluyendo $\text{TNF-}\alpha$, interferones (IFN) e Interleucinas que también juegan un papel importante (Donnelly, et al., 2007; Fleming, Norenberg, Ramsay, Dekaban, Marcillo, Saenz, Pasquale, Dietrich & Weaver., 2006; Popovich, Wei & Stokes., 1997). El incremento de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e Interleucina 6 (IL-6) que generalmente acompaña a la LTME, provoca el incremento en inflamación y de agentes apoptóticos incluyendo al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB), al factor de transcripción Proteína Activadora 1 (AP-1), a la cinasa c-Jun

N-terminal (JNK), a la proteincinasa activada por mitógenos p38 (P38 MAPK) y a la prostaglandina E2 (PGE₂) (**Fig. 4**) (Ludwig, et al., 2017).

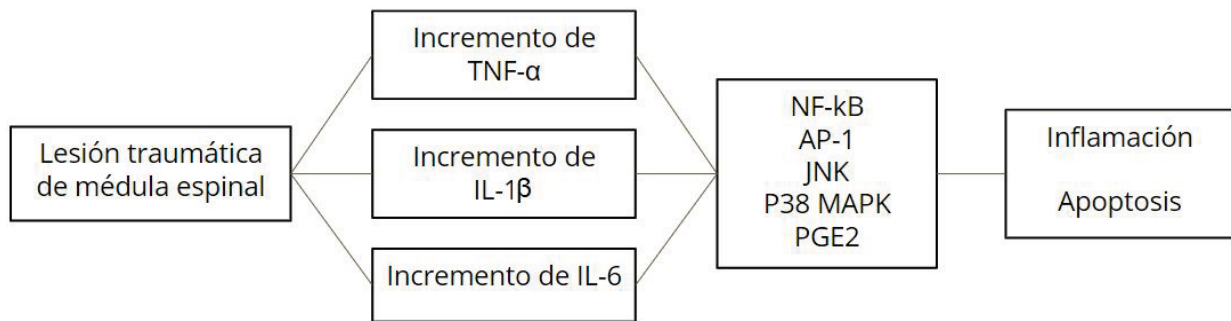


Figura 4. Agentes inflamatorios y apoptóticos en fase aguda temprana. La LTME provoca el incremento de TNF- α , IL-1 β e IL-6, estas citocinas provocan el aumento de agentes apoptóticos e inflamatorios (Ludwig, et al., 2017).

Los neutrófilos y monocitos/macrófagos infiltrados liberan O₂⁻ y H₂O₂ como un esfuerzo para esterilizar la zona de la lesión. Los fagocitos sanguíneos activados que se infiltraron generan cantidades enormes de O₂⁻ mediante la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa. El O₂⁻ puede ser convertido a H₂O₂ por efecto de la SOD y este a su vez puede ser convertido a radicales libres. La presencia de estos oxidantes en un tejido que se encuentra herido, inactiva las antiproteasas locales y activa a proteasas como metaloproteinasas de la matriz y colagenasas. Estas enzimas hidrolizan a su propio inhibidor, de manera que el resultado es un ataque incontrolado de enzimas de neutrófilos, incluyendo elastasas, colagenasas, gelatinasas, entre otras enzimas destructoras que tienen la capacidad de degradar tejidos fuera de la zona inflamada (Bao, Dekaban & Weaver., 2005).

Por otro lado, debemos considerar las acciones benéficas con las que participa la respuesta inflamatoria. Un ejemplo de la naturaleza dual de la respuesta inmune son los múltiples papeles que se observan en el comportamiento del TNF- α después de la lesión. Esta citocina es clave en la inflamación y aumenta su producción posterior a la LTME en neuronas, glía y células endoteliales. Su inhibición con anticuerpos neutralizantes ha demostrado mejorar la recuperación funcional neurológica (Bethea,

Nagashima, Acosta, Briceno, Gomez, Marcillo, Loor, Green & Dietrich., 1999), sin embargo, la señalización del mismo factor también ha demostrado tener un papel neuroprotector *in vitro* (Cheng, Christakos & Mattson., 1994) e *in vivo* (Kim, Xu, Song, Yan, Ku, Xu & Hsu., 2001). La inflamación también se muestra como una ventaja en cuanto a la recuperación funcional y la regeneración neuronal. Por ejemplo, la inflamación en la LTME mediada por macrófagos/microglía estimulados, juega un papel importante en la remoción del tejido dañado o deteriorado eliminando posibles inhibidores de crecimiento (Kong, et al., 2017).

1.2.3.4. Muerte Celular Apoptótica y Necrótica

La muerte celular posterior a la LTME puede ocurrir por necrosis y apoptosis. Mientras que la necrosis predomina inmediatamente después del episodio traumático primario, en la fase subaguda se induce apoptosis predominantemente en oligodendrocitos y en menor medida en neuronas. El proceso de la apoptosis es parcialmente dependiente en la activación de los receptores Fas (grupo de diferenciación 95 ó CD95), también conocido como antígeno apoptótico 1 (APO-1), de oligodendrocitos (Casha, Yu & Fehlings., 2001) y de la señalización mediante el receptor de neurotrofina p75 (Chu, Yu & Fehlings., 2007). Posterior a la LTME, el ligando Fas es expresado por la microglía y por linfocitos invasores mientras que el FasR se encuentra predominantemente en oligodendrocitos y en menor medida en neuronas. La interacción de Fas y de FasR, inicia la apoptosis mediante la activación de caspasas, que conlleva a la proteólisis y rompimiento del DNA por caspasas efectoras culminando en la muerte celular (Casha, et al., 2001).

Los oligodendrocitos también son susceptibles a la muerte celular excitotóxica posterior a la lesión debido a la expresión de receptores de NMDA (Stys & Lipton., 2007). La pérdida de oligodendrocitos resulta en desmielinización persistente que alcanza su punto máximo aproximadamente 24 horas después de la lesión provocada en ratas (Totou & Keirstead., 2005). Algunas causas del desencadenamiento de

apoptosis en la LTME, incluyen, pero no están limitadas a anomalías vasculares, isquemia-reperfusión, excitotoxicidad mediada por glutamato, desbalance iónico, estrés oxidativo e inflamación (Baptiste, et al., 2006).

1.3. Hormonas Esteroides

Las hormonas esteroides actúan para coordinar eventos complejos involucrados en el desarrollo, diferenciación y respuesta fisiológica. Las hormonas esteroides incluyen a las hormonas sexuales principales (esteroides sexuales); progesterona (P4), estrógeno y testosterona. Los esteroides sexuales provocan el desarrollo y determinación del sistema reproductivo embrionario, masculinizan o feminizan el cerebro al nacimiento, controlan la reproducción y el comportamiento reproductivo en adultos, y controlan el desarrollo de características sexuales secundarias (Evans, 1988).

Los estrógenos principales incluyen al estradiol (E2), la estrona y el estriol. El E2 y la P4 son producidos por los ovarios, pero también pueden ser producidos localmente en tejidos como el adiposo (Wierman, 2007). La testosterona es el andrógeno principal, en los hombres es secretada casi en su totalidad por los testículos y en las mujeres se secreta en ovarios y glándulas adrenales (Snyder, 2008). Estas hormonas esteroides son producidas en las glándulas esteroidogénicas periféricas. A estas hormonas sexuales se les considera como neuroactivas ya que regulan la actividad del sistema nervioso mediante su interacción con receptores nucleares y vías de señalización de membrana y citoplasmáticas (Melcangi, García LMS & Mensah., 2008)

Las hormonas esteroides son sintetizadas a partir del colesterol en la corteza adrenal y en gónadas. Las células y tejidos esteroidogénicos obtienen colesterol para la síntesis de las hormonas esteroides de distintas maneras; pueden tomarlo del colesterol presente en la membrana plasmática, sintetizar colesterol *de novo* a partir de acetato u obtenerlo desde el plasma a partir de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o

de lipoproteínas de alta densidad (HDL), o mediante la hidrólisis de ésteres almacenados (Guyton & Hall., 2011) (**Fig. 5**).

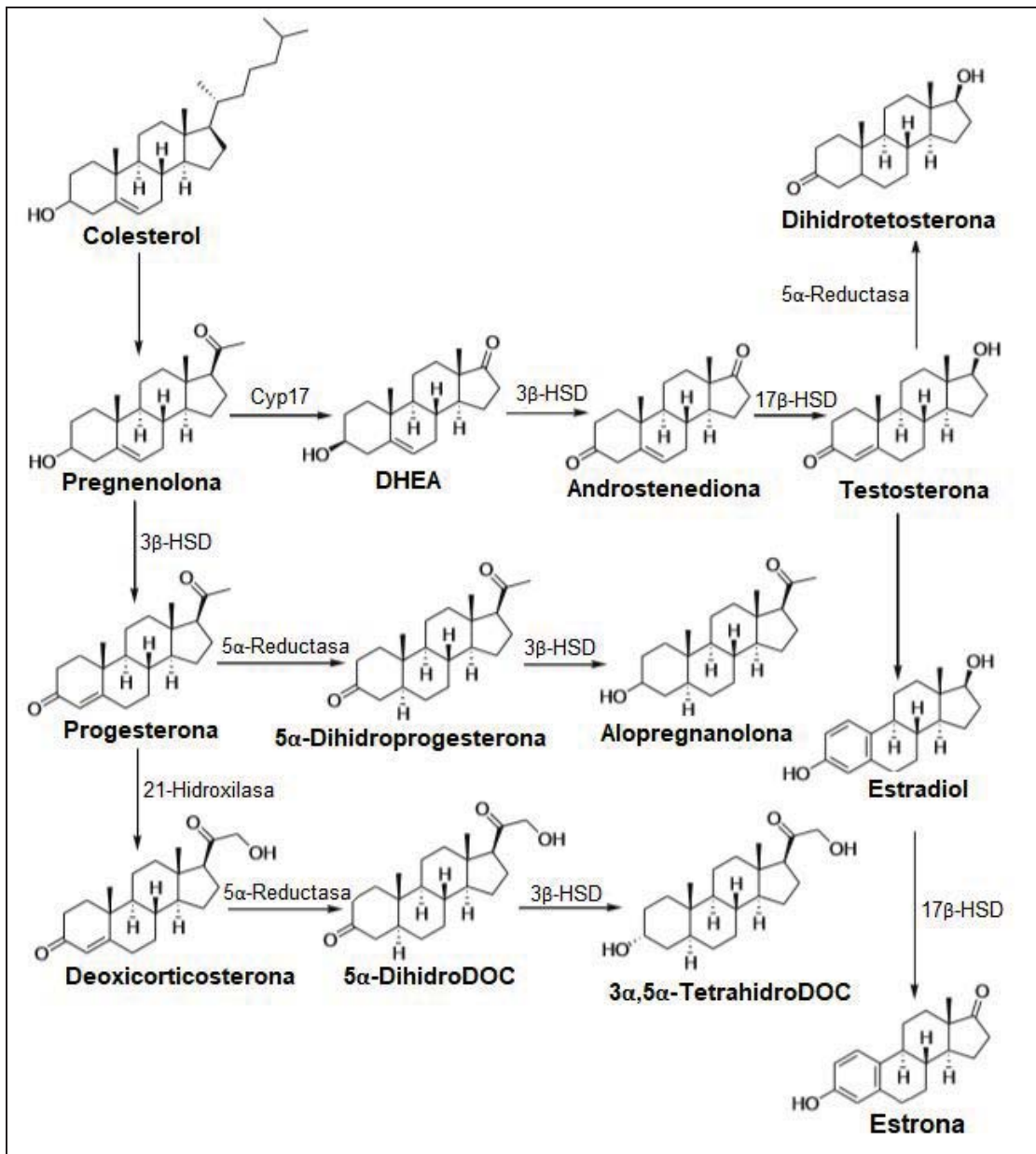


Figura 5. Ruta de Biosíntesis de esteroides. P450 scc: Citocromo p450; Cyp17: Citocromo p450 17- α -hidroxilasa; DHEA: dehidroepiandrosterona; 3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 17 β -HSD: 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 5 α -hidroDOC: 5 α -dihidro desoxicorticosterona; 3 α ,5 α -tetrahidroDOC: 3 α ,5 α -tetrahidro desoxicorticosterona. Modificada de Bansal & Singh. (2018).

En los primeros pasos del proceso biosintético, el colesterol es convertido a pregnenolona mediante la acción del citocromo p450 dentro de la mitocondria. La

pregnenolona dentro de la mitocondria o en el compartimiento citoplasmático, es convertido a progesterona y dehidroepiandrosterona (DHEA) por la acción de 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) y citocromo p450 17α -hidroxilasa (Cyp17) respectivamente. La conversión de progesterona a 5α -dihidroprogesterona (5α -DHP) y desoxicorticosterona es catalizado por la 5α -reductasa y 21 -hidroxilasa respectivamente. Posteriormente se forma alopregnanolona ($3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro progesterona) por la acción catalítica que tiene 3β -HSD sobre la 5α -DHP y la desoxicorticosterona se convierte en 5α -dihidro desoxicorticosterona (5α -hidroDOC) y luego a $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro desoxicorticosterona ($3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroDOC) bajo la influencia de las enzimas 5α -reductasa y 3β -HSD. Por otro lado, DHEA se convierte en androstenediona mediante la acción de 3β -HSD, la cual a su vez se transforma en testosterona en presencia de 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD). La enzima aromatasa cataliza la conversión de testosterona a estradiol, mientras que la 5α -reductasa convierte a la testosterona a dihidrotestosterona. El estradiol, en presencia de 17β -HSD es convertido a estrona (Bansal, et al., 2018).

Las hormonas esteroides ejercen sus acciones mediante distintos mecanismos. Las respuestas celulares rápidas son generalmente asociadas con receptores de superficie celulares, incluyendo receptores de factores de crecimiento y receptores acoplados con proteína G, y están vinculados con vías corriente abajo incluyendo la movilización del calcio, activación de cinasas y producción de óxido nítrico. Las respuestas celulares lentas (genómicas) inducidas por esteroides están asociados con factores de transcripción activados por ligando. La mayoría de las hormonas inician tanto eventos rápidos de señalización como respuestas lentas de transcripción (Prossnitz & Maggiolini., 2009). Los cambios de transcripción génica en las vías genómicas ocurren después de 30-60 minutos mientras que la vía no genómica influencia la función celular en segundos a minutos (Lorenzo, 2003).

1.4. Acción Neuroprotectora de las Hormonas Sexuales

Las hormonas sexuales, al unirse a sus receptores a hormonas, regulan la expresión de fosfatasa, cinasas y la transcripción de diversos genes, de esta manera incrementan la vida celular de la neurona previniendo apoptosis, excitotoxicidad y la producción de radicales libres. Las hormonas sexuales atenúan las consecuencias dañinas de la LTME mediante su interacción con el sistema GABA (Bansal, et al., 2018).

La Progesterona activa la vía MAPK/ERK, así como una vía de supervivencia alternativa: la vía de Akt. La activación de MAPK cinasa regulada por la señal extracelular (ERK) es necesaria para la neuroprotección inducida por estrógeno y la activación de Akt está asociada al aumento en supervivencia neuronal. La neuroprotección de la progesterona en la LTME está asociada a la regulación positiva del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), al incremento en los niveles y la actividad de la acetiltransferasa colina y a la reducción de la disfunción mitocondrial. En modelos de isquemia cerebral los efectos protectores de la progesterona son atribuidos en parte a la supresión de respuestas inflamatorias y de la expresión de óxido nítrico sintasa-2 (Brinton, Thompson, Foy, Baudry, Wang, Finch, Morgan, Pike, Mack, Stanczyk & Nilsen., 2008).

La testosterona también juega un papel en la neuroprotección. Esta hormona puede cruzar libremente la barrera hematoencefálica y estimular células neuronales. La testosterona puede actuar directamente mediante la vía de andrógenos o indirectamente mediante la vía de su conversión a estrógeno. Se ha observado que la activación de las vías de andrógenos en células neuronales cultivadas provoca diferenciación neuronal e incremento del crecimiento de neuritas, sin embargo, a diferencia del estradiol, hay evidencia de que la testosterona no provee

neuroprotección significativa en contra de la neurotoxicidad inducida por glutamato (Bialek, Zaremba, Borowicz & Czuczwa., 2004)

El estrógeno protege contra especies reactivas de oxígeno de la mitocondria gracias a sus propiedades antioxidantes y puede alterar moléculas pro y antiapoptóticas que actúan en la mitocondria; el estrógeno puede incrementar los marcadores antiapoptóticos bcl-2 y bcl-xl mientras que disminuye al marcador proapoptótico bax. Los estrógenos también tienen un efecto supresor en la neuroinflamación (Spence & Voskuhl., 2012) al reducir la gliosis reactiva y la liberación de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 e IL-6 bajo condiciones neuronales alteradas (Bansal, et al., 2018).

El estradiol (E2) es la hormona estrogénica más potente en circulación y está involucrada en una variedad de funciones fisiológicas que van desde el desarrollo y mantenimiento de órganos reproductores hasta la regulación de la homeostasis del sistema cardiovascular, musculoesquelético, inmune y del sistema nervioso central (Yasar, et al., 2017). El E2 inhibe la activación de la microglía por lipopolisacáridos y puede inhibir la localización intracelular del NF-kB, lo cual puede prevenir la activación de una variedad de genes inflamatorios (Spence, et al., 2012). Adicionalmente, el E2 actúa como un antioxidante potente y protege a las neuronas de la toxicidad inducida por glutamato y el daño oxidativo mediado por peróxido (García, Azcoitia & DonCarlos., 2001) mediante la vía MAPK. La neuroprotección también puede estar mediada por la vía del receptor de insulina estimulado por estrógenos/PI3K/Akt (Moriarty, Kim & Bender., 2006).

Los efectos biológicos y neuroprotectores de las hormonas sexuales pueden ser mediados por cuatro vías (Melmed & Conn., 2007). Se usa al E2 como ejemplo al haberse observado que este realiza todas las vías (**Fig. 6**):

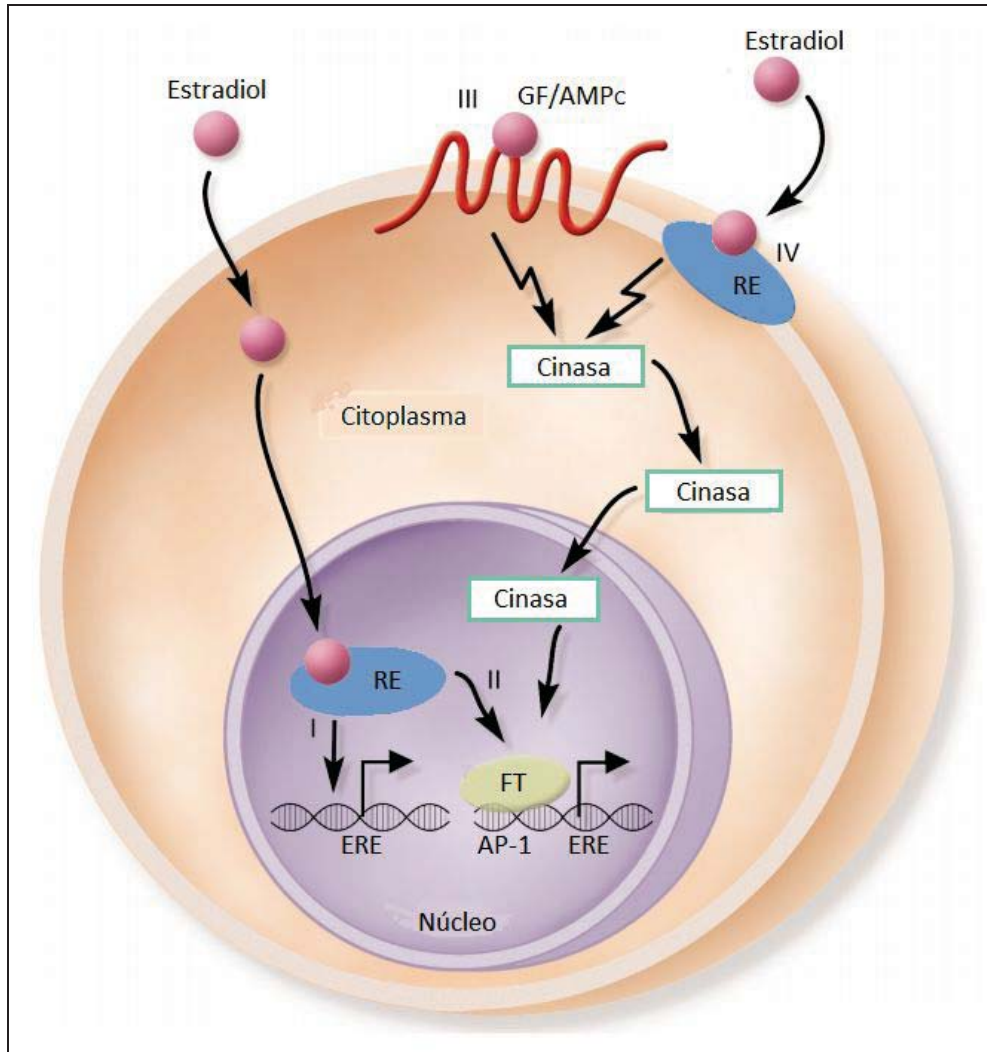


Figura 6. Mecanismos clásicos y no clásicos de la señalización del estradiol. RE, Receptor a estrógenos; FT, Factor de transferencia; ERE, Elemento de respuesta a estrógenos; GF, Factor de crecimiento; AMPc, Adenosin monofosfato cíclico. Las vías I y II dependen de la interacción directa del estradiol con su receptor nuclear. Una vez activado, el complejo receptor estrógeno puede mediar directamente la transcripción celular (I) o interactuar con factores de transcripción (II) para influenciar su actividad. Las vías III y IV funcionan más rápido y dependen de la habilidad del estradiol o de ligandos no hormonales para interactuar con receptores no esteroideos (III) o receptores de hormonas esteroideas en la membrana (IV). Estas vías activan cinasas que regulan la transcripción de genes específicos. Modificada de Lorenzo (2003).

- 1) **Vía clásica dependiente de ligando;** El esteroide entra libremente a la célula cruzando la membrana plasmática y la nuclear, y se queda únicamente en células que tienen su receptor localizado en el núcleo. La unión del esteroide al RE promueve alteraciones en la conformación del receptor,

- favoreciendo la unión con proteínas coactivadoras y con EREs. Los complejos E2-RE se unen a promotores blancos en el elemento de respuesta estrogénico (ERE) provocando un incremento o disminución en la regulación de la transcripción génica y subsecuente respuesta de tejido.
- 2) **Vía independiente de ERE;** Los complejos E2-RE alteran la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta alternativos al interactuar con el sitio de unión a AP-1, mediante la asociación con otros factores de transcripción unidos a DNA (Fos/Jun), los cuales unen el RE activado al DNA, resultando en la regulación de la expresión genética.
 - 3) **Vía independiente de ligando;** Factores de crecimiento (GF) o adenosín monofosfato cíclico (AMPC) activan vías de cinasas intracelulares, produciendo una fosforilación y activación del RE en promotores que contiene el ERE de una manera independiente de ligando.
 - 4) **Vía de señalización de superficie celular;** E2 activa sitios de unión asociado a una membrana, posiblemente una forma de RE unido a vías de transducción de señales (Melmed, et al., 2007).

1.5. Hormonas Sexuales en el Tratamiento de la LTME

Algunos estudios en modelos animales han mostrado diferencias en género en los desenlaces funcionales de la LTME, con una recuperación locomotora notoriamente mejor en roedores hembras (Hauben, Mizrahi, Agranov & Schwartz., 2002), marcando la importancia de los efectos benéficos de los estrógenos y la progesterona. Es importante notar que el tiempo de la administración de estrógenos es crítico para asegurar el resultado de la neuroprotección. Si los estrógenos son administrados muy tarde en la enfermedad no son protectores (Spence, et al., 2012).

El estradiol previno muerte celular apoptótica inducida por la LTME y mejoró la recuperación funcional posterior a la LTME (Samantaray, Smith, Das, Matzelle, Varma,

Ray & Banik., 2011; Hu, Sun, Zhang, Chen, Wu, Meng, Cui, Hu, Li, Lin, Wan Q & Feng., 2012). Además, un tratamiento preventivo con un agonista de RE atenuó apoptosis inducida por TNF α en motoneuronas espinales (Das, Smith, Gibson, Varma, Ray & Banik., 2011).

La progesterona también ejerce efectos neuroprotectores en la LTME. En ratas, posterior a una LTME, el tratamiento con progesterona mejora significativamente los déficits neurológicos con una recuperación histológica asociada (Thomas, Nockels, Pan, Shaffrey & Chopp., 1999) e incrementó la expresión de la MBP. De manera relacionada, el tratamiento con progesterona restaura la proliferación y diferenciación de oligodendrocitos y previene la degeneración de neuronas motoras después de una LTME en ratones (De Nicola, Labombarda, Gonzalez, Gonzalez, Garay, Meyer, Gargiulo, Guennoun & Schumacher., 2009).

La testosterona es un neuroprotector contra estrés oxidativo (Ahlbom, Prins & Ceccatelli., 2001), y protege contra muerte celular (Pike, 2001). La testosterona acelera la regeneración axonal y la recuperación funcional posterior a una axotomía (Jones, Brown & Damaser., 2001). Se sabe que la muerte neuronal induce atrofia dendrítica y un déficit concomitante en excitabilidad en neuronas motoras espinales. Sin embargo, el tratamiento con testosterona atenúa estos cambios regresivos en morfología y función (Fargo, Foster & Sengelaub., 2009).

Algunas ventajas del uso de hormonas sexuales como tratamiento incluyen que los efectos secundarios son limitados o más fácilmente anticipados en comparación con posibles terapias exógenas, así como la fácil accesibilidad y bajo costo de las hormonas en cuestión (Ludwig, et al., 2017). Sin embargo, debe considerarse la falta de especificidad y selectividad que poseen dichas hormonas, así como su corta vida media, baja bioaccesibilidad oral y rápido metabolismo (Rey & Coirini., 2015). También es importante considerar que el uso terapéutico del estradiol está limitado por sus

acciones hormonales periféricas, ya que aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama, de ovario y de endometrio. Debido a esto se han realizado múltiples estudios que ponen a prueba el potencial neuroprotector de diferentes compuestos estrogénicos, que imitan las acciones protectoras del estradiol, pero tienen ausencia de los efectos indeseables (Chuffa, Lupi, Costa, Amorim & Seiva., 2017).

1.6. Tibolona en el Sistema Nervioso Central

Las modificación de los neuroesteroides es un enfoque atractivo para producir agentes neuroprotectores para el tratamiento de varias patologías del sistema nervioso (Bansal, et al., 2018). Uno de estos esteroides sintéticos con acciones estrogénicas, androgénicas y progestagénicas es la tibolona. La tibolona puede usarse en la terapia de reemplazo hormonal ya que tiene propiedades neuroprotectoras y a diferencia del estrógeno, la tibolona no tiene actividad estrogénica en los tejidos endometriales ni en los mamaros (Pinto, Segura, Farfán & Guerra., 2017).

La tibolona se usa para el manejo de síntomas post menopáusicos ya que alivia los bochornos y la sequedad vaginal, mejora el humor, la libido y previene la osteoporosis (Verheul, van Lersel, Delbressine & Kloosterboer., 2007). Este fármaco se administra por vía oral con una dosis de 1.25 y 2.5 mg/día (Huang & Baber., 2010). La tibolona es un esteroide sintético clasificado como un modulador de actividad estrogénica de tejido selectivo (STEAR) que imita las acciones protectoras del estradiol sin ejercer los efectos secundarios indeseables propios de la administración de estradiol (Crespo, et al., 2018). La tibolona ejerce acciones específicas de tejido mediante diferentes mecanismos. Su especificidad depende de su transformación local específica de tejido para activar metabolitos que ejercen actividades estrogénicas, progestagénicas y androgénicas. La tibolona es convertida a sus metabolitos 3 α - y 3 β -hidroxi tibolona mediante la enzima 3 α (3 α -HSD) y 3 β -hidroxiesteroide (3 β -HSD) deshidrogenasa respectivamente. Adicionalmente la tibolona, mediante la acción de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (Δ -5-4 isomerasa), se convierte

en su $\Delta 4$ -isómero (**Fig. 7**) (Crespo, et al., 2018). Ambos 3-hidroxi metabolitos se unen a receptores estrógeno y son responsables de la actividad estrogénica. Los niveles en suero de tibolona y el 4-isómero de tibolona se unen a receptores a progestágenos y a androgénicos (Verheul, et al., 2007).

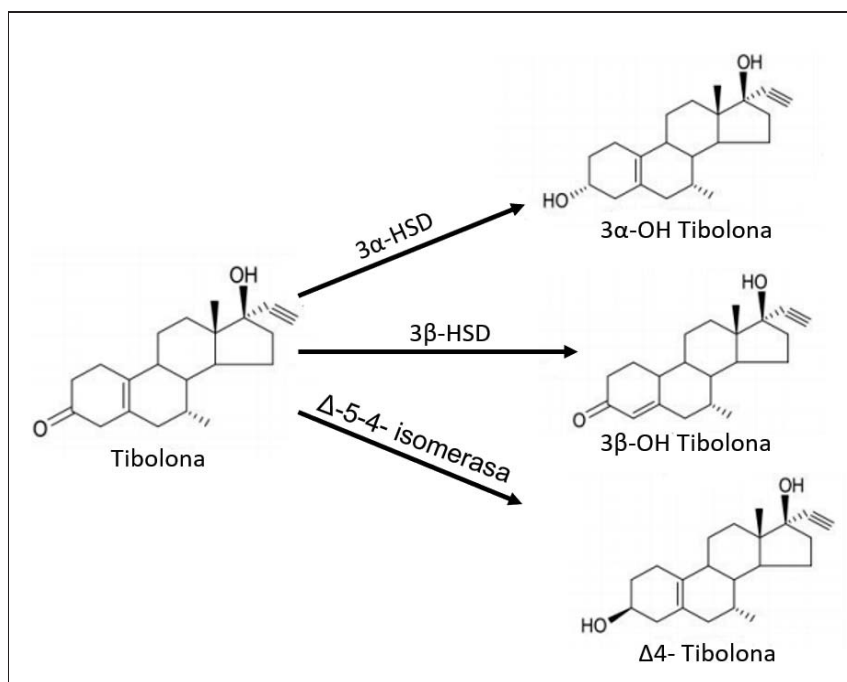


Figura 7. Estructura de la Tibolona y sus metabolitos. La tibolona es convertida a sus metabolitos 3 α - y 3 β -hidroxi tibolona mediante la enzima 3 α (3 α -HSD) y 3 β -hidroxiesteroide (3 β -HSD) deshidrogenasa respectivamente. Adicionalmente la tibolona, mediante la acción de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa (Δ -5-4-isomerasa), se convierte en su $\Delta 4$ -isómero. Modificada de Verheul, et. al. (2007).

Se sabe que la tibolona tiene efectos en el sistema nervioso ya que revierte la pérdida de espinas dendríticas causadas por la ovariectomía en células piramidales del hipocampo en rata (Beltrán, Díaz, Padilla, Aguilar, Rios & Diaz., 2015). También se han realizado estudios *in vitro* de células gliales que han revelado que la tibolona reduce el daño por estrés oxidativo y ejerce acciones antiinflamatorias al disminuir la activación del NF-kB (Crespo, et al., 2018). El esteroide también atenúa la respuesta de GABA(B) en neuronas hipotalámicas (Qiu, Bosch, Ronnekleiv, Kloosterboer & Kelly., 2008). Adicionalmente la tibolona reduce la actividad de acetilcolinesterasa y acetiltransferasa colina en el septum medial del área de Broca en monos ovariectomizados (Gibbs,

Nelson, Anthony & Clarkson., 2002), sugiriendo una modulación en las neuronas colinérgicas.

Se ha observado que la tibolona reduce la hiperfosforilación de la proteína Tau neuronal en el hipocampo y el cerebro (Pinto, Calzada, Campos & Guerra., 2012). La tibolona reduce la ansiedad en ratas jóvenes hembras (Aguiar, Dickel, Cunha, Monserrat, Barros & Martínez., 2006) y el estrés oxidativo (Farfán, Castillo, Pinto, Rivas, Gallardo & Guerra., 2014). Se han reportado efectos neuroprotectores de la tibolona en lesión aguda del cerebro (Vergouwen, Anderson & Meyer., 2000) y en lesión del cerebro por apuñalamiento en la corteza cerebral (Crespo, et al., 2018). A pesar de existir varios estudios de el efecto de la tibolona en el cerebro, sus efectos en la médula espinal no han sido estudiados.

1.7. Receptores Nucleares Hormonales

La superfamilia de los receptores nucleares (NR) describen una serie de diversos factores de transcripción especializados que incluyen a receptores nucleares hormonales (NHR) y receptores nucleares huérfanos (Novac & Heinzl., 2004). Las hormonas lipofílicas, como lo son los esteroides sexuales, pueden atravesar la membrana plasmática y entrar al interior celular donde se encuentran los receptores a hormonas esteroides (SHR) que pueden ser nucleares o citosólicos (Olefsky, 2001). Una vez activados, los NR regulan directamente la transcripción de genes que controlan una amplia variedad de procesos biológicos, incluyendo proliferación, desarrollo, metabolismo y reproducción (Sever & Glass., 2013). Los NHR controlan la transcripción génica al reclutar a proteínas que causan la remodelación de la cromatina o que causan modificaciones postraduccionales a las histonas que promueve una estructura relajada o una estructura represiva de la cromatina (Bagamasbad & Denver., 2010).

1.7.1. Estructura de los Receptores Nucleares (NHR)

Todos los receptores nucleares tienen características en común de secuencia y estructura, y se unen como homodímeros, heterodímeros o monómeros a secuencias específicas de DNA (elementos de respuesta) en la región promotora de genes diana. De esta manera regulan (al promover o reprimir) la transcripción de dichos genes diana en respuesta a una variedad de ligandos endógenos (Alexander, Cidlowski, Kelly, Marrion, Peters, Faccenda, Harding, Pawson, Sharman, Southan, Davies & CGTP Collaborators., 2017). Los NHR reconocen secuencias de DNA llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE) los cuales se derivan de pares de secuencias con el consenso RGGTCA (R es una purina) (Sever, et al., 2013).

Los seis dominios de los receptores nucleares consisten en regiones de función y secuencia conservada (**Fig. 8**). Todos los receptores nucleares incluyen un dominio central de unión a DNA (DBD) responsable de dirigir el receptor a secuencias altamente específicas de DNA que constituyen un elemento de respuesta (Olefsky, 2001). El DBD es el dominio más conservado compartido por receptores nucleares y consiste en dos módulos dedo de zinc ricos en cisteína que facilitan las interacciones de secuencias específicas con la ranura principal de la doble hélice de DNA. En el primer dedo de zinc se encuentran unos módulos proteicos cortos conocidos como P-box y DR-box, estos tienen un papel muy importante en determinar la especificidad de secuencia del DNA blanco de los receptores nucleares. El bucle P, situado entre las últimas dos cisteínas del primer dedo de zinc confiere la unión a distintos elementos específicos de respuesta para diferentes grupos de receptores nucleares (Novac, et al., 2004). El P-box de receptores nucleares como los SHR, permite que estos receptores reconozcan su HRE: GGT/AACAnnnTGTTCT (Grimm, Hartig & Edwards., 2016). La DR-box, que se encuentra entre el segundo y el tercer residuo de cisteína del primer dedo de zinc es un módulo corto que constituye una interfase de dimerización asimétrica y sus secuencias de aminoácidos es crítica para la discriminación entre

diferentes elementos de respuesta. El D-box es otra secuencia corta de aminoácidos que ha mostrado participar en la interfase de dimerización de receptores esteroideos (Novac, et al., 2004).

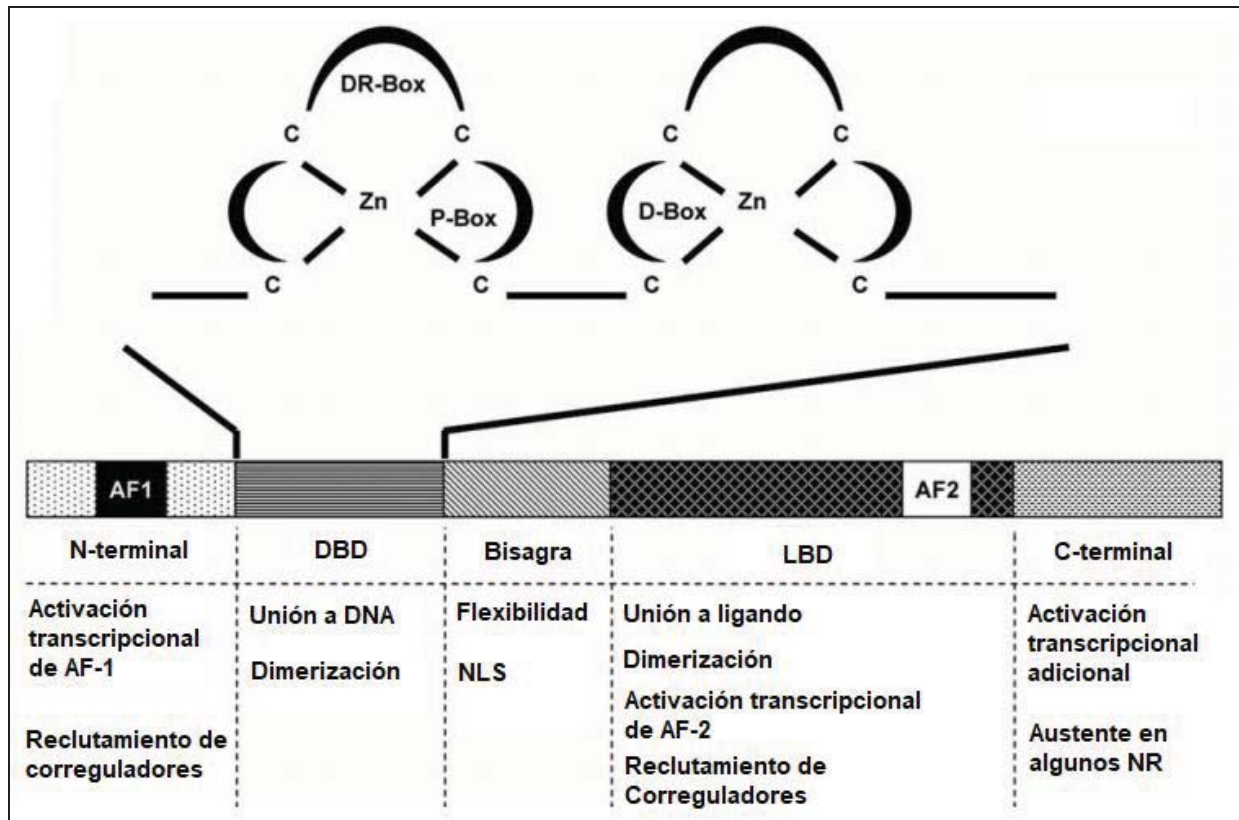


Figura 8. Características y funciones de los dominios estructurales de los Receptores Nucleares. DBD, Dominio de unión a ligando; LBD, Dominio de unión a ligando; NLS, Secuencia de localización nuclear; NR, receptores nucleares. Se muestra una representación esquemática de los dos dedos de zinc formados por la estructura proteica del DBD encima de la estructura genérica de los NR. Se indican las posiciones de los DR-, P- y D-box dentro de cada bucle peptídico correspondiente. Adicionalmente se enlistan las funciones características de cada dominio. Modificada de Novac, et al. (2004).

El dominio de ligando (LBD) se encuentra en la mitad C-terminal del receptor y reconoce hormonas específicas y ligandos no hormonales direccionando especificidad en la respuesta biológica (Olefsky, 2001). Este dominio muestra un nivel más bajo de conservación en comparación al DBD. El ligando se une a una cavidad hidrofóbica en el centro del LBD. La unión del ligando genera un cambio conformacional en el LBD de

manera que el ligando se convierte en una parte integral del centro hidrofóbico del receptor, estabilizando la estructura tridimensional (Novac, et al., 2004). Situado entre el DBD y el LBD hay un dominio de bisagra de longitud variable (Olefsky, 2001). Esta región contiene una secuencia de localización de nuclear (NLS) y las altamente conservadas extremidades de esta región son partes de los dominios DBD y LBD adyacentes (Novac, et al., 2004).

La parte C-terminal de la región de la bisagra contiene un módulo responsable de las interacciones reguladas por ligando entre receptores y moduladores transcripcionales (Novac, et al., 2004). La mayoría de los receptores también contienen una región C-terminal de longitud variable, cuya función es poco entendida. La región N-terminal variable contiene una función de activación AF-1; una superficie de activación transcripcional, y el extremo C-terminal de la molécula, dentro del LBD, contiene un dominio AF-2, el cual es otra región de activación transcripcional que es dependiente de ligando (Olefsky, 2001). AF-1 funciona en presencia de un promotor y/o de manera específica de célula y coopera con AF-2 en la regulación de la transcripción. La región AF-1 es la menos conservada tanto en secuencia como en tamaño de los NR. En contraste con el dominio AF-2, el cual está altamente estructurado (Novac, et al., 2004).

Muchas moléculas correguladoras diferentes se unen a AF-1 y estabilizan la estructura del dominio N-terminal. La actividad de AF-1 puede ser regulada mediante fosforilación la cual estabiliza el complejo AF-1-coactivador incrementando la polaridad del receptor y creando puntos específicos de interacción entre el receptor y el coactivador. En los NHR, las funciones de activación individuales de AF-1 y AF-2 pueden actuar cooperativamente para reclutar moduladores de transcripción como NCoA y TIF2. La comunicación entre ambas superficies de regulación transcripcional es requerida para alcanzar la actividad transcripcional total de receptores a esteroides (Novac, et al., 2004).

1.7.2. Categorización de los Receptores Nucleares (NR)

Los receptores nucleares pueden ser agrupados en cuatro subfamilias basándose en su modo de acción (**Fig. 9**).

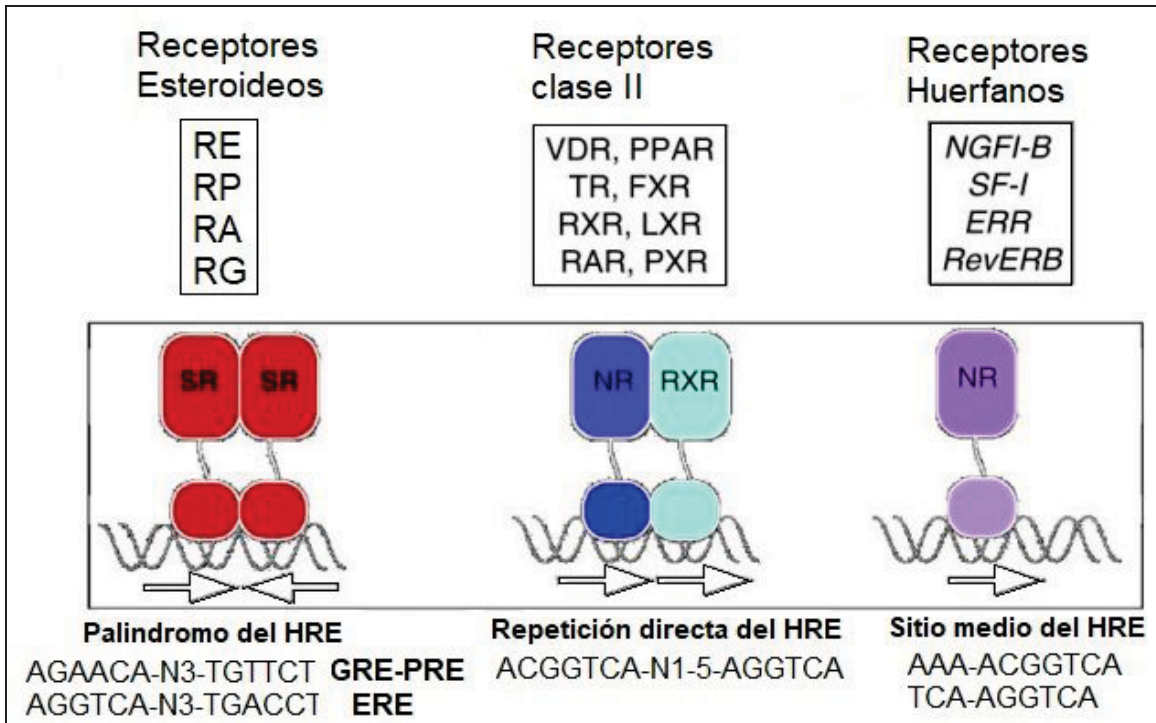


Figura 9. Familias de receptores nucleares y sus elementos de respuesta hormonal (HRE). RE, receptor a estrógeno; RP, receptor a progesterona; RA, receptor a andrógeno; RG, receptor a glucocorticoides; SR, receptor a esteroide; HRE, elemento de respuesta a hormona; GRE, elemento de respuesta a glucocorticoide; PRE, elemento de respuesta a progestágenos; ERE, elemento de respuesta a estrógeno; VDR, receptor a vitamina D; PPAR, receptor activado por proliferador de peroxisoma; TR, receptor a hormona tiroidea; FXR, receptor farnesoide X; RXR, receptor X retinoide; LXR, receptor X del hígado; RAR, receptor de ácido retinoico; PXR, receptor de pregnano X; NGFI-B, factor de crecimiento de nervios inducido-B; SF-1, factor esteroideogénico-1; ERR, receptor relacionado con el estrógeno; RevERB, NR subfamilia 1, grupo D, miembro 2. Modificada de Wierman (2007).

. El primer subtipo consiste en los receptores a hormonas esteroides (SHR), que funcionan principalmente como homodímeros inducidos por ligando. Estos receptores se unen a sus elementos de respuesta acomodados en repeticiones invertidas (palíndromos) (Novac, et al., 2004). A este grupo pertenecen el receptor a andrógenos (RA), el receptor a estrógeno (RE), el receptor a progesterona (RP), entre otros (Sever,

et al., 2013). Los SHR pueden ser divididos en tres grupos basándose en su distribución en su forma no ligada: RE se encuentra de manera predominante en el núcleo, RA se encuentran principalmente en el citoplasma y RP tiene una distribución mixta en el citoplasma y el núcleo (Griekspoor, Zwart, Neefjes & Michalides., 2007).

El segundo tipo de NR consiste en receptores que realizan una heterodimerización con el receptor X retinoide (RXR). Todos ellos reconocen repeticiones directas como elemento de respuesta. El tercer tipo representa a los receptores que se unen principalmente a repeticiones directas como homodímeros. Los miembros de la cuarta subfamilia se unen típicamente a sitios centrales extendidos como monómeros (Novac, et al., 2004).

Los SHR (NR tipo I) están anclados en el citoplasma por proteínas chaperonas, como las proteínas de choque térmico (ej. Hsp90). La unión al ligando libera al receptor de su chaperona permitiendo la homodimerización, la exposición de la NLS y la entrada al núcleo. Una vez en el núcleo, el complejo receptor-ligando se asocia con coactivadores transcripcionales que facilitan la unión al gen blanco y su subsecuente activación (Sever, et al., 2013). Dado que los receptores esteroideos han sido clonados y caracterizados se sabe que hay dos Receptores a estrógenos (RE); RE α y RE β , dos receptores a progesterona (RP); RPA y RPB y un receptor a andrógenos (RA). Dos moléculas de cada receptor esteroideo se unen con un ligando y luego interactúan con un DNA blanco mediante HRE palindrómicas para actuar como factores de transcripción y controlar la expresión génica (Wierman, 2007). La mayoría de los sitios de unión núcleo-receptor en el genoma están localizados en elementos potenciadores que están lejos del sitio de inicio transcripcional (Sever, et al., 2013).

1.7.3. Regulación de los Receptores Nucleares

Un papel principal de las hormonas sexuales esteroideas en la regulación de la transcripción de genes es el reclutamiento de coactivadores y correpresores complejos

al sitio de unión receptor-ligando-DNA. El balance relativo de receptores y proteínas coactivadoras y correpressoras es un determinante crítico para iniciar una respuesta (Lorenzo, 2003). Los ligandos controlan las interacciones con los receptores nucleares alostéricamente con coactivadores y correpresores influenciando la conformación del AF2 en el extremo C-terminal del LBD (Sever, et al., 2013).

Los agonistas endógenos son entidades hidrofóbicas que al unirse al receptor promueven cambios conformacionales en el receptor que permite el reclutamiento (o disociación) de parejas proteicas, generando un complejo multiproteico grande (Alexander, et al., 2017). Los agonistas se definen como compuestos que actúan como el compuesto natural, pero con afinidad al receptor o vida media alterada (ej. fitoestrógenos o estrógenos sintéticos) (Wierman, 2007). Los antagonistas se describen como parciales (para RE se conocen como moduladores selectivos del receptor a estrógeno; SERMs) o antagonistas completos. Una antagonista parcial puede, dependiendo del tipo celular, actuar como un agonista o antagonista del RE. En contraste, los antagonistas completos (para el RE se conocen como regulador degradador selectivo del receptor a estrógenos; SERDs), siempre inhiben al receptor, independientemente del tipo celular, en parte por provocar su degradación (Griekspoor, et al., 2007).

La unión de cualquiera de los tipos de agonistas al NR resulta en un cambio conformacional grande en el LBD y la liberación de las Hsp que protegen al receptor no ligado de desdoblarse y agregarse (Griekspoor, et al., 2007). Las estructuras cristalinas de un RE unido a un agonista o a un antagonista muestran distintas diferencias en cómo los ligandos encajan en el LBD del receptor y por ende resultan diferentes tipos de proteínas adaptadoras para incrementar o disminuir la eficiencia de la transcripción genética (Wierman, 2007).

Los NHR son residentes fuera del núcleo en un estado no ligado en complejo con una proteína acompañante, la cual se libera al unirse con un agonista. La migración al núcleo y la interacción con otros reguladores de transcripción génica, como polimerasa RNA, acetiltransferasas y deacetilasas, permite que la transcripción génica sea regulada (Alexander, et al., 2017).

Las funciones de los receptores nucleares también pueden ser moduladas por modificaciones postraduccionales que incluyen fosforilación, ubiquitinación y sumoilación. La fosforilación puede activar algunos NR independientemente de la unión al ligando y funciona como el mecanismo principal que regula las actividades de receptores huérfanos. La ubiquitinación de los receptores puede ocurrir como respuesta a la unión de ligandos y puede contribuir a la terminación de la señalización hormonal. La sumoilación reduce la función de activación de receptores nucleares y/o promueve la actividad represora. Adicionalmente, la modulación selectiva de las actividades de los NR puede alcanzarse mediante ligandos sintéticos que alteran diferencialmente la conformación de AF2 (Sever, et al., 2013).

1.7.4. Receptor a Estrógenos (RE)

Históricamente los REs han sido considerados factores de transcripción ubicados en el citosol cuya activación ocurre mediante la unión a su ligando para consecuentemente trasladarse al núcleo donde se dimeriza (Moriarty, et al., 2006). A pesar de que generalmente la mayoría de los receptores a estrógenos se encuentran en el núcleo, pequeñas cantidades están asociadas a la membrana (2 %) (Lorenzo, 2003). Los ligandos de los RE son los estrógenos; estradiol, estrona y estriol (Wierman, 2007). Una vez en el núcleo, los REs pueden unirse directamente a su secuencia de DNA blanco consensual o interactuar con otras proteínas nucleares (coactivadores o correpresores), de esta manera mejorando o reprimiendo la activación génica. A esto se le llama respuesta estrogénica génica o iniciada en el núcleo. El estrógeno también

provoca vías de señalización rápidas conocidas como respuestas de estrógeno no genómicas o iniciadas en membrana (Moriarty, et al., 2006).

Las señalizaciones iniciadas en la membrana plasmática pueden, a su vez, iniciar cascadas de señalización que resultan en eventos nucleares, sin la necesidad de translocación nuclear de REs. Algunos ejemplos de cascadas de señalización iniciadas por el estrógeno incluyen la inducción de cambios en los canales iónicos, generación de un segundo mensajero mediado por el receptor acoplado de proteína G (cAMP y calcio), la estimulación de receptores de factor de crecimiento y la activación de las vías de MAPK y fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K)/Akt (Moriarty, et al., 2006). Esto genera un impacto en la proliferación celular y migración entre otros procesos (Yasar, Ayaz, Damla, Güpür & Muyan., 2017).

Actualmente se considera al RE como un componente central de un “signasoloma” membranal que contiene numerosas moléculas, cuya orquestación resulta en cascadas de señalización rápidas. El estrógeno ejerce propiedades neuroprotectoras en el cerebro, mediante la señalización del RE asociado a la membrana en muchos tipos de células neuronales (Moriarty, et al., 2006).

Hay dos tipos de RE; RE α y RE β (**Fig. 10**). Ambos son codificados por dos genes distintos y son expresados en diferentes cantidades. El gen humano para el RE α (ESR1) es un segmento genómico largo que consiste en ~300 Kb y está localizado en q24-q27 del cromosoma 6. El RE α (ESR1) incluye ocho exones que codifican para una proteína de 66 kDa compuesta por 595 aminoácidos. Por su lado, el gen de RE β (ESR2), ubicado en q11-q24 del cromosoma 14, también es un segmento largo del genoma de 254 kb con ocho exones codificados. Consiste en 530 aminoácidos con una masa molecular de 60 kDa. En ambos casos el exón 1 codifica para la región A/B. El DBD en la región C es codificado por los exones 2 y 3, con un intrón localizado entre los dos dedos. El exón 4 codifica para una parte de la región C, para toda la región D y

parte de la región E. El dominio de unión a la hormona (E/F) es codificada por exones 4-8 (Yasar, et al., 2017).

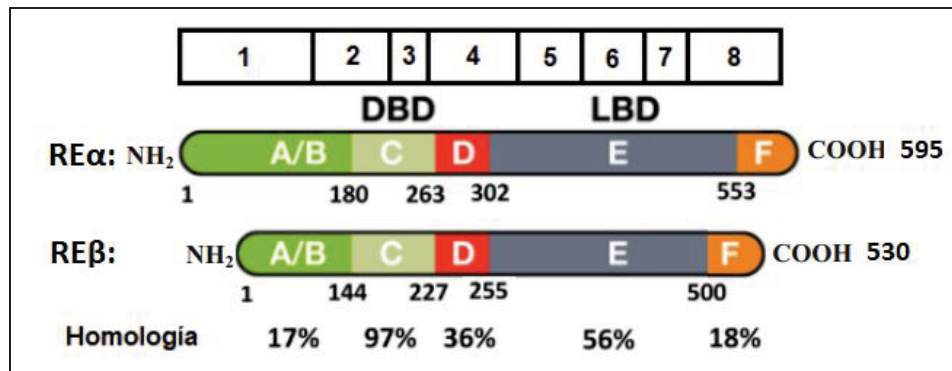


Figura 10. Representación esquemática del gen para el receptor a estrógenos y los dominios estructurales del receptor a estrógenos α (RE α) y β (RE β). El RE α y el RE β contienen un dominio adicional C-terminal (dominio F). Los números representan la longitud del receptor en aminoácidos y se muestra el porcentaje de homología de los dominios estructurales de los RE. La barra de arriba representa los exones correspondientes para cada dominio. Modificada de Griekspoor, et al. (2007) y Yasar, et al. (2017).

A pesar de que son muy similares en su estructura, los dos tipos de RE muestran diferencias estructurales y pueden mediar funciones biológicas diferentes. El RE β puede sustituir al RE α en algunas vías biológicas. Adicionalmente, RE β puede interactuar con el mismo ERE que RE α y los dos subtipos de RE forman heterodímeros indicando que en células que expresan ambos tipos de ER, la proporción entre ellas afectará la acción estrogénica (Olefsky, 2001). Ciertos dominios funcionales del RE α y el RE β muestran un elevado grado de homología, principalmente los DBD y LBD con 97 y 56 % respectivamente, mientras que otros dominios muestran divergencia aparente en el lado N-terminal (17 % de homología). Por lo tanto, ambos RE interactúan con elementos de respuesta de DNA idénticos y muestran un perfil de afinidad similar para diversos estrógenos endógenos, sintéticos y naturales en ensayos *in vitro* (Hall, Couse & Korach., 2001).

Mientras que RE α es el subtipo predominante expresado en mama, útero, cérvix, vagina y varios otros órganos blanco adicionales, RE β exhibe patrones de expresión más limitados y es detectado principalmente en los ovarios, próstata, testículos, bazo,

pulmón, hipotálamo y timo. Se han identificado diferencias en la expresión en regiones del cerebro (Hall, et al., 2001). Los RE son expresados en astrocitos reactivos y en microglía (Crespo, Yanguas, Arevalo, Azcoitia, Barreto & García., 2018).

1.7.5. Receptor a Progesterona (RP)

La progesterona (P4) es un regulador esencial para las funciones reproductivas de las mujeres en el útero, ovarios, glándula mamaria y cerebro, asimismo juega un papel importante en tejidos no reproductivos como el sistema cardiovascular, tejido óseo y el sistema nervioso central (Scarpin, Graham, Mote & Clarke., 2009). Las progestinas pueden tener efectos importantes para modular tanto el comportamiento sexual como la función de neurotransmisores en el sistema nervioso central (Wierman, 2007). La actividad biológica de la P4 está mediada por el receptor de progesterona (RP). El RP es el regulador más importante de los tejidos reproductivos ya que controla los procesos de desarrollo, así como la proliferación y diferenciación durante el ciclo reproductivo y el embarazo. Forma parte de los miembros de NHR que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando de manera que la acción principal del RP es regular la expresión de genes blanco en respuesta a la unión con su ligando (Grimm, et al., 2016).

El receptor inactivo está unido con proteínas chaperonas las cuales se separan a la hora de unirse el receptor nuclear con la P4 de manera que se revela el DBD. Posterior a la dimerización del receptor en el núcleo celular y su interacción con su elemento de respuesta a progestágenos (PRE), los coactivadores del receptor se conectan y se inicia la transcripción (Rękawiecki, Kowalik & Kotwica., 2011). Los RP también pueden generar reacciones nucleares rápidas independientes de la actividad transcripcional. Estas ocurren debido a interacciones del RP con el genoma mediante la activación de cinasas que modifican al RP o a otros factores asociados con los RP en sitios específicos de genes blanco (Grimm, et al., 2016).

Los RP existen en dos isoformas; RPA (94 KDa) y RPB (114 KDa) (Giangrande & McDonnell., 1999), los cuales son codificados por el gen para PR, que consiste en 8 exones, en la región q22-23 del cromosoma 11 pero son influenciados dos promotores diferentes (Rękawiecki, et al., 2011; Singhal, Greene, Zarnke, Laine, Abosy, Chang, Dembo, Schoenfelt, Vadhi, Qiu, Rao, Santhamma, Nair, Nickisch, Long, Becker, Brown & Greene., 2018). Se ha encontrado una tercera isoforma; RPC, que se muestra como la isoforma más corta al no tener uno de los dedos de zinc en el DBD y no tiene actividad transcripcional. La secuencia de RPC contiene un LBD completo y la secuencia responsable para la dimerización y ubicación de RPC en el núcleo celular. Esta isoforma muestra tener capacidad de unirse a progestinas sintéticas y a antagonistas de RP con la misma afinidad que RPA y RPB. El “splicing” alternativo y la inserción de exones puede provocar la formación de diferentes formas de RP (Rękawiecki, et al., 2011).

Generalmente el RPA se ubica en el núcleo mientras que el RPB se distribuye en el núcleo y en el citoplasma (Griekspoor, et al., 2007). El RP es expresado principalmente en tejidos reproductivos femeninos y en el sistema nervioso central (Grimm, et al., 2016). En el tejido epitelial de mama, los RPA Y RPB son expresados al mismo nivel (Singhal, et al., 2018). La expresión proteica de los RP también se ha demostrado en páncreas, huesos, testículos, glándulas mamarias, ovarios, oviductos, útero y tracto urinario (Rękawiecki, et al., 2011). Los receptores a progesterona también son expresados en células gliales (Crespo, et al., 2018).

Las isoformas del receptor a progesterona difieren en su estructura proteica. El RPB tiene la longitud completa de un RP mientras que el RPA tiene un dominio N-terminal truncado al cual le faltan los primeros 164 aminoácidos (Singhal, et al., 2018). El extremo N-terminal de los RP contienen dos dominios: AF-1 y AF-3 (**Fig. 11**), los cuales se unen a factores de transcripción responsables de la activación del promotor apropiado e inician la transcripción de las isoformas. El dominio AF-1 está presente en

el RPA y RPB, mientras que el AF-3 sólo está presente en el RPB. En el dominio AF-1 hay un dominio inhibitorio (ID) que consiste en 140 aminoácidos. Este dominio es responsable de la conexión del receptor con agonistas y así regula la actividad (Rękawiecki, et. al., 2011).

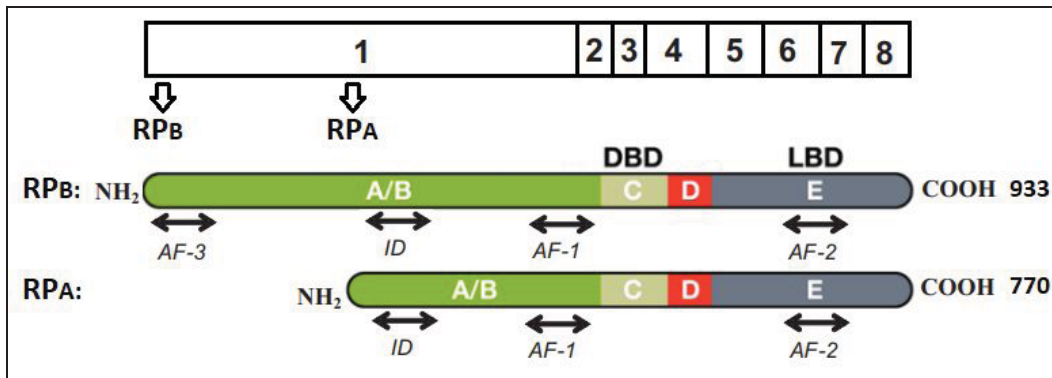


Figura 11. Representación esquemática del gen para el receptor a progesterona y los dominios estructurales del receptor a progesterona isoforma B (RPB) e isoforma A (RPA). El gen para el receptor a progesterona consiste en 8 exones. Las isoformas del receptor son transcritas por el mismo gen, pero bajo la influencia de diferentes promotores (flechas) (Rękawiecki, et al., 2011). Los números representan la longitud del receptor en aminoácidos. Modificada de Griekspoor, et al. (2007) y Rękawiecki, et al. (2011).

El ID está localizado en ambas isoformas del RP, pero su actividad en RPB es limitado mediante la activación del tercer dominio de activación (AF-3) presente únicamente en el RPB. Al lado del dominio AF-1, en el centro, se encuentra el DBD que consiste en aproximadamente 66-68 aminoácidos y es el responsable de la conexión del complejo hormona-receptor con su HRE ubicado dentro del gen promotor blanco. Su dominio LBD se encuentra en el extremo C-terminal al lado del DBD. Dentro del LBD se encuentra el dominio AF-2 responsable de la interacción del receptor con Hsp y la dimerización del receptor. Este dominio también recluta proteínas coactivadoras para la dimerización del receptor (Rękawiecki, et al., 2011).

1.7.6. Receptor a Andrógenos (RA)

Los andrógenos (testosterona y dihidrotestosterona (DHT)) son hormonas sexuales masculinas requeridas para el desarrollo del sistema reproductivo masculino,

así como de características sexuales secundarias. Adicionalmente, así como los estrógenos, los andrógenos regulan diversas acciones celulares incluyendo proliferación, morfogénesis, diferenciación y apoptosis (Lorenzo, 2013). La testosterona y la DHT regulan sus acciones mediante el receptor a andrógenos (RA), un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando que comparte estructura con los demás miembros de los SHR (Brand & Scott., 2014). RA se encuentran principalmente en el citoplasma (Griekspoor, et al., 2007)

El locus del gen para el RA está ubicado en Xq11-12, tiene una longitud aproximada de 180 Kb y consiste en ocho exones codificantes separados por segmentos intrónicos de longitud variable. El exón 1 codifica al dominio N-terminal entero lo que equivale al 60 % de la proteína. Los exones 2 y 3 codifican a los dos dominios dedo de zinc del DBD. Los exones 4-8 codifican por la región de bisagra y al LBD (**Fig. 12**). El resultado de la expresión del gen de RA es una proteína con un peso de 110 KDa. Los RA son expresados en una amplia variedad de tejidos, provocando acciones biológicas significativas en hueso, músculo, próstata, tejido adiposo y en los sistemas hematopoyéticos, inmune, cardiovascular y reproductivo (Brand, et al., 2014). Los receptores a andrógenos también son expresados en células gliales (Crespo, et al., 2018).

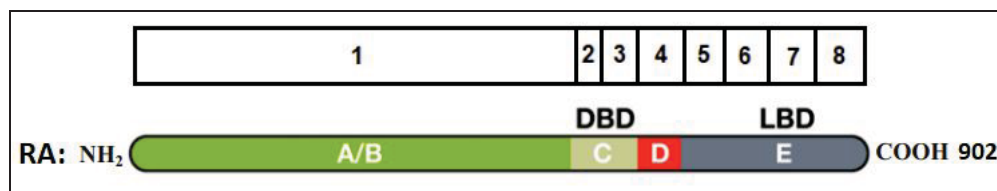


Figura 12. Representación esquemática del gen para el receptor a andrógenos y los dominios estructurales del receptor a andrógenos. Se muestran los exones y sus dominios correspondientes y la longitud del RA en aminoácidos. Modificada de Griekspoor, et al. (2007).

En ausencia de su ligando, el RA es citoplasmático y está asociado a Hsp y otras proteínas chaperonas. Los andrógenos se unen al RA resultando en un cambio conformacional, disociación de las proteínas chaperonas y la exposición de la NLS. El complejo andrógeno-RA se transloca al núcleo donde se dimeriza y se une a su

elemento de respuesta a andrógenos (ARE) dentro de genes blanco clásicos para modular la transcripción genética (Davey & Grossman., 2016).

La actividad transcripcional de los andrógenos unidos a su AR, así como las demás hormonas y sus NHR, está modulada por proteínas correguladoras que ayudan en el reclutamiento de proteínas requeridas para la maquinación transcripcional y que se unen al RA activado de una manera dependiente de ligando para mejorar o reprimir la habilidad de activar al gen blanco mediante la remodelación de cromatina y modificaciones a histonas. El complejo andrógeno-RA también puede mandar señales mediante vías no dependientes de la unión con DNA. Se ha identificado la activación de vías de segundos mensajeros incluyendo ERK, Akt y MAPK en varias líneas celulares (Davey, et al., 2016).

1.7.7. Autorregulación y Regulación Cruzada de Receptores Nucleares

Los genes que codifican para los receptores nucleares son regulados mediante diversas vías de señalización intracelular que interactúan entre sí. Los ligandos de los NR pueden regular la expresión del gen para su NR que media la acción de la hormona (autorregulación), de esta manera determinan cómo una célula responde a la hormona. La autorregulación puede ser positiva o negativa, con la hormona incrementando o disminuyendo la expresión de su propio NR respectivamente. A la autorregulación positiva se le conoce como autoinducción mientras que una autorregulación negativa se conoce como autorepresión. La autoinducción conlleva a la biosíntesis de más NRs en la célula mejorando la capacidad de la célula de responder a las hormonas y la autorepresión es un mecanismo homeostático para modular la acción hormonal disminuyendo el NHR (Bagamasbad, et al., 2010).

Adicionalmente, un NR unido a su ligando puede influir en la expresión de otros tipos de NRs (regulación cruzada) modificando la manera en la que una célula responde a diferentes hormonas (Bagamasbad, et al., 2010) (Fig. 13).

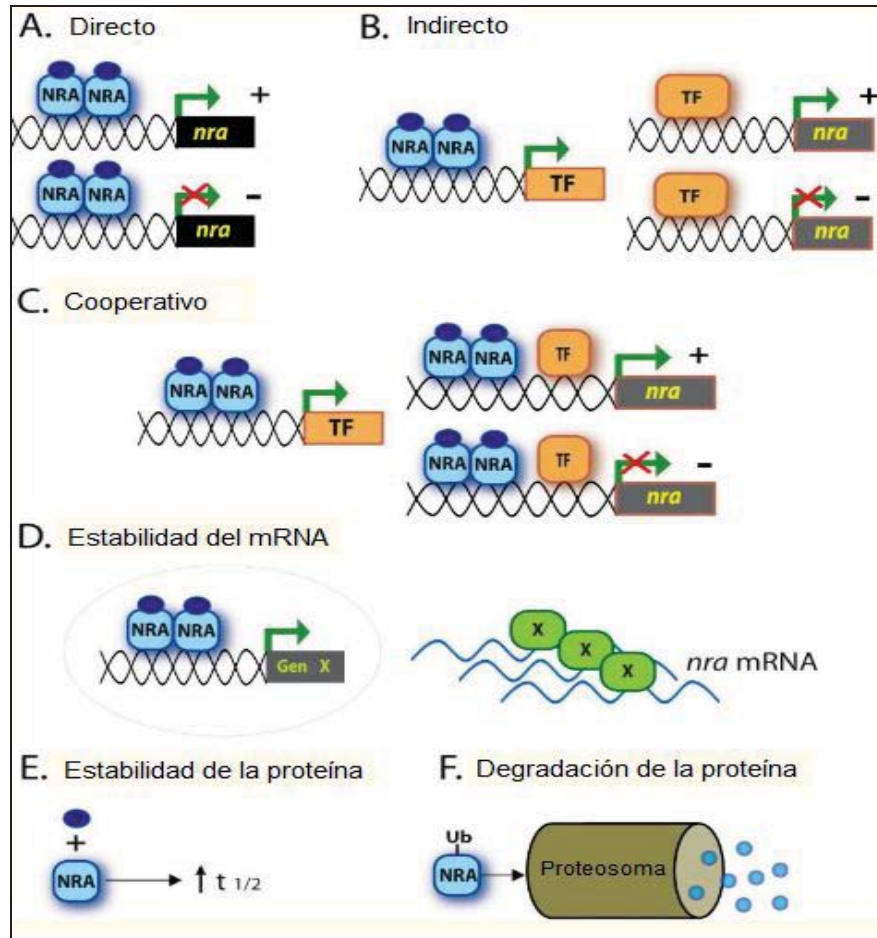


Figura 13. Mecanismos moleculares para la regulación de la expresión de receptores nucleares. **A.** La regulación transcripcional directa involucra al complejo hormona-NR (NRA: mostrado como un homodímero) uniéndose directamente a su elemento de respuesta hormonal localizado dentro del gen *nra* que activa o reprime su expresión (para la regulación cruzada el NRA se une al gen de un NR diferente para regularlo). **B.** La regulación transcripcional indirecta involucra al complejo hormona-NRA que induce la expresión de un gen que codifica a un factor de transcripción (TF) que posteriormente regula de manera positiva o negativa a la transcripción del gen *nra* (para la regulación cruzada el NRA regula a un factor de transcripción que se une y regula un gen de un NR diferente). **C.** La regulación de la transcripción cooperativa involucra mecanismos de transcripción directos e indirectos mostrados en las partes A y B. **D.** El NRA puede regular la expresión de genes que incrementan o disminuyen la estabilidad del mRNA del *nra* (Para la regulación cruzada, el mRNA del gen de un NR diferente). **E.** La unión de la hormona al NR lo estabiliza incrementando su vida media ($t_{1/2}$). **F.** El NRA puede inducir la expresión de una ligasa ubiquitina que ubiquitina NRs en la célula y lo dirige a un proteosoma para su degradación (Bagamasbad, et. al., 2010). Modificada de Bagamasbad, et al. (2010).

La regulación cruzada es una manera importante de coordinar las respuestas celulares a una señal hormonal o para permitir comunicación entre las vías de señalización hormonal. Los diversos mecanismos por los cuales se autorregula la expresión de NR pueden ser descritas como transcripcionales o postranscripcionales (Bagamasbad, et al., 2010).

La expresión del receptor a estrógeno está regulada por estrógenos, principalmente mediante autoinducción, pero también muestra autorepresión. Los mecanismos moleculares que se han identificado involucran la regulación transcripcional directa de los genes RE por el RE y la modulación de la estabilidad del mRNA del RE. La expresión de los RP es regulada de manera exclusivamente negativa por su ligando sin embargo los estrógenos aumentan la cantidad de RP mientras que la progesterona disminuye la cantidad de RE (Bagamasbad, et al., 2010). Se ha observado, en el cerebro basal anterior de las ratas macho que el mRNA del RA es regulado positivamente por el estrógeno, pero no es regulado por andrógenos (McAbee & DonCarlos., 1999). El RE β y el RA han mostrado inhibir la expresión de ambos receptores nucleares (Kumar, Dumasia, Deshpande, Raut & Balasinor., 2018).

Habiendo concluido con el marco teórico necesario para fundamentar este proyecto de investigación, prosigue la descripción de la metodología científica seguida con el fin de confirmar o rechazar la hipótesis que se expone a continuación.

2. Justificación

La lesión traumática de médula espinal (LTME) es un problema de salud para el cual actualmente no existe un tratamiento. Las hormonas esteroides pueden ser una opción para tratar dicha patología, sin embargo, pueden tener efectos indeseables. Recientemente se han utilizado hormonas sintéticas que imitan el comportamiento neuroprotector de las hormonas esteroides, pero carecen de efectos secundarios, la tibolona es uno de estos fármacos. La tibolona puede tener actividad estrogénica, progestagénica y androgénica y así promover neuroprotección. La actividad de la tibolona depende de los receptores presentes en el tejido, debido a esto es importante investigar el efecto de la tibolona en la expresión de los receptores a estrógenos, progesterona y andrógenos en la LTME.

3. Hipótesis

Si la tibolona tiene efecto estrogénico, progestágeno y androgénico entonces su administración modificará la expresión de los receptores a estrógenos, a progesterona y a andrógenos en la médula espinal de rata con lesión traumática.

4. Objetivos

Objetivo General

Evaluar el efecto de la administración de tibolona sobre la expresión de los receptores a hormonas sexuales en la lesión traumática de médula espinal en rata, para explorar su uso como neuroprotector en el modelo biológico mencionado.

Objetivos Específicos

Evaluar mediante RT-PCR el efecto de la administración de tibolona a dosis de 0.1, 1.0, 2.5 y 10 mg/kg sobre:

- La expresión del Receptor a Estrógenos α (RE α),
- La expresión del Receptor a Estrógenos β (RE β),
- La expresión del Receptor a Progesterona Total (RPT),
- La expresión del Receptor a Progesterona B (RPB) y
- La expresión del Receptor a Andrógenos (RA) en la lesión traumática de médula espinal en rata.

5. Materiales y Métodos

5.1. Animales

La lesión en médula espinal de rata se ha convertido en el modelo principal para evaluar diferentes estrategias experimentales de tratamiento. Los dos mamíferos más comúnmente usados en experimentación; la rata y el ratón, muestran diferencias considerables en la LTME y su recuperación. Después de la LTME, en la médula de los ratones, células proliferan en el área de la lesión, manteniendo los extremos opuestos de la médula espinal lesionada en contacto, y típicamente no hay formación de quistes rellenos de fluido. Esto no se observa en ratas ni humanos, en donde la formación de quistes en la zona de la lesión es común, de manera que la rata es un modelo más conveniente que el ratón (Kjell & Olson, 2016).

Se usaron 30 ratas macho de la cepa Sprague Dawley con un peso de 250 a 300 gramos obtenidas del bioterio de Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México. A lo largo de la experimentación los animales se mantuvieron en cajas de acrílico de manera individual bajo condiciones de iluminación de 14 horas de luz por 10 horas de oscuridad y condición de temperatura de 22 ± 2 °c. Las ratas tuvieron acceso a agua con analgésico (5 mL de paracetamol) y alimento (dieta comercial) *at libitum*. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 6 grupos de 5 ratas cada uno;

1. Laminectomía (únicamente se realizó laminectomía);
2. LTME (se realizó laminectomía y LTME);
3. Laminectomía y LTME con administración de Tibolona (0.1 mg/Kg);
4. Laminectomía y LTME con administración de Tibolona (1 mg/Kg);
5. Laminectomía y LTME con administración de Tibolona (2.5 mg/Kg);
6. Laminectomía y LTME con administración de Tibolona (10 mg/Kg).

5.2. Lesión Traumática de Médula Espinal

Todos los procedimientos quirúrgicos y experimentales se realizaron de acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud (De la Madrid, 1998) y con autorización de la Comisión Nacional de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social. Así mismo, se siguieron las indicaciones y recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999; especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Inicialmente se anestesiaron las ratas con una mezcla de clorhidrato de ketamina y de xilacina a razón de 75 y 25 mg/kg de peso corporal respectivamente. Después de aplicada la anestesia, se les realizó una tricotomía en la región dorsal y bajo condiciones de asepsia y antisepsia se llevó a cabo una laminectomía, para lo cual se realizó una incisión media sagital en la piel de la región torácica posterior para disecar los músculos paravertebrales. Una vez que quedaron expuestas las apófisis espinosas, se extirpó la vértebra torácica nueve (T9), dejando libre la porción dorsal de la médula espinal con las meninges intactas en esa zona.

Se les efectuó a las ratas (excepto los miembros del grupo de laminectomía) una LTME por contusión de intensidad moderada empleando para ello el aparato estereotáxico *New York Impactor* (NYU), con el cual se produjo una lesión por impacto directo sobre la médula espinal con una barra de acero que tiene una superficie en su extremo inferior de 2 mm y un peso de 10 g, misma que se dejó caer de forma vertical guiada y controlada por sensores conectados a una computadora que registra el peso, la deformación de la médula espinal al momento del impacto, la altura de la caída (en este caso 2.5 cm) y la velocidad de la misma.

Después de producida la lesión fueron cerrados tanto la piel como los músculos por planos con suturas no absorbibles. Finalmente se administró 0.6 mL de bencilpenicilina procaínica con bencilpenicilina cristalina en suspensión inyectable de 800 000 UI (*AMSA laboratorios*) para prevenir infecciones.

5.3. Tratamientos

Media hora después de la cirugía se le administró a cada rata su tratamiento correspondiente. Al grupo de Laminectomía y al grupo de LTME se les administró vehículo (agua). A los demás grupos (con LTME) se les dio su tratamiento correspondiente de tibolona a 0.1 mg/Kg, 1.0 mg/Kg, 2.5 mg/Kg y 10 mg/Kg. El tratamiento se administró 30 minutos, 24 horas y 48 horas después de la LTME. El sacrificio se realizó 72 horas posterior a la LTME.

Diariamente, durante los tres días de tratamiento, se revisó la herida quirúrgica, se vació la vejiga y el intestino manualmente, se bañaron los animales con agua tibia y se verificaron las condiciones generales de salud de cada animal incluido en el estudio. Al tercer día, posterior al último tratamiento, se sacrificaron los animales mediante decapitación y se extrajo la médula espinal a la altura de la lesión (medio centímetro arriba y medio centímetro abajo del epicentro de la lesión). El tejido extraído se colocó en nitrógeno líquido para que las muestras se mantuvieron congeladas hasta su tratamiento posterior.

5.4. Extracción y Cuantificación de RNA

La extracción de RNA de la médula lesionada se hizo mediante la técnica de trizol-cloroformo. Se colocó cada medula por separado en tubos cónicos tipo Eppendorf con 300 μ L de trizol, manteniéndose en frío todo el tiempo ($\approx 0^{\circ}\text{C}$) y se realizó el homogeneizado de las muestras usando un vástago. Entre cada homogeneizado de muestra se limpió el vástago con NaOH 0.1N y agua dietilpirocarbonato (DEPC). Una

vez obtenido los homogeneizados se completó el volumen a 1000 μL de trizol. Posteriormente se adicionaron 200 μL de cloroformo y se agitó usando un vortex. Se dejó reposar 5 minutos permitiendo que las fases se separen y después de centrifugó a 14 000 rpm, 15 minutos a 4°C. Una vez terminada la centrifugación se observó la fase acuosa, la cual se pasó a un tubo cónico Eppendorf limpio usando una pipeta pasteur, teniendo cuidado de no tocar la interfase. En caso de levantar la interfase se realizó la centrifugación nuevamente.

La precipitación del RNA se logró adicionando 600 μL de isopropanol y dejando reposar a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente se realizó otra centrifugación con las mismas condiciones, descritas anteriormente obteniendo el pellet (RNA). Se decantó el sobrenadante y se realizaron lavados del pellet con etanol al 75 %: Se añadió 600 μL de etanol, se resuspendió el pellet agitando con vortex y se centrifugó a 15 000 rpm, por 5 minutos a 4 °c. Una vez concluida la centrifugación se volvió a decantar el sobrenadante y se repitió el lavado centrifugando a 7 500 rpm, 10 minutos a 4 °c. Finalmente se dejó secar el pellet, el etanol se evaporó a temperatura ambiente, hasta que el pellet tomó una apariencia transparente. Una vez obtenido el pellet seco (RNA), se disolvió en 35 mL de agua desionizada de grado molecular.

Posteriormente se cuantificó por duplicado el RNA de cada muestra usando un equipo NANODROP y se promediaron las dos lecturas para determinar la concentración de las muestras. Para determinar la pureza y presencia del RNA se determinó la relación de absorbancia A260/280, la cual debe estar entre 1.8 y 2.0. En caso de que las muestras tuvieran una concentración elevada de RNA, se diluyó la muestra con un máximo de 20 μL de agua desionizada de grado molecular, ajustando a una concentración menor a los 1000 ng/ μL .

5.5. Integridad de RNA

Para determinar la integridad del RNA presente en las muestras, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.1 % y se visualizaron los resultados con un equipo *Molecular imager system BIO-RAD* haciendo uso del programa *Quantity one 4.6* (**Fig.14**). El equipo expone al gel a luz UV periódicamente hasta obtener una imagen clara de las bandas respectivas a 28S (5 Kb) y 18S (1.8 Kb) propias del RNA.

5.6. Estandarizaciones

Una vez verificada la integridad del RNA se buscó determinar la concentración más adecuada de muestra para realizar las retrotranscripciones. Para esto se realizó la retrotranscripción de una muestra tratada perteneciente al grupo de Laminectomía con buena integridad, una concentración de RNA elevada (667.3 ng/ μ L) y una relación de A260/280 de 1.9. Se usó dos concentraciones distintas de RNA: 0.2 μ g/ μ L y 0.4 μ g/ μ L. La retrotranscripción se efectuó con el kit de *M-MLV transcriptasa reversa INVITROGEN* bajo las condiciones sugeridas para un volumen total de 20 μ L; la reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: 50 minutos a temperatura de 37 °C seguido de 15 minutos a 70 °C

Posteriormente se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para los genes en cuestión y el gen de 18S (gen constitutivo) (Volumen total= 45 μ L) usando 5 μ L de reactivo para PCR obtenido mediante las retrotranscripciones, bajo las dos condiciones de concentración de muestra. Se usaron los oligonucleótidos sentido y antisentido (*SIGMA*) correspondientes para la amplificación de los genes mencionados a 0.5 μ M (**Tabla 3**) y un kit de PCR *MyTaq DNA Polymerase (Bioline)* bajo las siguientes condiciones:

Tabla 2. Condiciones de la PCR

Fase		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial		95	5:00
35 ciclos	Desnaturalización	95	00:30
	Alineamiento	60	00:30
	Extensión	72	00:20
Extensión final		72	10:00
Mantener		4	∞

Para analizar los resultados de las PCRs se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa (100 mL de TBE [1X] al 2 % de agarosa) con Bromuro de etidio a una concentración aproximada de $[7.6 \times 10^{-4} \text{ M}]$. Para cargar el gel se usó un volumen del producto de la amplificación de 22 μL con 3 μL de amortiguador de carga (*Thermo Scientific*).

Posteriormente se realizaron las curvas de ciclos para amplificar el RPT, RPB, RE α y RE β , a 30, 35 y 40 ciclos. Para RA se realizaron a 25, 30 y 35 ciclos y para 18S se realizaron a 15, 20 y 25 ciclos (**Fig. 16**).

5.7. Amplificación de RPT, RPB, RE α , RE β , RA y 18S Mediante la Técnica de Retrotranscripción Acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Una vez estandarizada la concentración de la muestra requerida para las RTs, las condiciones de las PCRs y la cantidad de ciclos requeridos para la PCR por gen, se realizaron las RT-PCRs de todas las muestras bajo las condiciones determinadas y los kits de retrotranscripción y PCR mencionados anteriormente. Subsecuentemente se realizaron electroforesis de las PCRs resultantes, para posteriormente visualizar los resultados usando un transiluminador UV que digitaliza las imágenes. Finalmente se

cuantificó la intensidad de las bandas obtenidas de RPT, RPB, RE α , RE β y RA y del gen constitutivo (18S) mediante un análisis densitométrico usando el programa *ImageJ*.

Tabla 3. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes de RPT, RPB, RE α , RE β , RA y 18S.

Genes	Secuencias	Tamaño esperado de los amplímeros (pb)
RPT	Sentido: 5'-AGTTATTGCTGCCAGTTGC-3' Antisentido: 5'-CACGTAAGGCTTTCAGAAGGA-3'	181
RPB	Sentido: 5'-GCTCCCAGACGAAAAGACAC-3' Antisentido: 5'-GCCCAAAGAGACACCAAGAA-3'	227
RE α	Sentido: 5'-CTTCTGGAGTGTGCCTGGTT-3' Antisentido: 5'-CTTCTCCCTGCAGGTTTCATC-3'	199
RE β	Sentido: 5'-TCCCGGCAGCACCAAGTAAC-3' Antisentido: 5'-CCCAGATGCATAATCGCTGC-3'	301
RA	Sentido: 5'-GAACTTGCATGTGGATGACC-3' Antisentido: 5'-TGAGAAACGTGCCTCATCCT-3'	198
18S	Sentido: 5'-CGCGGTTTCCTATTTTGTGGT-3' Antisentido: 5'-AGTCGGCATCGTTTATGGTC-3'	219

5.8. Análisis Estadístico

Se usó el programa *Prism 5.0* para comparar los promedios de los grupos de estudio mediante un análisis de Varianza (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* de Tukey's para probar si existen diferencias significativas. Se consideró como diferencia estadísticamente significativa aquellas cuya probabilidad es menor o igual a 0.05.

6. Resultados

6.1. Integridad de RNA

Se verificó la integridad de las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa. La **figura 14** muestra las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 18S y 28S, lo que indica que el RNA no está degradado y puede ser utilizado para realizar el RT-PCR.

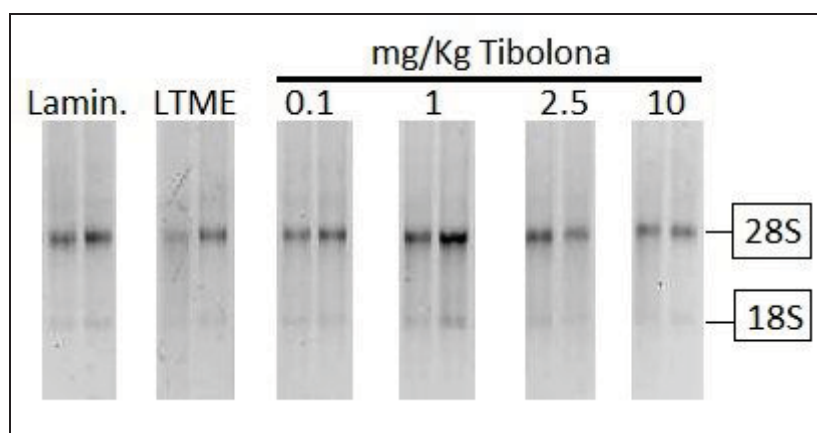


Figura 14. Imagen representativa de la integridad del RNA de las muestras. Se presentan dos muestras de cada grupo. De izquierda a derecha se observan muestras del grupo de Laminectomía (Lamin), LTME y LTME con administración de Tibolona a 0.1 mg/Kg, 1 mg/Kg, 2.5 mg/Kg y 10 mg/Kg.

6.2. Estandarizaciones

Para realizar la RT-PCR de las muestras de estudio, fue necesario primero estandarizar la concentración de RNA y el número de ciclos de amplificación de PCR. La concentración que se determinó usar de RNA para realizar el RT-PCR de las muestras fue 0.2 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$, es decir, con 1 μg de RNA. A esa concentración observamos que todos los genes se pueden identificar y la banda no se observa saturada (**Fig. 15**).

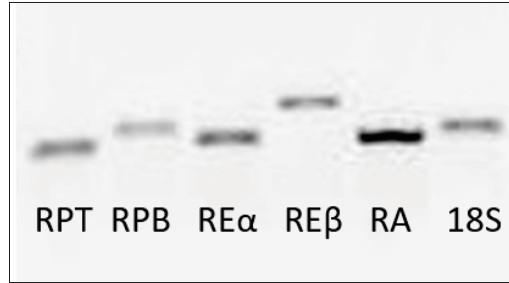


Figura 15. Amplificación de genes con 1 µg de RNA. De izquierda a derecha se observan las bandas correspondientes al RPT, RPB, RE α , RE β , RA y 18S.

Continuando con la estandarización de las reacciones en cadena de polimerasa, se realizaron curvas de ciclos de PCR. Se amplificó el RPT, RPB, RE α y RE β a 30, 35 y 40 ciclos. Para RA se realizaron a 25, 30 y 35 ciclos y para 18S se realizaron a 15, 20 y 25 ciclos. La **figura 16** muestra las curvas donde se observan las bandas resultantes de la amplificación de los genes en cuestión a los ciclos mencionados. Ya que la muestra usada es del grupo de laminectomía (grupo en el cual se esperaba la menor expresión de genes), se eligieron los ciclos donde las bandas pudieran aumentar sin saturarse permitiendo distinguir los cambios sutiles en expresión entre grupos. Considerando lo anterior y usando la información obtenida de las curvas se decidió realizar PCRs con 30 ciclos para RPT y RE α , 35 para RPB y RE β , 25 para RA y 15 para 18S.

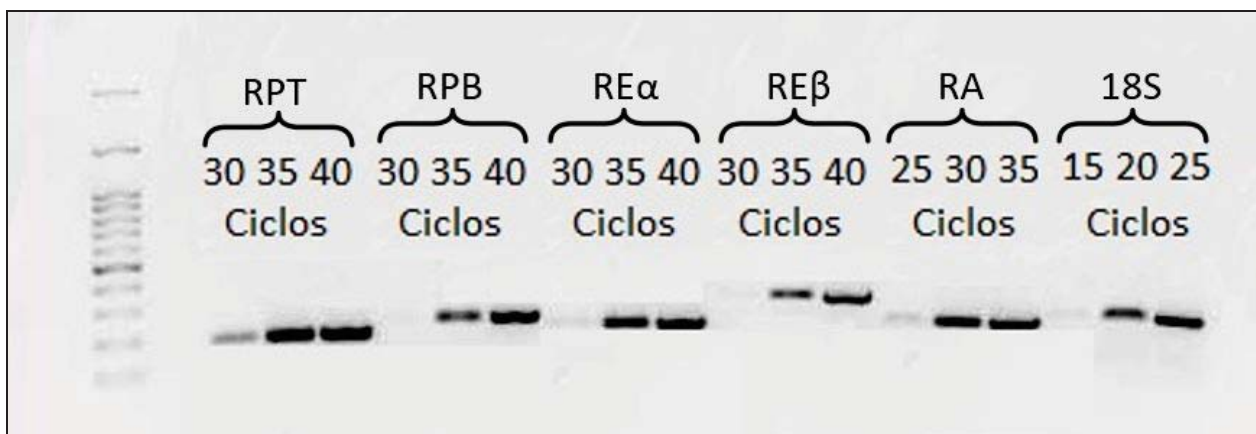


Figura 16. Curvas para estandarización de PCR. Se observa en los carriles de izquierda a derecha el marcador de peso molecular (*Cleaver Scientific, ladder 100 en 100*), un carril vacío, RPT a 30, 35 y 40 ciclos, RPB a 30, 35 y 40 ciclos, RE α a 30, 35 y 40 ciclos, RE β a 30, 35 y 40 ciclos, RA a 25, 30 y 35 ciclos y 18S a 15, 20 y 25 ciclos.

6.3. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RPT en la Médula Espinal con LTME

Para determinar si la administración de tibolona a diferentes concentraciones modifica la expresión del receptor a progesterona total en la LTME, se amplificó el gen del RPT y 18S (gen constitutivo) mediante RT-PCR. En la **figura 17** se muestra una imagen representativa de los resultados de las RT-PCRs y en la **figura 18** se muestra la media de la expresión génica del RPT en los grupos de estudio.

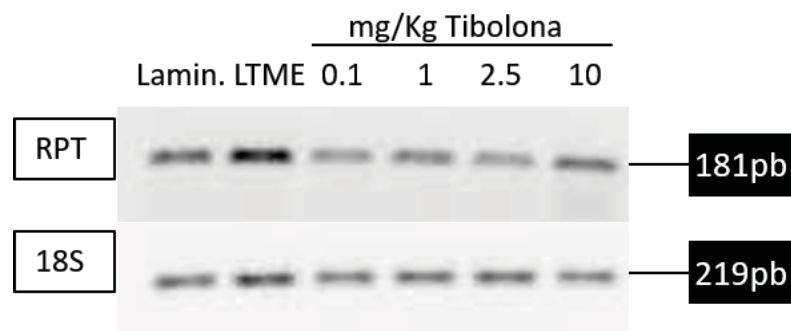


Figura 17. Imagen representativa de la expresión del RPT. De izquierda a derecha se observa el grupo de laminectomía (Lamin), el grupo de LTME y posteriormente se muestran los grupos con LTME y tratamiento de tibolona a 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg.

Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RPT en la LTME en rata

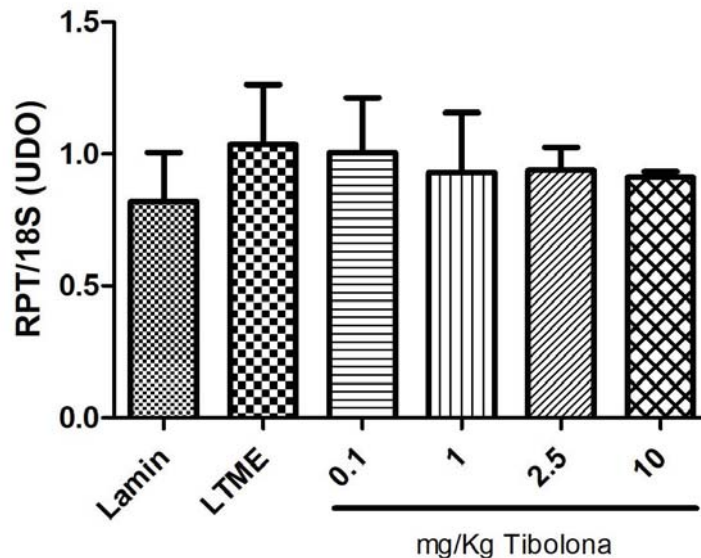


Figura 18. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RPT en LTME en rata. Se muestra la media de la expresión génica del RPT en los grupos de estudio \pm la desviación estándar. UDO: Unidades de Densidad Óptica. De izquierda a derecha se observa el resultado del grupo que recibió únicamente laminectomía (lamin), seguido del grupo de LTME y de los grupos que recibieron LTME y administración de tibolona a dosis de 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg.

A pesar de no haber resultados estadísticamente significativos, los resultados para RPT muestran una tendencia al aumento en la expresión de estos receptores nucleares en el grupo de LTME en comparación con el grupo de laminectomía. Los grupos que recibieron tratamiento con tibolona muestran una ligera disminución en la expresión de RPT en comparación con el grupo de LTME.

6.4. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RPB en la Médula Espinal con LTME

Para determinar si la administración de tibolona a diferentes concentraciones modifica la expresión del receptor a progesterona B en la LTME, se amplificó el gen del RPB y 18S (gen constitutivo) mediante RT-PCR. En la **figura 19** se muestra una

imagen representativa de los resultados de las RT-PCRs y en la **figura 20** se muestra la media de la expresión génica del RPB en los grupos de estudio.

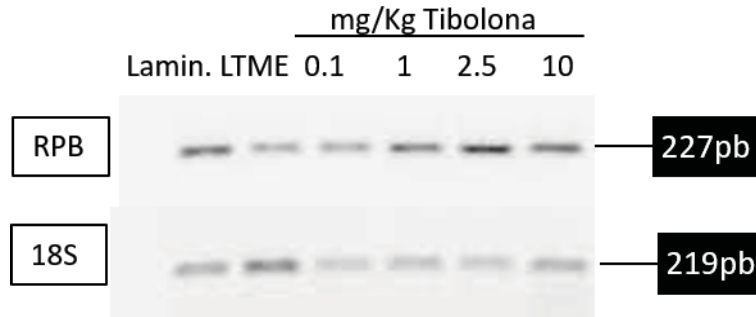


Figura 19. Imagen representativa de los resultados de la PCR para RPB. De izquierda a derecha se observa el grupo de laminectomía (Lamin), el grupo de LTME y posteriormente se muestran los grupos con LTME y tratamiento de tibolona a 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg.

Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RPB en la LTME en rata

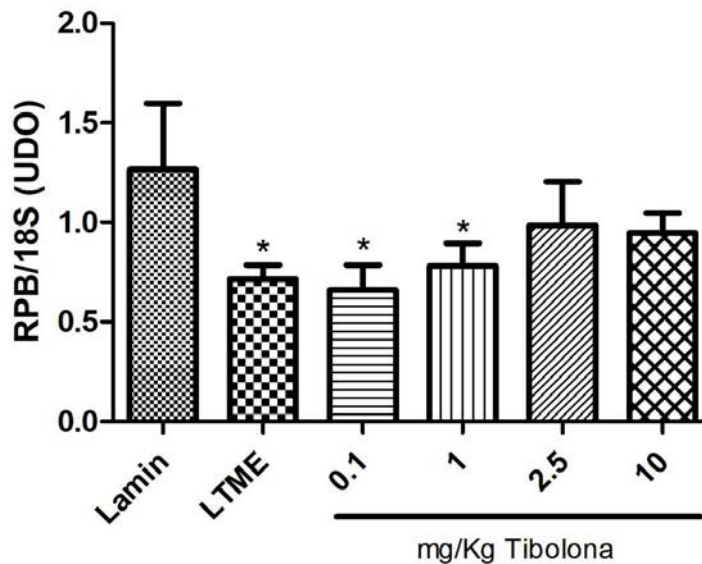


Figura 20. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RPB en LTME en rata. Se muestra la media de la expresión génica del RPB en los grupos de estudio \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$. UDO: Unidades de Densidad Óptica. De izquierda a derecha se observa el resultado del grupo que recibió únicamente laminectomía (lamin), seguido del grupo de LTME y de los grupos que recibieron LTME y administración de tibolona a dosis de 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg. (*): Los grupos con asterisco muestran una disminución significativa en su expresión de RPB en comparación con el grupo de laminectomía.

El grupo de LTME muestra una disminución en la expresión de RPB estadísticamente significativa en comparación con el grupo de laminectomía. Esta diferencia se mantiene en los grupos a los que se les administró tibolona a concentraciones de 0.1 y 1 mg/Kg. Sin embargo, las dosis de 2.5 y 10 mg/Kg no muestran diferencias significativas en comparación con el grupo de laminectomía y sugieren un aumento en comparación con el grupo de LTME.

6.5. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RE α en la Médula Espinal con LTME

Para determinar si la administración de tibolona a diferentes concentraciones modifica la expresión del receptor a estrógenos α en la LTME, se amplificó el gen del RE α y 18S (gen constitutivo) mediante RT-PCR. En la **figura 21** se muestra una imagen representativa de los resultados de las RT-PCRs y en la **figura 22** se muestra la media de la expresión génica del RE α en en los grupos de estudio.

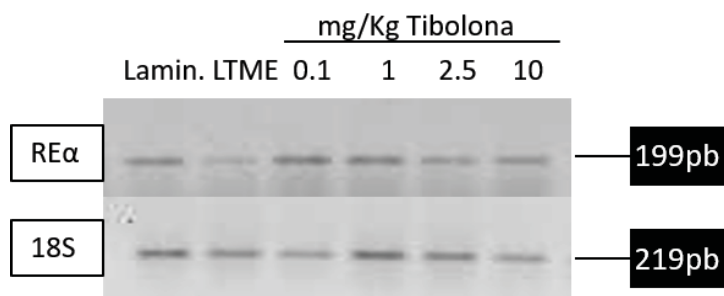


Figura 21. Imagen representativa de los resultados de la PCR para RE α . De izquierda a derecha se observa el grupo de laminectomía (Lamin), el grupo de LTME y posteriormente se muestran los grupos con LTME y tratamiento de tibolona a 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg.

Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RE α en la LTME en rata

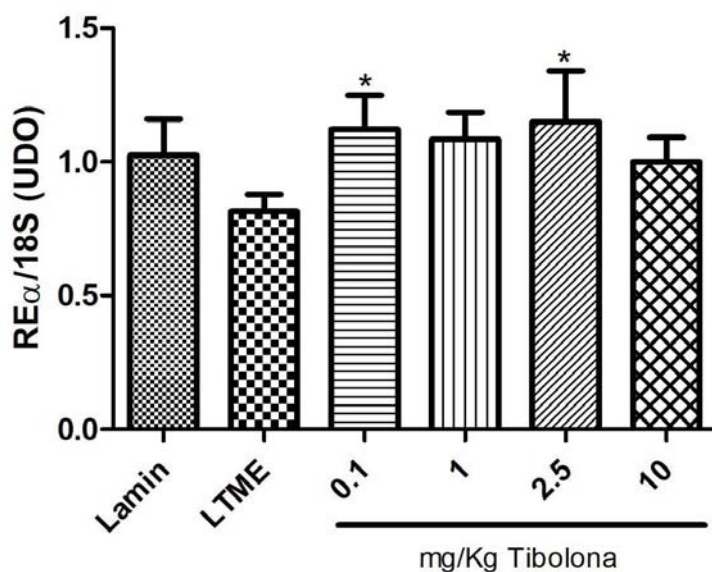


Figura 22. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RE α en LTME en rata. Se muestra la media de la expresión génica de RE α en los grupos de estudio \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$. UDO: Unidades de Densidad Óptica. De izquierda a derecha se observa el resultado del grupo que recibió únicamente laminectomía (lamin), seguido del grupo de LTME y de los grupos que recibieron LTME y administración de tibolona a dosis de 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg. (*): Los grupos con asterisco muestran un aumento estadísticamente significativo en su expresión de RE α en comparación con el grupo de LTME.

De manera similar a los resultados obtenidos para RPB, la LTME disminuye la expresión del RE α en comparación con el grupo de laminectomía. Adicionalmente, los resultados indican que la administración de tibolona a dosis de 0.1 y 2.5 mg/Kg aumenta de manera significativa la expresión de RE α en comparación con el grupo de LTME. Las dosis de 1 y 10 mg/Kg no muestran diferencias significativas, sin embargo, también se observa un incremento en la expresión de RE α en comparación con el grupo de LTME.

6.6. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RE β en la Médula Espinal con LTME

Para determinar si la administración de tibolona a diferentes concentraciones modifica la expresión del receptor a estrógenos β en la LTME, se amplificó el gen del RE β y 18S (gen constitutivo) mediante RT-PCR. En la **figura 23** se muestra una imagen representativa de los resultados de las RT-PCRs y en la **figura 24** se muestra la media de la expresión génica del RE β en los grupos de estudio.

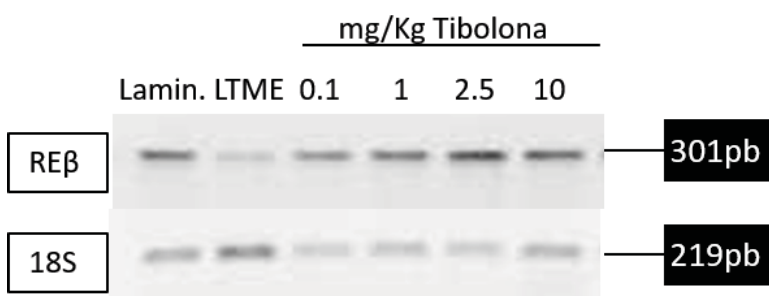


Figura 23. Imagen representativa de los resultados de la PCR para RE β . De izquierda a derecha se observa el grupo de laminectomía (Lamin), el grupo de LTME y posteriormente se muestran los grupos con LTME y tratamiento de tibolona a 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg.

Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RE β en la LTME en rata

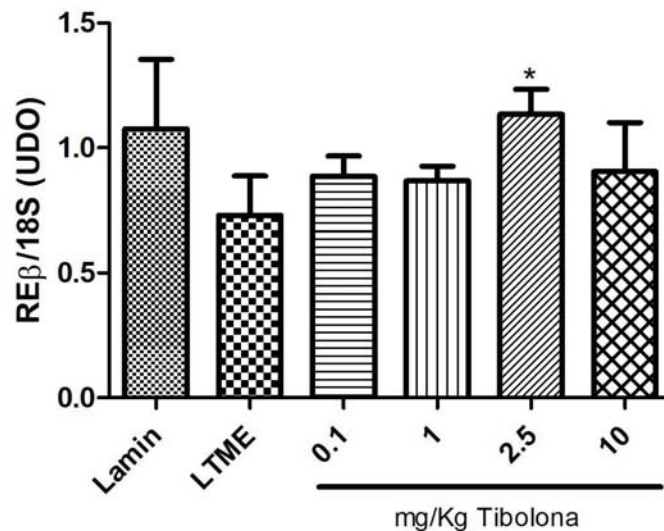


Figura 24. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RE β en LTME en rata. Se muestra la media de la expresión génica de RE β en los grupos de estudio \pm la desviación estándar. * $p < 0.05$. UDO: Unidades de Densidad Óptica. De izquierda a derecha se observa el resultado del grupo que recibió únicamente laminectomía (lamin), seguido del grupo de LTME y de los grupos que recibieron LTME y administración de tibolona a dosis de 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg. (*): El grupo al que se le administró tibolona a dosis de 2.5 mg/Kg muestra un incremento significativo en su expresión de RE β en comparación con el grupo de LTME.

Los resultados indican que en LTME disminuye la expresión génica del RE β en comparación con el grupo de laminectomía y que la administración de tibolona a dosis de 2.5 mg/Kg aumenta de manera significativa la expresión de RE β en comparación con el grupo de LTME. Adicionalmente, los grupos que recibieron tibolona a dosis de 0.1, 1 y 10 mg/Kg, muestran un ligero incremento en la expresión de RE β en comparación con el grupo de laminectomía.

6.7. Efecto de la Tibolona sobre Expresión del RA en la Médula Espinal con LTME

Para determinar si la administración de tibolona a diferentes concentraciones modifica la expresión del receptor a andrógenos en la LTME, se amplificó el gen del RA y 18S

(gen constitutivo) mediante RT-PCR. En la **figura 25** se muestra una imagen representativa de los resultados de las RT-PCRs y en la **figura 26** se muestra la media de la expresión génica del RA en los grupos de estudio.

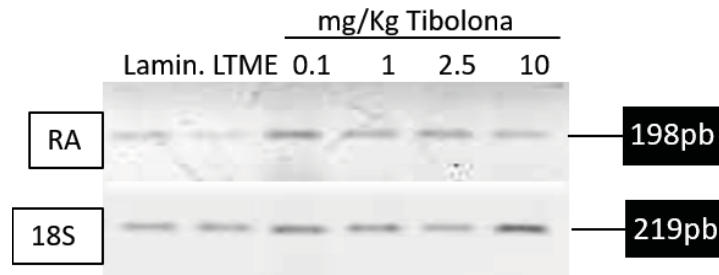


Figura 25. Imagen representativa de los resultados de la PCR para RA. De izquierda a derecha se observa el grupo de laminectomía (Lamin), el grupo de LTME y posteriormente se muestran los grupos con LTME y tratamiento de tibolona a 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg.

Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RA en la LTME en rata

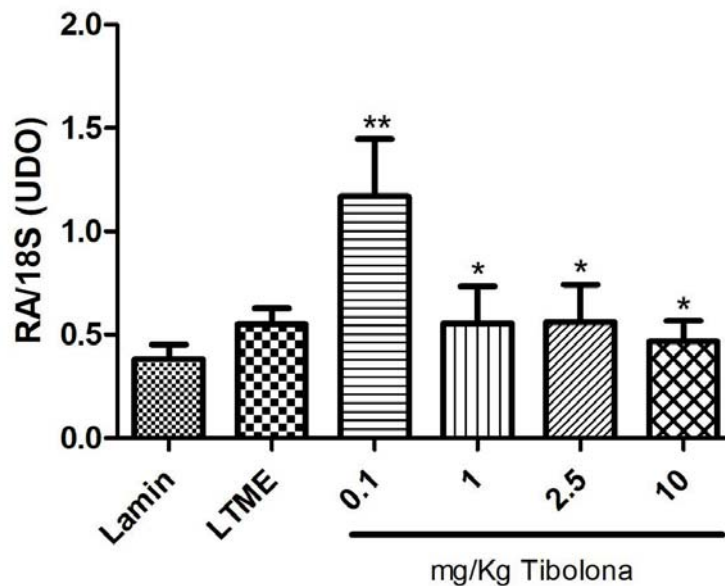


Figura 26. Efecto de la Tibolona a diferentes concentraciones en la expresión de los RA en LTME en rata. Se muestra la media de la expresión génica de RA en los grupos de estudio \pm la desviación estándar en médula espinal en la LTME * $p < 0.05$. UDO: Unidades de Densidad Óptica. De izquierda a derecha se observa el resultado del grupo que recibió únicamente laminectomía (lamin), seguido del grupo de LTME y de los grupos que recibieron LTME y administración de tibolona a dosis de 0.1, 1, 2.5 y 10 mg/Kg. (**): El grupo que recibió una dosis de 0.1mg/Kg de tibolona muestra una expresión de RA significativamente mayor a los grupos de laminectomía y LTME. (*): Los grupos con un asterisco muestran expresión significativamente menor de RA comparado con el grupo al que se le administró tibolona a una dosis de 0.1 mg/Kg.

Los resultados muestran que la expresión de RA no se ve significativamente influenciada por la LTME, aunque sugieren un ligero aumento en todos los grupos que recibieron la LTME. En el grupo al que se le administró tibolona a dosis de 0.1 mg/Kg aumentó de manera significativa la expresión de RA en comparación con el grupo de laminectomía y el grupo de LTME. Adicionalmente, los grupos que recibieron administración de tibolona a dosis de 1, 2.5 y 10 mg/Kg muestran una disminución significativa en su expresión de RA en comparación con el grupo al que se le administró 0.1mg/Kg.

7. Análisis de Resultados y Discusión

Se administró tibolona a diferentes dosis a un modelo de LTME y se evaluó el cambio en la expresión de RPA, RPB, RE α , RE β y RA mediante RT-PCR, para determinar si dicha hormona sintética regula la expresión de HNR en el tejido dañado. A continuación se discuten los resultados obtenidos descritos anteriormente.

La LTME provoca una disminución discreta en la expresión del RE α en comparación con el grupo de laminectomía. La administración de tibolona a concentraciones de 0.1 y 2.5 mg/Kg aumenta de manera significativa la expresión de RE α en comparación con el grupo de LTME. Adicionalmente, a pesar de no mostrar un incremento significativo, la administración de tibolona a dosis de 1 y 10 mg/Kg muestra una tendencia al incremento en la expresión del RE α .

El comportamiento de la regulación de la expresión del RE β es similar al descrito para el RE α . A pesar de no haber una diferencia significativa entre la disminución en la expresión del RE β en el grupo de LTME en comparación al grupo de laminectomía, si se observa una disminución y los grupos a los que se les administró tibolona tienen mayor expresión que el grupo de LTME, aunque únicamente el grupo que recibió dosis de 2.5 mg/Kg muestra una diferencia significativa.

De acuerdo a los resultados, podemos inferir que la tibolona fue metabolizada en 3 α - y 3 β -hidroxi tibolona mediante la enzima 3 α (3 α -HSD) y 3 β -hidroxiesteroide (3 β -HSD) deshidrogenasa respectivamente, que se unen con los RE (Verheul, et al., 2007) formando un complejo que regula de manera positiva (autoinducción) al gen del RE. El incremento en la síntesis de los RE en la LTME ocurre mediante regulación transcripcional directa y/o al incrementar la estabilidad de su mRNA (Bagamasbad, et

al., 2010). El aumento de RE puede tener efectos benéficos en la LTME al mejorar la señalización de estrógenos y permitir que realicen sus efectos neuroprotectores.

Debe considerarse el posible impacto que tiene la inflamación en la regulación de la expresión de los genes que codifica a los receptores a estrógenos mediante la vía independiente de ligando del RE ya que, como se mencionó anteriormente, las citocinas proinflamatorias que se presentan en la LTME causan el incremento de factores inflamatorios y apoptóticos como el factor de transcripción AP-1 (Ludwig, et al., 2017). El RE es activado de manera independiente de ligando por dicho factor de transcripción (Safe & Kim., 2008). Adicionalmente, la activación de la señalización de IFN- α o γ en las células inmunes regula positivamente la expresión del RE α codificado por el gen *Esr1* y estimula la expresión en genes diana (Panchanathan, Shen, Zhang, Ho & Choubey., 2010).

Como ha estudiado Bagamasbad, los RE y RP presentan regulaciones cruzadas recíprocas positiva y negativa. El RE unido a su ligando regula positivamente al RP, mientras que el RP unido a su ligando regula negativamente a la expresión del RE. La base molecular de la regulación positiva del RP dependiente del estrógeno se atribuye a la presencia de elementos de respuesta de estrógenos funcionales en la región promotora del gen del PR. Por otro lado, la progesterona bloquea el incremento en RE y RP mediado por estrógeno. Esta regulación cruzada entre RE y RP es crucial para los cambios fisiológicos y morfológicos que ocurren en células uterinas durante el ciclo ovárico en mamíferos (Bagamasbad, et al., 2010), e implica que el efecto neuroprotector que ejerce la tibolona pudiera limitarse indirectamente al incrementar la expresión de RP, el cual subsecuentemente, provocaría una disminución en la expresión de ER.

Los resultados obtenidos para RPT no muestran ninguna diferencia significativa entre los grupos. Sin embargo, Peters y colaboradores han observado que la presencia

de factores proinflamatorios, como la IL-1 β y lipopolisacáridos, incrementa marcadamente la cantidad de RPA mediante mecanismos postranscripcionales involucrando la estabilidad de la proteína RPA, pero disminuye la cantidad de RPB al incrementar su velocidad de degradación (Peters, Prokvolit, Patel, Amini, Tan & Mesiano., 2016). Así que, hubiera sido conveniente detectar el nivel de expresión del RPA y de los factores proinflamatorios mencionados en los grupos de estudio y determinar si hay un aumento del RPA por la presencia de los factores proinflamatorios. La activación de RPA como consecuencia de la inflamación podría influir de forma negativa el efecto neuroprotector que se busca alcanzar con la administración de tibolona al inhibir los posibles efectos neuroprotectores de la RPB y regular negativamente al RE.

Además debe considerarse la acción del Δ 4-isómero de la tibolona al tener afinidad por el RP ya reportada por Verheul, et al. en el 2007, pudiendo provocar una regulación negativa en la expresión de RP causada por la unión del RP a su ligando. El mecanismo de la autorepresión del RP puede involucrar antagonismo de la inducción dependiente de estrógeno del gen del RP mediante interacciones proteína-proteína con el RE (Bagamasbad, et al., 2010). Esta autorepresión podría disminuir la regulación negativa cruzada que provoca el RP al RE y permitir que los RE realicen su actividad neuroprotectora.

Por otro lado, la LTME redujo la expresión del RPB en comparación al grupo de laminectomía, de manera significativa. La administración de tibolona a 0.1 y a 1 mg/Kg, no modificó la expresión del RPB, sin embargo, su expresión mostró una disminución significativa comparada con el grupo de laminectomía. Los grupos que recibieron una dosis de 2.5 y 10 mg/Kg ya no muestran esa diferencia significativa. Estos resultados permiten suponer que, a estas dosis, los metabolitos 3 α - y 3 β -hidroxitibolona de la tibolona provocaron una respuesta estrogénica e indujo la expresión del RE, lo que a su vez provocó un incremento en la expresión de RPB al unirse el RE-ligando al ERE

presente en el gen que codifica para el RP. Sin embargo, la expresión del RPB no se vio aumentada a dosis de 0.1 y 1 mg/Kg a pesar de que si hubo incremento en la expresión de RE.

La capacidad de la progesterona de afectar la expresión de genes es dependiente de la razón RPA:RPB. Esto es especialmente aparente en la expresión de genes proinflamatorios. La progesterona disminuye la expresión de genes proinflamatorios cuando la razón PRA:PRB favorece al PRB, y causa un incremento en expresión de genes proinflamatorios cuando la razón favorece al RPA. Se ha observado que la progesterona vía RPB incrementa la expresión del inhibidor de $\text{kB}\alpha$, un represor del factor de transcripción NF- kB , e inhibe la expresión génica proinflamatoria basal e inducida por lipopolisacáridos. Ambos efectos mencionados son inhibidos por el RPA (Tan, Rote, Hurd & Mesiano., 2012). Los factores pro-inflamatorios resultantes de la presencia favorecida de RPA disminuyen la cantidad de RPB al incrementar la velocidad de degradación de su mRNA (Peters, et al., 2016).

Si observamos los resultados obtenidos para RPT (RPA + RPB), en la administración de tibolona a dosis de 2.5 y 10 mg/Kg, las columnas están cerca de alcanzar 1 UDO. Considerando que los resultados correspondientes a dichas dosis para RPB muestran similitud, se puede asumir que la razón RPA:RPB favorece al RPB, a diferencia de los resultados obtenidos a dosis de tibolona de 0.1 y 1 mg/Kg, donde los resultados obtenidos para RPB dan un UDO considerablemente menor a los obtenidos para el RPT, indicando que a estas dosis hay más RPA, en comparación con los otros dos grupos que recibieron tibolona.

Esto podría significar que a una dosis de tibolona de 2.5 y 10 mg/Kg, la razón favorece al RPB, el cual actúa como un regulador positivo de los efectos progestágenos (Beshay & Carr., 2013) y por ende genera un efecto antiinflamatorio. Por otro lado, a dosis de 0.1 y 1 mg/Kg, la razón favorece al RPA, este antagoniza al

RPB (Beshay, et al., 2013), provocando inflamación. La consecuente presencia de factores inflamatorios provoca entonces una disminución en la cantidad del RPB (Peters et al., 2016) lo que explicaría por qué en los resultados obtenidos para RPB en los grupos con dosis de 0.1 y 1 mg/Kg no se observa un aumento del receptor a pesar de la administración de tibolona y subsecuente aumento en RE que debería provocar un aumento en RP.

Por otro lado, la expresión del receptor a andrógenos no se modifica en el grupo LTME, pero la administración de tibolona a dosis de 0.1 mg/Kg aumentó la expresión del RA en comparación con el grupo de laminectomía y el grupo de LTME. Los otros tres grupos que recibieron tratamiento de tibolona, muestran una disminución estadísticamente significativa en comparación con el grupo que recibió la dosis de 0.1 mg/Kg, pero con valores muy similares a los grupos laminectomía y LTME.

El $\Delta 4$ -tibolona también se une al RA (Verheul, et al., 2007) generando actividad androgénica. A pesar de que la autorregulación del RA es predominantemente negativa, se han reportado ejemplos de autoinducción del RA (Bagamasbad, et al., 2010) lo cual podría ser una explicación para el incremento observado, en la expresión de RA cuando se trata con tibolona a 0.1 mg/Kg al grupo LTME.

Es importante considerar el efecto de la inflamación en la regulación del RA ya que los factores apoptóticos Myc, Foxo3a, Smad, así como los factores de transcripción inflamatorios NF-kB e Interleucina-8 regulan positivamente al RA (Shiota, Yokomizo & Seiji., 2011).

También, Yeh y colaboradores han observado, en cultivos de células de cáncer prostático, que a una concentración de 10 nM y en presencia de un coactivador (ARA₇₀), E2 puede inducir 30 veces más la actividad transcripcional de RA (Yeh, Miyamoto, Shima & Chang., 1998). Si la tibolona imita el comportamiento del E2 es

posible que genere una actividad transcripcional de RA dependiente de dosis explicando por qué se observa un incremento drástico del RA a una dosis de tibolona de 0.1 mg/Kg. De tal forma, sería útil demostrar la presencia del ARA₇₀ y realizar cuantificaciones de tibolona y sus metabolitos presentes en la médula espinal después de la administración de dicho fármaco.

Es importante considerar cuál sería la mejor dosis de tibolona, para generar sus efectos deseables en la LTME en rata. Por ejemplo, no se recomienda la dosis de 0.1mg/Kg ya que bajo esta condición se indica una presencia considerable de RA y este inhibe la expresión de RE β (Kumar, et al., 2018). Similarmente, los resultados indican una razón que favorece la presencia de RPA en los grupos que recibieron dosis de 0.1 y 1 mg/Kg. Esto representa que en los grupos de menor dosis de tibolona, se promueve un ambiente pro inflamatorio que inhibe la expresión del RPB y previene sus efectos anti inflamatorios. Por último, el grupo que recibió dosis de 2.5 mg/Kg muestra un aumento estadísticamente significativo de RE en comparación con el grupo de laminectomía, mejorando la señalización de estrógenos y favoreciendo sus efectos neuroprotectores. Debido a esto se propone que la dosis de tibolona de 2.5 mg/Kg es la más apropiada para conducir los efectos deseables de dicho fármaco en la LTME en rata, mediante la regulación de los receptores a hormonas esteroideas.

8. Conclusión

Se evaluó, mediante PCR, el efecto de la administración de tibolona a dosis de 0.1, 1.0, 2.5 y 10 mg/kg sobre la expresión del Receptor a Estrógenos α (RE α), Receptor a Estrógenos β (RE β), Receptor a Progesterona Total (RPT), Receptor a Progesterona B (RPB) y Receptor a Andrógenos (RA), en la lesión traumática de médula espinal en rata.

La LTME ocasionó una disminución en la expresión del RE α y RE β . La administración de tibolona aumentó la expresión de los RE, compensando el efecto que tiene la LTME, a una dosis de 0.1 y 2.5 mg/Kg para el RE α y a una dosis de 2.5mg/Kg para el RE β . El aumento de la expresión del RE provocada por la administración de tibolona puede tener efectos benéficos en la LTME al mejorar la señalización de estrógenos y permitir que realicen sus efectos neuroprotectores. La expresión del RPT no se modificó significativamente con ninguno de los tratamientos, sin embargo, la expresión del RPB disminuyó su expresión en la LTME. En los grupos a los que se les administró dosis de tibolona a 2.5 y 10 mg/Kg no se observa dicha disminución. Este comportamiento sugiere que la tibolona altera la razón RPA: RPB de manera dependiente de dosis, afectando la expresión de genes proinflamatorios los cuales a su vez influyen la expresión de los PR. La expresión del RA no se modificó por la LTME pero presentó un marcado incremento dependiente de dosis en su expresión al administrar tibolona a una dosis de 0.1 mg/Kg.

Se evaluó el efecto de la administración de la tibolona sobre la expresión de los receptores a hormonas sexuales en la lesión traumática de médula espinal en rata. La tibolona regula la expresión de los receptores a hormonas esteroides en la médula espinal en un modelo de lesión traumática y esta regulación es dosis dependiente.

9. Perspectivas

La regulación de los receptores nucleares hormonales mediante la administración de tibolona, pudiera ejercer una potenciación de la señalización hormonal que induce efectos neuroprotectores propios de las hormonas sexuales. Dicho comportamiento podría ayudar a disminuir las secuelas de la LTME apaciguando los mecanismos bioquímicos que son provocados por la lesión secundaria.

Para complementar los resultados obtenidos de RE hubiera sido conveniente determinar la presencia de los hidroximetabolitos de tibolona en el tejido, así como del factor de transcripción AP-1 y del IFN- α . También hubiera sido conveniente estudiar la expresión del receptor progesterona A, en vez de receptor progesterona total en los grupos de estudio y determinar si, en efecto, hay un aumento del RPA, el cual pudiera deberse a la regulación cruzada positiva que tiene con el receptor a estrógenos y a factores proinflamatorios, que lo regulan positivamente. Asimismo, la determinación de la presencia de dichos factores inflamatorios (IL-1 β y lipopolisacáridos) y del isómero de la tibolona sería de utilidad. Por último, para apoyar el análisis realizado de los resultados para RA sería necesario cuantificar la presencia de los hidroximetabolitos de tibolona que imitan al estradiol y pudieran ser los responsables del aumento que se observa en la expresión del RA a dosis baja. La determinación de la presencia del coactivador ARA₇₀, Δ 4-tibolona y los factores inflamatorios NF-kB e IL-8 sería conveniente.

10. Referencias

- Aguiar RB, Dickel OE, Cunha RW, Monserrat JM, Barros DM & Martínez PE. (2006). Estradiol valerate and tibolone: effects on memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 85(4):689–696. doi: 10.1016/j.pbb.2006.10.023.
- Ahlbom E, Prins GS & Ceccatelli S. (2001). Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. *Brain Research*. 892(2):255-262. doi: 10.1016/s0006-8993(00)03155-3.
- Alexander SPH, Cidlowski JA, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA & CGTP Collaborators. (2017). THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Nuclear hormone receptors. *British Journal of Pharmacology*. v.174(Suppl Suppl 1). doi: 10.1111/bph.13882.
- Anwar MA, Al Shehabi TS & Eid AH. (2016). Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.10:98. doi: <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00098>.
- Bagamasbad P & Denver RJ. (2010). Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation. *General and Comparative Endocrinology*. 170(1):3-17. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.03.013.
- Bansal R & Singh R. (2018). Exploring the potential of natural and synthetic neuroprotective steroids against neurodegenerative disorders: A literature review, *Medicinal Research Reviews*. 38(4):1126-1158. doi: 10.1002/med.21458.
- Bao F, Dekaban GA & Weaver LC. (2005). Anti-CD11d antibody treatment reduces free radical formation and cell death in the injured spinal cord of rats. *Journal of Neurochemistry*. 94(5):1361-1373. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03280.x>.
- Bao F & Liu D. (2003). Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptotic cell death and activates caspase-3. *Neuroscience*. 116(1):59–70. doi: [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00571-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00571-7).
- Baptiste DC & Fehlings MG. (2006). Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord. *Journal of Neurotrauma*. 23(3-4):318–334. doi: <https://doi.org/10.1089/neu.2006.23.318>.
- Barton MJ, St John J, Clarke M, Wright A & Ekberg J. (2017). The Glia Response after Peripheral Nerve Injury: A Comparison between Schwann Cells and Olfactory Ensheathing Cells and Their Uses for Neural Regenerative Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(2):287. doi: 10.3390/ijms18020287.

- Beltran V, Díaz A, Padilla E, Aguilar H, Rios C & Diaz SC. (2015). Effect of tibolone on dendritic spine density in the rat hippocampus. *Neurología*. 30(7):401–406. doi: 10.1016/j.nrl.2014.03.002.
- Beshay VE & Carr BR. (2013). Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle. In: *Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide*. 2nd Edition. Springer. New York, USA. Chapter 2. Pp. 39.
- Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F, Marcillo AE, Looor K, Green J & Dietrich WD. (1999). Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma*. 16(10):851–863. doi: 10.1089/neu.1999.16.851.
- Bialek M, Zaremba P, Borowicz KK & Czuczwa SJ. (2004). Neuroprotective Role of Testosterone in the Nervous System. *Polish Journal of Pharmacology*. 56(5):509-518. Recuperado de: <https://bit.ly/2TIR59A>. Consulta realizada el día 3 de diciembre del 2019.
- Brand LJ & Scott MD. (2014). Androgen Receptor Gene Rearrangements: New Perspectives on Prostate Cancer Progression. *Current Drug Targets*. 14(4): 441-449. Recuperado de: <https://bit.ly/30PWQUI>. Consulta realizada el día 2 de septiembre del 2019.
- Brau RH, Acevedo YS & Giovannetti K. (2018). Epidemiological Trends of Traumatic Brain and Spinal Cord Injury in Puerto Rico from November 10th, 2006, through May 24th, 2011, *Puerto Rico Health Sciences Journal*. 37(2):67-77. Recuperado de: <https://bit.ly/3axsYAQ>. Consulta realizada el día 2 de diciembre del 2019.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang JM, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ & Nilsen J. (2008). Progesterone receptors: Form and function in brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 29(2):313-339. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.02.001.
- Casha S, Yu WR & Fehlings MG. (2001). Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*. 103(1):203–218. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00538-8.
- Cheng B, Christakos S & Mattson MP. (1994). Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron*. 12(1):139–153. doi: 10.1016/0896-6273(94)90159-7.
- Chu GK, Yu W & Fehlings MG. (2007). The p75 neurotrophin receptor is essential for neuronal cell survival and improvement of functional recovery after spinal cord injury. *Neuroscience*. 148(3):668–682. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.05.028.

- Chuffa LG, Lupi LAJ, Costa AB, Amorim JP & Seiva FR. (2017). The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. *Steroids*. 118:93–108. doi: 10.1016/j.steroids.2016.12.011.
- Crespo CA, Yanguas CN, Arevalo MA, Azcoitia I, Barreto GE & Garcia SLM. (2018). The Synthetic Steroid Tibolone Decreases Reactive Gliosis and Neuronal Death in the Cerebral Cortex of Female Mice After a Stab Wound Injury. *Molecular Neurobiology*. 5(11):8651-8667. Recuperado de: doi: 10.1007/s12035-018-1008-x.
- Darain H, Arsh A, Zeb A, Ilyas SM, Muhammad D & Khan MN. (2018). Epidemiology, Clinical Features and Consequences of Spinal Cord Injury in Children. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. 28(7):532-535. Recuperado de: <https://bit.ly/2RDQ6oD> Consulta realizada el día 2 de diciembre del 2019.
- Das A, Smith JA, Gibson C, Varma AK, Ray SK & Banik NL. (2011). Estrogen receptor agonists and estrogen attenuate TNF-alpha-induced apoptosis in VSC4.1 motoneurons. *Journal of Endocrinology*. 208 (2):171–182. doi: 10.1677/JOE-10-0338.
- Davey RA & Grossmann M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clinical Biochemist Reviews*. 37(1): 3–15. Recuperado de: <https://bit.ly/2uitleyH>. Consulta realizada el día 3 de diciembre del 2019.
- De la Madrid MH. (1998). REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Recuperado de: <https://bit.ly/2RfQUkF>. Consulta realizada el día 3 de diciembre del 2019.
- De Nicola AF, Labombarda F, Gonzalez MCD, Gonzalez SL, Garay L, Meyer M, Gargiulo G, Guennoun R & Schumacher M. (2009). Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 30(2):173-187. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.03.001.
- Devivo MJ. (2012). Epidemiology of traumatic spinal cord injury: trends and future implications. *Spinal Cord*. 50(5):365–372. doi:10.1038/sc.2011.178.
- Ditunno JF, Little JW, Tessler A & Burns AS. (2004). Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord*. 42(7):383–395. doi:10.1038/sj.sc.3101603.
- Donnelly DJ & Popovich PG. (2007). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental Neurology*. 209(2):378–388. doi: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.009>.
- Dubový P. (2017). Cytokines and Their Implication in Axon Degeneration and Regeneration Following Peripheral Nerve Injury. In: Cytokine Effector Functions in Tissues. Chapter 9. Pp 139–148. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804214-4.00008-7>.

- Evans RM. (1988). The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. *Science*. 240(4854):889-895. doi: 10.1126/science.3283939.
- Faden AI, Wu J, Stoica BA & Loane DJ. (2016). Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. *British Journal of Pharmacology*. 173(4):681-691. doi: <https://doi.org/10.1111/bph.13179>.
- Farfán GED, Castillo HMC, Pinto AR, Rivas AS, Gallardo JM & Guerra AC. (2014). Tibolone prevents oxidation and ameliorates cholinergic deficit induced by ozone exposure in the male rat hippocampus. *Neurochemical Research*, 39(9):1776–1786. doi: 10.1007/s11064-014-1385-0.
- Fargo KN, Foster AM & Sengelaub DR. (2009). Neuroprotective effect of testosterone treatment on motoneuron recruitment following the death of nearby motoneurons. *Developmental Neurobiology*. 69(12):825-35. doi: 10.1002/dneu.20743.
- Finn JT, Weil M, Archer F, Siman R, Srinivasan A & Raff MC. (2000). Evidence that Wallerian degeneration and localized axon degeneration induced by local neurotrophin deprivation do not involve caspases. *Journal of Neuroscience*. 20(4):1333–1341. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-04-01333.2000.
- Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, Pasquale MS, Dietrich WD & Weaver LC. (2006). The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*. 129(Pt 12):3249–3269. doi: <https://doi.org/10.1093/brain/awl296>.
- Garcia LMS, Azcoitia I & DonCarlos LL. (2001). Neuroprotection by estradiol. *Progress in Neurobiology*. 63(1):29-60. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00025-3.
- Gaudet AD, Popovich PG & Ramer MS. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*. 8:110. doi:10.1186/1742-2094-8-110.
- Giangrande PH & McDonnell DP. (1999). The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. *Recent Progress in Hormone Research*. 54:291-313. Recuperado de: <https://bit.ly/3axAlmj>. Consulta realizada el día 6 de agosto del 2019.
- 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, cynomolgus monkeys. *Neuroscience*. 113(4):907–914. 10.1016/s0306-4522(02)00239-7.
- Griekspoor A, Zwart W, Neefjes J & Michalides R. (2007). Visualizing the action of steroid hormone receptors in living cells. *Nuclear Receptor Signaling*. Vol.5. doi: 10.1621/nrs.05003.

- Grimm SL, Hartig SM & Edwards DP. (2016). Progesterone Receptor Signaling Mechanism. *Journal of Molecular Biology*. 428(19):3831-3849. doi: 10.1016/j.jmb.2016.06.020.
- Guyton AC & Hall JE. (2011). Fisiología femenina antes de la gestación y hormonas femeninas. En: Tratado de Fisiología Médica. 12a Edición. Editorial *Elsevier*. España. Cap.81.Pp.991-1001. Recuperado de: <https://bit.ly/2RdymkS>. Consulta realizada el día 3 de diciembre del 2019.
- Hall JM, Couse JF & Korach KS. (2001). The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(40):36869-36872. doi: 10.1074/jbc.R100029200.
- Hauben E, Mizrahi T, Agranov E & Schwartz M (2002). Sexual dimorphism in the spontaneous recovery from spinal cord injury: a gender gap in beneficial autoimmunity? *European Journal of Neuroscience*.16(9):1731–1740. doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02241.x.
- Hill CE, Beattie MS & Bresnahan JC. (2001). Degeneration and sprouting of identified descending supraspinal axons after contusive spinal cord injury in the rat. *Experimental Neurology*. 171(1):153–169. doi: <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7734>.
- Hu R, Sun H, Zhang Q, Chen J, Wu N, Meng H, Cui G, Hu S, Li F, Lin J, Wan Q & Feng H. (2012). G-protein coupled estrogen receptor 1 mediated estrogenic neuroprotection against spinal cord injury. *Critical care medicine*. 40(12):3230–3237. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182657560.
- Huang KE & Baber R. (2010). Updated clinical recommendations for the use of tibolone in Asian women. *Climacteric*. 13(4): 317–327. doi: 10.3109/13697131003681458.
- Jiang W, Li M, He F, Bian Z, He Q, Wang X, Yao W & Zhu L. (2016). Neuroprotective effect of asiatic acid against spinal cord injury in rats. *Life Sciences*. 157:45-51. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.05.004>.
- Jones KJ, Brown TJ & Damaser M. (2001). Neuroprotective effects of gonadal steroids on regenerating peripheral motoneurons. *Brain Research Brain Research Reviews*. 37(1-3):372-382. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00107-2.
- Kim GM, Xu J, Song SK, Yan P, Ku G, Xu XM & Hsu CY. (2001). Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *Journal of Neuroscience* 21(17):6617–6625. Recuperado de: <https://bit.ly/3awlKgr>. Consulta realizada el día 3 de diciembre del 2019.
- Kjell J & Olson L. (2016). Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Journal List*. v.9(10). doi: 10.1242/dmm.025833.

- Kong X & Gao J. (2017). Macrophage polarization: a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 21(5):941-954. doi: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13034>.
- Kumar A, Dumasia K, Deshpande S, Raut S & Balasinor NH. (2018). Delineating the regulation of estrogen and androgen receptor expression by sex steroids during rat spermatogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 182:127-136. doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.04.018.
- Lipton SA & Rosenberg PA. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *The New England Journal of Medicine*. 330(9):613-622. doi: 10.1056/NEJM199403033300907.
- Lorenzo J. (2003). A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *Journal of Clinical Investigation*. 111(11):1641-1643. doi: 10.1172/JCI18812.
- Ludwig PE, Patil AA, Chamczuk AJ & Agrawal DK. (2017). Hormonal therapy in traumatic spinal cord injury. *American Journal of Translational Research*. 9(9):3881-3895. Recuperado de: <https://bit.ly/2RenVNW>. Consulta realizada el día 2 de diciembre del 2019.
- McAbee MD & DonCarlos LL. (1999). Estrogen, But Not Androgens, Regulates Androgen Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in the Developing Male Rat Forebrain. *Endocrinology*. 140(8):3674-3681. doi: 10.1210/endo.140.8.6901.
- Melcangi RC, García LMS & Mensah AGN. (2008). Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65(5):777-797. doi: 10.1007/s00018-007-7403-5.
- Melmed S & Conn MP. (2007). Plasma Membrane Receptors for Steroids. In: *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*. 2nd Edition. Human Press. New Jersey, USA. Chapter 4. Pp. 70. Recuperado de: <https://bit.ly/38q5BHB>. Consulta realizada el día 12 de diciembre del 2019.
- Molnar C & Gair J. (2013). The animal body: Basic Form and Function. In: *Concepts of Biology-1st Canadian Edition*. Rice University. Texas, USA. Chapter 14. Pp. 18.
- Moriarty K, Kim KH & Bender JR. (2006). Minireview: Estrogen Receptor-Mediated Rapid Signaling. *Endocrinology*. 147(12):5557-5563. doi: 10.1210/en.2006-0729.
- Norenberg MD, Smith J & Marcillo A. (2004). The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *Journal of Neurotrauma*. 21(4):429-440. doi: <https://doi.org/10.1089/089771504323004575>.
- Novac & Heinzl. (2004). Nuclear Receptors: Overview and Classification. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*. 3(4):335-346. doi: 10.2174/1568010042634541.

- Olefsky JM. (2001). Nuclear Receptor Minireview Series. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(40):36863-36864. doi: 10.1074/jbc.R100047200.
- Panchanathan R, Shen H, Zhang X, Ho SM & Choubey D. (2010). Mutually Positive Regulatory Feedback Loop between Interferons and Estrogen Receptor- α in Mice: Implications for Sex Bias in Autoimmunity. *PLoS One*. 28;5(5):e10868. doi: 10.1371/journal.pone.0010868.
- Peters GA, Yi L, Prokvolit YS, Patel B, Amini P, Tan H & Mesiano S. (2016). Inflammatory Stimuli Increase Progesterone Receptor-A Stability and Transrepressive Activity in Myometrial Cells. *Endocrinology*. 158(1):158–169. doi: 10.1210/en.2016-1537.
- Pike CJ. (2001). Testosterone attenuates beta-amyloid toxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Research*. 919(1):160-165. doi: 10.1016/s0006-8993(01)03024-4.
- Pineau I & Lacroix S. (2007). Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *Journal of Comparative Neurology*. 500(2):267–285. doi: <https://doi.org/10.1002/cne.21149>.
- Pinto AR, Calzada MCC, Campos LMG & Guerra AC. (2012). Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat. *Journal of Neuroscience Research*. 90(4):878–886. doi: 10.1002/jnr.22808.
- Pinto AR, Segura UJJ, Farfán GED & Guerra AC. (2017). Effects of Tibolone on the Central Nervous System: Clinical and Experimental Approaches. *BioMed Research International*. 8630764. doi: <https://doi.org/10.1155/2017/8630764>.
- Prossnitz ER & Maggiolini M. (2009). Mechanisms of estrogen signaling via GPR30. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 24:308(1-2):32–38. doi: 10.1016/j.mce.2009.03.026.
- Popovich PG, Wei P & Stokes BT. (1997). Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *Journal of Comparative Neurology*. 377(3):443–464. doi:[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19970120\)377:3<443::AID-CNE10>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19970120)377:3<443::AID-CNE10>3.0.CO;2-S).
- Qiu J, Bosch MA, Ronnekleiv OK, Kloosterboer HJ & Kelly MJ. (2008). Tibolone rapidly attenuates the GABAB response in hypo-thalamic neurones. *Journal of Neuroendocrinology*. 20(12):1310–1318. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01789.x.
- Quarles RH, Macklin WB & Morell P. (1999). Myelin Formation, Structure and Biochemistry. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 7th Edition. Elsevier Academic Press. Canada. Chapter 4. Pp. 51-71. Recuperado de: <https://bit.ly/2Gc3RWj>. Consulta realizada el día 2 de diciembre del 2019.

- Rękawiecki R, Kowalik MK & Kotwica J. (2011). Nuclear progesterone receptor isoforms and their functions in the female reproductive tract. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 14(1):149-158. doi:10.2478/v10181-011-0024-9.
- Rey M & Coirini H. (2015). Synthetic neurosteroids on brain protection. *Neural Regeneration Research*. 10(1):17-21. doi: 10.4103/1673-5374.150640.
- Rodríguez MMV, Paredes CM, Grijalva I & Rojano MD. (2016). Clinical and demographic profile of traumatic spinal cord injury: a mexican hospital-based study. *Spinal Cord*. 54(4):266-269. doi:10.1038/sc.2015.164.
- Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B & Fehlings MG. (2008). Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgery Focus*. 25(5):E2. doi: <https://doi.org/10.3171/FOC.2008.25.11.E2>.
- Safe S & Kim K. (2008). NONCLASSICAL GENOMIC ER/Sp AND ER/AP-1 SIGNALING PATHWAYS. *Journal of Molecular Endocrinology*. 41(5):263-275. doi: 10.1677/JME-08-0103.
- Samantaray S, Smith JA, Das A, Matzelle DD, Varma AK, Ray SK & Banik NL. (2011). Low dose estrogen prevents neuronal degeneration and microglial reactivity in an acute model of spinal cord injury: effect of dosing, route of administration, and therapy delay. *Neurochemical Research*. 36(10):1809–1816. doi: 10.1007/s11064-011-0498-y.
- Scanlon VC. & Sanders T. (2007). The Nervous System. In: *Essentials of Anatomy and Physiology*. 5th Edition. *Davis Company*. Philadelphia, USA. Chapter 8. Pp.166-167. Recuperado de: <https://bit.ly/30F70HE>. Consulta realizada el día 2 de diciembre del 2019.
- Scarpin KM, Graham JD, Mote PA & Clarke CL. (2009). Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nuclear Receptor Signaling*. 7: e009. doi: 10.1621/nrs.07009.
- Schanne FA, Kane AB, Young EE & Farber JL. (1979). Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*. 206(4419):700–702. doi: 10.1126/science.386513.
- Sever & Glass. (2013). Signaling by Nuclear Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. v.5(3). doi: 10.1101/cshperspect.a016709.
- Shiota M, Yokomizo A & Seiji N. (2011). Increased androgen receptor transcription: a cause of castration-resistant prostate cancer and a possible therapeutic target. *Journal of Molecular Endocrinology*. 47(1):R25-41. doi: 10.1530/JME-11-0018.

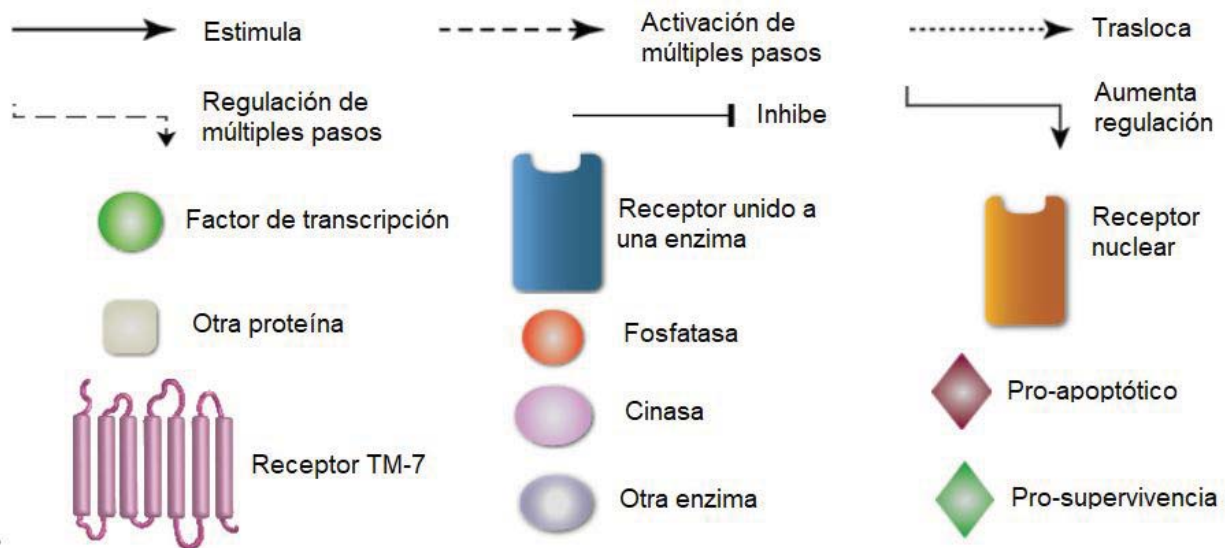
- Singhal H, Greene ME, Zarnke AL, Laine M, Abosy RA, Chang YF, Dembo AG, Schoenfelt K, Vadhi R, Qiu X, Rao P, Santhamma B, Nair HB, Nickisch KJ, Long HW, Becker L, Brown M & Greene GL. (2018). Progesterone receptor isoforms, agonists and antagonists differentially reprogram estrogen signaling. *Oncotarget*. 9(4):4282-4300. doi: 10.18632/oncotarget.21378.
- Snyder PJ. (2008). Androgens. In: Osteoporosis. 3rd Edition. Editorial *Academic Press*. USA. Chapter 77. Pp. 1897-1941.
- Spence RD & Voskuhl RR. (2012). Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 33(1):105-115. doi: 10.1016/j.yfrne.2011.12.001.
- Stoodley MA. (2000). Pathophysiology of syringomyelia. *Journal of Neurosurgery*. 92(6):1069–1073. Recuperado de: <https://bit.ly/2tvTZUN>. Consulta realizada el día 2 de diciembre del 2019.
- Stys PK & Lipton SA. (2007). White matter NMDA receptors: an unexpected new therapeutic target?. *Trends in Pharmacological Science*. 28(11):561–566. doi: 10.1016/j.tips.2007.10.003.
- Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW & Mesiano S. (2012). Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 97(5):E719-30. doi: 10.1210/jc.2011-3251.
- Tator CH & Koyanagi I. (1997). Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*. 86(3):483–492. doi: <https://doi.org/10.3171/jns.1997.86.3.0483>.
- Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, Shaffrey CI & Chopp M. (1999). Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*: 24(20):2134-2138. doi: 10.1097/00007632-199910150-00013.
- Tocris Bioscience. (2020). Signaling Pathways, Interactive signal transduction pathways. Recuperado de: <https://bit.ly/36bqapC>. Consulta realizada el día 15 de Enero del 2010.
- Tortora GJ & Derrickson B. (2011). La médula espinal y los nervios espinales. En: Principios de Anatomía y Fisiología. 11ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Capítulo 13. Pp.444-449.
- Totoiu MO & Keirstead HS. (2005). Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *Journal of Comparative Neurology*. 486(4):373– 383. doi: 10.1002/cne.20517.

- Vergouwen MD, Anderson RE & Meyer FB. (2000). Gender differences and the effects of synthetic exogenous and non-synthetic estrogens in focal cerebral ischemia. *Brain Research*. 878(1–2):88–97. doi:10.1016/s0006-8993(00)02713-x.
- Verheul HAM, van Lersel MLPS, Delbressine LPC & Kloosterboer HJ. (2007). Selective Tissue Distribution of Tibolone Metabolites in Mature Ovariectomized Female Cynomolgus Monkeys after Multiple Doses of Tibolone. *Drug metabolism and disposition*. 35(7):1105–1111. doi: 10.1124/dmd.106.014118.
- Wierman, ME. (2007). Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Advances in Physiology Education*. 31(1):26-33. doi: 10.1152/advan.00086.2006.
- Wrathall JR, Teng YD & Choiniere D. (1996). Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors. *Experimental Neurology*. 137(1):119–126. doi: <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0012>.
- Xiong Y, Rabchevsky AG & Hall ED. (2007). Role of peroxynitrite in secondary oxidative damage after spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry*. 100(3):639–649. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04312.x>.
- Xun C, Mamat M, Guo H, Mamati P, Sheng J, Zhang J, Xu T, Liang W, Cao R & Sheng W. (2017). Tocotrienol alleviates inflammation and oxidative stress in a rat model of spinal cord injury via suppression of transforming growth factor- β . *Experimental and Therapeutic Medicine*. 14(1):431–438. doi: 10.3892/etm.2017.4505.
- Yasar P, Ayaz G, Damla SU, G p r G & Muyan M. (2017). Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*. 16(1):4–20. doi: 10.1002/rmb2.12006.
- Yeh S, Miyamoto H, Shima H & Chang C. (1998). From estrogen to androgen receptor: A new pathway for sex hormones in prostate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*. 95(10): 5527–5532. doi: 10.1073/pnas.95.10.5527.
- Z rate KB, Jiménez GA, Reyes SA, Robles OR, Cabrera AEE & Rosales OLM. (2016). Demographic and clinical characteristics of patients with spinal cord injury: a single hospital-based study. *Spinal Cord*. 54(11):1016-1019. doi:10.1038/sc.2016.41.

11. ANEXO

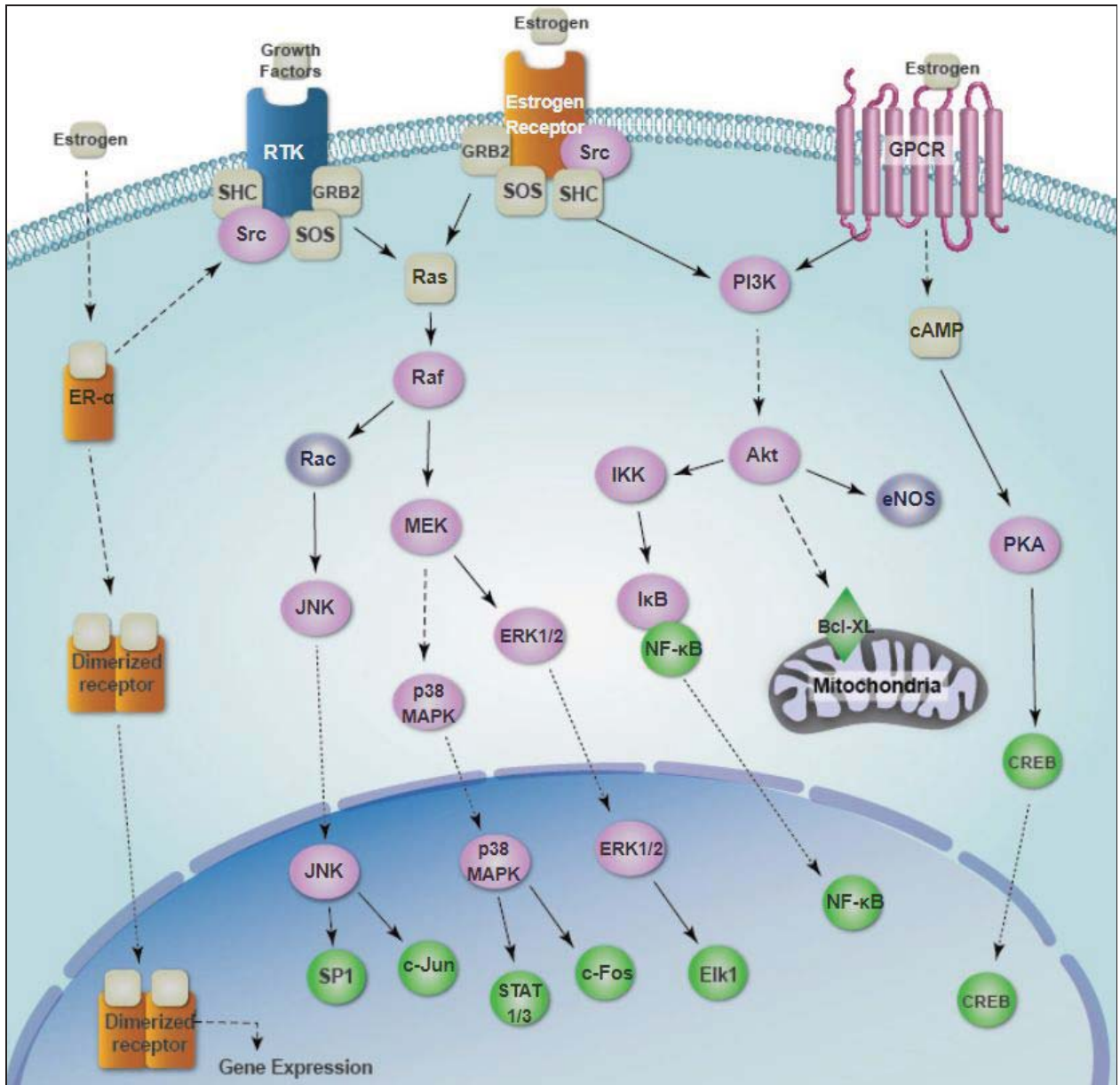
11.1 Rutas de Señalización de interés

Claves de la Cascada de Señalización



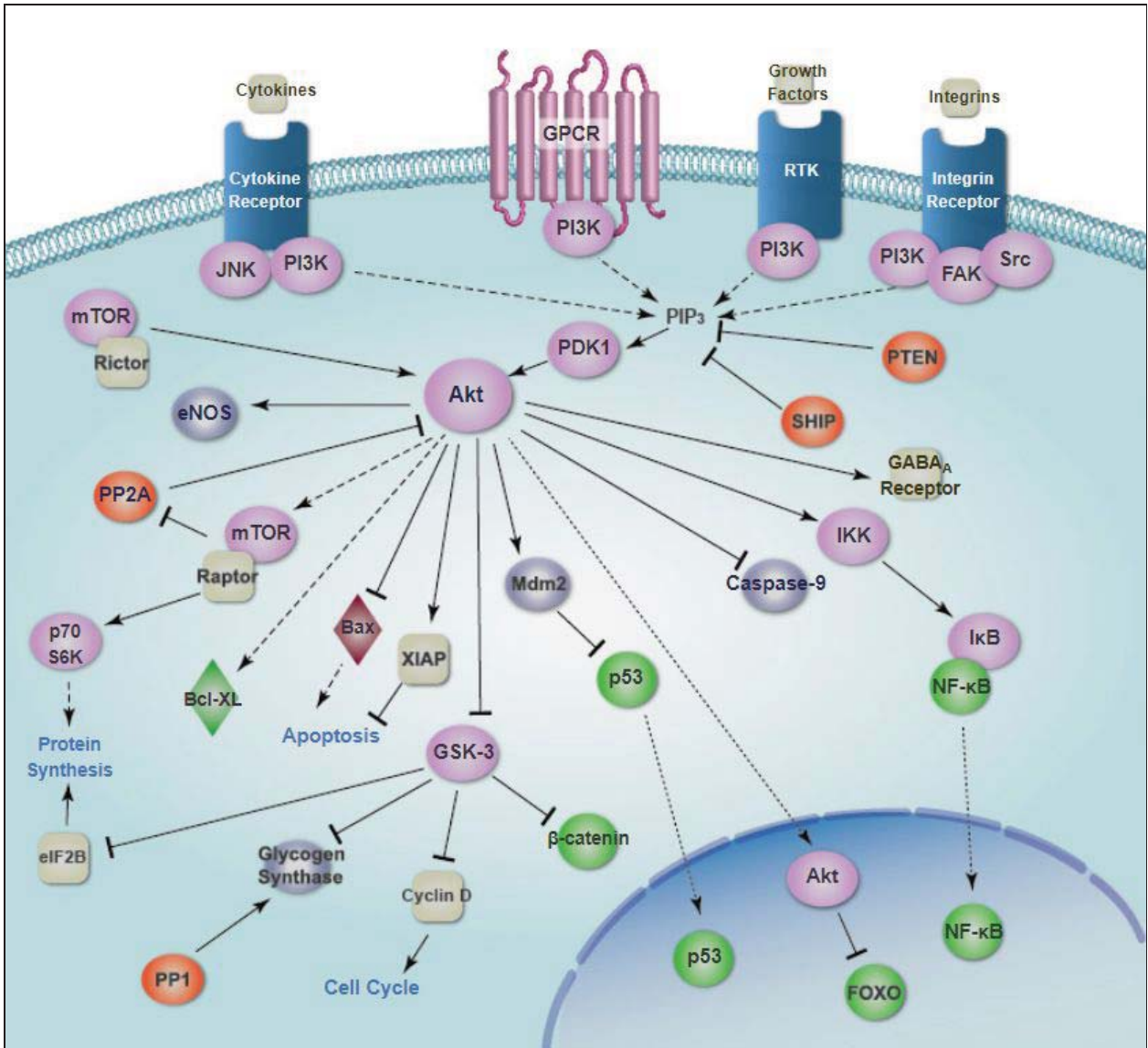
Modificada de: Tocris Bioscience. (2020).

1) Vía de Señalización de Estrógenos



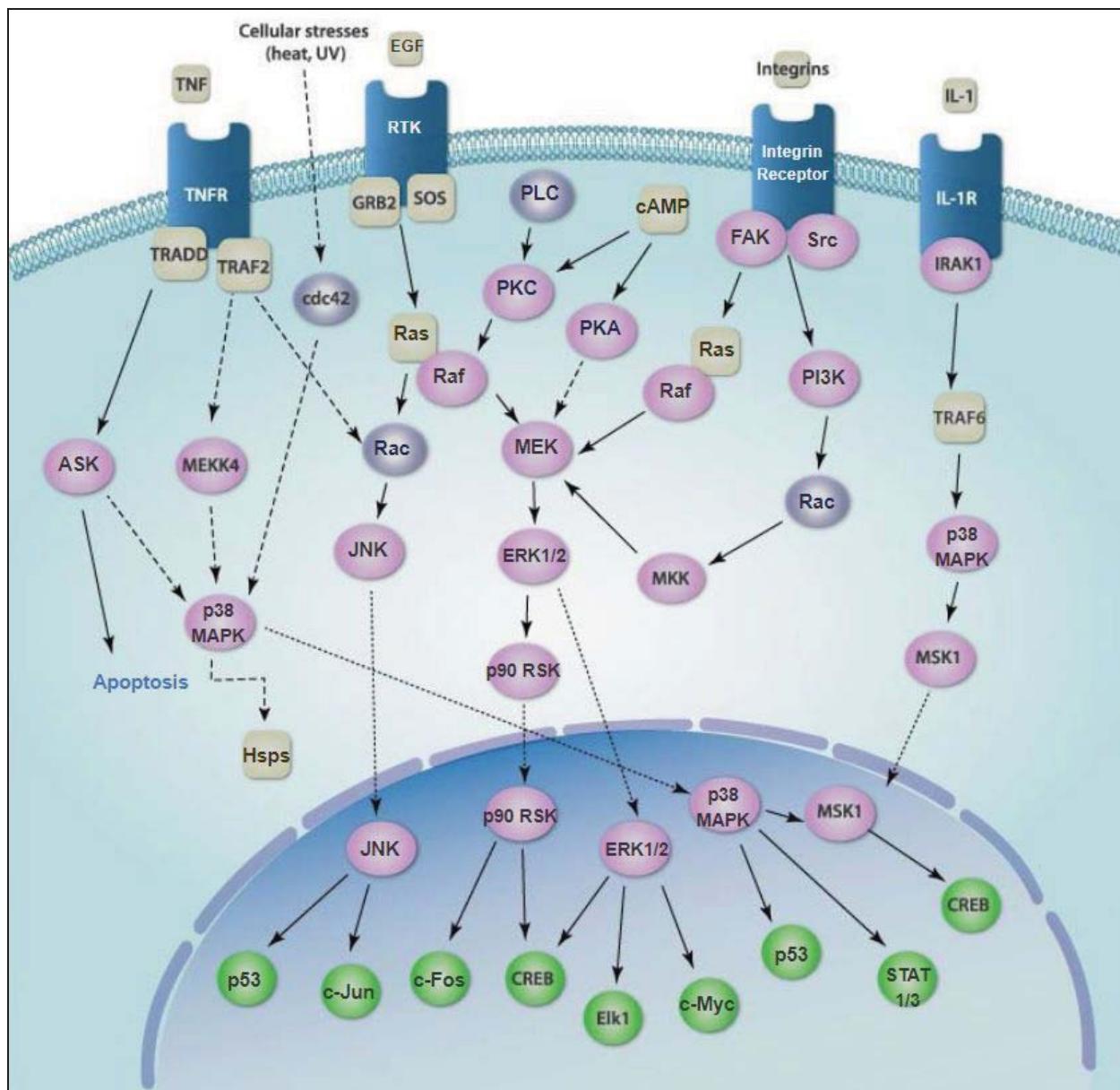
Tocris Bioscience. (2020).

2) Ruta de Señalización AKT/PI3K



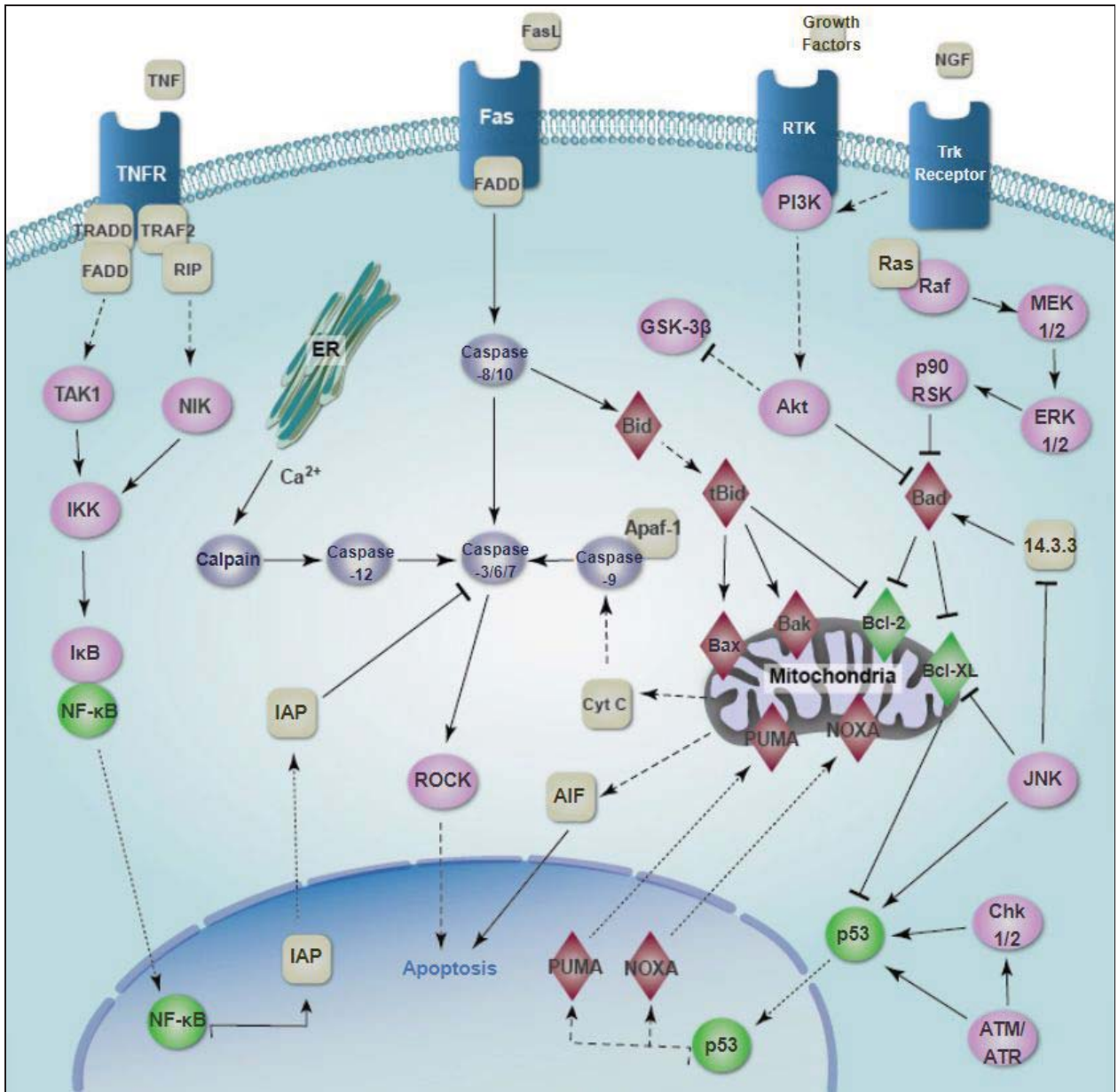
Tocris Bioscience. (2020).

3) Ruta de Señalización MAPK/ERK



Tocris Bioscience. (2020).

4) Vía de señalización de la Apoptosis



Tocris Bioscience. (2020).