





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Posgrado en Ciencias Biológicas

Activación de los receptores de estrógeno y  
progesterona por progestinas sintéticas que  
participan en la inducción de la conducta sexual  
femenina

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

**José Luis Encarnación Sánchez**

**DIRECTOR: Dr. Oscar González Flores.**

**TUTORES: Dra. Dora Luz Corona Quintanilla  
Dr. Porfirio Gómora Arrati**

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2020

La presente tesis se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación en Reproducción Animal, del Cinvestav y la Universidad Autónoma de Tlaxcala, en el laboratorio de Conducta sexual femenina bajo la dirección del Dr. Oscar González Flores.

El proyecto se desarrolló dentro del programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, el cual está incorporado al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PNPC-CONACyT).

El proyecto contó con el financiamiento del CONACyT (Proyecto: CB-2009-C01-134291; Beca: 297920) y PROMEP No. 103.5/09/1294 para OGF.



Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

*Posgrado en Ciencias Biológicas*



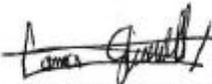
**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **José Luis Encarnación Sánchez** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Activación de los receptores de estrógeno y progesterona por progestinas sintéticas que participan en la inducción de la conducta sexual femenina”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

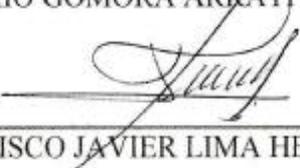
ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 22 DE 2019

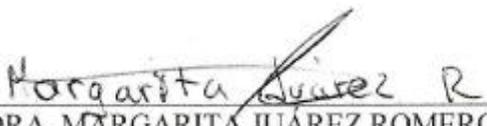
  
DR. OSCAR GONZÁLEZ FLORES

  
DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA

  
DR. PORFIRIO GÓMORA ARRATI

  
DR. MARCOS GARCÍA JUÁREZ

  
DR. FRANCISCO JAVIER LIMA HERNÁNDEZ

  
DRA. MARGARITA JUÁREZ ROMERO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:  
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado del CTBC, UAT y todos sus académicos que participaron en el desarrollo de mi superación académica y personal.

Al CONACyT como organismo dedicado al apoyo de la ciencia y tecnología en nuestro país por brindarme la beca; 297920 para realizar el proyecto; CB-2009-C01-134291, y permitirme cursar una maestría de excelencia.

Al PROMEP por brindarme su apoyo para la realización de mi trabajo de investigación con el proyecto; No. 103.5/09/1294 para OGF.

A los sinodales:

Dr. Oscar González Flores

Dr. Porfirio Gómora Arrati

Dra. Dora Luz Corona Quintanilla

Dr. Francisco Javier Lima Hernández

Dr. Marcos García Juárez

Dra. Margarita Juárez Romero

Por prestar parte de su tiempo académico en la revisión de la presente tesis y compartir sus sugerencias y perspectivas para mejorar el desarrollo de esta.

Al Dr. Oscar González Flores por su orientación y guía en la realización de esta tesis, y sobre todo por su paciencia y apoyo para mi persona tanto en el ámbito profesional como personal.

Al Dr. Porfirio Gómora Arrati por su participación en la mejora de esta tesis, y seguir siendo un buen maestro y amigo.

A la Dra. Dora Luz Corona Quintanilla por sus comentarios tan precisos y amistosos a lo largo de todos los años que he compartido experiencias académicas con ella.

A mis amigos del CIRA; Dr. Raymundo, Dr. Marcos, Dr. Javier, MC. Lupita y la Biol. Lupita, gracias por su apoyo incondicional en mi labor académica y en mi vida.

## DEDICATORIAS

A mi mamá Delia, gracias por creer siempre en mí, por brindarme todo tu amor y darme todo lo necesario y más, gracias por ser mi madre y amiga.

A mi mamá Alicia, gracias por cuidarme toda la vida, gracias por educarme y criarme, gracias por darme todo tu amor y cariño, sabes que tú siempre tendrás el mío.

A Sarai, mi esposa con quien comparto las alegrías y tristezas de la vida, gracias por tu amor, paciencia y apoyo para poder concluir este grado académico, sé que juntos creceremos como personas y como académicos.

A mi hija, gracias por darme tu amor de manera incondicional, siempre que te veo sé que volví a nacer.

## Resumen

La conducta sexual femenina o conducta de estro en roedores es inducida por la acción de secuencial de estrógenos y progesterona, se plantea a la progesterona como la hormona disparadora de esta conducta. Desde la segunda mitad del siglo XX se han desarrollado numerosos esteroides sintéticos muy similares a la progesterona que fueron nombradas progestinas sintéticas, estas han sido empleadas principalmente como agentes anticonceptivos y en terapias de remplazo hormonal. Sin embargo, el uso inadecuado de estas progestinas junto con la falta de un entendimiento de las acciones fisiológicas y celulares que estas pueden ejercer en diferentes tejidos indujo la aparición de diversos trastornos asociados al uso de ellas.

Existen progestinas sintéticas relacionadas con la estructura molecular de progesterona, estrógenos o andrógenos, algunas de ellas tienen una afinidad mayor por el receptor de progesterona que su propio ligando natural. Un ejemplo de este tipo de progestinas son el levonorgestrel, el acetato de megestrol y el acetato de medroxiprogesterona, las cuales se emplearon en el presente trabajo buscando conocer algunas de las vías de acción intracelulares que pueden estar utilizando para ejercer sus acciones farmacológicas en los sistemas biológicos.

En el presente trabajo utilizando el modelo de la conducta de estro y el reflejo de lordosis en la rata hembra pudimos evaluar conductualmente la efectividad de las progestinas sintéticas ya mencionadas en la activación del receptor de progesterona, el receptor de estrógenos, las vías de señalización de la MAPK y la proteína cinasa Src. Para esto realizamos la administración intracerebral de soluciones oleosas compuestas por estas progestinas sintéticas junto con la administración de los antagonistas del receptor de progesterona y del receptor de estrógenos, los inhibidores de las vías de la MAPK y de la proteína Src.

Los resultados obtenidos muestran que estas progestinas sintéticas inducen conducta de estro mediante la activación del receptor de progesterona y el receptor de estrógenos, ya que al administrar los antagonistas de dichos receptores la conducta de estro inducida por las progestinas sintéticas se vio significativamente reducida, mientras que los grupos a los cuales se les administraron los inhibidores de la MAPK y la proteína cinasa Src no presentaron una reducción significativa en la conducta de estro inducida por las progestinas sintéticas. Podemos

concluir que las progestinas sintéticas, compuestos que presentan una gran afinidad por el receptor de progesterona, inducen conducta de estro mediante una activación clásica o genómica al unirse a los receptores de progesterona y estrógeno.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1 El ciclo estral en roedores.....	14
2.2 Conducta de estro en roedores.....	17
2.2.1 Atractividad.....	18
2.2.2 Proceptividad.....	18
2.2.3 Receptividad.....	19
2.3 Regulación neuroendocrina de la conducta de estro en roedores.....	20
2.3.1 Regulación hormonal de la conducta de estro en la rata.....	20
2.3.2 Regulación neural de la conducta estral en roedores.....	23
2.3.3 Regulación neuroanatómica de la conducta estral en roedores.....	25
2.3.4 Control endocrino de la conducta sexual femenina.....	28
2.4 Receptor de progesterona.....	29
2.5 Facilitación de la conducta de estro en roedores: Mecanismos celulares involucrados.....	34
2.5.1 Mecanismo genómico.....	37
2.5.2 Mecanismo membranal (Extragenómico).....	38
2.6 Progestinas sintéticas.....	40
2.6.1 Estructura de las progestinas sintéticas.....	42
2.6.2 Progestinas sintéticas y su afinidad por el RP.....	44
2.6.3 Progestinas sintéticas y conducta sexual femenina.....	49

3. JUSTIFICACIÓN.....	50
4. HIPÓTESIS.....	51
5. OBJETIVO.....	52
5.1 Objetivos específicos.....	52
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
6.1 Animales.....	53
6.2 Cirugías.....	53
6.2.1 Ovariectomía (ovx).....	53
6.2.2 Canulación intracerebroventricular.....	53
6.3 Fármacos.....	54
6.4 Prueba conductual.....	54
6.5 Experimento I. Curva dosis respuesta del acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol y levonorgestrel sobre la inducción de la conducta de estro.....	55
6.6 Experimento II. Participación del receptor de progesterona y el receptor de estrógenos sobre la expresión de la conducta de estro inducida por la administración intracerebral de progestinas sintéticas en ratas estrogenizadas.....	55
6.7 Experimento III. Participación de la vía de señalización de la Src y la MAPK sobre la conducta de estro inducida por la administración intracerebral de progestinas sintéticas en ratas estrogenizadas.....	56
6.8 Análisis estadístico.....	56
7. RESULTADOS.....	57

7.1. Experimento I. Curva dosis respuesta del acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol y levonorgestrel sobre la inducción de la conducta de estro .....	57
7.2 Experimento II. Participación del receptor de progesterona y el receptor de estrógenos sobre la expresión de la conducta de estro inducida por la administración intracerebral de progestinas sintéticas en ratas estrogenizadas.....	62
7.3 Experimento III. Participación de la vía de señalización de la Src y la MAPK sobre la conducta de estro inducida por la administración intracerebral de progestinas sintéticas en ratas estrogenizadas.....	69
8. DISCUSIÓN.....	76
9. CONCLUSIONES.....	87
10. PERSPECTIVAS.....	88
11. REFERENCIAS.....	89
12. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	101
13. PUBLICACIONES.....	104

## 1. INTRODUCCIÓN

La progesterona (P) es un compuesto sintetizado principalmente en los ovarios y con gran actividad biológica, ya que puede modular numerosas funciones fisiológicas y reproductivas dentro del sistema nervioso central (SNC). Por otro lado, las progestinas sintéticas (PS) son compuestos químicamente relacionados con esteroides sexuales como la P, ya que presentan una estructura de 21 átomos de carbono, con los andrógenos que contienen 19 átomos de carbono o bien con los estranos de 18 átomos de carbono, estas PS han sido ampliamente utilizadas como anticonceptivos y en terapias de remplazo hormonal (TRH) (Villaseca y Arteaga 1993). Compuestos como el levonorgestrel (LNG), muestra una estructura similar a la de los estrógenos (E) con 18 átomos de carbono. Mientras que compuestos como el acetato de medroxiprogesterona (AMP) o el acetato de megestrol (AMG) son estructural y químicamente relacionados con la P. Las PS muestran efectos similares a la P ya que presentan una fuerte afinidad con el receptor de P (RP), sin embargo, existen datos contradictorios reportados en el año 2002 por el grupo de García-Becerra, donde se señala, que algunas de estas progestinas ejercen sus acciones a través de unirse al receptor de estrógenos (RE), por lo que la afinidad de unión para esos receptores y las propiedades estereoquímicas, son las principales características en sus diferencias biológicas y farmacológicas. La P tiene efectos sobre diferentes procesos reproductivos, en la rata, por ejemplo, induce el reflejo de lordosis, el cual consiste en el arqueamiento y elevación de la parte trasera de la pelvis, lo cual facilita la inserción del pene dentro de la vagina durante la cópula, además, es capaz de inducir comportamientos de atraktividad y proceptividad en roedores que previamente han estado expuestos a estrógenos (Freeman 1994).

Estudios iniciales realizados por Kincl (1964), en donde exploró el efecto del acetato de clormadinona (AC), PS con un doble enlace en el C6, sobre la expresión de la conducta sexual femenina, concluyó que esta fue 25% menos potente que la P para inducir la expresión de dicha conducta en la hembra de cuyo pretratada con E. En apoyo con estos datos, nuestro grupo de investigación también mostró que el AC fue menos potente que la P para estimular la conducta sexual femenina. Sin embargo, el AMG y el AMP son considerablemente más potentes que la

P para estimular el comportamiento sexual en ratas previamente estrogenizadas (Kubli-Garfias y cols. 2013).

El modelo de la conducta de lordosis en roedores ha sido ampliamente utilizado para estudiar los mecanismos de acción de las hormonas esteroides en distintas áreas cerebrales, principalmente de compuestos que muestran gran afinidad por los receptores intracelulares, como lo es el caso de estas PS, también ha permitido estudiar las vías de señalización intracelular que activan dichas hormonas. Por lo que, utilizar el modelo de la conducta de lordosis junto con la administración de PS (AMP, AMG y LNG), de las cuales sus efectos son producidos por su unión a los clásicos receptores a esteroides intracelulares, permitirá estudiar los mecanismos celulares involucrados en diferentes procesos fisiológicos inducidos por las hormonas sexuales.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. EL CICLO ESTRAL EN ROEDORES**

La rata es un ovulador espontáneo que muestra un ciclo estral de corta duración, de 4 a 5 días debido a la falta de un cuerpo lúteo funcional. Este ciclo, se divide en las fases denominadas: estro, metaestro, diestro y proestro (Moralí y Beyer 1979). Cabe señalar que, en el caso particular de la rata, la ovulación es regulada por el ritmo de luz y oscuridad, por lo que, bajo condiciones naturales de luz, la ovulación ocurre durante la fase de oscuridad, usualmente entre la media noche y las cuatro de la mañana (Everett 1948). La receptividad sexual (primeros signos de lordosis) se puede observar antes de que suceda la ovulación, comenzando entre las cuatro y las diez p.m. (Young y cols. 1941).

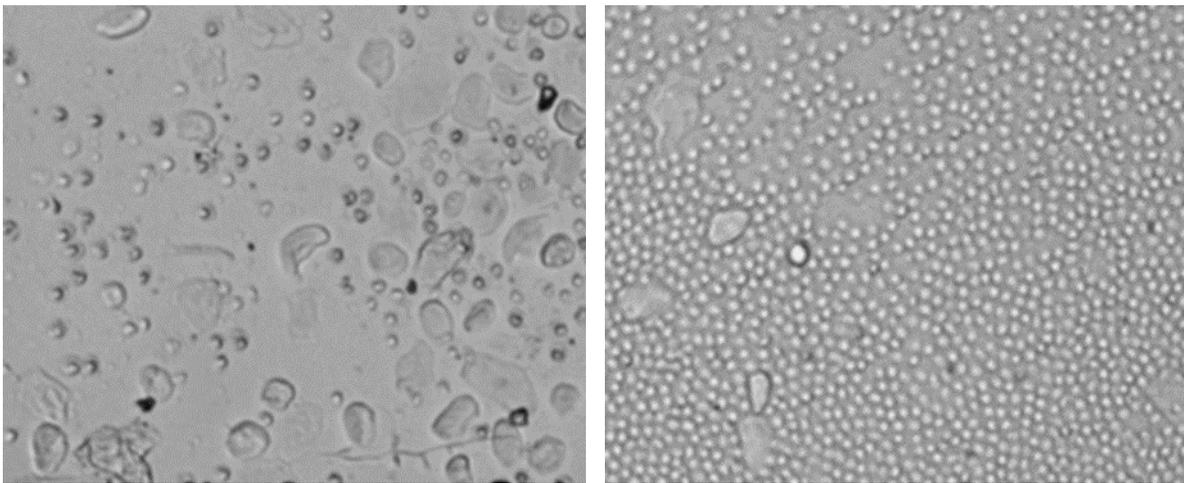
Heape (1900) utilizó el término “estro” para describir el periodo de receptividad sexual en la hembra y distinguirlo del “celo” en el macho; además, describió distintos estados del ciclo estral en las hembras de mamíferos. Utilizó el término anestro para describir el periodo de reposo en que los órganos reproductivos secundarios están inactivos y designó los prefijos pro-, di-, y met- con el sufijo estro para describir los diferentes periodos que ocurren a lo largo del ciclo estral.

La rata hembra muestra su máxima receptividad sexual durante la fase denominada estro, en donde se observa un incremento en la P circulante, este periodo es acompañado de la ovulación (Moralí y Beyer 1979). El efecto hormonal durante el ciclo reproductivo de la rata, puede ser detectado a través de la evaluación de la citología vaginal mediante la técnica de frotis vaginal (Evans y Long 1921). Los diferentes tipos de células que se presentan en el tejido del tracto vaginal se relacionan con los cambios en los niveles de E y P secretados por los ovarios a lo largo del ciclo estral.

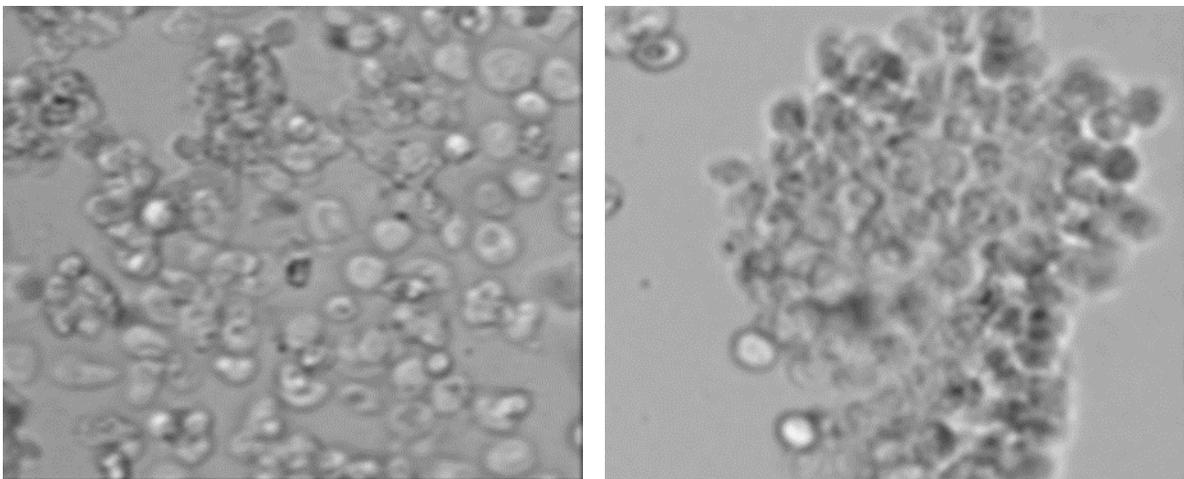
En el diestro, se pueden observar abundantes leucocitos (Fig. 1 y 2) (Goldman y cols. 2007), mientras que en el proestro predominan células epiteliales nucleadas (Mandl 1951), y a nivel del útero se muestra un incremento característico en su peso inmediatamente antes del estro (Morales 1997). Estas células nucleadas a menudo tienen apariencia granular al ser observadas

en el microscopio (Fig. 3, 4). Esta etapa tiene duración de un día y es seguida por el estro, el cual es comúnmente identificado por la presencia de un gran número de células cornificadas (Fig. 5) y células con bordes irregulares (Fig. 6) (Goldman y cols. 2007).

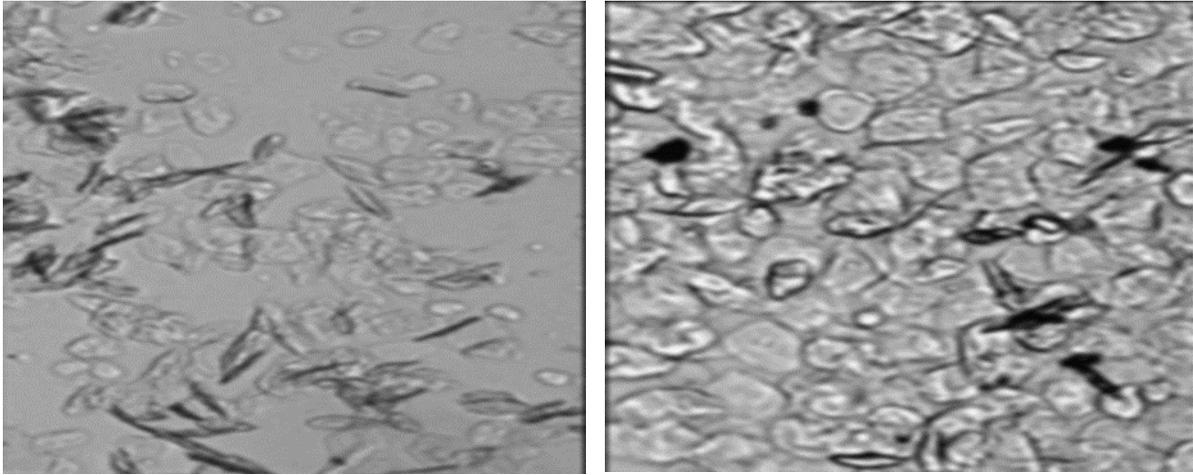
En el metaestro se observa una mezcla de los tres tipos de células (Morales-Hernández 1997), durante esta etapa el frotis se caracteriza por presentar una combinación de leucocitos, células cornificadas y células epiteliales nucleadas (Fig. 7) (Goldman y cols. 2007).



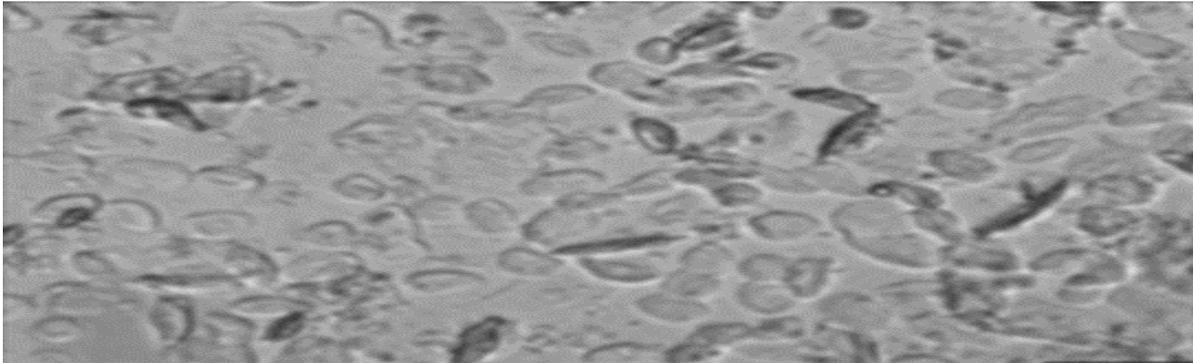
**Figura 1 y 2.** Frotis representativos de la etapa de diestro, se puede observar una cantidad abundante de leucocitos.



**Figura 3 y 4.** Frotis representativos de la etapa de proestro caracterizado por la presencia de células epiteliales nucleadas.



**Figura 5 y 6.** Frotis representativos de la etapa de estro, se caracteriza por presentar células cornificadas.



**Figura 7.** Frotis representativo de la etapa de metaestro, en esta etapa se pueden observar los tres tipos celulares, leucocitos, células epiteliales nucleadas y células cornificadas.

## **2.2. CONDUCTA DE ESTRO EN ROEDORES**

La conducta sexual femenina (CSF) o conducta de estro (CE) en los roedores ha sido definida como el conjunto de patrones motores que realiza la hembra durante la cópula con un macho (Beach 1942). Durante la etapa de mayor receptividad sexual en la rata hembra se presentan patrones motores, somáticos y sensoriales específicos, que le permiten al macho identificar su receptividad sexual, estimulándolo para copular con ella. En la etapa del estro se presenta la mayor receptividad sexual ya que los niveles plasmáticos de P aumentan en la circulación. Las características conductuales que se pueden observar durante la CE se han dividido en tres categorías, las cuales juegan un papel muy importante que le permite a la hembra llamar la atención de un macho sexualmente activo, estas son; la atractividad (capacidad de la hembra para atraer al macho hacia ella), patrones motores estereotipados que representan la proceptividad (arrancones “darting”, brincoteo “hopping” y orejeo “ear-wiggling”), y evidentemente la receptividad (adopción de la postura de lordosis) (Beach 1976).

La conducta de lordosis es inducida por la estimulación del área perineal y de los flancos de la hembra que el macho le proporciona durante la monta, lo que facilitará la inserción peneana durante la cópula (Beyer y cols. 2007). En algunas especies como la coneja, la gata o la hembra del hurón, la conducta de lordosis se despliega con la presencia de E, mientras que, en otras especies, como en los roedores, se requiere de la acción secuencial de E y P (Beyer y cols. 1976). Estos patrones conductuales serán analizados en la siguiente sección.

### **2.2.1. ATRACTIVIDAD**

La atractividad consta de cambios morfológicos en los cuales el área genital se torna de pálida a rojiza, cambios fisiológicos que constan de la producción y secreción de feromonas, lo cual permite que la rata macho sea capaz de identificar el estado reproductivo de la hembra (Beach 1976).

### **2.2.2. PROCEPTIVIDAD**

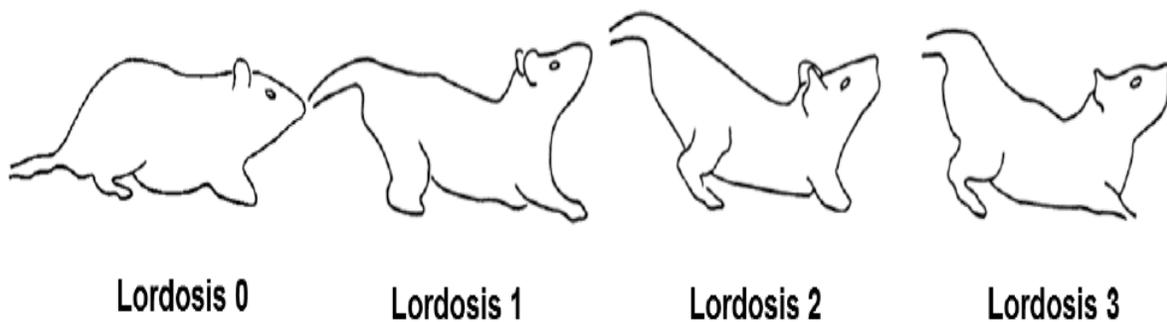
La proceptividad consta de un conjunto de patrones motores estereotipados realizados por la hembra, los cuales son dirigidos hacia el macho para estimularlo y direccionarlo a la consumación de la cópula. Estos patrones motores son:

1. Brincos sobre sus cuatro extremidades.
2. Carreras cortas en forma de “zig zag”, que terminan abruptamente en una postura de inmovilidad y con la elevación de la grupa.
3. Orejeo, producido por el movimiento de alta frecuencia de la cabeza en el plano horizontal.
4. Conducta afiliativa: consiste en establecer y mantener la proximidad con el macho.
5. Conducta de solicitud: consiste en que la hembra presenta su área perineal al macho, la cual normalmente presenta cambios en la coloración, turgencia o producción de feromonas.
6. Conducta de acercamiento y retirada: consiste en secuencias alternadas de aproximación y retirada de la hembra hacia el macho.
7. Contacto físico: consiste en el establecimiento de contacto nasal u oral con el área genital del macho.
8. Conducta de monta: consiste en la monta por parte de la hembra hacia el macho.

Las conductas más utilizadas para evaluar si una hembra es proceptiva son; los brincos, las carreras cortas y el orejeo (Beach 1976).

### 2.2.3. RECEPTIVIDAD

Cuando una rata hembra se encuentra receptiva adopta la postura de lordosis, la cual se presenta cuando el macho monta a la hembra siendo el aspecto conductual más representativo de las hembras en estro. Dicha postura consiste en la flexión de la región dorsolumbar de la columna vertebral, acompañada de la elevación de la región anogenital y seguida por un movimiento lateral de la cola (Komisaruk y Diakow 1973), lo que permite la intromisión del pene en la vagina de la hembra (Beach 1976, Morali y Beyer 1979). Hardy y DeBold (1972) propusieron una escala nominal para evaluar la intensidad de la lordosis, que va de cero a tres, dependiendo de la intensidad de la flexión de la columna vertebral (Figura 8).

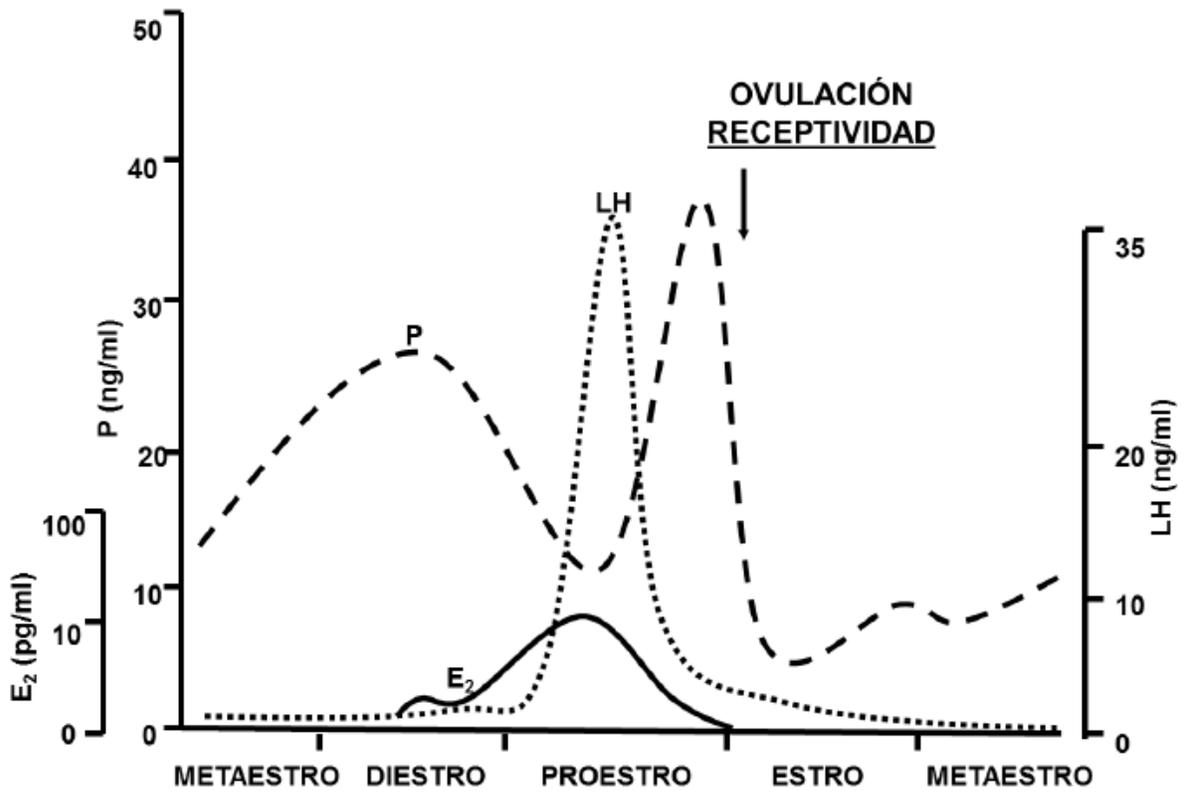


**Figura 8.** Intensidad de la lordosis que despliega la hembra en respuesta a la monta ejecutada por el macho. Note que la intensidad de la lordosis se determina en función del grado de flexión del dorso de la hembra en sentido ventral. Modificada de Pfaff (1980).

## **2.3 REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DE LA CONDUCTA DE ESTRO EN ROEDORES**

### **2.3.1. REGULACIÓN HORMONAL DE LA CONDUCTA DE ESTRO EN LA RATA**

Endocrinológicamente, el ciclo estral de la rata se puede dividir en dos etapas; la fase folicular o estrogénica (proestro y estro) y la fase luteínica o progestacional (metaestro y diestro) (Pfaff 1980, Freeman 1994, Pfaff 1994, Smith y cols. 1975, Blaustein y Erskine 2002). -Durante la fase folicular del ciclo estral la hormona folículo estimulante (FSH) actúa en los ovarios para inducir un pico en la secreción de E en el día del proestro. Este pico de E es seguido por un incremento de la hormona luteinizante (LH), la cual es la causante de la ovulación. En los ovarios se realizan la mayor síntesis y secreción de E y P en los mamíferos, observándose fluctuaciones cíclicas de los niveles plasmáticos de estas hormonas a lo largo del ciclo estral. Por otro lado, el folículo ovárico juega un doble papel, ya que por un lado provoca la secreción de hormonas, mientras que por el otro es el responsable de la liberación del ovulo durante la etapa del estro. A lo largo del ciclo estral y antes de la ovulación, las células de la granulosa y de la teca del folículo ovárico, sintetizan y secretan E, posteriormente después de la secreción de E, en el ovario de la rata, también secretara la P durante la tarde y la noche del proestro (Smith y cols. 1975). La máxima secreción de esta hormona es de origen folicular la cual es inducida por la acción de la LH hipofisaria sobre el folículo, después de la ruptura folicular y la liberación del ovulo, las células foliculares formaran el cuerpo lúteo, el cual es el responsable de la secreción de P y E en la última parte del ciclo. La liberación de la P por el cuerpo lúteo es provocada por diversas hormonas como, la LH, FSH, la prolactina (PRL), prostaglandinas y agentes  $\beta$ -adrenérgicos los cuales también juegan un rol en el control de la secreción de P (Graham y Clarke 1997). El incremento de la P circulante se inicia en la tarde del diestro, alcanzando su pico máximo en la tarde del proestro (Butcher y cols., 1974) dando como resultado la expresión de la CSF o CE (Figura 9).



**Figura 9.** Patrón de secreción hormonal durante el ciclo estral de la ratona. Note que la receptividad sexual comienza hacia el final del proestro y continúa durante la etapa del estro. La ovulación ocurre en las primeras horas del estro que coincide con el periodo de receptividad sexual. Modificado de Butcher y cols. (1974).

Se ha reportado que la máxima expresión de la receptividad sexual es durante el final de proestro e inicios del estro, lo que coincide con la secreción de los estrógenos y principalmente de la P, esta idea fue apoyada con los trabajos en donde se realizó la remoción de los ovarios en estas etapas del ciclo estral, lo que inhibió la expresión de la CE. Mientras que la remoción de los ovarios junto con la subsecuente administración de estradiol (E2) y P fue capaz de inducir la expresión de esta conducta, así como de reanudar la expresión de las conductas proceptivas (Boling y Blandau 1939, Beach y cols. 1942, 1976).

Se ha planteado a la P como la hormona responsable de la inducción de la CE en la rata hembra, ya que al realizar la remoción de los ovarios mediante una ovariectomía (OVX) en la tarde del proestro, etapa del ciclo estral en la cual no ha sucedido la secreción de P, la hembra no es capaz de desplegar la CE a pesar de haber estado expuesta a la secreción folicular de E2. Mientras que cuando se realiza la OVX, después de la secreción de P, la hembra es capaz de desplegar la CE. De igual manera cuando se realiza la OVX antes de la secreción de P y subsecuentemente se da un tratamiento de P, la hembra es capaz de desplegar la CE (Powers 1970).

### **2.3.2. REGULACIÓN NEURAL DE LA CONDUCTA ESTRAL EN ROEDORES**

Inicialmente con el uso de las técnicas de estimulación eléctrica, así como lesionando regiones cerebrales específicas o mediante la implantación de hormonas se describieron algunas áreas del cerebro que se encuentran relacionadas con la facilitación y la inhibición de la CE en diferentes especies de roedores. Algunas de las áreas cerebrales que se han descrito son; el cerebro anterior, hipotálamo, mesencéfalo, la parte baja del tallo cerebral y la médula espinal (Pfaff 1980, Pfaff 1999). Se ha demostrado que el cerebro anterior ejerce efectos de tipo inhibitorios sobre el reflejo de lordosis, en esta zona se localiza el área preóptica media (APOm), el septum y el bulbo olfatorio, ya que si se lesionan estas áreas se observa una facilitación de la receptividad sexual, mientras que su estimulación eléctrica la inhibe (Law y Meagher 1958, Singer 1968, Powers y Valenstein 1972). Por otro lado, en trabajos en los cuales se realizaron implantes de E2 y P directamente en el APOm en forma de cristales se restaura el reflejo de lordosis en hembras OVX, y de igual manera dicho efecto es repetible al realizar micro depósitos oleosos de P en ratas OVX pretratadas con inyecciones de E2 (Beyer y cols. 1988, Beyer y González-Mariscal 1991).

En el caso del septum lateral las lesiones electrolíticas incrementaron la conducta de lordosis en ratas hembras, posiblemente al incrementar la sensibilidad neuronal al E y a la P (Nance y cols. 1975, Beyer y González-Mariscal 1991).

Se ha reportado al bulbo olfatorio como un área cerebral de tipo inhibitorio ya que su remoción quirúrgica en ratas tratadas con E y P, induce un incremento del reflejo de lordosis (Moss 1971, McGinnis y cols. 1985).

En el hipotálamo el núcleo del hipotálamo ventromedial (HVM) tiene una función crítica en la facilitación de la conducta de estro en ratas (Singer 1968) ya que la estimulación eléctrica de este núcleo facilita la conducta de lordosis en ratas pretratadas con benzoato de estradiol (BE) (Pfaff y Sakuma 1979). Sin embargo, se ha propuesto que dicho núcleo no constituye parte integral del arco reflejo de lordosis que se origina en la médula espinal, ya que la estimulación o lesión de esta área no activa o reduce de manera inmediata dicha conducta.

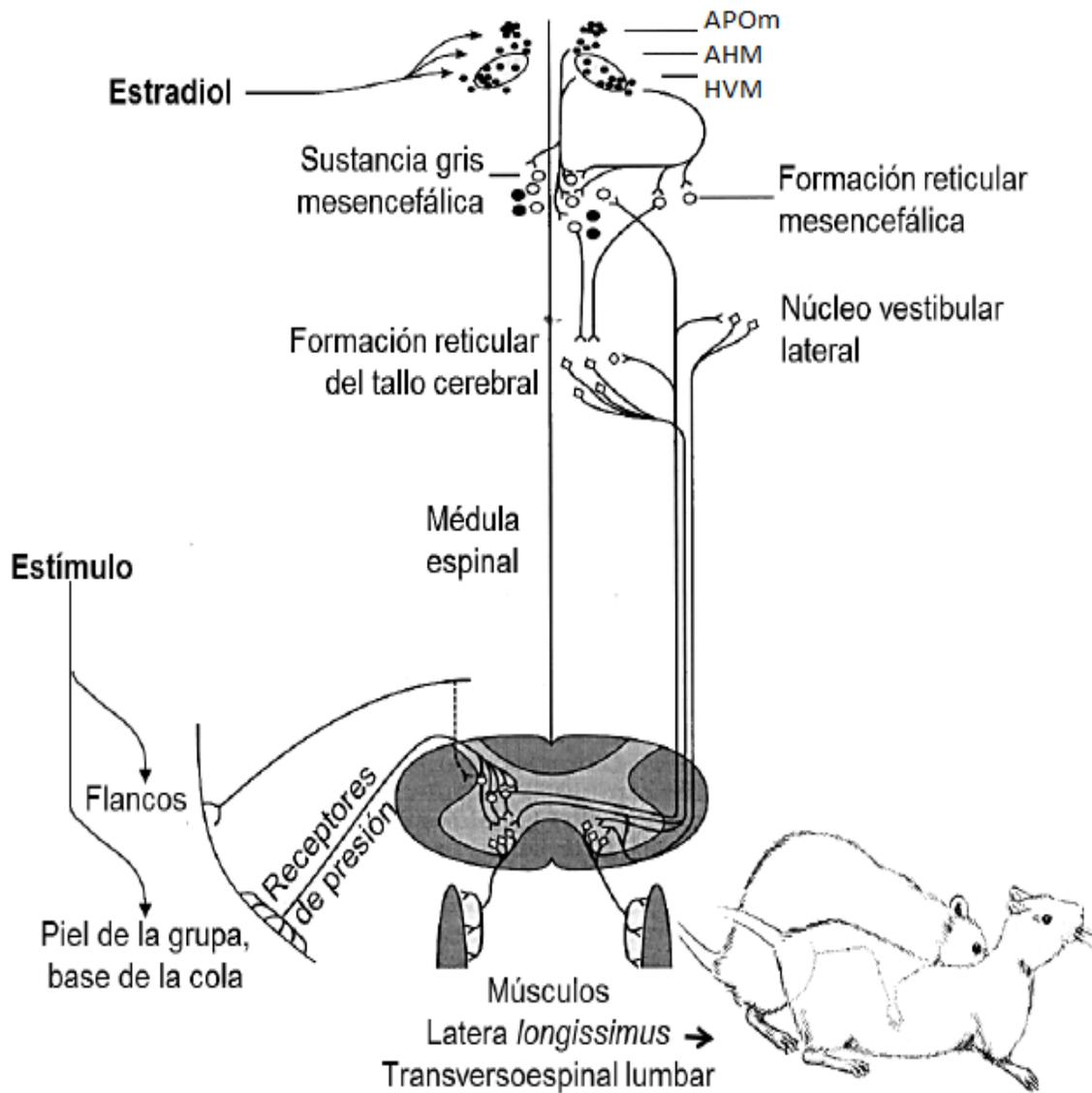
La sustancia gris central (SGC) y la formación reticular mesencefálica (FRM), que conforman al mesencéfalo, son regiones que reciben estímulos provenientes de las fibras del HVM y los transfieren a las neuronas reticulospinales de la parte más baja del tallo cerebral. Esto permite la expresión de la lordosis en ratas, ya que la estimulación eléctrica de la SGC facilita la expresión de la conducta de lordosis en ratas OVX tratadas con estradiol (Pfaff y Sakuma 1979), mientras que la lesión de esta área ocasiona la inhibición de esta conducta (Hennessey y cols. 1990).

### **2.3.3 REGULACIÓN NEUROANATÓMICA DE LA CONDUCTA ESTRAL EN ROEDORES**

La expresión de la conducta de lordosis se produce por la integración de las señales sensoriales que la hembra recibe por la monta del macho y las que se originan en el hipotálamo, particularmente en el HVM. Pfaff y cols. (1994) describieron un circuito neural que integra ambas señales; éste circuito es activado cuando una rata macho despliega el patrón de conducta sexual que involucra el contacto entre el macho y la hembra, durante esta interacción el macho mantendrá contacto con regiones específicas de la piel de la hembra, así durante el despliegue de dicha conducta el macho estimulará con sus extremidades delanteras y antebrazos los flancos de la hembra, a la vez que la parte inferior del abdomen del macho junto con sus extremidades traseras y región pélvica tienen contacto con los cuartos traseros de la hembra, el área perineal y la base de la cola (Pfaff y cols. 1972, Pfaff y Lewis 1974, Adler y cols. 1977). Estos estímulos proporcionados por el macho durante la cópula pueden ser complementados en algunas ocasiones cuando el macho toca la espalda de la hembra con su barbilla y su nariz durante la lordosis, de igual modo la palpación del macho en la parte lateral del abdomen de la hembra estimula el campo del nervio genitofemoral, lo que ayuda a iniciar la elevación de la grupa durante el despliegue del reflejo de lordosis. Los estímulos somatosensoriales antes mencionados activan receptores cutáneos de presión asociados a fibras C (Kow y Pfaff 1975b), dichas fibras transmitirán la información generada en la piel de los flancos, los cuartos traseros, la base de la cola y del periné durante la cópula hacia al interior de la médula espinal mediante el nervio pudendo, el cual inerva el área perineal, y mediante las fibras nerviosas de la vértebra lumbar 1 (L1) hasta la vértebra sacra 1 (S1) (Kow y Pfaff 1975a, Kow y Pfaff 1975b), que entran por el cuerno dorsal de la región lumbar. Existen interneuronas que median la información excitatoria proveniente de los receptores de presión, la activación de estas es suficiente para inducir la contracción muscular necesaria para ejecutar el reflejo de lordosis (Kow y cols. 1980). La información transmitida por las interneuronas responsivas a presión convergen en las motoneuronas (Engberg 1964, Egger y Wall 1971) al igual que con interneuronas de orden superior espinal o neuronas supra espinales (Kow y cols. 1977) ya que existe una regulación supraespinal para que dicho reflejo se produzca (Kow y cols. 1980). Así, las señales que llegan

a las interneuronas antes mencionadas, activan fibras ascendentes de la columna anterolateral de la médula espinal, las cuales arriban a la formación reticular del tallo cerebral, al núcleo vestibular lateral y a la sustancia gris central mesencefálica. Así la influencia supra espinal sobre el reflejo de lordosis trabaja para simplemente incrementar la actividad en el designado circuito del reflejo espinal (Kow y Pfaff 1975b). Cabe señalar que el HVM, mantiene un estímulo tónico sobre la sustancia gris central mesencefálica, por la acción de E y la P, la cual a su vez activa a la formación reticular del tallo cerebral (Pfaff 1980, Pfaff 1999).

Las neuronas de la formación reticular del tallo cerebral no sólo reciben señales sensoriales provenientes de la periferia, sino también de la sustancia gris mesencefálica (sitio de relevo de las vías descendentes originadas en el hipotálamo ventromedial). Así, las neuronas de la formación reticular del tallo cerebral integran las señales provenientes tanto de la periferia, como las centrales del HVM y envían señales a través de vías descendentes por las neuronas reticuloespinales hacia la médula espinal (Pfaff 1980). Esta señalización descendente facilita la actividad de las motoneuronas responsables de producir la contracción de los músculos epaxiales, los músculos vertebrales dorsales, dorso laterales de la columna vertebral, el músculo lateral longissimus y transverso-espinal lumbar, responsables de producir la dorsiflexión que caracteriza a la lordosis (Brink y cols. 1980) como se ilustra en la Figura 10. El músculo lateral longissimus se extiende a lo largo de la columna vertebral lumbar y es múltiplemente innervado por los nervios lumbares espinales (Brink y Pfaff, 1980) se ha reportado que este músculo es activado durante el reflejo de lordosis, ya que es activado para realizar los movimientos requeridos durante la conducta sexual de la hembra (Schwartz y cols. 1983). Dicho reflejo consta de la dorsiflexión de la columna vertebral junto con la extensión de las extremidades, la elevación de la cabeza, los cuartos traseros y la base de la cola junto con el descenso del tórax (Brink y cols. 1980). Una vez que la hembra se encuentra en la posición de lordosis le permitirá al macho lograr la inserción peneana en la cavidad vaginal (Kow y Pfaff 1975a).



**Figura 10.** Circuito neural para la activación de la conducta de lordosis. Se ilustra la participación de los estímulos somatosensoriales para la activación de la conducta de lordosis, a través de las vías sensoriales ascendentes hacia el hipotálamo ventromedial, donde el E2 y la P actúan para facilitar la conducta. Las vías descendentes del hipotálamo van al cerebro medio, de este hacia la formación reticular del tallo cerebral y de la formación reticular del tallo cerebral a la médula espinal. La estimulación y activación de los centros neurales ocurren por efecto de estímulos sensoriales externos producidos por la monta del macho, que llevan a la contracción de los músculos lateral longissimus y transversoespinal lumbar. APOm, área preóptica media; AHM, área hipotalámica medial; HVM, hipotálamo ventromedial. Modificado de Pfaff (1999).

### **2.3.4 CONTROL ENDOCRINO DE LA CONDUCTA SEXUAL FEMENINA**

En estudios de conducta sexual (CS) en mamíferos se ha mostrado que su expresión es dependiente de la secreción hormonal de las gónadas (testículos y ovarios), ya que cuando el animal es castrado, la CS se ve alterada (Beyer y cols. 2007). Por ejemplo, en la rata hembra la ovariectomía reduce gradualmente la motivación sexual y otros componentes de la CE como algunos patrones proceptivos (Moralí y Beyer 1979). De igual manera, estructuras cerebrales que se han relacionado con el control de esta conducta, como el núcleo ventromedial del hipotálamo, el núcleo lateral vestibular, el retículo espinal medular, el cerebro medio (Pfaff y Sakuma 1979) y el área preóptica (Sakuma 1995), también se ven afectadas, alterándose el control cerebral que regula la CSF. Así, la secreción del E2 durante la tarde del proestro, ejerce sus efectos reproductivos a través de un proceso que consta de 2 pasos; el primero es un efecto preparador en esas áreas cerebrales, ya que induce la síntesis de una gran variedad de proteínas, entre ellas el RP (Molenda y cols. 2003), mientras que el segundo paso es provocar un incremento en la secreción de la LH, la cual, a su vez al actuar en el ovario, aumenta la secreción de la P, siendo esta quien dispara y potencializa los eventos celulares iniciados por el E2 sobre la expresión de la CSF. Por otro lado, después de ese periodo de receptividad, la hembra presenta un periodo de anestro en el cual la actividad sexual ya no se presenta.

La P es la hormona esteroidea clave para que se lleve a cabo de manera normal la función reproductiva en las hembras. Se conoce que el mayor efecto fisiológico de la P en mamíferos sucede en el útero, ovario, glándula mamaria y en el cerebro (Graham y Clarke 1997).

## 2.4 RECEPTOR DE PROGESTERONA

Las hormonas esteroideas ejercen una gran variedad de efectos al unirse a sus respectivos receptores intracelulares, (Molenda y cols. 2003), de igual modo el efecto de la P es mediado por su receptor nuclear, el RP. Este receptor es miembro de la superfamilia de receptores nucleares (Jericevic y Conneely 2004), el RP es una proteína a la que se une de manera específica la P, la cual es su ligando natural. La síntesis de este receptor fue inicialmente caracterizada en los 70s tanto en el útero de mamíferos como en el oviducto de pollo, se planteó que la síntesis de este receptor es mediada por la acción de E (Graham y Clarke 1997).

Más de una isoforma del RP son producidas en tejidos animales, debido a la activación de un solo gen que se encuentra localizado en el cromosoma 11 en la región q22-23 (Mani 2008), mediante la acción de dos promotores diferentes (Kastner y cols. 1990, Kraus y Katzenellenbogen 1993), lo que induce la síntesis de dos diferentes proteínas (Conneely y cols. 1989). Con base a esto, se han descrito, tanto en humanos como en otros vertebrados, al menos dos isoformas del RP con importante actividad fisiológica, los cuales son capaces de mediar la actividad transcripcional, estas son; la isoforma del RP-A y el PR-B (Jericevic y Conneely 2004), en donde la isoforma del RP-A es una forma trunca del RP-B ya que carece de 164 aminoácidos en su N-terminal, los cuales si se encuentran en el RP-B.

Estudios de clonación mostraron que la estructura del RP está conformada por diferentes componentes denominados dominios y algunas zonas en el amino y carboxilo terminal que presentan distintas funciones de activación del receptor, las cuales son capaces de modular al sitio promotor ubicado en el ADN. Los componentes del RP son: a) un dominio de unión al ligando (LBD por sus siglas en inglés), que como su nombre lo dice es el sitio en el cual se une la P, localizado en el carboxilo-terminal del receptor, b) un dominio de unión al ADN (DBD por sus siglas en inglés), compuesto aproximadamente de 66 a 68 aminoácidos y por dos prolongaciones denominadas dedos de zinc, que son los sitios con los que el receptor se une a las secuencias de unión específicas localizadas en el ADN (Jericevic y Conneely 2004), c) el sitio de la bisagra, el cual le permite al receptor doblarse para poder pasar del citoplasma al núcleo y viceversa.

Como se mencionó en párrafos anteriores, el RP contiene en su región amino-terminal la función de activación-1 (AF1), la cual modula y promueve la activación del gen al interactuar de una forma ligando independiente con factores de transcripción basal, o bien con coactivadores o correpresores. Por otro lado, en el LBD se localiza la función de activación-2 (AF2) que provoca el reclutamiento de coactivadores, pero de una forma hormona-dependiente (es decir, esta zona se activa cuando la hormona se une al receptor). Así, la unión hormona-receptor induce el desprendimiento de las proteínas de choque térmico y la dimerización del receptor (Jericevic y Conneely 2004), que en ausencia de la hormona esas proteínas se encuentran unidas al receptor inhibiendo su función. Se conoce que existe una tercera función de activación (AF3) presente solo en el RP-B en la región N-terminal, esta función puede ejercer sus acciones autónomamente o sinergizar con la AF1 o con la AF2.

Es importante volver a enfatizar que el RP funciona como un factor de transcripción al ser activado por su ligando y así mediar la acción de la P en los tejidos blanco a través de regular la expresión y modulación de genes blanco. El RP, además de ser activado por la P, puede activarse de manera ligando-independiente mediante un proceso de fosforilación. Los receptores a hormonas esteroides son fosfoproteínas, las cuales se pueden fosforilar cuando su ligando natural se une a ellas, o mediante la acción de diferentes eventos intracelulares, incrementando con ello la activación transcripcional de dicho receptor (Molenda y cols. 2003).

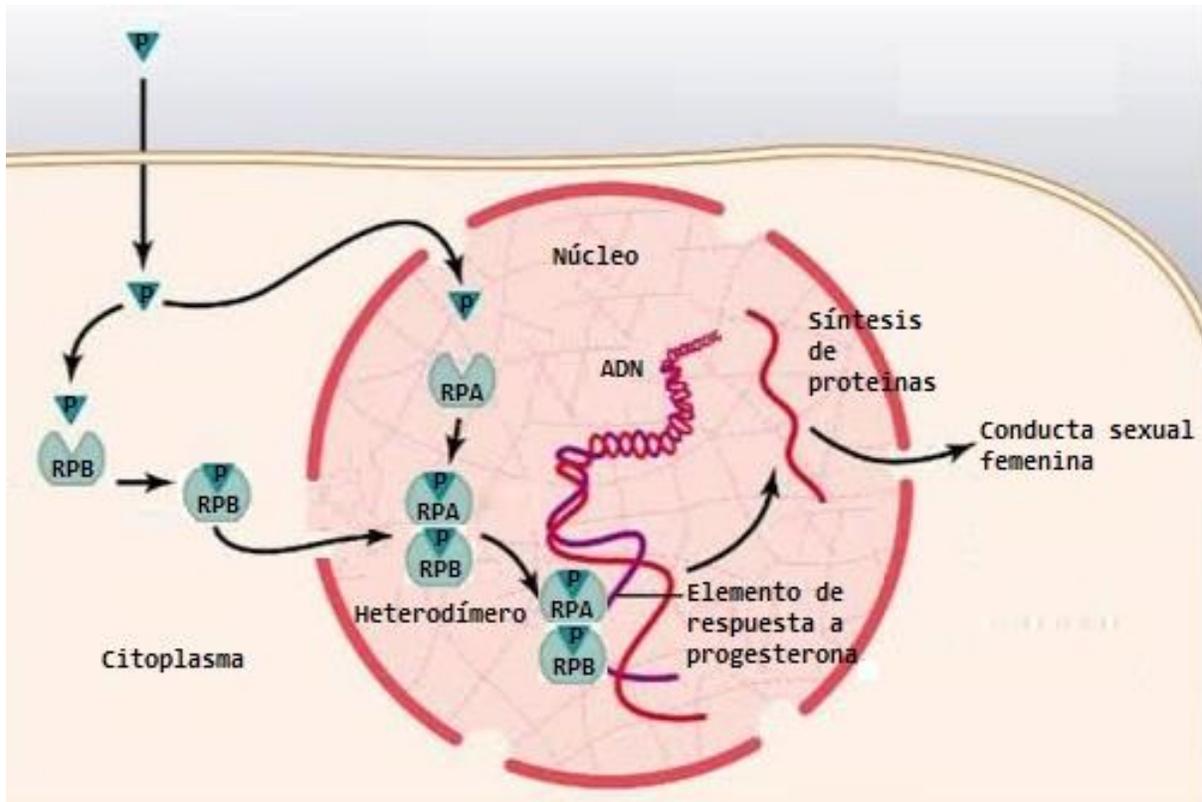
Una vez activado el RP tiene la capacidad de inducir efectos, principalmente genómicos por medio de sus diferentes isoformas, por lo que se ha sugerido una expresión diferencial no solo en sus tejidos blanco, sino también en diferentes especies de mamíferos. Por ejemplo, en roedores, la expresión del RP-A predomina sobre la expresión del RP-B en una relación de 3:1 (Graham y cols. 1995), mientras que en conejos no se ha detectado la expresión de la isoforma A (Beyer y cols. 2007).

Las 2 isoformas del RP se encuentran estructuralmente relacionadas, siendo identificadas e investigadas en la mayoría de las especies de vertebrados, incluyendo el pollo, roedores, primates y en el humano. El RP-A y el RP-B median, en su mayoría, distintas respuestas reproductivas ejercidas por la P, ya que las diferencias estructurales de las isoformas del RP les confieren distintas respuestas en tejidos específicos, así mientras el RP-A tiene un mayor efecto

en el útero y ovario, el RP-B es responsable de las acciones proliferativas de la P en la glándula mamaria. Utilizando al ratón como modelo animal se ha reportado que la glándula mamaria muestra un desarrollo normal a pesar de la ausencia del RP-A pero se observa una severa hiperplasia uterina y anormalidades ováricas en respuesta a P, mientras que la falta de la isoforma del RP-B no afecta las respuestas biológicas del ovario o útero a P, pero resulta en una reducción de la capacidad gestacional, asociada a la morfogénesis de la glándula mamaria (Connely y cols. 2003). Las diferencias activacionales del RP-A y RP-B se observan en la estructura conformacional de estas isoformas, básicamente en la región N-terminal del RP, presente en el RP-B que le proporciona una capacidad activacional específica (Graham y cols. 1995).

El RP-A y RP-B después de ser activados pueden formar dímeros entre ellos y unirse al ADN como tres posibles combinaciones: A:A, B:B (homodímeros) y A:B (heterodímeros). Así, por medio de la fosforilación y/o el reclutamiento de coactivadores, el RP puede controlar y coordinar la expresión de subconjuntos de genes que se encuentran implicados en el control de la CSF (Mani 2008).

El RP-A es crítico en la facilitación de la respuesta mediada por la P, aun así, este no puede facilitar la magnitud completa de la respuesta conductual, por lo que la participación funcional del RP-B muy probablemente es a través de la heterodimerización, lo cual parece ser más efectivo para el despliegue completo de los componentes de la CSF dependiente de la P en ratones (Mani y cols. 2006), sin embargo, Gerra-Araiza y cols. (2009) reportan que en la rata hembra la activación del RP-B es más importante que la activación del RP-A para el despliegue de la conducta de lordosis en estos roedores mediante el uso de los antisentidos para las isoformas del RP (Figura 11).



**Figura 11.** Muestra la participación del RP-B sobre la expresión de la CSF en la rata hembra mediante su activación y la formación de heterodímeros del RP.

Por otro lado, una manera para estudiar la acción de cada una de las isoformas del RP y la vía alternativa de señalización intracelular ligando independiente se han utilizado a ratones K.O., los cuales no expresan la isoforma del RP-A (PRAKO<sup>-/-</sup>) o la isoforma del RP-B (PRBKO<sup>-/-</sup>). Con este modelo animal se ha podido analizar las respuestas neuronales que de manera particular ejercen cada una de estas isoformas al ser activadas por la P (Mulac y cols. 2000).

Los niveles del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifican para el RP-A y RP-B varía de acuerdo a la etapa del ciclo estral de las ratas, en donde estos se incrementan en la mañana del proestro (coincidiendo con los niveles elevados del E2) y decrecen por la tarde (Szabo y cols. 2000).

En la rata hembra adulta el E2 y la P regulan de manera diferencial a las isoformas del RP en distintas regiones cerebrales, por ejemplo, en el hipocampo, el E2 induce exclusivamente la expresión de la isoforma A, sin embargo, la P no tiene efecto sobre ambas isoformas en esta área (Camacho y cols. 1998). Por otro lado, en el hipotálamo los ARNm transcriptores para el RP-A y B son inducidos por el E2 y regulados a la baja por la P, mientras que en el área preóptica (APO), solamente el ARNm del RP-B es modulado hormonalmente (Mani y cols. 1994). Scott y cols. (2002) reportaron que la isoforma B es la inducida por el E2 en el hipotálamo y pituitaria de hembras, pero ni el E2 ni la P tuvieron efecto sobre la expresión del RNAm de ambas isoformas del RP, en el cerebelo ni en la corteza frontal (Guerra y cols. 2002).

Estudios realizados en la última década, han incrementado dramáticamente nuestros conocimientos sobre la acción de las hormonas esteroides en diferentes eventos reproductivos, sobre todo en la regulación de la expresión génica de tejidos reproductivos que son mediados por esas hormonas.

## **2.5 FACILITACIÓN DE LA CONDUCTA DE ESTRO EN ROEDORES: MECANISMOS CELULARES INVOLUCRADOS**

Las hormonas esteroidales ejercen importantes efectos durante las diferentes etapas del desarrollo, crecimiento y reproducción, estos pueden ser clasificados como efectos organizacionales o activacionales. Los efectos organizacionales se refieren a que estas hormonas actúan en los diferentes tejidos que expresan sus receptores, localizados tanto en glándulas como en órganos y así poder inducir cambios en la expresión génica de las células que los conforman, lo que resulta en importantes efectos sobre la fisiología y la conducta reproductiva. Mientras que el efecto activacional, se refiere a aquellos eventos que se producen a diferentes niveles celulares, tanto en la membrana, el citosol y en el núcleo de la célula, los cuales desencadenan respuestas que modifican la respuesta celular (Beato y cols. 1996).

La P juega un papel central en la coordinación de diversos eventos asociados con la reproducción femenina, esta hormona es un modulador clave de las funciones reproductivas, incluyendo la ovulación y tiene un papel crítico durante la etapa temprana del embarazo en la preparación del epitelio uterino, en el desarrollo de las glándulas mamarias y de la expresión neuroconductual asociada con la capacidad de respuesta sexual (Molenda y cols. 2003).

Los estudios endocrinos y farmacológicos han señalado a la P como la principal hormona inductora de la CE en ratas pretratadas con E (Moralí y Beyer 1979). Sin embargo, ambas hormonas modulan la expresión génica a través de la unión con sus receptores intracelulares localizados en el hipotálamo, el cual es un área cerebral relacionada con el control de la CSF (Mani y cols. 1994). Los mecanismos celulares mediante los cuales la P induce o dispara la conducta de estro en la rata son muy complejos, y pueden involucrar tanto eventos genómicos como no genómicos, incluyendo la activación de varios mecanismos de señalización intracelular. El RP es un factor de transcripción que puede ser modulado no solamente por la P y PS, sino también por vías de señalización activadas por una variedad de agentes no esteroidales a nivel membranal (Beyer y cols. 2007).

Existen una serie de trabajos en donde se han utilizado diferentes estrategias que han mostrado la correlación existente entre la expresión de los diferentes receptores a esteroides y la expresión de la conducta de estro en la rata. Así, Moguilewski y Raynaud (1979) encontraron en ratas OVX y posteriormente tratadas con E2, que los niveles máximos de conducta sexual producida por la inyección de P coincidían con los niveles o la tasa de expresión del RP hipotalámico, y en específico, la inducción de la expresión del RP en el hipotálamo ventromedial y área preóptica por estrógenos o por la exposición secuencial a estrógenos y P, se encuentra correlacionado con el observable incremento en la respuesta de lordosis.

En un estudio similar utilizando a la progestina sintética, R5020, como marcador del RP, se encontró que tanto la iniciación como la desaparición de la conducta de estro inducida por P coincidieron con la presencia o ausencia del RP. Otra estrategia para estudiar la participación del RP ha sido a través del uso de oligonucleótidos, con este tipo de estrategias farmacológicas, se ha reportado que el antisentido del ARNm del RP administrado en el tercer ventrículo, suprimió la conducta sexual en la rata hembra facilitada por P, por lo que se propone al RP como un componente crítico importante en el control de la conducta sexual en la rata hembra (Mani y cols. 1994, Pfaus 1999).

El uso de antiprogestinas y antiestrógenos también han sido utilizados para evaluar la participación de los receptores a hormonas esteroides sobre la CE inducida por una gran variedad de compuestos. Estos compuestos sintéticos se han utilizado para estudiar los mecanismos de acción de las hormonas esteroides en tejidos periféricos, así como en tejidos cerebrales. Uno de estos antagonistas ha sido el RU486, el cual fue la primera antiprogestina utilizada con este propósito. Este compuesto no presenta el grupo metilo en el carbono 19 pero sí un grupo bencénico en el carbono 11, lo cual le confiere una mayor unión al RP que la propia P. Así, al unirse el RU486 al RP impide que esta proteína inicie el proceso transcripcional en el ADN.

Experimentos realizados en la década de los 80s, mostraron que el RP participa en el control de la CE ya que cuando se administraba el RU486 por vía sistémica o intracerebral, a ratas y cuyos estrogenizados, bloqueó la CE inducida por la P. El efecto inhibitor de este compuesto, aparentemente ocurre en las mismas áreas cerebrales involucradas en la expresión de la conducta sexual femenina inducida por P, es decir, el HVM, y el APOm. Además, nosotros hemos mostrado que en ratas pretratadas con BE la administración del RU486 bloqueó la conducta de lordosis inducida por metabolitos de la P reducidos en el anillo A, así como por una variedad de compuestos con diferentes estructuras químicas (Beyer y cols. 2007). Además, Meyerson y Lindstrom (1968) inicialmente reportaron un efecto inhibitor del MER-25, un antiestrógeno, sobre la conducta de lordosis estimulada con estradiol en ratas OVX. En un estudio similar, la administración de otro antiestrógeno, el CI-628, bloqueó la lordosis estimulada con E2. Posteriormente, se comenzaron a utilizar una creciente variedad de antiestrógenos, incluyendo al tamoxifen, la nafoxidina o alclomifen. Cabe señalar que el diseño básico de estos estudios consistió en la inyección sistémica del antiestrógeno concurrentemente con la inyección de estrógenos (estradiol o bien benzoato de estradiol), 40 horas después se administraba una inyección de P y posteriormente se realizaron las pruebas de comportamiento varias horas después de la administración de la P.

Actualmente se ha propuesto que la conducta de lordosis, la cual es regulada por la acción sinérgica del E y la P, involucra la participación tanto de mecanismos genómicos, así como membranales a través de la activación de receptores intracelulares y de aquellos localizados en la membrana (Shailaja y cols. 1994). Por tal motivo, vale la pena describir brevemente esos eventos.

### 2.5.1 MECANISMO GENÓMICO

Existe una gran cantidad de resultados en la literatura que apoyan la hipótesis de la participación del mecanismo genómico en la acción de los estrógenos y P sobre el control de la expresión de la conducta sexual femenina. Este mecanismo involucra varios pasos y es el mismo que el propuesto inicialmente por Jensen en la década de los 60s para demostrar las acciones del estrógeno sobre el útero. Este mecanismo propone que la P atraviesa por difusión pasiva a la membrana celular de la neurona blanco y se une al RP, que hoy se sabe que se puede localizar en el núcleo estando laxamente unido a la cromatina. El RP al ser activado funciona como un factor transcripcional provocando la expresión y modulación de genes específicos. Sin embargo, la actividad neurobiológica que ejerce la P no solo es mediada por un solo tipo de RP sino por sus isoformas A y B, las cuales al unirse con la P forman un complejo estable hormona-receptor “activo”. Este complejo puede formar homodímeros (A:A, B:B) o bien heterodímeros (A:B) y realizar una mejor unión sobre el ADN (Graham y cols., 1995), en donde previamente pueden ser fosforilados y reclutar coactivadores, los cuales sirven como un puente entre el complejo activo y el ADN y así ejercer un mejor control y coordinación de la expresión de un subconjunto de genes que serán los responsables de activar a la maquinaria transcripcional involucrada en la síntesis de proteínas específicas que pudieran estar relacionadas con la inducción de la conducta de estro en la rata (Mani y cols. 2006).

Varios experimentos apoyan la participación de este mecanismo sobre la expresión de la conducta de estro, por ejemplo: a) existe una latencia larga de varios minutos, entre la administración sistémica de P y la inducción de la conducta de estro (Moralí y Beyer 1979); b) la acción de la P sobre la inducción de la lordosis es reducida por la administración de bloqueadores de síntesis de proteínas (Whalen y cols. 1974); c) existe una correlación positiva entre la síntesis del RP en el hipotálamo y la expresión de la lordosis (Etgen 1984); d) la antiprogestina RU486, bloquea la conducta de estro inducida por P (Beyer y cols. 1995); e) el uso de ratones mutantes del RP en estudios de CSF (Mulac y cols. 2000); f) algunas PS, que muestran mayor afinidad de unión por el RP que la P, son más efectivas que esta hormona para inducir la conducta de lordosis y las conductas proceptivas.

### **2.5.2 MECANISMO MEMBRANAL (EXTRAGENÓMICO)**

Además de las acciones genómicas descritas anteriormente que ejercen esas hormonas esteroidales, también pueden estimular respuestas celulares que son independientes de las funciones transcripcionales reguladas por el RP, este mecanismo ha sido llamado membranaral o extragenómico.

Este modelo es complementario al mecanismo genómico el cual fue propuesto debido a que se ha reportado que la facilitación de la conducta de estro por compuestos con diferentes estructuras químicas, como progestinas, péptidos, nucleótidos cíclicos, prostaglandinas, etc., facilitan la conducta de lordosis en un breve periodo de tiempo, es decir, entre los 5 y 10 minutos seguidos de su administración, lo cual descarta la participación del mecanismo genómico ya que para ello se requiere un periodo de tiempo más prolongado. Otra evidencia a favor de este mecanismo, es que la activación del RP neural se puede realizar de manera indirecta a través de los compuestos antes mencionados (Mani y cols. 2006), de los cuales se conoce no pueden penetrar a la célula, por lo que estas moléculas generan sus efectos al unirse a sus respectivos receptores localizados en la membrana celular y son capaces de activar diferentes vías de proteínas cinasas (enzimas que activan proteínas cuando las fosforilan), por lo que se ha propuesto que de esta forma se puede inducir la conducta de lordosis de manera similar a la producida por la P en ratas pretratadas con E2. Por lo que actualmente se considera la existencia de una comunicación cruzada entre el mecanismo genómico y membranaral. Por ejemplo, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), dopamina, noradrenalina, prostaglandina E2 (PGE2), etc., activan a proteínas localizadas en la membrana, las cuales son capaces de inducir la formación de segundos mensajeros como el adenosin monofosfato cíclico y el guanosin monofosfato cíclico (AMPc y GMPc) los cuales se unen a su correspondiente proteína cinasa, activándola mediante fosforilación por lo que posteriormente dicha cinasa provocará a su vez la fosforilación del RP o del RE lo que los activará, los cuales una vez activos actuarán como factores de transcripción, induciendo así la síntesis de proteínas al unirse a sitios aceptores localizados en el ADN (Beyer y cols. 2007, González-Flores y Hoffman 2009, González-Flores y cols. 2009, Lima-Hernández y cols. 2012).

En el caso del RP se ha reportado su participación en cascadas de fosforilación intracelulares, tales como la vía de la Src/Ras/MAPK, mediante la cual puede modular respuestas celulares causadas por la P (Boonyaratanakornkit y cols. 2001, Ballaré y cols. 2003).

Nuestro grupo de investigación ha estado muy interesado en evaluar las diferentes vías de señalización intracelular, para lo cual se ha empleado el uso de una gran variedad de inhibidores de proteínas cinasas y hemos reportado que la PKA, la PKG, la PKC y actualmente la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) junto con la proteína cinasa derivada de la tirosina, la Src, participan en el control de la conducta de estro inducida por la P, algunos de sus metabolitos y por compuestos con diferentes estructuras químicas como; GnRH, PGE2, óxido nítrico e inclusive por la estimulación vaginocervical (González-Flores y cols. 2009).

Podemos resumir que la P tiene la capacidad de regular señales a nivel cerebral que se encuentran involucradas en la respuesta de la conducta sexual, dichos efectos son mediados por el RP en el hipotálamo y el área preóptica, a su vez los efectos de la P en el cerebro pueden también ser mediados por mecanismos no clásicos de acción, tales como la directa interacción de los metabolitos de la P con otros receptores, como el receptor GABA-A (Graham y Clarke 1997) concordando con el mecanismo membranal.

## 2.6 PROGESTINAS SINTÉTICAS

La P puede ser metabolizada dentro de las células animales, sufriendo varias reducciones así como hidroxilaciones en sus carbonos, por ejemplo la reducción, es decir la incorporación de un H<sup>+</sup>, puede afectar al grupo cetona localizado en el C-3 y el C-20, al igual que al doble enlace del C-4, mientras que la hidroxilación (incorporación de un OH) ocurre principalmente en los C-6, C-11, C-16, C-17 y C-21. A partir de estas modificaciones se producen más de 30 metabolitos naturales de la P los cuales han sido nombrados como progestinas naturales (Raynaud y cols. 1982).

Durante muchos años, una gran cantidad de esteroides han sido sintetizados de manera artificial, generando PS que poseen mayor actividad progestacional que la propia P y de los cuales, solo un número relativamente pequeño, tienen valor terapéutico y aplicación clínica (Thijssen 1972).

Las PS son compuestos químicamente relacionados con la estructura de los pregnanos (de 21 átomos de carbono), androstanos (19 átomos de carbono) y estranos (18 átomos de carbono), los cuales han sido usados primordialmente como anticonceptivos para regular la fertilidad y en TRH. Algunas de las PS actúan como pro-hormonas, por lo que necesitan ser metabolizadas para convertirse en compuestos activos, que son los encargados de llevar a cabo los efectos farmacológicos (Schindler y cols. 2003).

Algunas PS como el Acetato de Medroxiprogesterona (AMP); 6 $\alpha$ -methyl-3,20-di-oxopregn-4-en-17-yl acetato y el Acetato de Megestrol(AMG) (17 $\alpha$ -acetoxo-6-methyl-4,6-pregnadiene-3,20 dione), presentan una semejanza estructural y química con la P, mientras que otras PS son derivadas de la 19-nortestosterona, como el 13-ethyl gonano Levonorgestrel (LNG); 13- $\beta$ -ethyl-17 $\alpha$ -ethynyl-17B-hidroxigon-4-en-3-one (Kubli-Garfias y cols. 2013).

El AMP es farmacológicamente muy eficaz y es utilizado clínicamente a una dosis 20 veces menor que la P para las TRH (Simoncini y cols. 2004). Por otro lado, la organización mundial de la salud estableció en 1998 al LNG como uno de los mejores fármacos para el tratamiento de anticoncepción de emergencia, con una alta eficacia y una baja incidencia de efectos secundarios (Tirelli y cols. 2008).

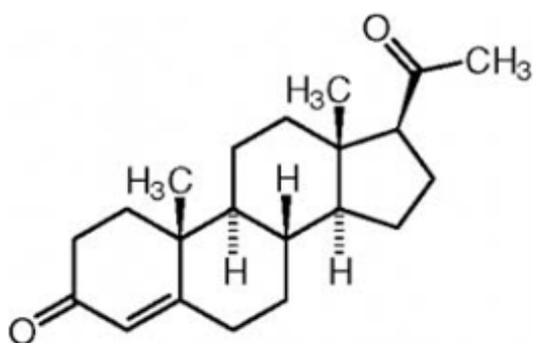
Esta PS presenta una potente actividad progestacional y ha sido ampliamente usada como anticonceptivos (Okewole y cols. 2007), además de ser ampliamente utilizada en una gran variedad de tratamientos. Los mecanismos de acción del LNG aún no han sido bien esclarecidos, sin embargo, se ha planteado que esta progestina tiene un amplio espectro en sus mecanismos de acción (Tirelli y cols. 2008), por ejemplo, muestra efectos androgénicos, antigonadotrópicos y progestacionales, pero no presenta actividad estrogénica (Cabeza y cols. 1995) y se ha reportado que la exposición endometrial al LNG induce una regulación a la baja de receptores de esteroides sexuales en todos los componentes celulares, lo cual demuestra su clara interacción con dichos receptores (Guttinger y Critchley 2007).

Básicamente todas las progestinas tienen un efecto en común, el progestacional, es decir el crecimiento del endometrio pretratado con estrógenos, pero existen grandes diferencias entre las progestinas en los diferentes tejidos biológicos y en los efectos biológicos inducidos por estas. El efecto final progestogénico o actividad progestacional de algunas moléculas depende también de la ruta y tiempo de la administración (Schindler y cols. 2003).

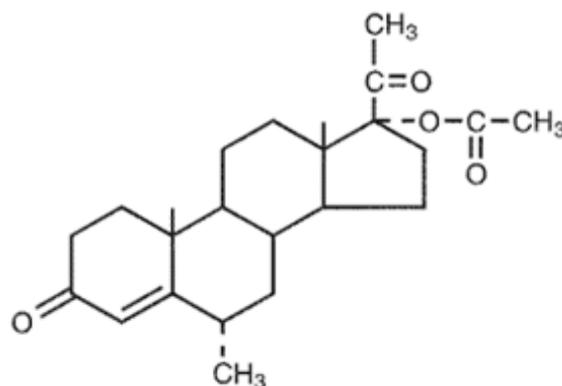
### 2.6.1 ESTRUCTURA DE LAS PROGESTINAS SINTÉTICAS

Algunas de las PS se sintetizan a partir de la molécula de la P, por ejemplo, el AMP, el cual se forma por la sucesiva introducción de un grupo acetoxi en su C-17 en configuración alfa y un grupo metilo en el C-6. El AMG se forma, por la unión de un doble enlace en el C-6 además de las modificaciones mencionadas en la formación del AMP, por lo que es un compuesto que se mantiene cercanamente relacionado con esta PS. Cabe señalar que las PS que presentan ese doble enlace en su estructura no pueden ser reducidas, por lo que son poco susceptibles a ser metabolizadas (Cooke y Vallance 1964, 1965, Raynaud y cols. 1982). Por otro lado, el AMP y el AMG presentan en el C-17 un grupo  $\beta$ -acetyl conservado de la P, pero cuando se les incorpora un grupo C-17 $\alpha$ -acetato les proporciona una importante diferencia en su estructura y función.

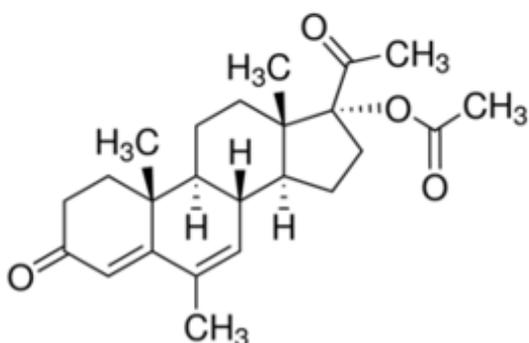
El 13- $\beta$ -ethyl-17 $\alpha$ -ethynyl-17 $\beta$ -hidroxigon-4-en-3-one, norgestrel, o DL-norgestrel es una mezcla formada por d-norgestrel y l-norgestrel. D-norgestrel es el enantiómero con mayor actividad biológica y como fue descrito en la sección anterior se ha nombrado como LNG (Croxatto y cols. 2001). Esta PS tienen diferencias significativas con la P, principalmente por el grupo metilo en la región del C-17, y un grupo etilo en el C-13 seguida de la remoción del grupo metilo de su C-19, aunque mantienen el grupo carbonilo en el C-3 del anillo A (Kubli-Garfias y cols. 2013, Raynaud y cols. 1982). Estas características estructurales de las PS forman: un gran núcleo hidrofóbico y 2 farmacóforos polares que se encuentran uno en el anillo A y otro en el anillo D (Figura 12).



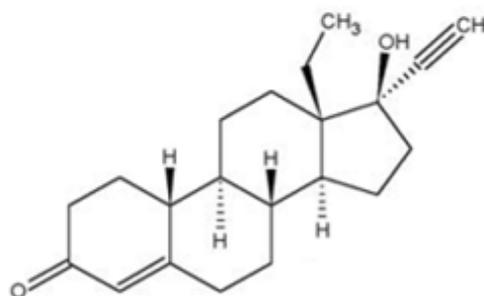
**Progesterona**



**Acetato de medroxiprogesterona**



**Acetato de megestrol**



**Levonorgestrel**

**Figura 12.** Diagrama de las estructuras químicas de la Progesterona, Acetato de medroxiprogesterona, Acetato de megestrol y Levonorgestrel.

De igual manera, la conformación molecular de las PS les confiere un diferente mecanismo de acción y biodisponibilidad. En el caso del AMG la biodisponibilidad que esta presenta es muy similar a la del AMP, cerca del 100%. La más importante vía metabólica de esta PS es mediante la reacción de hidroxilación.

El LNG es rápidamente absorbido cuando se toma de manera oral, la biodisponibilidad de este, es prácticamente de 100%, su pico máximo en niveles plasmáticos se observa aproximadamente entre 1 y 3 horas después de la administración (Schindler y cols. 2003). El LNG suele ser reducido en los sistemas biológicos, lo que le confiere una distinta capacidad de unión y acción (García-Becerra y cols. 2002).

## **2.6.2 PROGESTINAS SINTÉTICAS Y SU AFINIDAD POR EL RP**

A pesar de que se asume que las PS tienen efectos clínicos similares, estas presentan características particulares al unirse con el RP lo que da como resultado que induzcan efectos celulares particulares. De este modo podemos entender que los receptores de hormonas esteroideas reclutan vías de señalización específicas, dependiendo de la conformación inducida por la unión con su ligando con el RP, el cual en este caso es el encargado de disparar la actividad fisiológica iniciada por la hormona.

En el área de las hormonas esteroideas, el receptor es un componente clave, ya que, el hecho de que un esteroide pueda ejercer sus acciones va a depender de la condición en que este interactúe con dicho receptor. Por lo tanto, existe una correlación entre la estructura molecular de las hormonas y la fuerza de unión que estas ejerzan con su receptor, dando como resultado una diferente magnitud de respuesta que es generada cuando se forma el complejo activo hormona-receptor. Por lo tanto, una buena unión entre el ligando con su receptor forman un fuerte complejo activo (Raynaud y cols. 1982).

Debido a la variedad de estructuras moleculares que presentan las PS, cada una tiene efectos específicos y particulares, por lo que cada PS dará como resultado un efecto clínico único y específico (Simoncini y cols. 2004), debido a las enormes variaciones en las estructuras químicas de los esteroideas con actividad progestacional, es muy difícil deducir la gran variedad de acciones biológicas que presentarán cada una de las progestinas solo por su estructura química (Schindler y cols. 2003), ya que los efectos biológicos que ejercerán dichas progestinas a nivel celular serán mediados por la gran variedad de receptores intracelulares presentes en las células blanco (Schindler y cols. 2003). Con base a todas las características y efectos celulares individuales que presentan las PS se han realizado un sinnúmero de experimentos para entender el funcionamiento y los diferentes efectos celulares de las progestinas, tanto naturales como sintéticas.

Por otro lado, los 2 farmacóforos polares que se encuentran presentes en la estructura molecular de las PS les permiten unirse al RP. Así, el farmacóforo presente en el C-3-oxígeno, que, si bien le confiere la capacidad de unión a la PS con el RP, por sí solo no es suficiente para definir la

potencia de la progestina, (Kubli-Garfias y cols. 2013) ya que requiere de otro farmacóforo, formado por la presencia de un grupo metilo en el C-21, los cuales están presentes tanto en el AMP y del AMG, además, el LNG contiene un grupo etilo en el C-13, así como la remoción del grupo metilo de su C-19. Todas esas modificaciones les permiten a estas PS tener una unión más fuerte y estable con el RP que la unión que presenta la propia P por dicho receptor (Raynaud y cols. 1982) Tabla 1.

<b>Hormona Esteroide</b>	<b>Afinidad Relativa de Binding</b>	<b>Referencia</b>
<b>Progesterona</b>	100	Duax y cols. 1978
<b>Acetato de Medroxiprogesterona</b>	305	Duax y cols. 1978
<b>Acetato de Megestrol</b>	120	Chandross y Bordner 1975.
<b>Levonorgestrel</b>	905	DeAngelis y cols. 1975.

**Tabla 1.** La tabla 1 muestra que el LNG tiene la más alta afinidad por el RP y los derivados acetilados están clasificados con un binding más alto que el de la P.

Kubli-Garfias y colaboradores (2013) reportaron que las afinidades relativas de unión hacia el RP por parte de estas PS muestran la siguiente potencia; LNG>AMP>AMG>P. Además, Kuhnz y colaboradores (1995) reportaron que el LNG, que es la PS con mayor afinidad por el RP, también presenta gran afinidad por el RP que se expresa en el útero de conejo, en el útero de humano y por el RP humano cultivado de manera *in vitro* en células SF9 de insecto, además de ser capaz de mantener la gestación en ratas gonadectomizadas.

Por su gran efecto agonista el LNG es considerado como un agonista total del RP, ya que al tener una gran hidrofobicidad, al igual que una red de enlace de hidrógeno similar al de la P, debido a la estructura ya mencionada en el párrafo anterior, le permite tener más áreas de contacto y unión con el RP, lo cual hace que se acople eficazmente a dicho receptor, principalmente al RP-A y formar un complejo activo que presenta muy baja energía libre. Adicionalmente, la interacción que tiene el LNG con la Met909 del RP juega un importante papel como agonista, incrementando su potencia. Estas modificaciones son las que le proporcionan al LNG una mayor unión hacia el RP y una alta potencia farmacológica. Sin embargo, el complejo ligando receptor que forma el LNG no necesariamente puede reproducir todas las acciones clásicas que la P ejerce en los sistemas biológicos (Critchley y cols. 1998).

Se ha propuesto que el LNG presenta mayor afinidad por el RP-A (Schoonen y cols. 1998) en células cancerígenas, y cuando este es metabolizado a compuestos reducidos en el anillo A como el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -LNG también puede actuar sobre el RE $\alpha$  (García-Becerra y cols. 2002). Estudios comparativos de los valores de afinidad del LNG por las dos isoformas, el RP-A y el RP-B en células del ovario de hámster, muestran mayor unión hacia el RP-A. Así, los exámenes realizados para explorar la diferenciación del endometrio en conejo, mostraron que el LNG tiene mayor potencia que la P y presenta valores similares al R5020 (Schoonen y cols. 1998). Critchley y cols. (1998) sugieren que ya que el LNG suprime fuertemente al RP-B, probablemente el RP-A sea la isoforma que media a largo plazo las acciones en el endometrio.

Se ha reportado, en el caso de las PS acetiladas como el AMG y el AMP, que presentan un agonismo parcial que puede ser correlacionado con una unión más débil hacia el RP en comparación con el LNG, pero aun así más fuerte que la de la P, y quizá con una activación parcial del RP, además de que estas presentan un diferente metabolismo y biodisponibilidad (Kubli-Garfias y cols. 2013). En experimentos realizados *in vivo*, se ha encontrado que la hidrólisis desacetila a las PS dando como resultado la formación de compuestos libres. Además, la desacetilación ocurre en diferentes proporciones para cada compuesto, por ejemplo, el AMP es desacetilado entre 30 y 70% (Ishihara y cols. 1975), mientras que el AMG, que es una progestina muy resistente al metabolismo, puede llegar a ser desacetilada hasta en un 54% en la glándula adrenal de rata (Cooke y Vallance 1968).

Todos estos factores sugieren que la cantidad de progestinas libres es bajo, sin embargo, el efecto de la suma de los esteroides acetilados y libres podrían sinergizar para ejercer sus efectos fisiológicos. El significado biológico de este evento puede ser relevante para que se lleve a cabo la unión con el RP, generándose tanto uniones débiles como fuertes y así, provocando la activación del RP y el mecanismo genómico considerado como clásico (Kubli-Garfias y cols. 2013).

El AMG y el AMP tienen una buena afinidad por los receptores a esteroides, mientras que otras solo interactúan con alguno de ellos, por ejemplo, se ha demostrado que el AMG y AMP son fuertes competidores de esteroides, pues se unen a los receptores de andrógenos, glucocorticoides y de P, indicando que estas PS son capaces de unirse a estos receptores con alta afinidad, sin embargo, algunas de ellas no compiten con el estradiol por su receptor (Teulings y cols. 1980).

Experimentos realizados *in vitro* han mostrado que PS como el R5020 o el AMP son capaces de unirse con gran afinidad al RP-A y al RP-B, por ende, los activan eficientemente. Así el tratamiento con R5020 resulta en un incremento significativo en la actividad de la luciferasa, al igual que el tratamiento con AMP incrementa significativamente la actividad de esa enzima en células cotransfectadas con el RPHA (RP humano A) o el RPHB (RP humano B). Además, el AMP induce una intensa activación celular, ya que incrementa la actividad promotora en células cotransfectadas con el RPHA Y RPHB de hasta 1.2 a 27 veces más que la misma P, a través de su unión con el RP-A, no teniendo la misma potencia transcripcional al activar al RP-B. Por otro lado, se conoce que la administración de diferentes progestinas como el AMP, P y 19 nor-progestinas; Org2058 y noretindrona al unirse sobre el RP-A fueron más potentes que al unirse sobre el RP-B, en específico se menciona que en células endometriales estromales el AMP es capaz de activar en una tasa más elevada al RP-A que al RP-B (Gao y cols. 2000).

A pesar de que frecuentemente se asume que los análogos de las progestinas tienen efectos clínicos similares, no todos ellos ejercen un efecto agonista sobre el cerebro como lo harían en algún otro tejido que exprese al clásico RP (Bradley y cols. 2009). Las progestinas naturales o sintéticas pueden tener diferentes efectos celulares al unirse al RP, debido a su distinta

farmacocinética, así como sus diferentes afinidades por el RP, que pueden generar la activación parcial de diferentes vías de señalización en las células blanco, debido a una modulación diferencial del RP.

A diferencia de otros receptores, los de las hormonas esteroideas activan a vías específicas de señalización dependiendo de la conformación inducida por sus diferentes ligandos. Además, algunas progestinas son capaces de interactuar con otros receptores de esteroides y pueden activar vías de señalización diferentes. Se ha propuesto que las progestinas además de unirse al RP, se pueden unir a receptores membranales teniendo algunos efectos sobre el SNC (Schindler y cols. 2003). Como ya se ha mencionado, las hormonas esteroideas además de unirse a su propio receptor, tienen la capacidad de unirse con otros receptores a esteroides, por lo que se puede esperar que cada progestina ejerza un efecto clínico único. Debido a las diferentes acciones inducidas por las progestinas naturales como sintéticas, es necesario tratar de comprender la forma en que dichas progestinas pueden estar activando diferentes vías de señalización (Simoncini y cols. 2004).

Se ha sugerido que la transactivación, la dimerización, la fosforilación y la interacción de los receptores de esteroides con el ADN y factores de transcripción juegan un rol en la potencia final de un compuesto. Sin embargo, en los estudios de unión solo se le ha dado importancia a la interacción con el sitio de unión a la hormona (Schoonen y cols. 1998). La diferente farmacocinética de progestinas naturales o sintéticas y sus diversas afinidades por el RP puede llevar al reclutamiento de vías de señalización parcialmente divergentes, debido a la modulación diferencial del receptor, por lo cual es de gran importancia el inicio de estudios que se enfoquen en el efecto de dichas hormonas en los diferentes sistemas biológicos.

### **2.6.3 PROGESTINAS SINTÉTICAS Y CONDUCTA SEXUAL FEMENINA**

Los estudios en roedores muestran que la P estimula la CSF a través de su acción en los RP hipotalámicos inducidos por el E2 (Pazol y cols. 2004), en roedores la P induce el reflejo de lordosis, al igual que las conductas de atractividad y proceptividad (Moralí y Beyer, 1979), mientras que se reporta que las PS ejercen sus efectos progestomiméticos al interactuar con el RP y que las PS tienen una afinidad mayor por el RP que la misma P como ya se ha mencionado. Así se ha reportado que PS como el R5020 y el AMG son potentes agentes lordogénicos (González-Flores y cols. 1998), se ha planteado que una progestina tan potente como el R5020 principalmente induce conducta de lordosis a través de su interacción con el RP nuclear y no mediante un efecto generado en la membrana celular (Beyer y cols. 2003), se ha reportado que en algunos sistemas biológicos la respuesta fisiológica al R5020 es mediado principalmente por el RP-B (Kahmann y cols. 1998) mientras que en otros se ha reportado que la progestina R5020 puede inducir la actividad transcripcional mediante la regulación del RP-A y el RP-B (Shatnawi y cols. 2007). La vía de acción de esta progestina como se ha mencionado es mediante la activación del RP ya que la expresión génica inducida por esta, es reducida por la administración del ZK98299 y el RU486 los cuales son antagonistas de la P (Beck y cols. 1993). Además de los efectos fisiológicos que puede inducir el R5020, esta progestina tiene la capacidad de generar una respuesta conductual tan importante como lo es la conducta de estro en roedores (Blaustein y Feder 1979).

Ahora bien nuestro grupo de investigación ha reportado que el AMG es más potente que la P para estimular la expresión de la lordosis, así mismo muestra una gran eficacia para inducir respuesta tanto en la expresión de la lordosis como en las conductas proceptivas (González-Flores y cols. 1998), de igual manera, una gran variedad de PS entre las cuales se encuentran el AMG, AMP y el LNG, inducen respuesta de lordosis con una potencia variable, ya que el AMP y el AMG actúan como agonistas parciales, induciendo la CSF en ratas estrogenizadas con una potencia similar a la P, mientras que el LNG actúa como un agonista total teniendo la capacidad de incrementar de manera significativa la CSF en comparación con la P (Kubli-Garfias y cols. 2013).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Desde mediados del siglo pasado se han desarrollado un gran número de progestinas sintéticas, estas se encuentran relacionadas estructuralmente con la progesterona, testosterona y el estrógeno, por lo cual estas tienen la capacidad de unirse a los receptores de dichas hormonas respectivamente, he inclusive unirse a más de un receptor, por lo que pueden manifestar un gran número de efectos farmacológicos, por esta razón es de suma importancia realizar estudios como el presente para poder comprender los mecanismos de acción y las diferentes vías de señalización intracelular que estas progestinas sintéticas son capaces de activar al ejercer sus acciones farmacológicas en diferentes tejidos y sistemas biológicos.

#### **4. HIPÓTESIS**

La conducta de estro (lordosis y proceptividad) inducida por levonorgestrel, acetato de megestrol y el acetato de medroxiprogesterona se produce preferentemente por un mecanismo que involucra la activación de los receptores de P y E, y no por efectos membranales que pudieran activar a la proteína cinasa Src y la MAPK en ratas previamente estrogenizadas.

## **5. OBJETIVO**

Explorar la participación del receptor de estrógenos, el receptor de progesterona, la vía de señalización de la Src y la MAPK sobre la conducta de estro inducida por progestinas sintéticas.

### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la dosis efectiva del acetato de medroxiprogesterona, el acetato de megestrol y el levonorgestrel para inducir conducta de estro.

Evaluar la participación del receptor de progesterona en la expresión de la conducta de estro inducida por la administración intracerebral de progestinas sintéticas a ratas estrogenizadas a través de la administración del RU486, antagonista del receptor de progesterona.

Evaluar la participación del RE en la expresión de la conducta de estro inducida por la administración intracerebral de progestinas sintéticas a ratas estrogenizadas a través de la administración del tamoxifen, antagonista del receptor de estrógenos.

Evaluar la participación de la proteína Src en la conducta de estro inducida por la administración intracerebral de progestinas sintéticas a ratas estrogenizadas a través de la administración del PP2, inhibidor respectivo de dicha cinasa.

Evaluar la participación de la MAPK en la conducta de estro inducida por la administración intracerebral de progestinas sintéticas a ratas estrogenizadas a través de la administración del PD98059, inhibidor respectivo de dicha cinasa.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 ANIMALES**

En el presente trabajo se utilizaron doscientas cuarenta y dos ratas hembra Sprague-Dawley sexualmente inexpertas con un peso de 230-270 gr., nacidas en la colonia del CIRA Panotla, Tlaxcala, mantenidas en condiciones de bioterio, con temperatura controlada entre los  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  y con un ciclo invertido de luz oscuridad, 14 horas luz y 10 horas oscuridad, en el cual la luz se apaga a las 10 horas y se enciende a las 20 horas. Las ratas fueron provistas de alimento Purina rat chow y agua *ad libitum*.

### **6.2 CIRUGÍAS**

#### **6.2.1 OVARIECTOMÍA (OVX)**

Las ratas hembra fueron OVX ventralmente bajo anestesia de ketamina (80mg/Kg) y xilazina (4mg/Kg). Después de la cirugía las hembras fueron alojadas en grupos de 4 hembras por jaula.

#### **6.2.2 CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR**

Dos semanas después de la OVX las hembras fueron anestesiadas con las mismas dosis de ketamina y xilazina, y colocadas en un instrumento estereotáxico (Tujunga, CA, USA), con el fin de implantarles una cánula de acero inoxidable de 17mm de longitud directamente en el ventrículo lateral derecho, utilizando las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982) (antero posterior +0.80mm, lateral -1.5mm y dorso ventral -3.5mm con respecto a lambda). Se insertó un tornillo de acero inoxidable al cráneo y junto con la cánula se fijó utilizando acrílico dental. Se introdujo a la cánula un tapón de acero quirúrgico y se administró 22000ui/kg peso de penicilina para evitar infecciones.

### **6.3 FÁRMACOS**

El benzoato de estradiol, acetato de medroxiprogesterona (17 $\alpha$ -Acetyloxy-6 $\alpha$ -methylpregna-4,6-diene-3,20-dione), acetato de megestrol (17 $\alpha$ -Acetyloxy-6-methylpregna-4,6-diene-3,20-dione), levonorgestrel (D-norgestrel), los antagonistas del receptor a estrógenos y del receptor a progesterona, tamoxifen y RU486 respectivamente, fueron obtenidos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los inhibidores de la MAPK y de la cinasa Src, el PD98059 y PP2 respectivamente, fueron adquiridos en Calbiochem (San Diego, CA, USA).

### **6.4 PRUEBA CONDUCTUAL**

La prueba de conducta sexual se realizó colocando a las hembras en una arena circular de plexiglás con un diámetro de 53cm en donde se colocó previamente un macho sexualmente experto. La prueba se realizó durante la fase de oscuridad del ciclo, a cada hembra se le evaluó el cociente de lordosis (CL) empleando la siguiente fórmula:  $CL = (\text{número de lordosis} / 10 \text{ montas}) \times 100$ , la intensidad de lordosis se evaluó en una escala creciente que va de 0 a 3. Para evaluar la proceptividad se determinó la expresión de brincoteo, arrancones y orejeo durante la prueba de conducta sexual, consideraremos que una hembra presenta proceptividad si despliega al menos dos de estas conductas durante el tiempo de la prueba y se representa en porcentaje de hembras proceptivas.

Las pruebas conductuales se realizaron a los 60, 120 y 240 minutos después de la administración intracerebroventricular (ICV) de la PS respectiva para cada grupo de hembras.

## **6.5 EXPERIMENTO I. CURVA DOSIS RESPUESTA DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA, ACETATO DE MEGESTROL Y LEVONORGESTREL SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA CONDUCTA DE ESTRO.**

En este experimento se determinó cual dosis de entre 1.3ng, 13ng, 130ng y 1300ng es la más efectiva de cada una de las PS (AMP, AMG y LNG) para facilitar la conducta de estro, para lo cual formamos 12 grupos de entre 8 a 12 hembras, los cuales recibieron tratamiento con una de las tres PS en diferentes dosis y un grupo de 10 hembras que recibió la administración del vehículo oleoso para formar un grupo control.

Una semana después del implante ICV, las ratas recibieron un tratamiento hormonal, el cual consistió en la inyección subcutánea (SC) de 5µg de benzoato de estradiol (0 hrs.) y 40 horas después recibieron una infusión ICV con la progestina que correspondía a cada grupo. La prueba conductual se realizó en los tiempos descritos previamente.

Una vez que obtuvimos la dosis de cada una de las progestinas que facilitó mejor la conducta de estro, se empleó dicha dosis para realizar cada uno de los experimentos posteriores.

## **6.6 EXPERIMENTO II. PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA CONDUCTA DE ESTRO INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBRAL DE PROGESTINAS SINTÉTICAS EN RATAS ESTROGENIZADAS.**

Una semana después del implante de la cánula, un grupo de 30 hembras fueron inyectadas con benzoato de estradiol vía SC, 39.5 hrs. después recibieron por vía ICV el antagonista tamoxifen a una dosis de 5µg y 30 minutos después se administró la dosis efectiva de AMP (n=10), de AMG (n=10) y de LNG (n=10) obtenidas del primer experimento.

Un grupo de 30 hembras fueron inyectadas con benzoato de estradiol vía SC y posteriormente (39 hrs) recibieron por vía SC la administración del antagonista RU486, a una dosis de 5mg y 60 minutos después fueron inyectadas ICV con la dosis efectiva de AMP (n=12), AMG (n=8) y LNG (n=10) obtenidas del primer experimento, ambos grupos fueron evaluados

conductualmente a los 60, 120 y 240 minutos posteriores a la administración de la PS correspondiente a cada grupo experimental.

### **6.7 EXPERIMENTO III. PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA Src Y LA MAPK SOBRE LA CONDUCTA DE ESTRO INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBRAL DE PROGESTINAS SINTÉTICAS EN RATAS ESTROGENIZADAS.**

Una semana después del implante de la cánula, un grupo de 27 hembras fueron inyectadas con benzoato de estradiol vía SC, luego 39.5 hrs. después recibieron una administración ICV del antagonista PP2 en una dosis de 30µg y 30 minutos después se inyectaron ICV con la dosis efectiva de AMP (n=10), AMG (n=8) y LNG (n=9).

Un segundo grupo de 31 hembras fueron inyectadas con benzoato de estradiol vía SC, luego 39.5 hrs. después recibieron una administración ICV del antagonista PD98059 en una dosis de 3.3µg y 30 minutos después se inyectaron ICV con la dosis efectiva de AMP (n=11), AMG (n=10) y LNG (n=10), los dos grupos de hembras fueron evaluadas conductualmente a los 60, 120 y 240 minutos posteriores a la administración de la PS correspondiente a cada grupo experimental.

### **6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

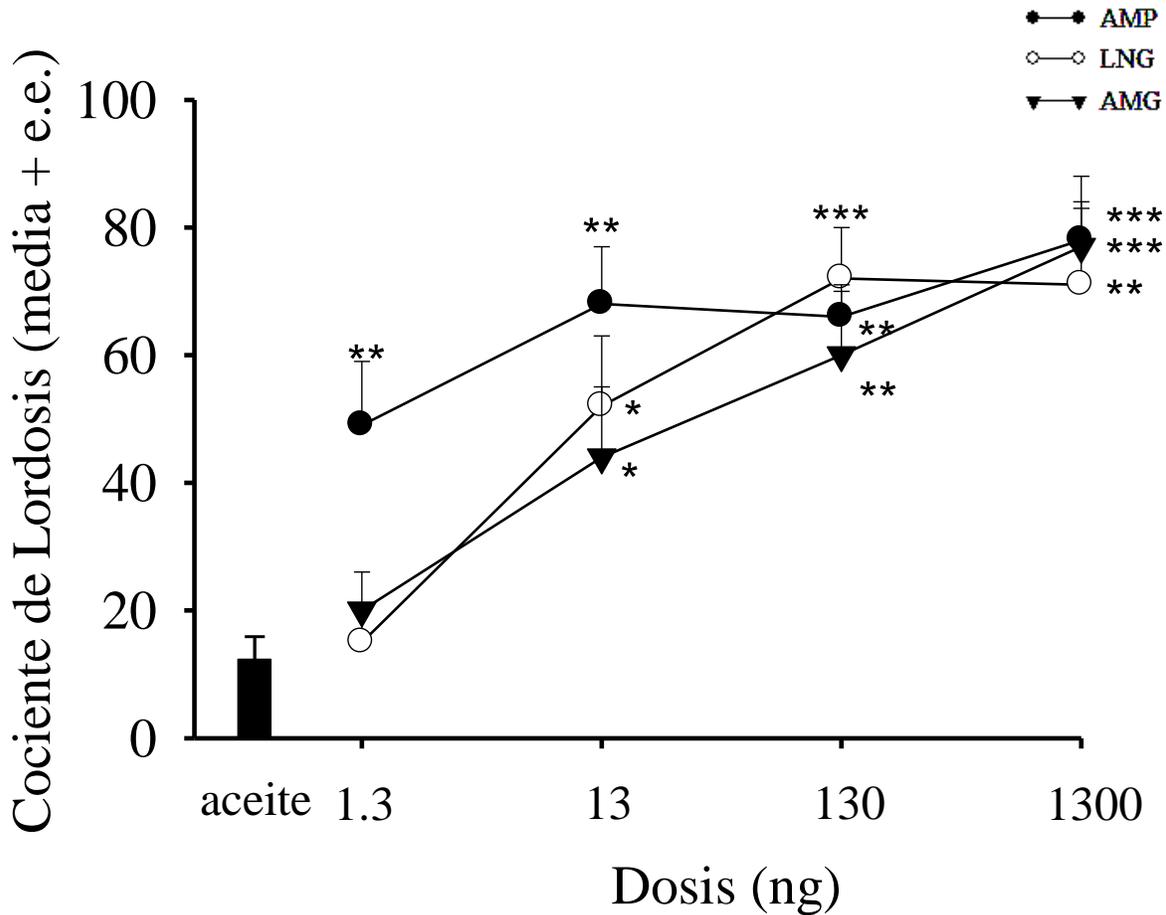
Los datos del cociente de lordosis se analizaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, con el fin de comparar el efecto de la administración de las PS en diferentes dosis y se utilizó la U de Mann Whitney para grupos independientes para determinar las diferencias entre los grupos tratados con una PS y el grupo control, y los tratados con dicha PS junto con los fármacos inhibidores.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. EXPERIMENTO I. CURVA DOSIS RESPUESTA DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA, ACETATO DE MEGESTROL Y LEVONORGESTREL SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA CONDUCTA DE ESTRO.**

Los resultados obtenidos en el primer experimento muestran la expresión de lordosis y proceptividad inducida por las PS a los 120 minutos después de la administración ICV de cada PS utilizada. Los resultados del grupo control representados mediante la barra negra muestran baja expresión de lordosis y no muestran despliegue de proceptividad. Por otro lado, se puede observar que las PS inducen la expresión de lordosis y proceptividad de manera significativa en comparación con el grupo control, principalmente las dosis más altas. A pesar de que las tres PS tienen la capacidad de inducir la expresión de estas conductas, el AMP es la PS con mayor efectividad.

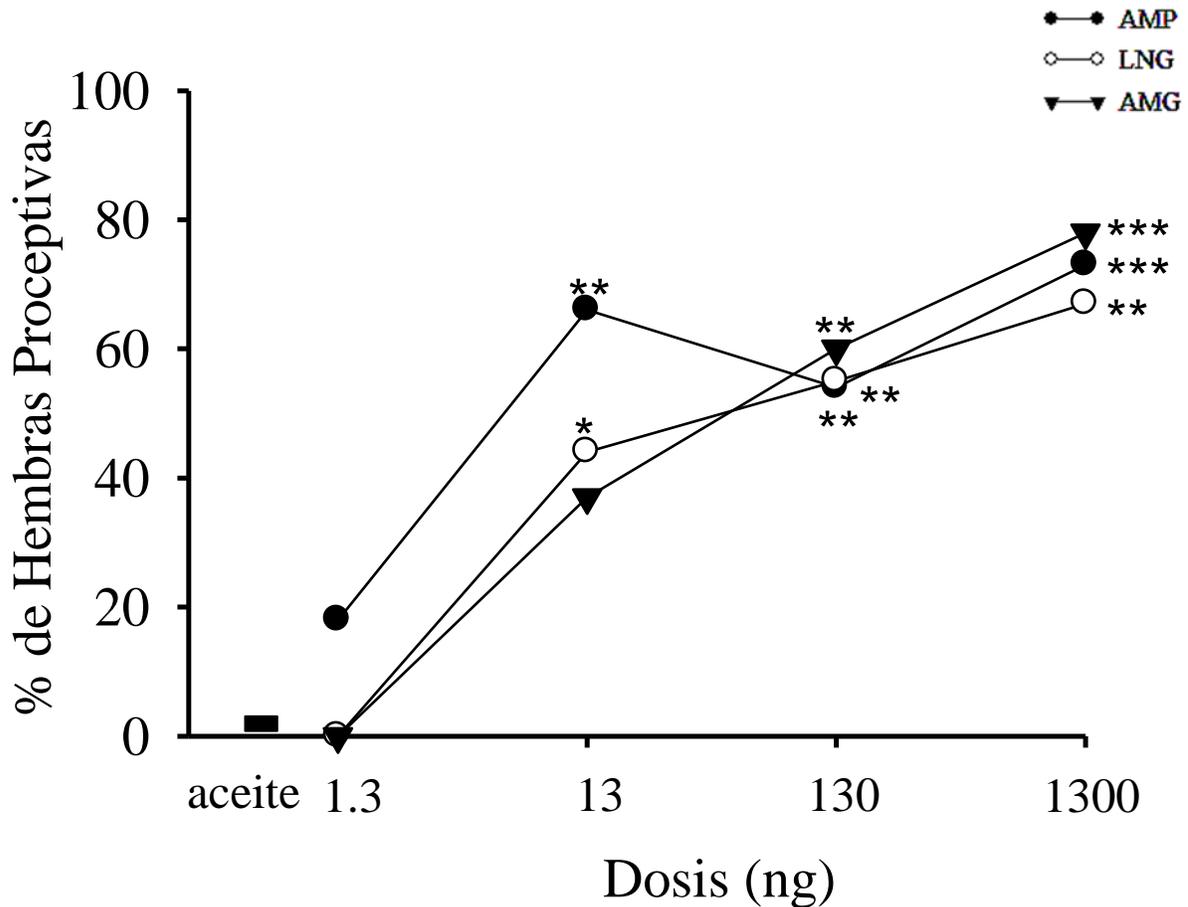
CURVA DOSIS RESPUESTA DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (AMP),  
 ACETATO DE MEGESTROL (AMG) Y LEVONORGESTREL (LNG) EN LA  
 INDUCCIÓN DE LA LORDOSIS



La gráfica 1 muestra las curvas dosis respuesta obtenidas por la administración de las dosis 1.3, 13, 130 y 1300ng de AMP, LNG y AMG sobre el cociente de lordosis en la rata OVX pretratada con estrógenos 2 horas después de recibir la administración de la PS comparadas con un grupo control que solamente recibió el vehículo, mostrando los siguientes valores de probabilidad \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  vs el grupo control. Los resultados obtenidos al realizar una curva dosis respuesta del cociente de lordosis dos horas después de la administración de las PS muestran que en el grupo control representado por la barra negra no hubo despliegue del reflejo de lordosis. Al administrar una dosis de 1.3ng de las PS se observa que el grupo que recibió la administración de AMP muestra un incremento significativo del cociente de lordosis en comparación con el grupo control, mientras que los resultados de los grupos que recibieron LNG o AMG no se observa una diferencia significativa. Cuando las tres PS fueron administradas en una dosis de 13ng indujeron un incremento significativo en el cociente de lordosis comparado

con el grupo control, mientras que al administrar las PS en dosis de 130ng y 1300ng se incrementó significativamente el cociente de lordosis en comparación con el grupo control, mostrando un mayor incremento con la dosis de mayor concentración.

CURVA DOSIS RESPUESTA DEL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (AMP),  
 ACETATO DE MEGESTROL (AMG) Y LEVONORGESTREL (LNG) EN LA  
 INDUCCIÓN DE LAS CONDUCTAS PROCEPTIVAS



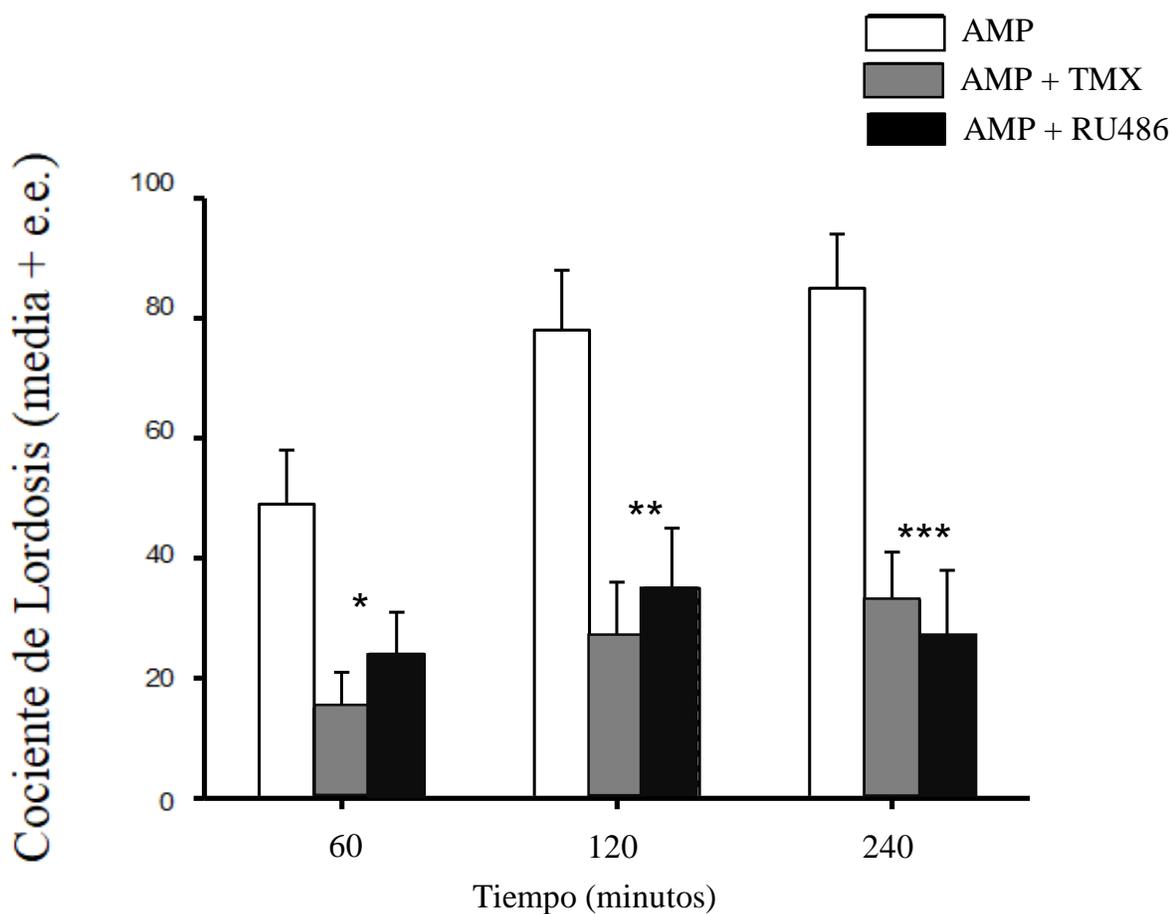
La gráfica 2 muestra los resultados obtenidos con la administración de 1.3, 13, 130 y 1300ng de AMP, LNG y AMG sobre la expresión de conductas proceptivas en la rata OVX pretratada con estrógenos 2 horas después de recibir la administración de la PS comparadas con el grupo control que recibió solamente el vehículo mostrando los siguientes valores de probabilidad \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  vs el grupo control. Los resultados de la administración de las PS en una dosis de 1.3ng no muestran un incremento significativo en el % de hembras proceptivas a pesar de que el grupo que recibió el AMP mostrara cierto incremento. Los grupos que recibieron la administración de las PS en la dosis de 13ng mostraron un incremento de las conductas proceptivas, pero solo los resultados del grupo tratado con AMP y el tratado con LNG mostraron una diferencia significativa al compararlos con el grupo control. Los grupos que recibieron la dosis de 130ng de las PS muestran resultados similares entre ellos en la expresión

de las conductas proceptivas y tienen una diferencia significativa similar al comprarlas con el grupo control. Cuando se administró una dosis de 1300ng los tres grupos mostraron un incremento significativo en la expresión de las conductas proceptivas, siendo los grupos tratados con AMP y AMG los que mostraron una mayor diferencia significativa.

## **7.2 EXPERIMENTO II. PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA CONDUCTA DE ESTRO INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBRAL DE PROGESTINAS SINTÉTICAS EN RATAS ESTROGENIZADAS.**

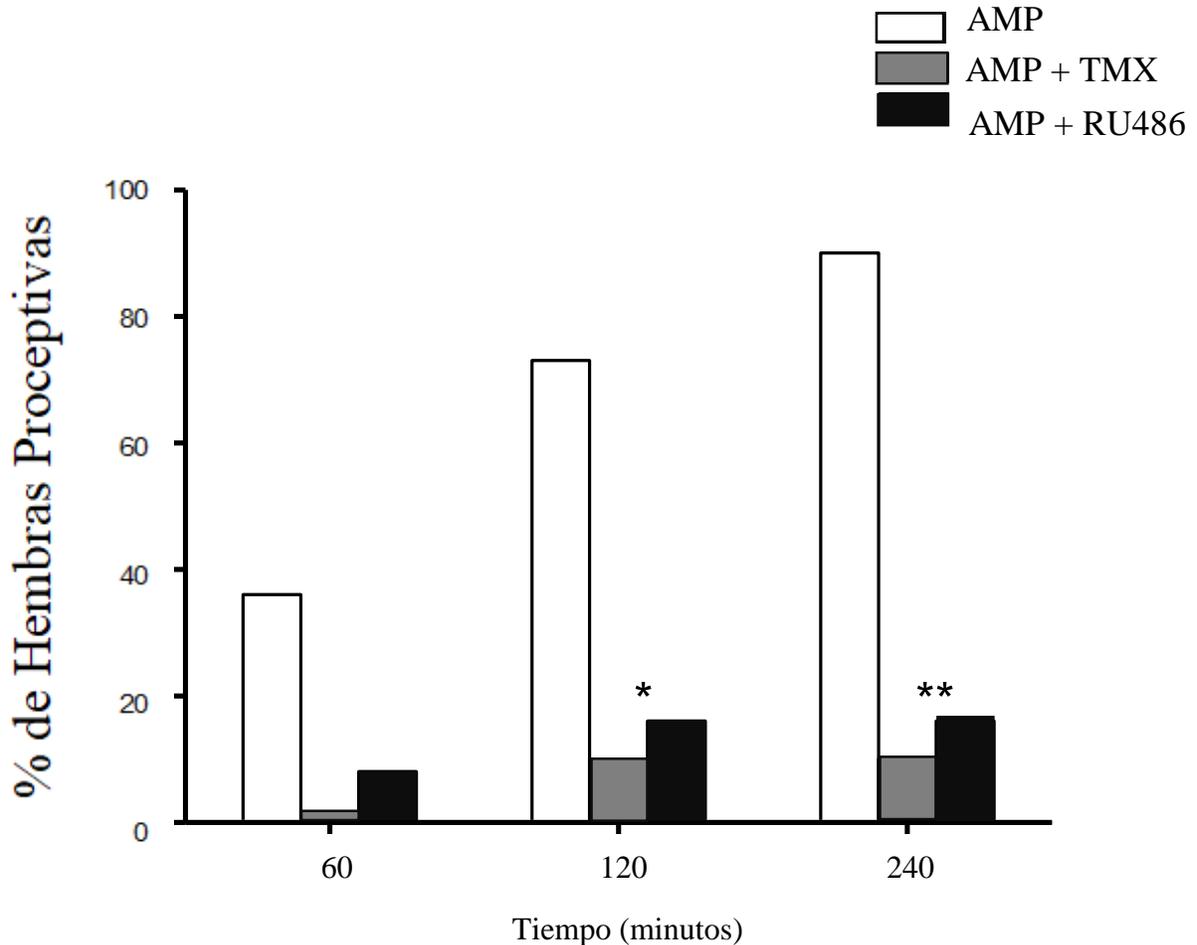
Los resultados del segundo experimento muestran los efectos de la administración del TMX y el RU486 sobre la expresión de lordosis y proceptividad inducida por el AMP, LNG y AMG con las dosis efectivas que fueron obtenidas del experimento anterior.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA LORDOSIS INDUCIDA POR EL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (AMP).



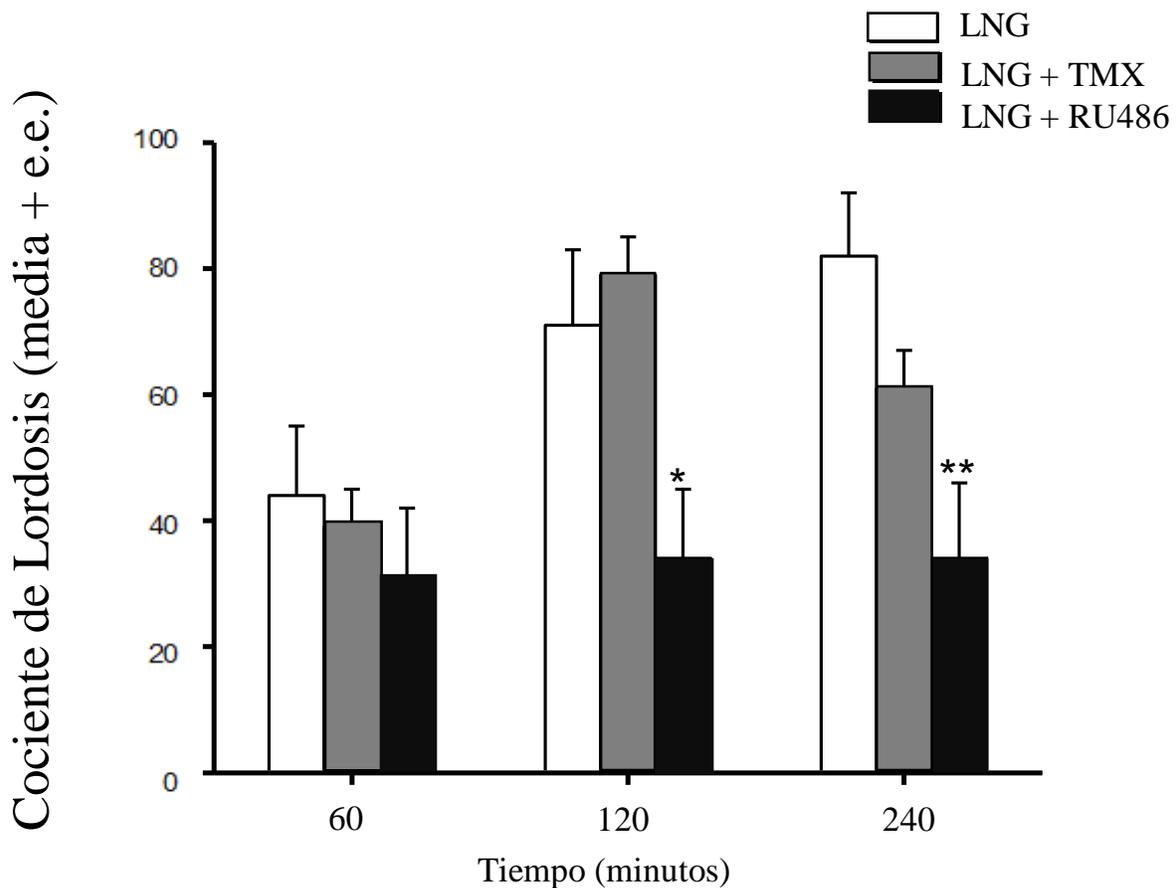
La gráfica 3 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de AMP junto con la administración de Tamoxifen o RU486 sobre el cociente de lordosis en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS mostrando los siguientes valores de probabilidad \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  y \* $p < 0.05$  vs el grupo control que solamente recibió la dosis de PS. En los resultados mostrados se puede observar que tanto la administración independiente de RU486, antagonista del RP, y el TMX, antagonista del RE redujeron de manera significativa el CL inducido por el AMP en una dosis de 1300ng a los 60, 120 y 240 minutos después de su administración, siendo a los 240 minutos donde se observa una diferencia significativa mayor.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS CONDUCTAS PROCEPTIVAS INDUCIDAS POR EL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (AMP).



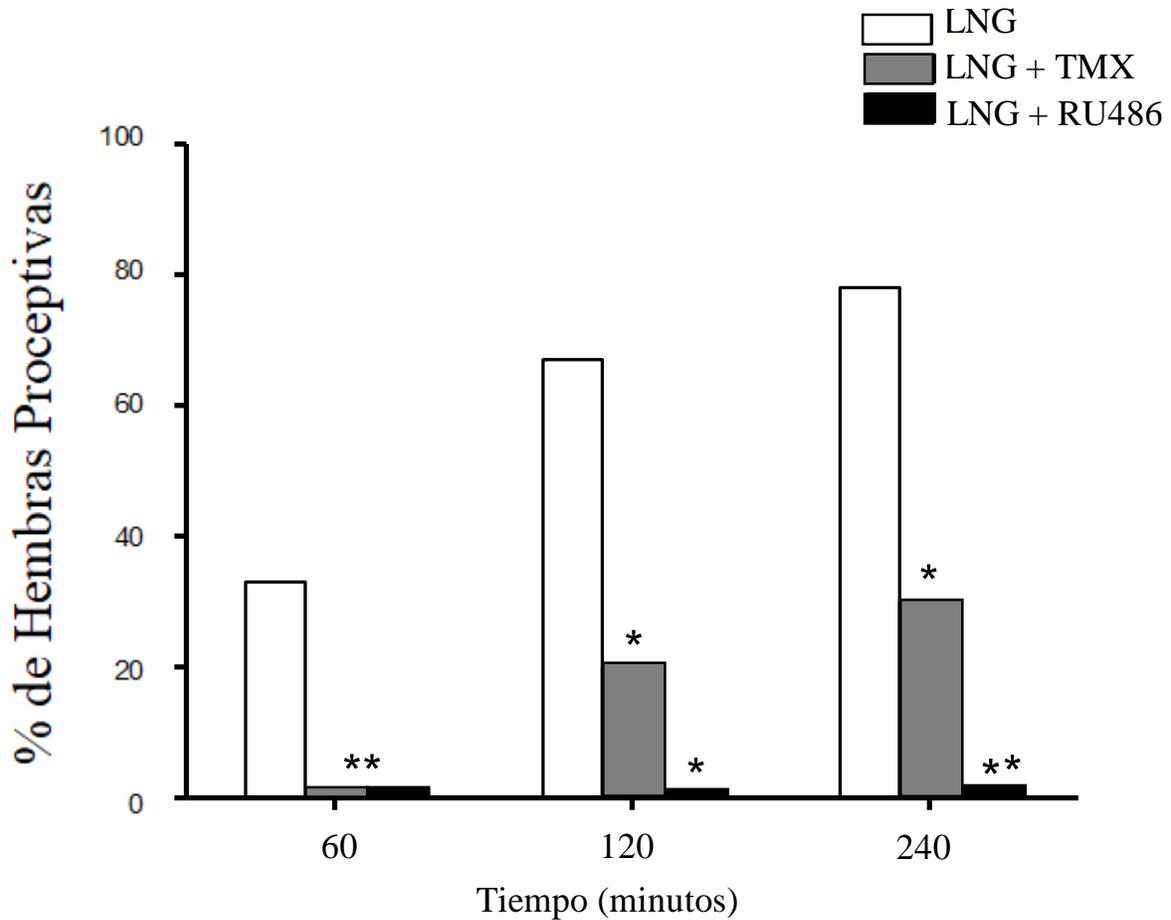
La gráfica 4 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de AMP junto con la administración de Tamoxifen o RU486 sobre el % de hembras proceptivas en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS mostrando los siguientes valores de probabilidad  $**p < 0.01$  y  $*p < 0.05$  vs el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS. En nuestros resultados se observa una reducción de manera significativa en el % de hembras proceptivas inducido por el AMP en una dosis de 1300ng a los 60, 120 y 240 minutos después su administración, pudiéndose observar diferencias significativas con el grupo control a los 120 y 240 minutos después de su administración, los valores obtenidos de la administración del TMX muestran la misma tendencia que los obtenidos por el efecto del RU486.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA LORDOSIS INDUCIDA POR EL LEVONORGESTREL (LNG).



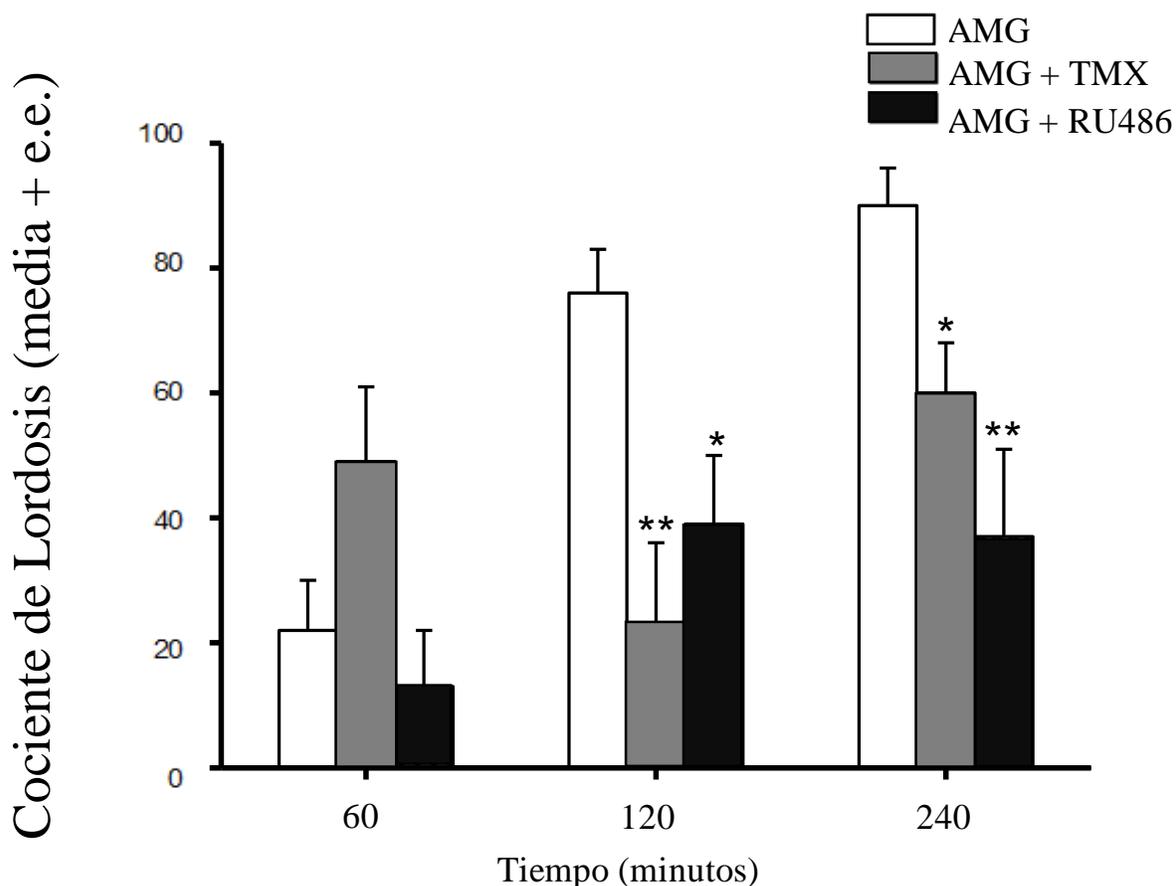
La gráfica 5 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de LNG junto con la administración de Tamoxifen o RU486 sobre el cociente de lordosis en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS mostrando los siguientes valores de probabilidad  $**p<0.01$  y  $*p<0.05$  vs el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS. Podemos observar que el TMX no tuvo efecto sobre el CL inducido por esta PS mientras que el RU486 disminuyó de manera significativa el CL inducido por el LNG a los 120 y 240 minutos después de ser administrada esta PS.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS CONDUCTAS PROCEPTIVAS INDUCIDAS POR EL LEVONORGESTREL (LNG).



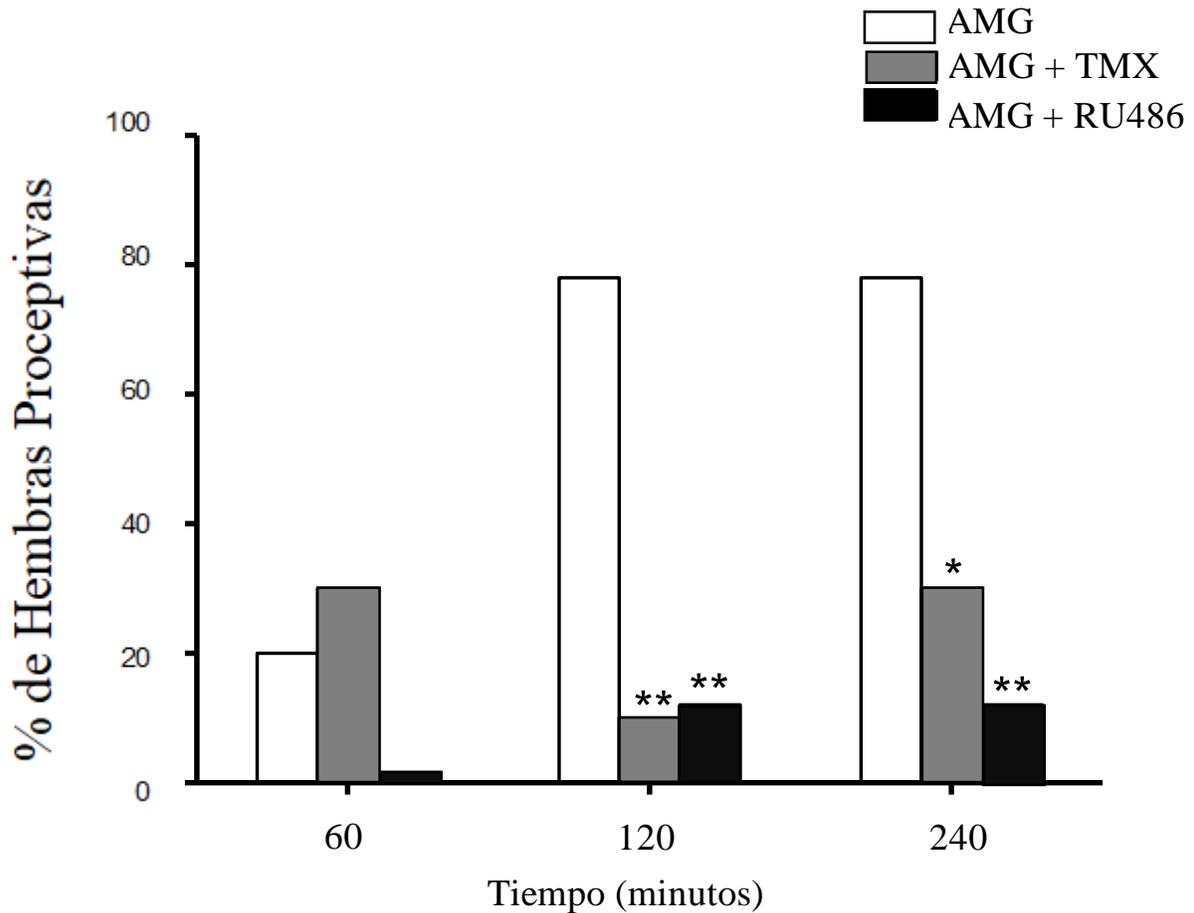
La gráfica 6 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de LNG junto con la administración de Tamoxifen o RU486 sobre el % de hembras proceptivas en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS mostrando los siguientes valores de probabilidad  $**p < 0.01$  y  $*p < 0.05$  vs el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS. Los resultados muestran que ambos antagonistas redujeron de manera significativa el % de hembras proceptivas inducidas por el LNG a los 60, 120 y 240 minutos después de la administración de esta PS, habiendo una mayor diferencia significativa en los resultados mostrados por el grupo que recibió la administración del RU486.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA LORDOSIS INDUCIDA POR EL ACETATO DE MEGESTROL (AMG).



La gráfica 7 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de AMG junto con la administración de Tamoxifen o RU486 sobre el cociente de lordosis en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS mostrando los siguientes valores de probabilidad  $**p<0.01$  y  $*p<0.05$  vs el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS. En los resultados podemos observar que los antagonistas del RP y el RE redujeron de manera significativa el CL inducido por el AMG a los 120 y 240 minutos después de que se administrara dicha PS.

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS CONDUCTAS PROCEPTIVAS INDUCIDAS POR EL ACETATO DE MEGESTROL (AMG).

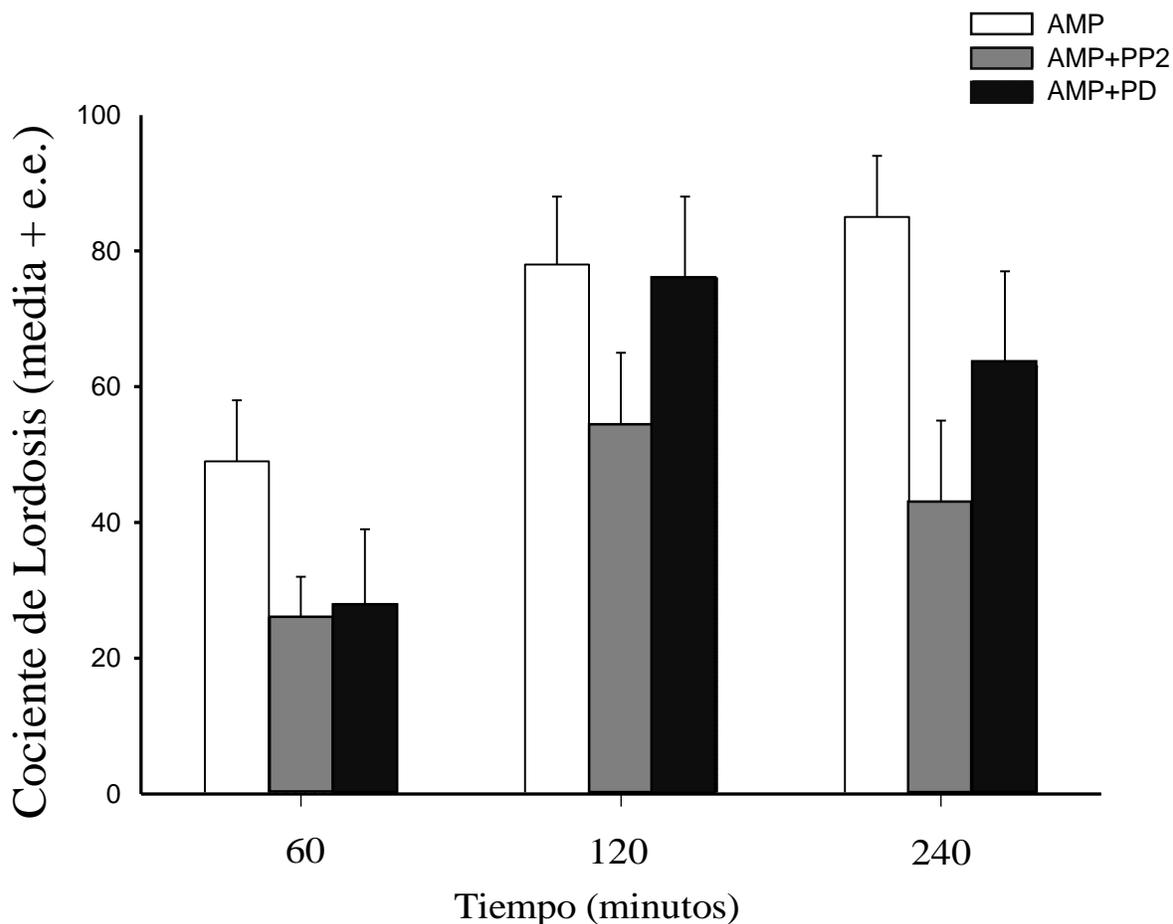


La gráfica 8 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de AMG junto con la administración de Tamoxifen o RU486 sobre el % de hembras proceptivas en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS mostrando los siguientes valores de probabilidad  $**p < 0.01$  y  $*p < 0.05$  vs el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS. Podemos observar en los resultados, que los antagonistas del RP y RE redujeron de manera significativa las conductas proceptivas a los 120 y 240 minutos después de la administración del AMG.

### **7.3 EXPERIMENTO III. PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA Src Y LA MAPK SOBRE LA CONDUCTA DE ESTRO INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBRAL DE PROGESTINAS SINTÉTICAS EN RATAS ESTROGENIZADAS.**

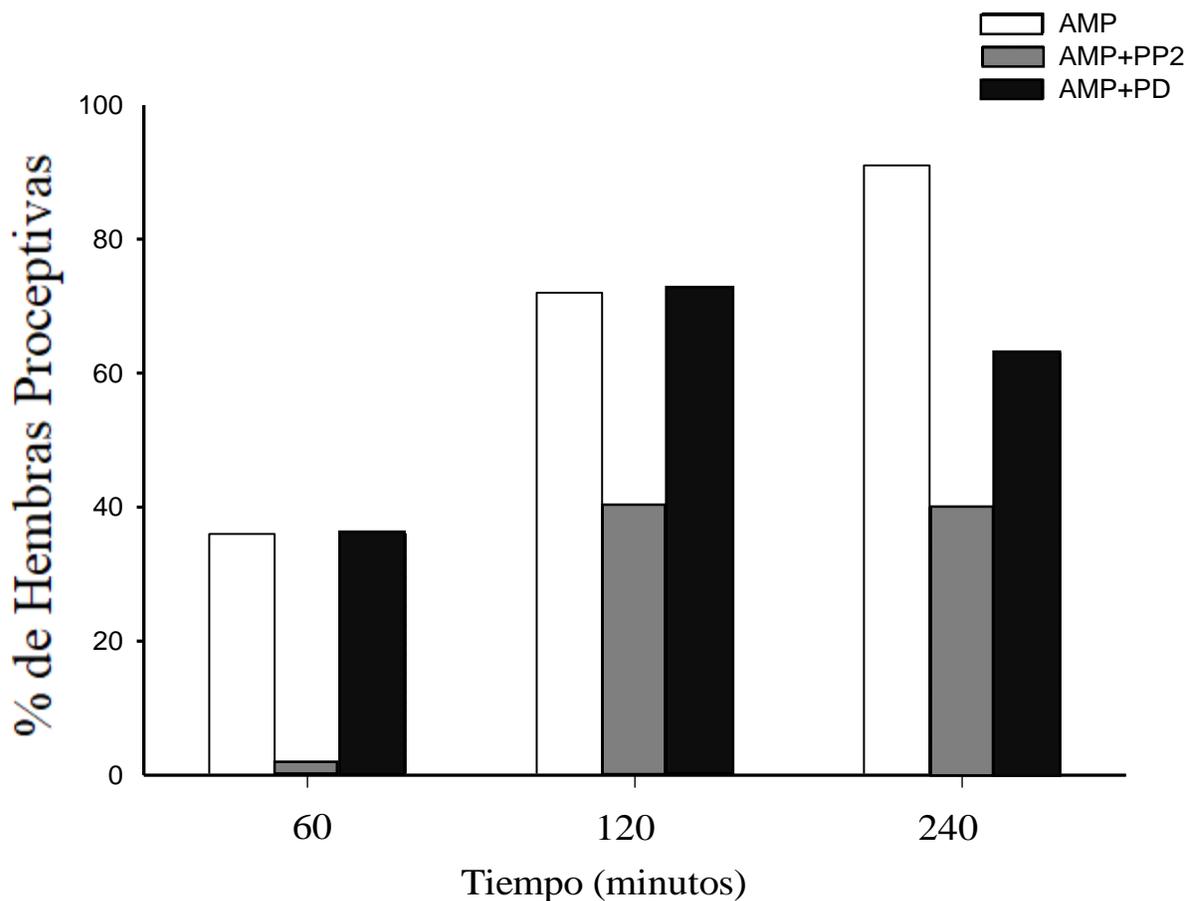
Los resultados del experimento 3 que se pueden observar en las siguientes graficas muestran el efecto del PP2 y el PD98059, inhibidores de la vía de la cinasa Src y la vía de la MAPK respectivamente sobre el CL y la expresión de las conductas proceptivas inducidas por la administración de una dosis de 1300ng de AMP, LNG y AMG. Todos los resultados obtenidos muestran que el CL y las conductas proceptivas inducidas por las PS no se redujeron de manera significativa con la administración del PD98059 y el PP2.

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA Src Y LA MAPK SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA LORDOSIS INDUCIDA POR EL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (AMP).



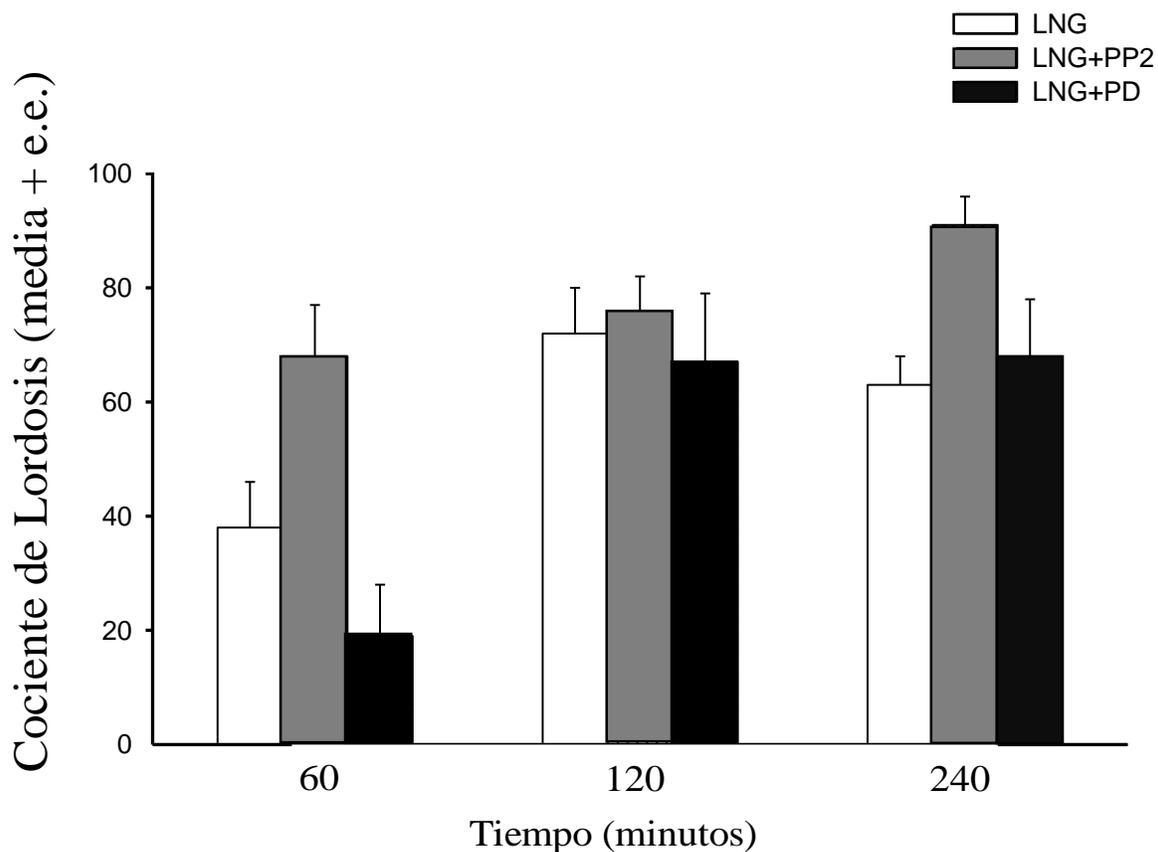
La gráfica 9 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de AMP junto con la administración de PP2 o PD98059 sobre el cociente de lordosis en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS, estos no muestran diferencias significativas al ser comparados con el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS.

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA Src Y LA MAPK SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS CONDUCTAS PROCEPTIVAS INDUCIDAS POR EL ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA (AMP).



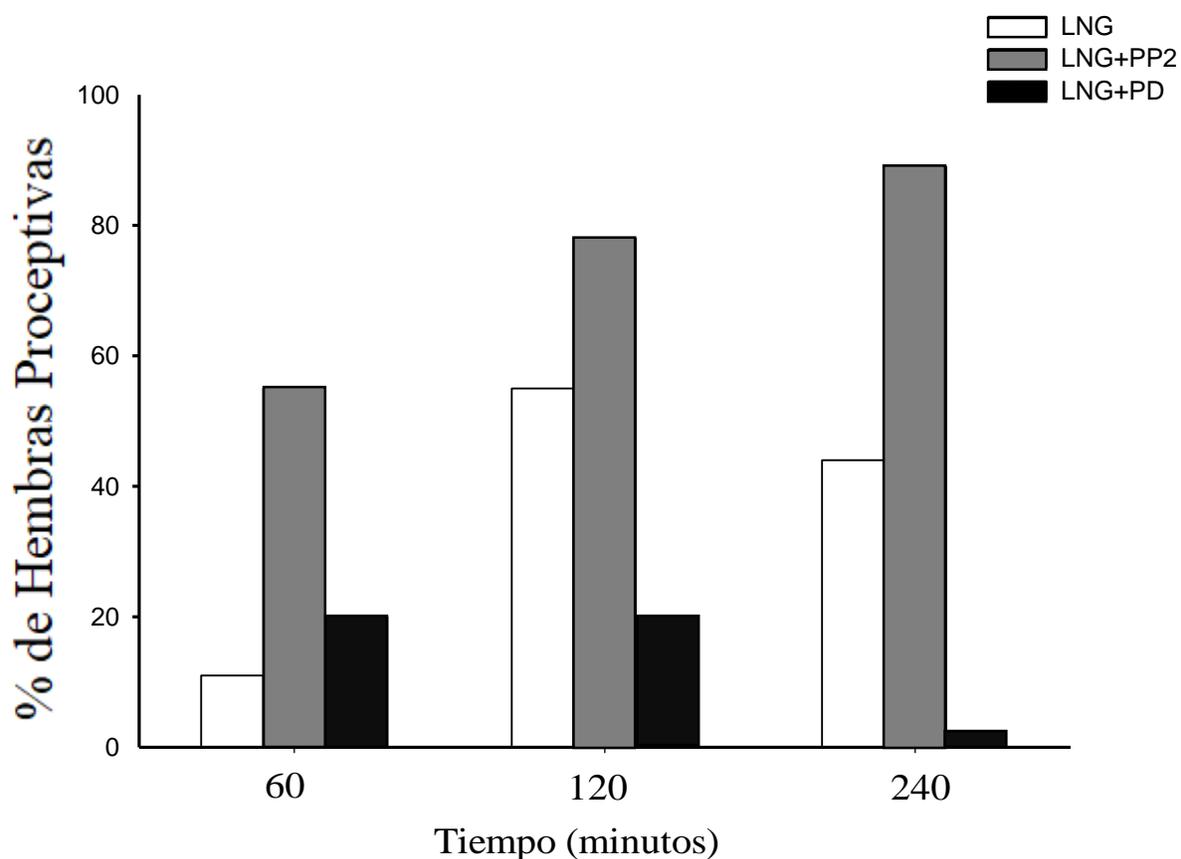
La gráfica 10 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de AMP junto con la administración de PP2 o PD98059 sobre el % de hembras proceptivas en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS, estos no muestran diferencias significativas con el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS.

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA Src Y LA MAPK SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA LORDOSIS INDUCIDA POR EL LEVONORGESTREL (LNG).



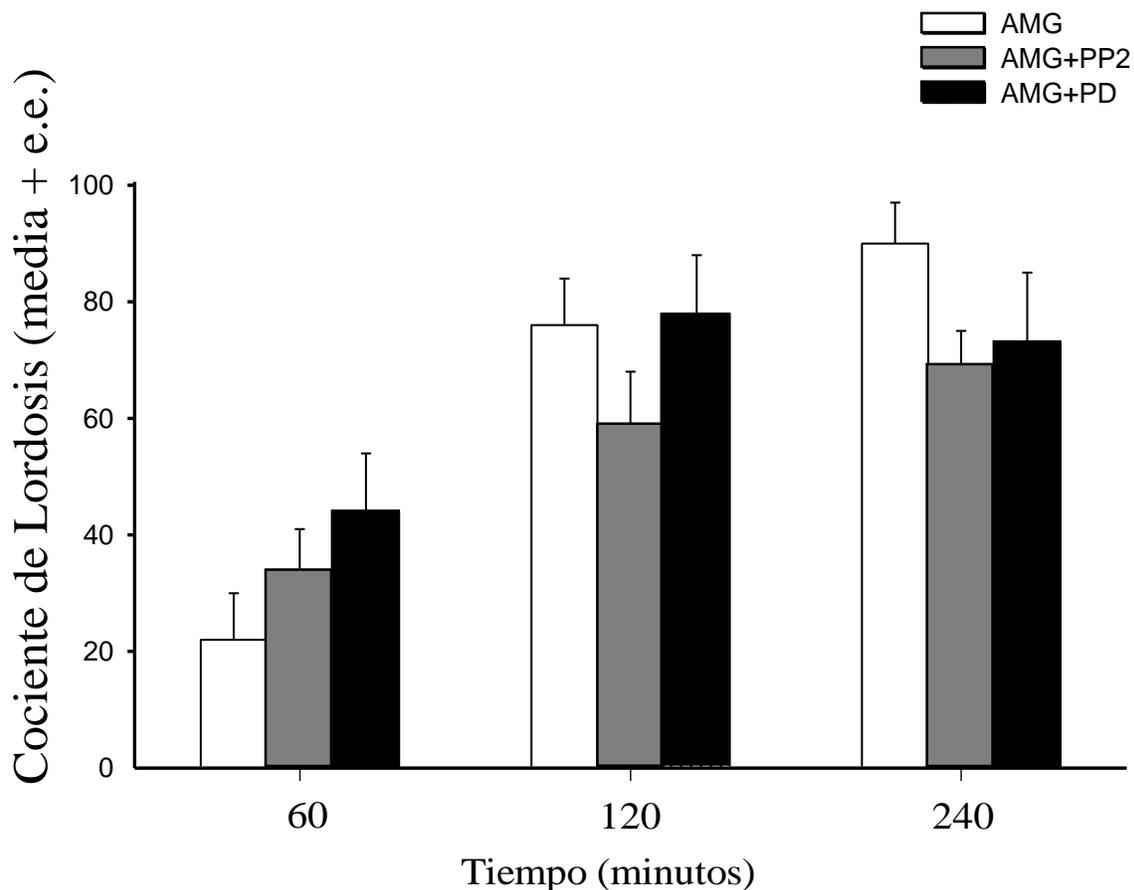
La gráfica 11 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de LNG junto con la administración de PP2 o PD98059 sobre el cociente de lordosis en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS, estos no muestran diferencias significativas al ser comparados con el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS.

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA Src Y LA MAPK SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS CONDUCTAS PROCEPTIVAS INDUCIDAS POR EL LEVONORGESTREL (LNG).



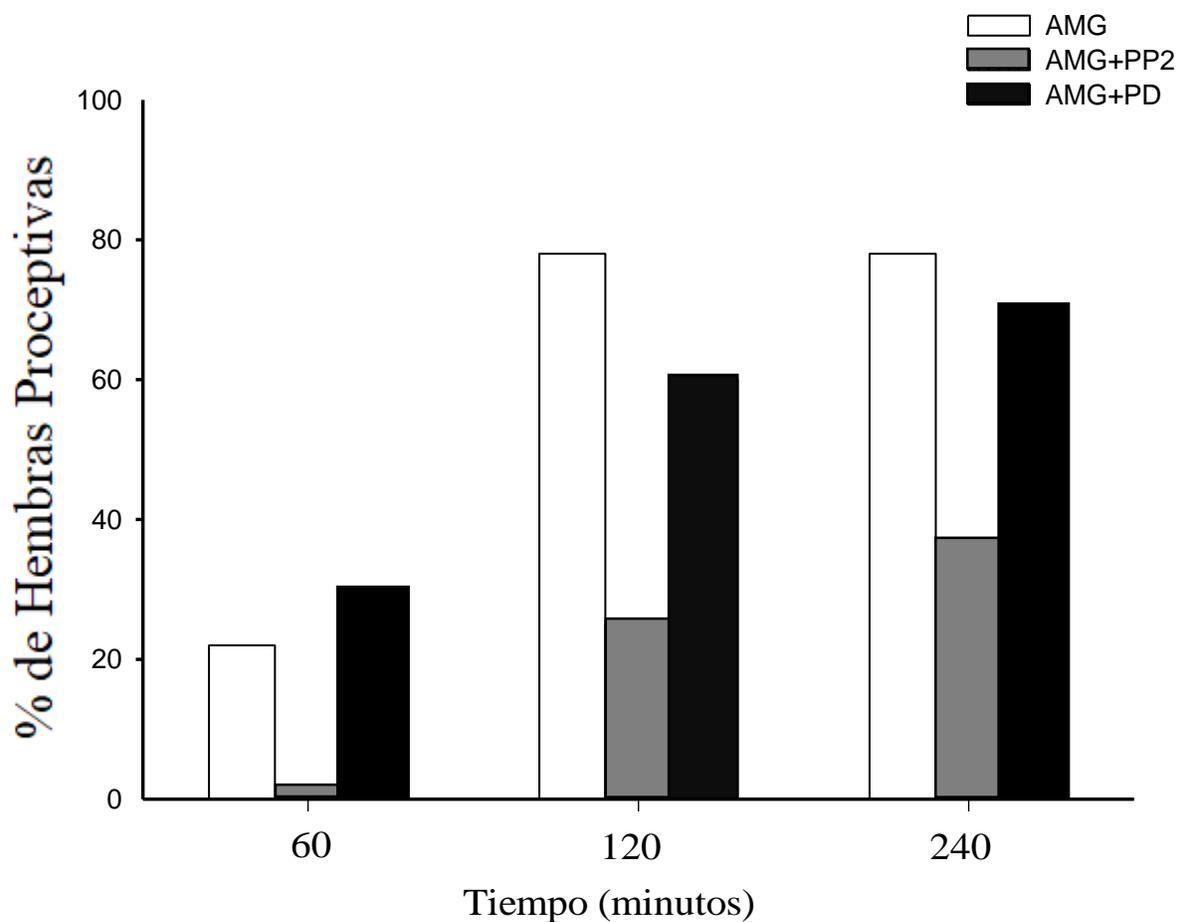
La gráfica 12 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de LNG junto con la administración de PP2 o PD98059 sobre el % de hembras proceptivas en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS, estos no muestran diferencias significativas con el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS.

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA Src Y LA MAPK SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA LORDOSIS INDUCIDA POR EL ACETATO DE MEGESTROL (AMG).



La gráfica 13 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de AMG junto con la administración de PP2 o PD98059 sobre el cociente de lordosis en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS, estos no muestran diferencias significativas al ser comparados con el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS.

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA Src Y LA MAPK SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS CONDUCTAS PROCEPTIVAS INDUCIDAS POR EL ACETATO DE MEGESTROL (AMG).



La gráfica 14 muestra los resultados obtenidos por la administración de 1300ng de AMG junto con la administración de PP2 o PD98059 sobre el % de hembras proceptivas en la rata OVX pretratada con estrógenos a los 60, 120 y 240 minutos después de recibir la administración de la PS, estos no muestran diferencias significativas con el grupo control que solamente recibió la dosis de la PS.

## 8. DISCUSIÓN

En los resultados obtenidos de nuestros experimentos podemos observar que las tres PS (AMG, AMP y LNG) son capaces de inducir CE, siendo el LNG la PS más potente para inducirla, ya que, desde la tercera dosis experimental probada, esta PS es capaz de inducir su máximo efecto lordogénico. En el modelo clásico de inducción de la CE se ha planteado un control genómico en el cual es activado el RP al unirse a él su ligando natural, el cual es la P, en nuestro trabajo al utilizar diferentes PS, cada una con características estructurales propias, fue de gran importancia el utilizar diversas herramientas farmacológicas para poder esclarecer las vías de acción que poseen estas PS.

Además de la P natural producida y secretada normalmente en las hembras de mamíferos por el cuerpo lúteo, la placenta y en pequeñas cantidades por la corteza adrenal, existe un amplio espectro de esteroides, los cuales presentan acciones similares a la P, dichos esteroides son conocidos como progestinas. Básicamente todas las progestinas tanto naturales como sintéticas tienen un efecto en común, este es el efecto progestogénico, que ejercen sobre células previamente expuestas a estrógenos, a pesar de que la mayoría de las progestinas presentan la capacidad de inducir este efecto, existen grandes diferencias entre la gran variedad de progestinas, ya que cada una puede inducir efectos biológicos propios y exclusivos.

Durante muchos años, una gran cantidad de esteroides han sido sintetizados de manera artificial, generando PS que poseen mayor actividad progestacional que la propia P y de los cuales, solo un número relativamente pequeño, tienen valor terapéutico y aplicación clínica (Thijssen 1972).

Algunas de estas PS son consideradas como prodrogas, las cuales necesitan ser metabolizadas para así formar un compuesto que sea considerado activo, siendo este el que podrá ejercer los efectos biológicos propios de dicha PS (Schindler y cols. 2003).

Algunas de las PS son moléculas derivadas de la  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona como el “AMP y AMG”, y otras derivan de la 19, nortestosterona como el “LNG” (Schindler y cols. 2003). Se ha demostrado que PS como el AMG y AMP son fuertes competidores de esteroides, pues se unen

a los receptores de andrógenos, glucocorticoides y de P, debido a la gran afinidad que estas presentan por dichos receptores (Teulings y cols. 1980, Simoncini y cols. 2004).

Debido a sus efectos el AMP ha sido usado comúnmente en TRH y como un anticonceptivo de igual manera que el LNG, PS que ha sido utilizada más comúnmente con este fin, sin embargo, se conoce poco acerca de los efectos que este esteroide puede ejercer sobre el SNC al igual que sucede con un gran número de otras PS (Tirelli y cols. 2008, Pazol y cols. 2004).

El hecho de que un esteroide pueda ejercer sus acciones va a depender de la condición en que este interactúe con dicho receptor, existe una correlación importante entre la estructura molecular de las hormonas y la fuerza de unión que estas ejerzan con su receptor, dando como resultado una diferente magnitud de respuesta generada por la formación del complejo “activo” hormona-receptor (Raynaud y cols. 1982).

Debido a la variedad de estructuras moleculares que presentan las PS y a los efectos biológicos que ejercerán dichas progestinas a nivel celular debido a la gran variedad de receptores intracelulares presentes en las células blanco (Schindler y cols. 2003), cada una presentará efectos específicos y particulares que darán como resultado un efecto clínico único y específico (Simoncini y cols. 2004).

Las modificaciones de las PS que se utilizaron en el presente trabajo les permite tener una unión más fuerte y estable con el RP que la unión que presenta la propia P por dicho receptor (Raynaud y cols. 1982), así en un trabajo realizado en colaboración con Kubli-Garfias (2013) se reportó que la PS con mayor afinidad relativa por el RP es el LNG, seguido del AMP y el AMG, cabe mencionar que la afinidad relativa presentada por estas PS es mayor que la afinidad relativa que presenta la P por su propio receptor, por lo que el LNG es considerado como un agonista total del RP, teniendo una mayor unión hacia el RP y una alta potencia farmacológica, mientras que en el caso de las PS acetiladas como el AMG y el AMP, presentan un agonismo parcial que puede ser correlacionado con una unión más débil hacia el RP.

Al englobar la acción de las PS como el AMG y el AMP se puede observar que estas muestran una gran afinidad por los receptores a esteroides, por ejemplo, se ha demostrado que el AMG

y AMP presentan afinidad por receptores de andrógenos, glucocorticoides y de P como ya se ha mencionado, indicando que estas PS son capaces de unirse a estos receptores con alta afinidad, sin embargo estas no compiten con el estradiol por su receptor (Teulings y cols. 1980), mientras por el contrario cuando se habla de las características del LNG, si se puede observar cierta afinidad por el receptor de estrógenos (García-Becerra y cols. 2002).

En los trabajos donde se ha estudiado la acción de los esteroides en la reproducción se ha reportado a la P como la principal hormona inductora de la CSF, mediante la activación de los RP hipotalámicos (Pazol y cols. 2004), en el caso de las PS, las cuales presentan una mayor afinidad por el RP que la P, de igual manera ejercen sus efectos progestomiméticos al interactuar con dicho receptor. Se ha reportado que PS como el R5020 y el AMG son potentes agentes lordogénicos (González-Flores y cols. 1998), y se ha planteado que el efecto de las PS como el R5020 induce la expresión de la CSF a través de la activación del RP nuclear y no mediante un efecto generado en la membrana (Beyer y cols. 2003), ya que la expresión génica inducida por esta PS es reducida por la administración del ZK98299 y el RU486 los cuales bloquean la activación del RP (Beck y cols. 1993).

Ahora bien nuestro grupo de investigación ha reportado que el AMG es más potente que la P para estimular la expresión de la lordosis, así mismo muestra una gran eficacia para inducir respuesta tanto en la expresión de la lordosis como en las conductas proceptivas (González-Flores y cols. 1998), de igual manera se ha reportado que PS como el AMG, AMP y el LNG inducen respuesta de lordosis en diferente intensidad, ya que el AMP y el AMG actúan como agonistas parciales, induciendo la CSF en ratas estrogenizadas con una potencia similar a la P, mientras que el LNG actúa como un agonista total teniendo la capacidad de incrementar de manera significativa la CSF en comparación con la P (Kubli-Garfias y cols. 2013).

En experimentos realizados *in vivo*, se ha reportado que mediante la hidrólisis las PS pueden ser desacetiladas, dando como resultado la formación de compuestos libres. Además, la desacetilación ocurre en diferentes proporciones para cada compuesto, en el caso del AMP es desacetilado entre 30 y 70% (Ishihara y cols. 1975), mientras que el AMG, que es una progestina

muy resistente al metabolismo, puede llegar a ser desacetilado hasta en un 54% en la glándula adrenal de la rata (Cooke y Vallance 1968).

Todos estos factores sugieren que la cantidad de progestinas libres es bajo, sin embargo, el efecto de la suma de los esteroides acetilados y libres podrían sinergizar para ejercer sus efectos fisiológicos. El significado biológico de este evento puede ser relevante para que se lleve a cabo la unión de la progestina con el RP, generándose tanto uniones débiles como fuertes y así, provocando la activación del RP y a su vez al mecanismo genómico considerado como clásico (Kubli-Garfias y cols. 2013).

Experimentos realizados *in vitro* han mostrado que PS como el R5020 o el AMP son capaces de unirse con gran afinidad al RP-A y RP-B, y por ende activarlos eficientemente. Así el tratamiento con R5020 resulta en un incremento significativo en la actividad de la luciferasa, al igual que el tratamiento con AMP incrementa significativamente la actividad de dicha enzima en células cotransfectadas con el RPHA o el RPHB. Aunado a esto, el AMP induce una intensa activación celular, ya que incrementa la actividad promotora en células cotransfectadas con el RPHA Y RPHB de hasta 1.2 a 27 veces más que la misma P mediante su unión con el RP-A (Montecchia y cols. 1999).

Del mismo modo se ha reportado que la administración de diferentes progestinas como el AMP, P y 19 nor-progestinas; Org2058 y noretindrona, al unirse con el RP-A fueron más potentes que al unirse sobre el RP-B, y en específico se menciona que en células endometriales estromales el AMP es capaz de activar en una tasa más elevada al RP-A que al RP-B (Gao y cols. 2000).

En estudios realizados para explorar la diferenciación del endometrio en conejo, se pudo observar que la PS LNG tiene una mayor potencia que la P y que presenta valores similares al R5020 (Schoonen y cols. 1998). Critchley y cols. (1998) sugieren que como el LNG suprime fuertemente al RP-B, es probable que el RP-A sea la isoforma que media a largo plazo sus acciones en el endometrio.

En otros trabajos de igual modo se reporta que el LNG presenta mayor afinidad por el RP-A, esto en un modelo de células cancerígenas (Schoonen y cols. 1998) y que cuando este es

metabolizado a compuestos reducidos en el anillo A como el  $3\beta,5\alpha$ -LNG también puede activar al RE $\alpha$  (García-Becerra y cols. 2002). Mientras que en estudios comparativos de afinidad del LNG por las dos isomorfias, el RP-A y el RP-B en células de ovario de hámster, se observó una mayor afinidad del LNG por el RP-A.

A diferencia de otros receptores, los de las hormonas esteroideas activan a vías específicas de señalización dependiendo de la conformación inducida por sus diferentes ligandos y a pesar de que frecuentemente se asume que los análogos de las progestinas tienen efectos clínicos similares, no todos ellos ejercen un efecto agonista sobre el cerebro como los harían en algún otro tejido que exprese al clásico RP (Jodhka y cols. 2009), algunas progestinas son capaces de interactuar con otros receptores de esteroides y pueden activar vías de señalización diferentes, se ha propuesto que las progestinas además de unirse al RP, se pueden unir a receptores membranales teniendo algunos efectos sobre el SNC (Schindler y cols. 2003). Como ya se ha mencionado, las hormonas esteroides además de unirse a su propio receptor, tienen la capacidad de unirse con otros receptores a esteroides, por lo que se puede esperar que cada progestina ejerza un efecto clínico único. Debido a las diferentes acciones inducidas por las progestinas naturales como sintéticas es necesario tratar de comprender la forma en que dichas progestinas pueden estar activando diferentes vías de señalización (Simoncini y cols. 2004).

Se ha sugerido que la transactivación, la dimerización, la fosforilación y la interacción de los receptores de esteroides con el ADN, además de la intervención de factores de transcripción juegan un rol importante en la determinación de la potencia final de un compuesto como pudieran ser las PS. Sin embargo, en los estudios de unión solo se le ha dado importancia a la interacción con el sitio de unión a la hormona (Schoonen y cols. 1998). La diferente farmacocinética de progestinas naturales o sintéticas y sus diversas afinidades por el RP puede llevar al reclutamiento de vías de señalización parcialmente divergentes, debido a la modulación diferencial del receptor, por lo cual es de gran importancia el inicio de estudios que se enfoquen en el efecto de dichas hormonas en los diferentes sistemas biológicos.

Lo antes mencionado indica que los efectos biológicos inducidos por las PS a nivel celular son mediados por los receptores intracelulares de esteroides, pero también se puede esperar que

algunos efectos de las progestinas naturales y sintéticas sobre el SNC sean mediados por receptores membranales, incrementando así la complejidad de este fenómeno. Además de esto, las progestinas naturales o sintéticas pueden tener diferentes efectos celulares al unirse al RP, debido a su distinta farmacocinética, así como sus diferentes afinidades por el RP en donde pueden generar la activación parcial de diferentes vías de señalización en las células blanco, debido a una modulación diferencial del RP.

En los resultados de nuestros experimentos encontramos que tanto el AMP, el AMG y el LNG son capaces de inducir CE y que estas progestinas inducen esta conducta mediante la activación del RP, ya que al administrar el RU486, un antagonista del RP se redujo significativamente la expresión de la CE inducida por estas PS.

Estos resultados concuerdan con trabajos en los cuales se ha reportado que estas PS tienen una gran afinidad por el RP y que, mediante la activación de este, se ejercen sus efectos farmacológicos. En el caso del AMP se ha reportado que tiene una afinidad tres veces mayor por el RP que la afinidad presentada por la P, además de que esta PS es farmacológicamente más potente que la P (Simoncini y cols. 2004). En el perro como modelo animal se ha reportado que el AMP tiene una alta afinidad por el RP, la cual es 10 veces mayor que la afinidad que tiene la P (Selman y cols. 1996), y se menciona al AMP como un potente agonista del RP (Pazol y cols. 2004). En otro modelo se reporta que el AMP incrementa la producción y secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en células estromales, y que dicho efecto está dado a través de la activación del RP ya que cuando es administrado el RU486 se revierte su efecto (Makrigiannakis y cols. 1999).

En el caso del AMG lo observado en nuestros experimentos concuerdan con lo reportado en otros estudios, en los cuales se muestra a esta PS como fuerte competidor del R5020, el cual es una PS con una gran afinidad por el RP, indicando que el AMG es una PS con una muy fuerte afinidad por dicho receptor (Teulings y cols. 1980), de igual manera mediante los experimentos realizados en este trabajo podemos evidenciar que el LNG se une al RP para inducir la CE, ya que su efecto lordogénico fue bloqueado por el RU486, los datos obtenidos concuerdan con los trabajos antes mencionados, en los que se ha reportado la capacidad de esta PS de actuar y

ejercer sus acciones farmacológicas mediante la activación del RP y principalmente mediante su unión con la isoforma A de este receptor (Schoonen y cols. 1998). Además de que esta progestina se ha considerado como un agente fuertemente lordogénico, ya que en estudios realizados por el grupo de Kubli-Garfias en el 2013 se observó que estas tres PS inducen la expresión de la CE y en particular para el caso del LNG se reporta su capacidad de inducir un gran incremento en la CE en comparación con la P.

Si bien en nuestros resultados podemos mostrar que estas PS son capaces de interactuar con el RP y activarlo, se ha reportado en algunos estudios que, en ciertos sistemas neuroquímicos, el AMP tiene propiedades antagónicas que difieren de aquellas que son de la P endógena (Pazol y cols. 2004). Sin embargo, en un gran número de estudios se han reportado resultados que concuerdan con lo hallado en nuestro trabajo de investigación, en algunos estudios in vitro se ha reportado que progestinas como el AMP son capaces de activar al RP-A y al RP-B, lo que demuestra la gran afinidad que estas PS presentan por dicho receptor (Gao y cols. 2000). De igual manera estudios previos han mostrado que las progestinas pueden incrementar los niveles del RNAm y la tasa de transcripción de genes blanco, haciendo mención principalmente en que el AMP activa la transcripción génica mediante su unión con el RP-A en una tasa significativamente más elevada que con el RP-B. Al administrar el AMP, P y 19 nor-progestinas; Org2058 y norethindrona se observó en todos los casos que el RP-A fue la isoforma con mayor interacción y activación por estas PS en comparación con la isoforma B (Gao y cols., 2000), en el caso del LNG se reporta que de igual manera esta PS presenta una mayor afinidad por el RP-A (Schoonen y cols. 1998).

Los datos reportados por diversos grupos de investigación en los estudios antes mencionados a pesar de haber sido realizados en diferentes modelos de estudio, coinciden con nuestros resultados, en los cuales podemos observar que las PS inducen una activación ligando dependiente del RP, reflejando en nuestro modelo de estudio como resultado la expresión de la CE.

Al explorar la participación del RE en la inducción de la expresión de la CE por acción de estas PS pudimos hallar que el AMP y el AMG son capaces de interactuar y activar al RE durante la

expresión de la CE ya que al administrar el Tamoxifen, un antagonista del RE, la CE inducida por estas dos PS se vio reducida de manera significativa, por otra parte, contradictorio a nuestros hallazgos se ha reportado que estas progestinas no tienen la habilidad de competir con el estradiol por la unión con el RE (Teulings y cols. 1980). García-Becerra y colaboradores en el 2002 reportaron que los metabolitos reducidos del LNG como el  $3\beta,5\alpha$ -LNG eran capaces de activar al RE, contrariamente a lo reportado en dicho trabajo, nosotros hayamos que durante la inducción de la expresión de la CE facilitada por el LNG el RE no tiene participación alguna, ya que al administrar el Tamoxifen, este no causo ningún efecto inhibitorio sobre la CE inducida por el LNG.

Se ha reportado que la activación ligando dependiente del RP media la mayoría de los efectos progestacionales en los sistemas biológicos, ahora, también se conoce que la P puede inducir efectos mediante una vía no genómica, lo cual indica que la progesterona puede estar ejerciendo efectos membranales o a nivel citosólico mediante su interacción con diferentes receptores o proteínas y que cada una de estas posibles vías de señalización intracelular son capaces de tener una activación transcripcional en específico, debido a las diferentes capacidades para reclutar una diversa variedad de factores transcripcionales (Gao y cols. 2000).

Ahora se plantea que la interacción de las hormonas esteroideas con sus receptores nucleares o citosólicos dispara un efecto genómico, induciendo el crecimiento celular del endotelio y que los efectos de las hormonas esteroideas sexuales sobre el crecimiento celular endotelial parecen ser mediados por la actividad de la MAPK (Orshal y Khalil. 2004), lo cual deja a esta cinasa como una de las principales vías de señalización intracelular mediante las cuales pueden ejercer sus efectos las hormonas esteroideas.

Al explorar la participación y activación de la MAPK mediante la administración del inhibidor de esta vía de señalización el PD98059 pudimos encontrar que ninguna de las PS estudiadas en este trabajo son capaces de activar esta vía de señalización, descartando así la participación de dicha vía de señalización en el control de la CE inducida por estas PS.

Los hallazgos de nuestro trabajo concuerdan con lo publicado por Simoncini y colaboradores en 2004, donde se reporta que en neuronas del hipocampo, el AMP es incapaz de activar a una

de las proteínas de la cascada de la MAPK, la ERK, e inducir su translocación al núcleo mediada por hormonas esteroideas como el E2, en este mismo trabajo reporta que la P puede activar a la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) e inducir la síntesis de ON mediante la activación de la MAPK y a pesar de que se considera al AMP como un agonista de esta hormona no presenta los mismos efectos que ella, puesto que no tuvo ningún efecto estimulador o inhibitorio sobre los niveles de ON o la eNOS, ya que al administrar el PD98059 en grupos experimentales no se observó diferencia significativa alguna.

Un mecanismo involucrado en los efectos proteicos de la P es su habilidad para inducir la fosforilación de la ERK y se ha reportado que el efecto neuroprotector de la P en el hipocampo es a través de la vía de la MAPK/ERK, interesantemente se hace mención que el AMP a pesar de su inhabilidad para ejercer efectos neuroprotectivos, este también puede inducir la fosforilación de la ERK (Jodhka y cols. 2009). En otro estudio se muestra que en neuronas hipocampales, tanto la P y el AMP activan las vías de señalización de la MAPK/ERK, donde se observa a la P como un rápido activador de la ERK nuclear, mientras que el AMP activa a la ERK que permanece en el citoplasma sin una señal nuclear (Nilsen y Brinton 2003). L'Hermite y colaboradores en 2008, concluyen que los datos presentados en sus trabajos proveen evidencia de una regulación diferencial de la función vascular por P y AMP, y que estas PS no son equivalentes en términos de señalización molecular en tejido vascular humano, y que activan diferentes eventos de señalización en modelos *in vitro*. En base a lo reportado y a nuestros resultados se puede sugerir que existe una diferente activación de la MAPK inducida por las diferentes hormonas esteroideas tanto naturales como sintéticas, y que la estructura molecular propia y específica de la P es la que le confiere la capacidad de poder inducir la activación completa de esta vía.

En nuestros resultados hayamos que las PS estudiadas, no son capaces de activar a la Src durante la inducción de la CE, ya que al realizar la administración del PP2, inhibidor de esta proteína cinasa, no se redujo la CE inducida por estas tres progestinas. Lo antes mencionado difiere con trabajos previos realizados por González-Flores y colaboradores en el 2010, donde se reporta que tanto la P como algunos de sus metabolitos reducidos en el anillo A son capaces de activar a dicha proteína.

En nuestros resultados podemos observar que el AMP puede activar al RP, coincidiendo con lo reportado en un modelo experimental diferente, donde se ha demostrado que el AMP tiene la capacidad de inducir la proliferación de células cancerosas de ceno humano mediante su interacción con el RP y la interacción de este con la tirosina cinasa c-*Src* (Fu y cols. 2008, Cutini y cols. 2014).

El hecho de encontrar que solo ciertos progestágenos puedan inducir la activación de la *Src*, se puede basar en que la conformación del RP resultado de la activación de este por distintas progestinas induce en la estructura del RP diferentes conformaciones selectas que pueden activar o no a la cascada de la *Src* (Simoncini y cols. 2004).

A pesar de que se asume que las PS tienen similares efectos clínicos, estas presentan características particulares al unirse con el RP, lo que da como resultado que induzcan efectos celulares particulares. De este modo podemos entender que los receptores de hormonas esteroides reclutan vías de señalización específicas, dependiendo de la conformación inducida por la unión con su ligando.

La explicación tentativa de las diferencias farmacológicas, biológicas y de señalización celular presentadas, se puede hipotetizar en que la distinta farmacocinética de los progestágenos naturales o sintéticos, así como las diferentes afinidades por el RP, puede llevar a reclutar vías de señalización divergentes en las células blanco, debido a la modulación diferencial del RP. Además de esto un nivel adicional de complejidad es añadido por el hecho de que algunas progestinas son capaces de interactuar con diferentes receptores de esteroides y pueden por lo tanto activar vías de señalización no dependientes del RP. Los receptores de hormonas esteroides reclutan vías de señalización específicas, dependiendo de la conformación inducida por el ligando y dicho concepto se extiende de igual manera al RP. Debido a la variedad de acciones que pudieran ejercer las progestinas, cada una de ellas tiene efectos específicos, así como la capacidad de interferir con otras vías de señalización de hormonas esteroides, por lo cual el resultando es un efecto clínico particular único. Debido a todas las particularidades que presentan las progestinas, tanto su capacidad activacional como su efecto de bloqueo de algunas vías de señalización es que se ha establecido la búsqueda devota para entender la base de las

diferentes señales y efectos biológicos de la gran gama de progestinas existentes (Simoncini y cols. 2004).

La interacción que puedan presentar las diversas PS con el RP es de gran importancia, ya que este receptor tiene funciones regulatorias sobre la proliferación de varios tejidos, su activación puede desencadenar tanto efectos genómicos como activar diferentes vías de señalización intracelular, siendo así que una inadecuada activación de este puede ocasionar diversas patologías, sugiriendo que la vía del RP puede ser un factor importante en la proliferación celular de tumores que son progestino-dependientes y progestino-independientes (Montecchia y cols. 1999), del mismo modo se ha reportado que PS como el AMP tienen efectos secundarios como la inducción de carcinoma mamario (Lanari y Molinolo 2002), por lo que son de gran importancia estudios como este para poder adicionar a la literatura la amplia gama de efectos que pudieran ocasionar como consecuencia la gran variedad de PS empleadas en la TRH en humanos.

## **9. CONCLUSIONES**

La administración intracerebral de acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol en una dosis de 1300ng, y la administración de levonorgestrel en una dosis de 130ng indujeron la mayor expresión de la conducta de estro en ratas estrogenizadas.

El acetato de medroxiprogesterona, el acetato de megestrol y el levonorgestrel inducen conducta de estro mediante la activación del receptor de progesterona.

La conducta de estro inducida por el acetato de medroxiprogesterona y el acetato megestrol, involucra la activación del receptor de estrógenos, pero no la conducta de estro inducida por el levonorgestrel.

La conducta de estro inducida por el acetato de medroxiprogesterona, el acetato de megestrol y el levonorgestrel no involucra la participación de la vía de señalización de la Src y la MAPK.

## **10. PERSPECTIVAS**

El uso de las progestinas sintéticas en terapias de remplazo hormonal se inició desde la mitad del siglo pasado de un modo muy constante, principalmente en mujeres, sin embargo, a pesar de conocer los efectos principales de dichas hormonas, no se conocía todas las vías de acción que estas utilizan para ejercer dichos efectos y mucho menos los efectos secundarios que a largo plazo podrían provocar en los usuarios de estas. El trabajo de investigación realizado en esta tesis nos permite ampliar la perspectiva de los efectos farmacológicos de las progestinas sintéticas y conocer algunos de los mecanismos celulares y las vías de señalización intracelulares mediante los cuales estos compuestos ejercen sus efectos biológicos, por lo que es de gran importancia se continúe su estudio mediante el uso de diferentes herramientas, tanto farmacológicas como histológicas y conductuales para poder conocer los mecanismos moleculares mediante los cuales ejercen sus acciones dichas hormonas, y estudiar la manera de controlar o erradicar los efectos patológicos ligados al uso de estos fármacos. De modo particular creo que es de gran importancia el estudio de la activación de los receptores de progesterona de manera ligando dependiente e independiente por las progestinas sintéticas en tejidos como glándula mamaria y útero, los cuales se conoce son los tejidos principalmente afectados durante el uso de estas hormonas en los diferentes tipos de terapias de remplazo hormonal.

## 11. REFERENCIAS

1. Adler NT, Davis PG y Komisaruk BR. 1977. Variation in the size and sensitivity of a genital sensory field in relation to the estrous cycle in rats. *Hormones and Behavior* 9: 334-344.
2. Ballaré C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A y Beato M. 2003. Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 23: 1994-2008.
3. Beach FA. 1942. Male and female mating behavior in prepuberally castrated female rats treated with androgens. *Endocrinology* 31: 673-678.
4. Beach FA. 1976. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in female mammals. *Hormones and Behavior* 2: 105-138.
5. Beach FA, Etkin W y Rasquin P. 1942. Importance of Progesterone to Induction of Sexual Receptivity in Spayed Female Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 51: 369-371.
6. Beato M, Chavez y Truss M. 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61: 240-251.
7. Beck CA, Weigel NL, Moyer ML, Nordeen SK y Edwards DP. 1993. The progesterone antagonist RU486 acquires agonist activity upon stimulation of cAMP signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 4441-4445.
8. Beyer C, González-Flores O y González-Mariscal G. 1995. Ring A reduced progestins potently stimulate estrous behavior in rats: paradoxical effect through the progesterone receptor. *Physiology and Behavior* 58: 985-993.
9. Beyer C y González-Mariscal G. 1991. Effects of progesterone and natural progestins in brain. *Reproduction, growth and development* 71: 199-208.
10. Beyer C, González-Mariscal G, Eguíbar JR y Gómora P. 1988. Lordosis facilitation in estrogen primed rats by intrabrain injection of pregnanes. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 31: 919-926.

11. Beyer C, Hoffman KL y González-Flores O. 2007. Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Hormones and behavior* 52: 2-11.
12. Beyer C, Morali G, Larsson K y Sodersten P. 1976. Steroid regulation of sexual behavior. *Journal of Steroid Biochemistry* 7: 1171-1176.
13. Beyer C, Pawlak J y Karolczak M. 2003. Membrane receptors for oestrogen in the brain. *Journal of neurochemistry* 87: 545-550.
14. Blaustein JD y Erskine MS. 2002. Feminine sexual behavior: cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent forebrain. In *Hormones, brain and behavior* 139-214.
15. Blaustein JD y Feder HH. 1979. Cytoplasmic progestin-receptors in guinea pig brain: characteristics and relationship to the induction of sexual behavior. *Brain research* 169: 481-497.
16. Boling JL y Blandau RJ. 1939. The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology* 25: 359-364.
17. Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL y Edwards DP. 2001. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Molecular cell* 8: 269-280.
18. Bradley PA, De Koning PD, Johnson PS, Lecouturier YC, McManus DJ, Robin A y Underwood TJ. 2009. Development of a practical synthesis of the progesterone receptor antagonist 4-[[3-cyclopropyl-1-(mesylmethyl)-5-methyl-1H-pyrazol-4-yl] oxy]-2, 6-dimethylbenzonitrile. *Organic Process Research & Development* 13: 848-853.
19. Brink EE, Modianos DT y Pfaff DW. 1980. Ablations of lumbar epaxial musculature: Effects on lordosis behavior of female rats. *Brain Behavior* 17: 67-88.
20. Brink EE y Pfaff DW. 1980. Vertebral muscles of the back and tail of the albino rat (*Rattus norvegicus albinus*). *Brain, Behavior and Evolution* 17: 1-47.
21. Butcher RL, Collins WE y Fugo NW. 1974. Plasma Concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 $\beta$  Throughout the 4-Day Estrous Cycle of the Rat. *Endocrinology* 94: 1704-1708.

22. Cabeza M, Vilchis F, Lemus AE, Diaz de Lebn L y Perez-Palacios G. 1995. Molecular interactions of Levonorgestrel and its Sa-reduced derivative with androgen receptors in hamster flanking organs. *Steroids* 60: 630-635.
23. Camacho-Arroyo I, Guerra-Araiza C y Cerbon MA. 1998. Progesterone receptor isoforms are differentially regulated by sex steroids in the rat forebrain. *Neuroreport* 9: 3993-3996.
24. Chandross RJ y Bordner J. 1975. Chlormadinone acetate (6-chloro-17-hydroxypregna-4, 6-diene-3, 20-dione acetate). *Acta Crystallographica Section B* 31: 928-931.
25. Conneely OM, Jericevic BM y Lydon JP. 2003. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 8: 205-214.
26. Conneely OM, Kettelberger DM, Tsai MJ, Schrader WT y O'Malley BW. 1989. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. *Journal of Biological Chemistry* 264: 14062-14064.
27. Cooke BA y Vallance DK. 1964. Metabolism of 17alpha-acetoxy-6alpha-methyl-pregna-4, 6-diene-3, 20-dione+ related progesterone analogues by liver preparations in vitro. In *biochemical journal* 90: 31-32.
28. Cooke BA y Vallance DK. 1965. Metabolism of megestrol acetate and related progesterone analogues by liver preparations in vitro. *Biochemical Journal* 97: 672-677.
29. Cooke BA y Vallance DK. 1968. Metabolism of megestrol acetate by rat adrenal glands in vitro. *Biochemical Journal* 109: 121-125.
30. Critchley H, Wang H, Kelly RW, Gebbie AE y Glasier AF. 1998. Progestin receptor isoforms and prostaglandin dehydrogenase in the endometrium of women using a levonorgestrel-releasing intrauterine system. *Human Reproduction* 13: 1210-1217.
31. Croxatto HB, Devoto L, Durand M, Ezcurra E, Larrea F, Nagle C, Ortiz ME, Vantman D, Vega M y Herten E. 2001. Mechanism of action of hormonal preparations used for emergency contraception: a review of the literature. *Contraception* 63: 111-121.
32. Cutini PH, Campelo AE y Massheimer VL. 2014. Differential regulation of endothelium behavior by progesterone and medroxyprogesterone acetate. *Journal of Endocrinology* 220: 179-193.

33. DeAngelis NJ, Doyne TH y Grob RL. 1975. The crystal and molecular structure of d-norgestrel, a progestational steroid. *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 31: 2040-2043.
34. Duax WL, Cody V, Griffin JF, Rohrer DC y Weeks CM. 1978. Molecular conformation and protein binding affinity of progestins. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 4: 205-227.
35. Duax WL, Cody V, Griffin J, Hazel J y Weeks CM. 1978. Steroid structure and function—II. Conformational transmission and receptor binding of medroxyprogesterone acetate. *Journal of steroid biochemistry* 9: 901-907.
36. Egger MD y Wall PD. 1971. The plantar cushion reflex circuit: an oligosynaptic cutaneous reflex. *Journal of Physiology* 216: 483-501.
37. Engberg I. 1964. Reflexes to foot muscles in the cat. *Acta Physiology* 235: 1-64.
38. Etgen AM. 1984. Progestin receptor and the activation of female reproductive behavior: a critical review. *Hormones and Behavior* 18: 411-430.
39. Evans HM y Long JA. 1921. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. *Physiology* 8: 38-39.
40. Everett JW. 1948. Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 43: 389-405.
41. Freeman ME. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *The physiology of reproduction* 613-658.
42. Fu XD, Giretti MS, Baldacci C, Garibaldi S, Flamini M, Sanchez AM y Simoncini T. 2008. Extra-nuclear signaling of progesterone receptor to breast cancer cell movement and invasion through the actin cytoskeleton. *PLoS One* 3: e2790.
43. Gao J, Mazella J, Tang M y Tseng L. 2000. Ligand-activated progesterone receptor isoform hPR-A is a stronger transactivator than hPR-B for the expression of IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein-1) in human endometrial stromal cells. *Molecular Endocrinology* 14: 1954-1961.
44. García-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Pérez- Palacios G y Larrea F. 2002. The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic

derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- $\alpha$ . *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 82: 333-341.

45. Goldman, JM, Murr AS y Cooper RL. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 80: 84-97.
46. González-Flores O, Beyer C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Lima-Hernández FJ, Soto-Sánchez A y Etgen AM. 2010. A role for Src kinase in progestin facilitation of estrous behavior in estradiol-primed female rats. *Hormones and Behavior* 58: 223-229.
47. González-Flores O, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Gómez-Camarillo MA, Lima-Hernández FJ, Beyer C y Etgen AM. 2009. Nitric oxide and ERK/MAPK mediation of estrous behavior induced by GnRH, PGE2 and db-cAMP in rats. *Physiology and Behavior* 96: 606-612.
48. González-Flores O y Hoffman KL. 2009. Modulation of female sexual behavior by the progesterone receptor in the rat and rabbit. *Advances in Selected Topics in Endocrinology* 93-111.
49. González-Flores O, Sánchez N, González-Mariscal G y Beyer C. 1998. Ring A reductions of progestins are not essential for estrous behavior facilitation in estrogen-primed rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 60: 223-227.
50. Graham JD y Clarke LC. 1997. Physiological Action of Progesterone in Target Tissues. *Endocrine Reviews* Printed by The Endocrine Society 18: 502-519.
51. Graham JD, Yeates C y Balleine RL. 1995. Characterization of Progesterone Receptor A and B Expression in Human Breast Cancer. *Cancer Research* 55: 5063-5068.
52. Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A y Camacho-Arroyo I. 2002. Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoform expression in the rat brain. *Brain Research Bulletin* 59: 105-109.
53. Guerra-Araiza C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Armengual-Villegas A, Miranda-Martínez A, Lima-Hernández FJ, Camacho-Arroyo I y González-Flores O. 2009. Role of progesterone receptor isoforms in female sexual behavior induced by progestins in rats. *Neuroendocrinology* 90: 73-81.
54. Guttinger A y Critchley H. 2007. Endometrial effects of intrauterine levonorgestrel. *Contraception* 75: 93-98.

55. Hardy DF y DeBold JF. 1972. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 78: 400-408.
56. Heape W. 1900. The "sexual season" of mammals and the relation of the "pro-oestrus" to menstruation. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 44: 1-70.
57. Hennessey AC, Camak L, Gordon F y Edwards DA. 1990. Connections between the pontine central gray and the ventromedial hypothalamus are essential for lordosis in female rats. *Behavioral neuroscience* 104: 477.
58. Ishihara M, Kirdani RY, Osawa Y y Sandberg AA. 1975. Progesterone metabolism in the baboon. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 5: 1213-1218.
59. Jensen EV, Suzuki T, Stumpf WE, Jungbut P y DeSombre ER. 1968. Two-step mechanism for the interaction of estradiol with that rat uterus. *Biochemistry* 59: 632-638.
60. Jericevic BM y Conneely OM. 2004. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128: 139-146.
61. Jodhka PK, Kaur P, Underwood W, Lydon JP y Singh M. 2009. The differences in neuroprotective efficacy of progesterone and medroxyprogesterone acetate correlate with their effects on brain-derived neurotrophic factor expression. *Endocrinology* 150: 3162-3168.
62. Kahmann S, Vaßen L y Klein-Hitpass L. 1998. Synergistic enhancement of PRB-mediated RU486 and R5020 agonist activities through cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate represents a delayed primary response. *Molecular Endocrinology* 12: 278-289.
63. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H y Chambon P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *The EMBO Journal* 9: 1603-1614.
64. Kincl FA. 1964. Copulatory reflex response to steroids. *Methods in Hormone Research* 3: 477-484.

65. Komisaruk BR y Diakow C. 1973. Lordosis reflex intensity in rats in relation to the estrous cycle, ovariectomy, estrogen administration and mating behavior. *Endocrinology* 93: 548-557.
66. Kow LM, Montgomery MO y Pfaff DW. 1977. Effects of spinal cord transections on lordosis reflex in female rats. *Brain Research* 123: 75-88.
67. Kow LM y Pfaff DW. 1975 a. Sensory requirements for the lordosis reflex in female rats. *Brain Research* 101: 47-66.
68. Kow LM y Pfaff DW. 1975 b. Dorsal root recording relevant for mating reflexes in female rats: identification of receptive fields and effects of peripheral denervation. *Journal of Neurobiology* 6: 23-37.
69. Kow LM, Zemlan FP y Pfaff DW. 1980. Responses of lumbosacral spinal units to mechanical stimuli related to analysis of lordosis reflex in female rats. *Journal of Neurophysiology* 43: 27-45.
70. Kraus WL y Katzenellenbogen BS. 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132: 2371-2379.
71. Kubli-Garfias C, González-Flores O, Gómora-Arrati P, González-Mariscal G, Vázquez-Ramírez R y Beyer C. 2013. Bimodal binding and free energy of the progesterone receptor in the induction of female sexual receptivity by progesterone and synthetic progestins. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 133: 43-50.
72. Kuhn W, Fritzeimer KH, Hegele-Hartung C y Krattenmacher R. 1995. Comparative Progestational Activity of Norgestimate, Levonorgestrel-Oxime and Levonorgestrel in the Rat and Binding of these Compounds to the Progesterone Receptor. *Contraception* 51: 131-139.
73. Lanari C, y Molinolo AA. 2002. Progesterone receptors-animal models and cell signaling in breast cancer Diverse activation pathways for the progesterone receptor-possible implications for breast biology and cancer. *Breast Cancer Research* 4: 240.
74. Law T y Meagher. 1958. Hypothalamic Lesions and Sexual Behavior in the Female Rat. *Science* 128: 1626-1627.

75. L'Hermite M, Simoncini T, Fuller S y Genazzani AR. 2008. Could transdermal estradiol+ progesterone be a safer postmenopausal HRT? A review. *Maturitas* 60: 185-201.
76. Lima-Hernández FJ, Beyer C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Encarnación-Sánchez JL, Etgen AM y González-Flores O. 2012. Src kinase signaling mediates estrous behavior induced by 5 $\beta$ -reduced progestins, GnRH, prostaglandin E2 and vaginocervical stimulation in estrogen-primed rats. *Hormones and Behavior* 62: 579-584.
77. Makrigiannakis A, Margioris AN, Chatzaki E, Zoumakis E, Chrousos GP y Gravanis A. 1999. The decidualizing effect of progesterone may involve direct transcriptional activation of corticotrophin-releasing hormone from human endometrial stromal cells. *Molecular Human Reproduction* 5: 789-796.
78. Mandl AM. 1951. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology* 28: 576-584.
79. Mani S. 2008. Progesterone receptor subtypes in the brain: the known and the unknown. *Endocrinology* 149: 2750-2756.
80. Mani SK, Allen JMC, Clark JH, Blaustein JD y O'Malley BW. 1994. Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science* 265: 1246-1249.
81. Mani SK, Reyna AM, Chen JZ, Mulac-Jericevic B y Conneely OM. 2006. Differential response of progesterone receptor isoforms in hormone-dependent and -independent facilitation of female sexual receptivity. *Molecular Endocrinology* 20: 1322-32.
82. McGinnis MY, Lumia AR y McEwen BS. 1985. Increased estrogen receptor binding in amygdala correlates with facilitation of feminine sexual behavior induced by olfactory bulbectomy. *Brain Research* 334: 19-25.
83. Meyerson BJ y Lindström L. 1968. Effect of an oestrogen antagonist ethamoxy-triphetol (MER-25) on oestrousbehaviour in rats. *Acta Endocrinológica* 59: 8-41.
84. Moguilewsky H y Raynaud JP. 1979. Estrogen-sensitive progesterin-binding sites in the female rat brain and pituitary. *Brain Research* 164: 165-175.
85. Molenda HA, Kilts CP, Allen RL y Tetel MJ. 2003. Nuclear Receptor Coactivator Function in Reproductive Physiology and Behavior. *Biology of Reproduction* 69: 1449-1457.

86. Montecchia MF, Lamb C, Molinolo AA, Luthy IA, Pazos P, Charreau E y Lanari C. 1999. Progesterone receptor involvement in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 68: 11-21.
87. Morales Hernández M. 1997. Influencia del fotoperiodo y la copulación sobre la analgesia en la rata. Tesis de licenciatura. Escuela de Biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 69 pp.
88. Morali G y Beyer C. 1979. Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. En "Endocrine Control of Sexual Behavior" (C. Beyer, ed.), Raven Press, New York 1: 33-76.
89. Moss RL. 1971. Modification of copulatory behavior in the female rat following olfactory bulb removal. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 74: 374.
90. Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP y Conneely OM. 2000. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289: 1751-1754.
91. Nance DM, Shryne J y Gorski RA. 1975. Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones. *Hormones and Behavior* 6: 59-64.
92. Nilsen J y Brinton RD. 2003. Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 10506-10511.
93. Okewole IA, Arowojolu AO, Odusoga OL, Oloyede OA, Adeleye OA, Salu J y Dada OA. 2007. Effect of single administration of levonorgestrel on the menstrual cycle. *Contraception* 75: 372-377.
94. Orshal JM y Khalil RA. 2004. Gender, sex hormones, and vascular tone. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative. Physiology* 286: 233-249.
95. Paxinos G y Watson C. 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Australia: Academic Press.

96. Pazol K, Wilson ME y Wallen K. 2004. Medroxyprogesterone acetate antagonizes the effects of estrogen treatment on social and sexual behavior in female macaques. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89: 2998-3006.
97. Pfaff DW. 1980. Estrogen and brain function: Neural analysis of a hormone-controlled mammalian reproductive behavior. *Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York 1: 1517-1519.
98. Pfaff, D. W. 1999. Drive: Neurobiological and molecular mechanisms of sexual motivation. MIT press.
99. Pfaff, D. W. 1994. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. *The Physiology of Reproduction* 2: 107-220.
100. Pfaff DW y Lewis C. 1974. Film analyses of lordosis in female rats. *Hormones and Behavior* 5: 317-335.
101. Pfaff DW, Lewis C, Diakow C y Keiner M. 1972. Neurophysiological analysis of mating behavior responses as hormone-sensitive reflex. *Progress in Physiological Psychology* 5: 253-297.
102. Pfaff DW y Sakuma Y. 1979. Deficit in the lordosis reflex of female rats caused by lesions in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Physiology* 288: 203-210.
103. Pfau JG. 1999. Neurobiology of sexual behavior. *Neurobiology of Behavior* 9: 751-758.
104. Powers B y Valenstein ES. 1972. Sexual Sexual Receptivity: Facilitation by Medial Preoptic Lesions in Female Rats 175: 1003-1005.
105. Powers JB. 1970. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiology & Behavior* 5: 831-835.
106. Raynaud JP, Ojasoo T, Pottier J y Salmon J. 1982. Chemical substitution of steroid hormones: Effect on receptor binding and pharmacokinetics. In *Biochemical Actions of Hormones* 9: 305-342.
107. Sakuma Y. 1995. Differential control of proceptive and receptive components of female rat sexual behavior by the preoptic area. *Japanese Journal of Physiology* 45: 211-228.

108. Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW y Thijssen JH. 2003. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 46: S7-S16.
109. Schoonen WGEJ, Dijkema R, De Ries RJH, Wagenaars JL, Joosten JWH, De Gooyer ME y Kloosterboer HJ. 1998. Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells. II. Comparison of binding, transactivation and ED50 values of several synthetic (anti) progestagens in vitro in CHO and MCF-7 cells and in vivo in rabbits and rats. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 64: 157-170.
110. Schwartz SM, Nunez AA y Axelson JF. 1983. Effects of voluntary exercise on sexual behavior in female rats. *Physiology & Behavior* 30: 963-966.
111. Scott RE, Wu-Peng XS y Pfaff DW. 2002. Regulation and expression of progesterone receptor mRNA isoforms A and B in the male and female rat hypothalamus and pituitary following oestrogen treatment. *Journal of Neuroendocrinology* 14: 175-183.
112. Selman PJ, Wolfswinkel J y Mol JA. 1996. Binding specificity of medroxyprogesterone acetate and proligestone for the progesterone and glucocorticoid receptor in the dog. *Steroids* 61: 133-137.
113. Shailaja KM, Blaustein JD, Allen JMC, Law SW, O'Malley BW y Clark JH. 1994. Inhibition of rat sexual behavior by antisense oligonucleotides to the progesterone receptor. *Endocrinology* 135: 1409-1414.
114. Shatnawi A, Tran T y Ratnam M. 2007. R5020 and RU486 act as progesterone receptor agonists to enhance Sp1/Sp4-dependent gene transcription by an indirect mechanism. *Molecular Endocrinology* 21: 635-650.
115. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Willis M, Garibaldi S, Baldacci C y Genazzani AR. 2004. Differential Signal Transduction of Progesterone and Medroxyprogesterone Acetate in Human Endothelial Cells. *Endocrinology* 145: 5745-5756.
116. Singer JJ. 1968. Hypothalamic control of male and female sexual behavior in female rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 66: 738.
117. Smith MS, Freeman ME y Neill JD. 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-226.

118. Szabo M, Kilen SM, Nho SJ y Schwartz NB. 2000. Progesterone receptor A and B messenger ribonucleic acid levels in the anterior pituitary of rats are regulated by estrogen. *Biology of Reproduction* 62: 95–102.
119. Teulings FAG, Van Gilse HA, Henkelman MS, Portengen H y Alexieva-Figusch J. 1980. Estrogen, androgen, glucocorticoid, and progesterone receptors in progestin-induced regression of human breast cancer. *Cancer Research* 40: 2557-2561.
120. Thijssen JHH. 1972. The metabolism of orally active synthetic progestational compounds. *Pharmacology of the Endocrine System and Related drugs: Progesterone, Progestational Drugs and Antifertility Agents* 2: 217-244.
121. Tirelli A, Cagnacci A y Volpe A. 2008. Levonorgestrel administration in emergency contraception: bleeding pattern and pituitary-ovarian function. *Contraception* 77: 328–332.
122. Villaseca P y Arteaga E. 1993. Farmacología de los esteroides sexuales femeninos. *Ars Medica* 22: 32-40.
123. Whalen RE, Gorzalka BB, DeBold JF, Quadagno DM, Ho GKW y Hough Jr JC. (1974). Studies on the effects of intracerebral actinomycin D implants on estrogen-induced receptivity in rats. *Hormones and Behavior* 5: 337-343.
124. Young WC, Boling JL y Blandau RJ. (1941). The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *The Anatomical Record* 80: 37-45.

## 12. GLOSARIO DE TÉRMINOS

AC: Acetato de clormadinona

AF1: Función de activación 1 del receptor de progesterona

AF2: Función de activación 2 del receptor de progesterona

AF3: Función de activación 3, solo presente en la isoforma B del receptor de progesterona

AHM: Área hipotalámica medial

AMG: Acetato de megestrol

AMP: Acetato de medroxiprogesterona

AMPc: Segundo mensajero Adenosin monofosfato cíclico

APO: Área preóptica

APOm: Área preóptica media

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

BE: Benzoato de estradiol

CE: Conducta de estro

CI-628: Fármaco antiestrógeno

CL: Cociente de lordosis

CS: Conducta sexual

CSF: Conducta sexual femenina

DBD: Dominio de unión al ADN del receptor de progesterona

E: Estrógeno

E2: Estradiol

eNOS: Enzima óxido nítrico sintasa endotelial

FSH: Hormona folículo estimulante

FRM: Formación reticular mesencefálica

GABA-A: Receptor del ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GMPc: Segundo mensajero guanosin monofosfato cíclico

HVM: Hipotálamo ventromedial

IL: Intensidad de lordosis

ICV: Intracerebroventricular

L1: Vértebra lumbar 1

LBD: Dominio de unión al ligando del receptor de progesterona

LH: Hormona luteinizante

LNG: Progestina sintética Levonorgestrel

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno

MER-25: Fármaco antiestrógeno

ON: Óxido nítrico

Org2058: Progestina 16 $\alpha$ -etil-21-hidroxi-19-norprogesterona que muestra gran afinidad por el receptor de progesterona.

OVX: Ovariectomía

P: Progesterona

PD98059: Inhibidor de la MAPK

PGE2: Prostaglandina E2

PKA: Proteína cinasa A

PKC: Proteína cinasa C

PKG: Proteína cinasa G

PP2: Inhibidor "selectivo" de las cinasas de la familia Src

PRL: Prolactina

PS: Progestina sintética

R5020: Promegestona, progestina con afinidad por el receptor de progesterona

RE: Receptor de estrógeno

RP: Receptor de progesterona

RP-A: Isoforma A del receptor de progesterona

RP-B: Isoforma B del receptor de progesterona

RPHA: Isoforma A del receptor de progesterona humano

RPHB: Isoforma B del receptor de progesterona humano

RU486: Mifepristona, progestina que actúa como antagonista del receptor de progesterona

S1: Vertebra sacra 1

SGC: Sustancia gris central

SNC: Sistema nervioso central

Src: Proteína cinasa derivada de la tirosina

SC: Administración subcutánea

TMX: Tamoxifen, antagonista del receptor de estrógeno

TRH: Terapia de remplazo hormonal

ZK98299: Progestina onapristona, antagonista del receptor de progesterona

### 13. PUBLICACIONES

Resumen del LVII Congreso Nacional Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A.C.

#### **La lordosis inducida por progestinas sintéticas es mediada por los receptores de progesterona y estrógeno**

**Encarnación Sánchez José Luis** (estudiante de posgrado)<sup>1,2</sup>, Gómora Arrati Porfirio<sup>1</sup>, González Flores Oscar<sup>1</sup> y Lima Hernández Francisco Javier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados. <sup>2</sup>Maestría en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta.

En las ratas pre-tratadas con estrógenos, la progesterona (P) facilita la conducta de lordosis (CL) al interactuar con el receptor de P (RP). Además, *progestinas sintéticas* (PS) como el *acetato de megestrol* (AMG), el *acetato de medroxiprogesterona* (AMPG) y el *levonorgestrel* (LNG), son más potentes que la P para estimular la expresión de la CL en el modelo de la rata ovariectomizada (ovx) pretratada con *benzoato de estradiol* (BE). Dichas hormonas muestran mucha afinidad por el RP, sin embargo, se conoce que metabolitos reducidos del LNG también pueden unirse al receptor de estrógenos (RE). En el presente trabajo, exploramos la participación del RE y el RP en la expresión de lordosis inducida por el AMPG, AMG y LNG en ratas Sprague-Dawley pretratadas con 5µg de BE. Para ello, las hembras fueron implantadas con una cánula de acero inoxidable en el ventrículo lateral derecho, y 40 hrs después un grupo de hembras recibió por vía intracerebroventricular (icv) 1300ng de AMPG, otro 1300ng de AMG y un tercero 130ng de LNG. Otros grupos recibieron las progestinas antes descritas más la combinación con 5 µg icv de *tamoxifen* “antagonista del RE” y 5mg sc de *RU486* “antagonista del RP”. Encontramos que el *tamoxifen* redujo significativamente la expresión de la CL sólo en los grupos tratados con AMPG y AMG, mientras que el *RU486* redujo significativamente la expresión de la CL inducida por las tres PS y el hecho de que el *RU486* haya bloqueado la conducta de lordosis inducida por las PS utilizadas coincide con su afinidad de unión con el RP. Interesantemente, el *tamoxifen* no bloqueó la CL inducida por el LNG, a pesar de que se conoce que los metabolitos de éste pueden ejercer sus efectos sobre dicho receptor.

Financiado por CONACYT No. CB-2009-C01-134291 y PROMEP No. 103.5/09/1294 para OGF y Beca Conacyt de Maestría No. 297920.

**Nombre del autor:** José Luis Encarnación Sánchez<sup>1,2</sup>

Correo electrónico: [spankycira@hotmail.com](mailto:spankycira@hotmail.com)

Teléfono y fax: (246) 46-2-17-27 y (246) 133-33-21

**Nombre del investigador responsable del proyecto:** Porfirio Gómora Arrati<sup>1</sup>

Correo electrónico: [Gomora09@yahoo.com.mx](mailto:Gomora09@yahoo.com.mx)

Teléfono y fax: (246) 46-2-17-27

**Nombre de las instituciones:** <sup>1</sup>Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados. <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta.

**Nombre completo y grado académico de los autores:**

Biol. José Luis Encarnación Sánchez<sup>1,2</sup>

Dr. Porfirio Gómora Arrati<sup>1</sup>

Dr. Oscar González Flores<sup>1</sup>

M en C. Francisco Javier Lima Hernández<sup>1</sup>

**Área temática:** Neurociencias A.2. Aspectos integrativos

## Research Article

# Intracerebral Infusion of Levonorgestrel, but no other Synthetic Progestins, Induces Estrous Behavior Entirely through Progesterone Receptor

Oscar González-Flores<sup>1\*</sup>, Porfirio Gómora-Arrati<sup>1</sup>, Marcos García-Juárez<sup>1</sup>, José Luis Encarnación-Sánchez<sup>1</sup>, Francisco Javier Lima-Hernández<sup>1,3</sup>, Kurt L. Hoffman<sup>1</sup>, Ricardo Vazquez-Ramirez<sup>2</sup> and Carlos Kubli-Garfias<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, México

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México

<sup>3</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tlaxcala, México

**\*Corresponding author**

Oscar González-Flores, Centro de Investigación en Reproducción Animal, Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Apartado Postal No 62, Tlaxcala C.P., 90000, México, Tel/Fax: 52 246 46 21727; Email: oglezfo@gmail.com

Submitted: 23 October 2018

Accepted: 30 October 2018

Published: 31 October 2018

ISSN: 2333-7079

**Copyright**

© 2018 González-Flores et al.

## OPEN ACCESS

**Keywords**

- Levonorgestrel
- Medroxyprogesterone acetate
- Megestrol acetate
- Progesterone receptor
- Lordosis
- Proceptivity

**Abstract**

Synthetic progestins (SPs) Levonorgestrel (LNG), Medroxyprogesterone Acetate (MPA) and Megestrol Acetate (MGA) are more potent than progesterone to induce estrous behavior (lordosis and proceptive behaviors) in estrogen-primed rats. To test the role of progesterone receptor (PR) and estrogen receptor (ER) in the sexual response in rodents induced by SPs, three experiments were designed. In experiment 1, four dose levels (range 1.3-1300 ng) of the three SPs were infused into the right lateral ventricle (lcv) to estrogen primed rats. All SPs induced significantly sexual behavior, and calculated ED50s showed that MPA was the most effective progestin to elicit the estrous behavior, followed by LNG and MGA. In experiment 2, the estrous behavior stimulating effects of all three SPs (at a dose of 1300 ng) were significantly reduced by the antiprogestin RU486, indicating that binding to the PR is required for these effects. Interestingly, tamoxifen (TMX) blocked the sexual behavior induced by MPA and MGA, but failed to block significantly the sexual behavior response induced by LNG. In experiment 3, was assessed the role of the Src/MAPK system in the facilitation of estrous behavior induced by the three SPs. lcv infusion of either PP2 (Src inhibitor) or PD98059 (MAPK inhibitor) prior of 1300 ng of SPs infusion fail to inhibit both lordosis and proceptive behaviors induced by the three SPs. The results point clearly toward an active role of the PR in the sexual behavior display elicited by the three SPs. Besides, the ER seems to be required only for the progesterone derivatives MGA and MPA and unnecessary for the androgen derivative LNG which is readily reduced at C5. The active system Src/MAPK related in some extent with the PR in neoplastic cells is not linked with the present results in the central nervous system.

**INTRODUCTION**

The participation of estrogen and progesterone (P) receptors are essential for the induction of female estrous behavior elicited in rodents by several agents with varied chemical structures, among them: steroids such as estradiol (E<sub>2</sub>), progestins, and corticoids [1-3], peptides and proteins [4-8], biogenic amines [9,10], acetylcholine [11-13], cyclic nucleotides [14-19] and prostaglandins [7,20-23]. Sensory stimulation is also included, as occurs with the vaginocervical stimulation [24]. In addition, synthetic progestins (SPs) such as R5020, levonorgestrel (LNG), medroxyprogesterone acetate (MPA) or megestrolacetate (MGA), which are compounds that show high affinity for P receptors [25,26], and more agonistic effect than P, as LNG [27], and MGA [28], for inducing estrous behaviors (lordosis and proceptivity) in estrogen-primed rats.

SPs are substances structurally related to natural androgens and progestins and are functionally similar, but exhibit longer biological half-life than P. Chemically, like P, the three SPs studied bears a C3-carbonyl group at the A-ring. Interestingly, MPA and MGA are derivatives of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, while LNG is a 19-nortestosterone derivative. Some of these progestins are metabolized to yield active compounds. Both MPA and LNG can be metabolized at the A-ring [29,30]. However, MGA is not biochemically reduced at C5 due to a double bond at C6 [31]. LNG yields readily to A-ring reduced compounds when incubated with rat pituitary and hypothalamus [29]. However, we have demonstrated that neither the C5 nor the C3-carbonyl group reductions are needed for the induction of estrous behavior by SPs [28].

The effects exerted by SPs on different aspects of reproduction have been widely studied, especially those actions related to the

development and growth of the uterus, i.e., progestogenic activity [32], and as contraceptives by inhibiting ovulation [26,33,34]. Biological effects at the cellular level are principally mediated by activation of the intracellular steroid receptors. However, the capacity of each SP to bind the P receptor (PR) varies; for example, LNG shows the greatest affinity for the PR, followed by MPA and then MGA [25,26,31]. Additionally, LNG has been reported to have no binding or transcriptional activity via the estrogen receptor (ER) [26], while MPA binds to the ER in the rat uterus and *in vitro* [35]. On contrary, other studies, have demonstrated that this progestin lacks of binding to the ER and therefore, devoid of estrogenic activity [36, 37].

At the present, it is unknown whether SPs exert membrane effects capable of activating second messenger signaling systems such as the Src/MAPK pathway or other kinases within brain regions involved in the induction of estrous behavior in rodents. It is known however, that MPA and LNG can modulate second messenger pathways in association with some physiological process [38,39]. For example, MPA increases activation of ERK while prevents its translocation to the cell nucleus, the latter is a necessary process by which estrogens and P induce neuroprotection [39]. In addition, it has been described that LNG stimulates cyclic AMP induction in veins, a process involved in relaxation in several models of constricted veins [40].

Interestingly, both PR and ER elicit membranal responses, independent of transcriptional mechanisms [41-43], by activating the Src/MAPK pathway. The interaction of the PR and ER with c-Src tyrosine kinase produces the stimulation of the Src/ER/PR/MAPK pathway in different intracellular systems [44-49]. We recently showed, that P and some of its A-ring reduced P metabolites induce lordosis behavior through the activation of Src kinase [50].

SPs have been used as an important tool to explore probable cellular mechanisms exerted by steroid hormones; thus, to assess the importance of reduction at C5 for stimulation of estrous behavior in the rat, three experiments were designed. Briefly: in experiment 1, was tested the capacity of various ICV dosages of MPA and LNG which eventually, may be biochemically reduced at C5. Similarly, MGA, which lacks of C5-reduction due to an additional double bond at C6 [31], was also evaluated for comparison to stimulate estrous behavior in ovariectomized (OVX) estrogen-primed rats. In experiment 2, were assessed the participation of both ER and PR in the estrous behavior induced by the ICV administration of these SPs. To accomplish this, their respective antagonists, tamoxifen (TMX) or RU486 were also administered. In experiment 3, was explored the possible role of the Src tyrosine kinase pathway in the estrus-facilitating actions of MPA, LNG, and MGA by concurrently administering PP2 and PD98059, which are inhibitors of Src kinase and MAPK respectively [51-53].

## MATERIAL AND METHODS

Two hundred forty-two sexually inexperienced Sprague Dawley female rats (230-270 g body weight), bred in our colony in Tlaxcala City, were used. Females were maintained under controlled temperature (23 + 2°C) and light conditions (14h light; 10h dark; lights off at 1000 h). They were fed with Purina rat chow and water *ad libitum*.

## Surgical procedure

Female rats were bilaterally ovariectomized (OVX) under anesthesia with xylazine (4mg/kg) and ketamine (80mg/kg) and group housed (4/cage). One week later, the females were anesthetized with xylazine (4mg/kg) and ketamine (80mg/kg) and placed in a Kopf stereotaxic instrument (Tujunga, CA) for implantation into the right lateral ventricle of a stainless-steel cannula (22 gauge, 17-mm length) following the Paxinos and Watson [54], atlas coordinates: anteroposterior +0.80 mm, mediolateral -1.5 mm, dorsoventral -3.5 mm with respect to bregma. A stainless-steel screw was fixed to the skull, and both the screw and cannula were attached to the bone with dental cement. A dummy cannula (30 gauge) provided with a cap was introduced into the guide cannula to prevent clogging and contamination. Immediately after each surgical procedure, the rats were injected with penicillin (165,000 IU/kg of procaine benzyl penicillin and 55,000 IU/kg of crystalline benzyl penicillin), and this continued for 3 days after surgery. After surgery, rats were housed individually in plastic cages with food and water available *ad libitum* for recovery until the test day. All of the experiments were performed under the guidelines of the Mexican Law of Animal Protection (NOM-062-ZOO-1999) under the approval and supervision of the Institutional Committee for the use and care of laboratory animals of Centro de Investigación y de Estudios Avanzados.

## Drugs

Estradiol benzoate (EB), and three SPs: medroxyprogesterone acetate (6 $\alpha$ -methyl-3,20-di-oxopregn-4-en-17-yl acetate); levonorgestrel (13- $\beta$ -ethyl-17 $\alpha$ -ethynyl-17 $\beta$ -hydroxygen-4-en-3-one) and megestrol acetate (17 $\alpha$ -acetyloxy-6-methylpregnan-4,6-diene-3,20-dione) were used in this experiment. Steroids were dissolved in carthamus oil and EB was injected subcutaneously (sc, 0.1ml), while the SPs were injected ICV. All steroids were purchased from Sigma (St. Louis, MO). The ER antagonist TMX was dissolved in sesame oil vehicle and injected ICV, while the PR antagonist RU486 was dissolved in sesame oil: benzyl benzoate: benzoic alcohol (80:15:5) and injected sc. Both TMX and RU486 were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). The specific inhibitor of the Src kinase family 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo [3,4-d] pyrimidine (PP2; [51,52]) and the MAPK inhibitor, PD98059 (2'-amino-3'-methoxyflavone; [53]) were prepared in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) and purchased from Calbiochem (San Diego, CA). All protein kinase inhibitors were administered ICV.

## Experiment 1. Establishment of dose-response curves and effective dose 50 (ED50) for MGA, LNG, and MPA administered ICV on estrous behavior of OVX EB-primed rats

The objective of this experiment was to test the effect of SPs on estrous behavior and to establish a dose response relationship. One week after intracerebral cannula implant, the females were primed with 5 $\mu$ g EB (sc, in 0.1ml), 40 h before SPs or vehicle (oil; n=9) injections. Dosages used for MPA were: 1.3ng (n= 11), 13ng (n=9), 130ng (n= 10) and 1300ng (n= 11); for LNG; 1.3ng (n= 11), 13ng (n= 9), 130ng (n= 9) and 1300ng (n= 9); and MGA; 1.3ng (n= 9), 13ng (n= 8), 130ng (n= 10) and 1300ng (n=

9). These dosages were selected from previous studies published by us [27].

### Experiment 2. Effect of TMX and RU486 on the induction of lordosis behavior by SPs

In this experiment, we tested the idea that lordosis induced by SPs are mediated by ER and PR. One week after cannula implantation rats were primed with 5µg/100µl of EB, administered sc. At 39.5 hr after EB priming, we administered one of the following treatments, in order to respectively test the effects of TMX or RU486 on SPs-induced lordosis: (1) 5µg TMX combined with 1300ng of MPA (n= 10), LNG (n= 10), or MGA (n= 10). (2) 5mg RU486 combined with 1300ng of MPA (n= 12), LNG (n= 10) and MGA (n= 8). Dose, schedule and via of injection of TMX and RU486 were selected from previous results showing the optimal inhibitory effect of these compounds [55,56].

### Experiment 3. Effect of PP2 and PD98059 on the induction of lordosis by SPs

As in the previous experiments, OVX animals were primed 5µg of EB. At 39.5 hr later, the following treatments were initiated: (1) 30µg of PP2 was infused ICV, followed 15 min later by 1300ng of MPA (n= 10), LNG (n= 9) or MGA (n= 8). (2) 3.3µg of PD98059 was infused ICV, followed 15 later by 1300ng of MPA (n= 11), LNG (n= 10), or MGA (n= 10). Doses of the inhibitors and the schedule of injection were established based on previous results that showed the optimal inhibitory effect of these treatments to counteract the estrous behavior induced by several agents [50].

### Testing procedures

The tests for estrous behavior (receptivity and proceptivity) were conducted 60, 120, and 240 min after infusion of SPs, by an experimenter blind to treatment groups. Thus, the female rat was placed in a circular Plexiglas arena (53 cm diameter) with a sexually active male rat. The lordosis quotient [LQ = (number of lordosis / 10 mounts) × 100] and lordosis score (LS) were used to assess receptive behavior in response to the first 10 mounts. LS refers to the intensity of lordosis, which is quantified according to Hardy and DeBold [57]. This scale ranges from 0 to 3 for each individual response and consequently, from 0 to 30 for each female that received 10 mounts. Proceptivity behavior was studied by determining the incidence of hopping, darting, and ear-wiggling across the whole receptivity test. The proportion of females displaying at least two of these behavioral patterns was analyzed.

### Statistical analysis

Regression lines for the dose-response curves of the three SPs explored in this study and ED50s were calculated according to Tallarida and Murray [58].

The effects of the TMX, RU486, PP2, and PD98059 on the induction of estrous behavior by MPA, LNG, and MGA (experiments 2 and 3) were assessed by comparing the LQs obtained with these agents alone versus those obtained when inhibitor agents were co-administered. Since the distribution of LQ values in same groups was not normal, the Wilcoxon-Mann-Whitney test was used to compare two independent groups [59, 60]. This test is an excellent alternative to the t-test with a power efficiency of

95.5% of the parametric test [59,60]. Fischer's exact probability test was used to compare the proportions of proceptive females between experimental groups [59,60].

## RESULTS

The three SPs showed similar effect inducing sexual behavior display in both lordosis and proceptivity but at different extent. In addition the antagonists TMX and RU486 which binds the ER and PR respectively, gave important data on the action mechanism of the SPs.

### Experiment 1: Determination of dose-response curves and effective dose 50 (ED50) for MGA, LNG, and MPA.

Figure 1 shows dose-response relationships for lordosis and proceptive behaviors induced by each of the SPs, tested at 60, 120, and 180 min after the ICV SP administration. The control (oil, black bar) group showed very low levels of lordosis and did not display proceptivity. A linear relationship was observed for MGA and LNG at each of the three times tested, excepting MPA. A regression analysis for each of the three compounds at 240 min, which was the time at which the best response was obtained, showed that MPA was the most potent of the SPs with respect to lordosis induction. The ED50 values for lordosis behavior were as follows: MGA= 31.5ng, LNG= 6.4ng and MPA= 1.5ng while the proceptivity ED50s were: MGA= 89ng, LNG= 66ng and MPA= 2.5ng.

### Experiment 2. Effect of the antagonists TMX and RU 486 on the effectiveness of SPs for eliciting lordosis Behavior

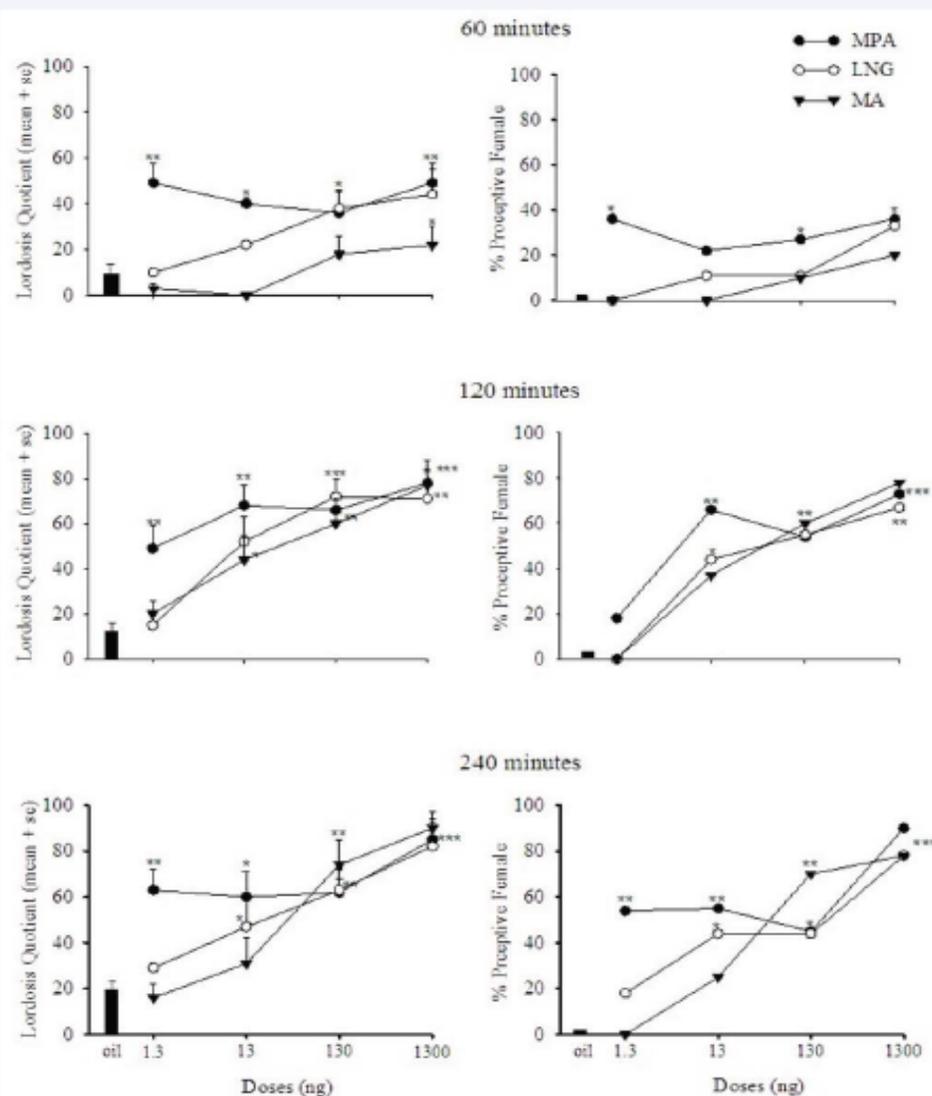
Figure 2 shows the effects of TMX and RU486 on lordosis and proceptive behaviors induced by MPA, LNG, and MGA. The lordosis response induced by MPA was significantly reduced by both TMX and RU486, at 60 (p< 0.05), 120 (p< 0.01) and 240 min (p< 0.001). Proceptive behavior induced by MPA was also inhibited at 120 (p< 0.05) and 240 min (p< 0.01). Likewise, MGA lordosis and proceptivity were inhibited by both TMX and RU486 at 120 and 240 min. Interestingly, lordosis induced by LNG was inhibited by RU486 at 120 (p< 0.5) and 240 (p< 0.01) min, but not by TMX which was clearly ineffective. However, the proceptive behavior induced by LNG was significantly inhibited by both RU486 and TMX at 120 and 240 min (p<0.01, p< 0.05 respectively). (See Figure 2 for the values of significance).

### Experiment 3. Effect of PP2 and PD98059 on estrous behavior induced by SPs in EB-primed rats

Table 1 shows the effect of PP2 and PD98059 on lordosis and proceptive behaviors induced by MPA, LNG, and MGA. Neither PP2 nor PD98059 inhibited SPs-induced lordosis or proceptive behaviors to the different times tested.

## DISCUSSION

The present data show that the ICV administration of all SPs to EB primed rats, induced estrous behavior, with different extent. MPA for instance, was the most effective to induce estrous behavior, followed by LNG. Interestingly, when these compounds are administered subcutaneously the opposite occurs, being LNG which showed the most agonist effect to induce these

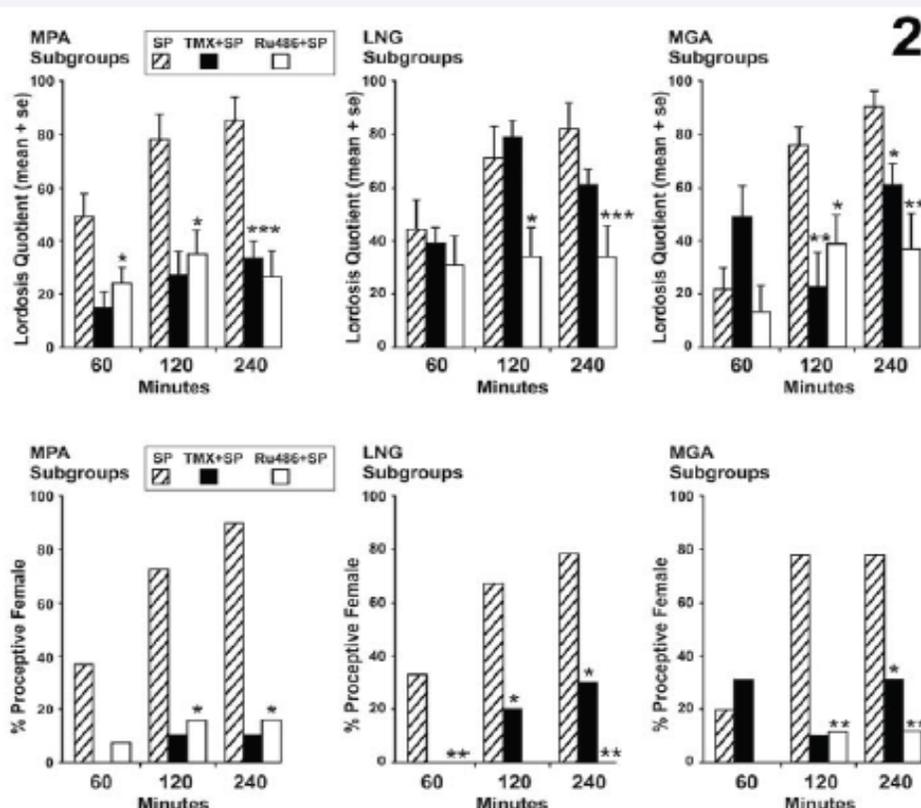


**Figure 1** Effect of icv injection of Medroxyprogesterone Acetate (MPA), Levonorgestrel (LNG) and Megestrol Acetate (MGA); 1.3, 13, 130 and 1300 ng, or oil, in ova, EB-primed rats on: lordosis quotient (LQ; panel A) and % Proceptive behavior (LS; panel B). Females were tested at 60, 120, and 240 min after injection of progestins or oil. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, \*p < 0.05 vs oil.

behaviors in estrogen-primed rats [27]. In addition, we also find that full lordosis and proceptive behaviors can be displayed by those SPs that can be reduced at C5, that is: LNG and MPA. In fact, the A-ring reduction favors the expression of female estrous behavior, as showed with the intravenous injection of C5-reduced P metabolites such as: dihydroprogesterone and allopregnanolone, which induce intense estrous behavior in estrogen-primed rats [55]. Notably, MGA was the progestin with the lowest behavioral effect, likely because the C5 reduction is unfavorable sterically because its double bond at C6. According to Kincl [61], chlormadinone with similar C6=C7 double bond as MGA, possessed less than 25% of the potency of P to induce estrous behavior in estrogen-primed rats.

All SPs have bind human, rabbit and rat PR with higher relative binding affinity than progesterone [25,62, 63].

Regarding this work, the following binding affinities order can be considered LNG > MPA > MGA [64, 65]. This is important since the present results support the participation of PR in the induction of estrous behavior by SPs, because of the antiprogestin RU486 reduced estrous behavior induced by the three SPs. Moreover, lordosis induced by natural progestins is significantly inhibited by intracerebral or systemic injection of RU486 [55,66] and the combination of RU486 with some SPs in reproductive organs such as: hyperplasia of mammary glands induced by MPA, or inhibition in the prolactin secretion induced by LNG both are reduced markedly by RU486 [67,68]. Regarding the ER, it has been reported that MPA, LNG, and MGA do not bind to this receptor, therefore, transcriptional effects mediated by this receptor are improbable [36,37]. Surprisingly, in the present study, estrous behavior induced by MPA and MGA was blocked by TMX (selective modulator of ER), while lordosis induced by



**Figure 2** Icv effect of tamoxifen (TMX) and RU486 on lordosis and proceptivity behaviors induced by icv infusion of 1300 ng of MPA, LNG and MGA, in ovx, EB primed rats at 60, 120 and 240 min after SP administration. RU486 significantly blocked estrous behavior induced by the three progestins, while TMX did not block lordosis or proceptivity induced by LNG. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  vs progestin synthetic (PS) + antagonist.

**Table 1:** Effect of PP2 (Src tyrosine kinase inhibitor) and PD98059 (MAPK inhibitor) on the facilitation of estrous behavior by Medroxyprogesterone Acetate (MPA), Levonorgestrel (LNG) and Megestrol Acetate (MGA) in ovariectomized estrogen primed (5 mg EB) rats.

Progestina	n	1h		2h		4h	
		LQ	% Proceptivity	LQ	% Proceptivity	LQ	% Proceptivity
MPA	11	49 ± 9	36	78 ± 10	72	85 ± 9	91
MPA+PP2	10	26 ± 6	0	54 ± 11	40	42 ± 13	40
MPA+PD	11	28 ± 11	36	76 ± 12	72	63 ± 14	63
LNG	9	38 ± 8	11	72 ± 8	55	63 ± 5	44
LNG+PP2	9	68 ± 9	55	76 ± 6	78	91 ± 5	89
LNG+PD	10	19 ± 9	20	67 ± 12	20	68 ± 10	0
MA	9	22 ± 8	22	76 ± 8	78	90 ± 7	78
MA+PP2	8	34 ± 7	0	59 ± 9	25	69 ± 6	37
MA+PD	10	44 ± 10	30	78 ± 10	60	73 ± 12	70

LQ: lordosis quotient; MPA: medroxyprogesteroneacetate; LNG; levonorgestrel; MA: megestrolacetate; PP2; Src kinase inhibitor; PD: PD98059, MAPK inhibitor.

LNG was not inhibited by TMX. Some, *in vitro* studies however, have showed that TMX inhibited MPA-induced cell proliferation of breast cancer cells [69], indicating that, at least *in vitro*, TMX can inhibit MPA-mediated processes. Additional experiments on this issue are needed to address this doubtful finding.

Regarding the proceptive behavior, which appears immediately after the lordosis response, it is known that is

largely dependent upon the action of P [70-73], involving the binding of the hormone with its receptor. The present results agree with this possibility, since RU486 lowered statistically the proceptivity induced by the SPs treatment. In addition, the proceptive behavior induced by several P metabolites is reduced by intracerebral and intravenously administration of RU486 [55,66].

Unexpectedly, proceptive behavior induced by the three SPs was significantly reduced by TMX administration, pointing toward an interaction of TMX with the PR. Since PR and ER belong to the same receptor family in our experimental condition an interaction steroid receptors-TMX interaction may occur, however experimental work in this regard is needed.

On other side, the fact that several steroids can exert effects on membrane receptors generates an additional level of complexity in the mechanism of action of steroid hormones. Cross-talk between a membranal (non-genomic) and genomic signaling via steroid receptors is suggested to play a role in the induction of female estrous behavior. For example, progestins have been shown to activate various pathways such as the Src and MAPK signaling cascades. This non-genomic signaling by progestins is primarily thought to be mediated by the classic PR and ER [44-49]. The Src system is an important integrator of steroid receptor signaling because it has an SH2 domain that binds directly to ER $\alpha$  as well as an SH3 domain which interacts with the PR. This interaction, in turn, activates MAPK, for example, in breast cancer cells. Migliaccio et al. [49], found that E2 activated both Src and MAPK, and that Src interacts with both ER and PR. Based in such data, it seems appealing to explore the SPs, which show good affinity for the PR, might exert some physiological effects by modulating the Src/ER/PR/MAPK intracellular mechanism in the central nervous system. Oppositely, the estrous behavior induced by SPs was not blocked by either PP2 or PD98059 (Src and MAPK inhibitors respectively), showing that the Src signaling pathway is not involved for the expression of proceptive and lordosis behaviors. However in oncology this signaling appears to be important since in an experimental model of hormonal carcinogenesis, MPA treatment induced rapid Src tyrosine phosphorylation [71], while immunoblotting and kinase assay in MCF-7 cells, MPA induced a late decrease in MAPK activities [74]. Regardless of the previous data, we recently showed that several agents that do not bind the PR, like ring A reduced progestins, GnRH and prostaglandin E2, are capable to induce lordosis behavior by activating the Src system, since both inhibitors PP2 and PD98059 reduced the facilitating effects of these compounds [50, 70].

In conclusion, the present results support the fact that strong binding to the PR and A-ring reduction, two important bio-pharmacological properties of MPA and LNG, are adequate to facilitate normal estrous behavior in estrogen-primed rats. MGA with the lowest potency to induce the sexual response is as well, resistant to the enzymatic A-ring reductions. An important difference observed that MPA and MGA both progesterone derivatives were ER dependent since the TMX administration blocked the sexual behavior display induced by both progestins. On contrary, the sexual induction produced by LNG the androgen derivative was not hampered by TMX resulting efficacious to elicit the behavioral response. Finally, the Src/MAPK pathway functioning along with the PR in neoplastic cells, is not active in the present behavior model, dependent of the central nervous system.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Proyecto apoyado por el fondo sectorial de investigación para la educación. Proyecto 255936 CONACYT CB-2015-01.

## REFERENCES

1. Beyer C, González-Mariscal G. Effects of progesterone and natural progestins in brain. In: Negro Vilar A, Pérez-Palacios G, editors. Reproduction, growth and development. New York: Raven Press. 1991; 199-208.
2. Morali G, Beyer C. Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. In: Beyer C, editor. Endocrine control of sexual behavior. New York: Raven Press. 1979; 33-75.
3. Clemens LG, Weaver DR. The role of gonadal hormones in the action of feminine sexual behavior. In: Adler N, Pfaff D, Goy RW, editors. Handbook of behavioral neuroendocrinology. New York and London: Plenum Press. 1985; 1833-1858.
4. Moss RL, McCann SM. Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. *Science*. 1973; 181: 177-179.
5. Pfaff DW. Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science*. 1973; 182: 1148-1149.
6. Riskind P, Moss RL. Effects of lesions of putative LHRH-containing pathways and midbrain nuclei on lordotic behavior and luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Brain Res Bull*. 1983; 11: 493-500.
7. Rodríguez-Sierra JF, Komisaruk BR. Common hypothalamic sites for activation of sexual receptivity in female rats by LHRH, PGE2 and progesterone. *Neuroendocrinology*. 1982; 35: 363-369.
8. Sakuma Y, Pfaff DW. LH-RH in the mesencephalic central grey can potentiate lordosis reflex of female rats. *Nature*. 1980; 283:566-567.
9. Etgen AM, Ungar S, Petitti N. Estradiol and progesterone modulation of norepinephrine neurotransmission: implications for the regulation of female reproductive behavior. *J Neuroendocrinol*. 1992; 4: 255-271.
10. Fernández-Guasti A, Larsson K, Beyer C. Potentiative action of alpha- and beta-adrenergic receptor stimulation in inducing lordosis behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 1985; 22: 613-617.
11. Dohanich GP, Barr PJ, Witcher JA, Clemens LG. Pharmacological and anatomical aspects of cholinergic activation of female sexual behavior. *Physiol Behav*. 1984; 32: 1021-1026.
12. Kaufman LS, McEwen BS, Pfaff DW. Cholinergic mechanisms of lordotic behavior in rats. *Physiol Behav*. 1988; 43: 507-514.
13. Richmond G, Clemens LG. Evidence for involvement of midbrain central gray in cholinergic mediation of female sexual receptivity in rats. *Behav Neurosci*. 1986; 100: 376-380.
14. Beyer C, Canchola E. Facilitation of progesterone induced lordosis behavior by phosphodiesterase inhibitors in estrogen primed rats. *Physiol Behav*. 1981; 27:731-733.
15. Beyer C, González-Mariscal G. Elevation in hypothalamic cyclic AMP as a common factor in the facilitation of lordosis in rodents: a working hypothesis. *Ann NY Acad Sci*. 1986; 474: 270-281.
16. Fernández-Guasti A, Rodríguez-Manzo G, Beyer C. Effect of guanine derivatives on lordosis behavior in estrogen primed rats. *Physiol Behav*. 1983; 31: 589-592.
17. Christensen A, Dewing P, Micevych P. Membrane-initiated estradiol signaling induces spinogenesis required for female sexual receptivity. *J Neurosci*. 2011; 31: 17583-17589.
18. Etgen AM, González-Flores O, Todd BJ. The role of insulin-like growth factor-I and growth factor-associated signal transduction pathways in estradiol and progesterone facilitation of female reproductive behaviors. *Front Neuroendocrinol*. 2006; 27: 363-375.

19. Kow LM, Brown HE, Pfaff DW. Activation of protein kinase C in the hypothalamic ventromedial nucleus or the midbrain central gray facilitates lordosis. *Brain Res.* 1994; 660: 241-248.
20. Dudley CA, Moss RL. Facilitation of lordosis in the rat by prostaglandin E2. *J Endocrinol.* 1976; 71: 457-458.
21. Rodríguez-Sierra JF, Komisaruk BR. Effects of prostaglandin E2 and indomethacin on sexual behavior in the female rat. *Horm Behav.* 1977; 9: 281-289.
22. Lima-Hernández FJ, Gomora-Arrati P, García-Juárez M, Blaustein JD, Etgen AM, Beyer C, et al. Estrogen receptors regulate the estrous behavior induced by progestins, peptides, and prostaglandin E2. *Horm Behav.* 2014; 66: 361-368.
23. Beyer C, González-Flores O, González-Mariscal G. Progesterone receptor participates in the stimulatory effect of LHRH, prostaglandin E2 and cyclic AMP on lordosis and proceptive behavior in rats. *J Neuroendocrinol.* 1997; 9: 609-614.
24. Komisaruk BR. Induction of lordosis in ovariectomized rats by stimulation of the vaginal cervix: hormonal and neural interrelationships. In: Sawyer CH, Gorski RA, editors. *Steroid Hormones and Brain Function.* Berkeley: University of California Press. 1971; 127-136.
25. Raynaud JR, Ojasoo T, Pottier J, Salmon J. Chemical substitution of steroid hormones: Effect on receptor binding and pharmacokinetics. In: Litwack G, editor. *Biochemical actions of hormones.* New York: Academic Press. 1982; 305-342.
26. Africander D, Verhoog N, Hapgood JP. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids.* 2011; 76: 636-652.
27. Kubli-Garfias C, González-Flores O, Gómora-Arrati P, González-Mariscal G, Vázquez-Ramírez R, Beyer C. Bimodal binding and free energy of the progesterone receptor in the induction of female sexual receptivity by progesterone and synthetic progestins. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013; 133: 43-50.
28. González-Flores O, Sánchez N, González-Mariscal G, Beyer C. Ring A reductions of progestins are not essential for estrous behavior facilitation in estrogen-primed rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998; 60: 223-227.
29. Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chavez BA, Garcia GA, Grillasca I, et al. Mechanism of action of levonorgestrel: *in vitro* metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992; 41: 881-890.
30. Martin F, Jarvenpää P, Kosunen K, Somers C, Lindstrom B, Adlercreutz H. Ring-A reduction of medroxyprogesterone acetate [17 alpha-acetoxy-6 alpha-methyl-4-pregnene-3,20-dione (MPA)] in biological systems. *J Steroid Biochem.* 1980; 12: 491-497.
31. Thijssen JHH. The metabolism of orally active synthetic progestational compounds. In: Peters A, Tausk M, editors. *Pharmacology of the endocrine system and related drugs: Progesterone, progestational drugs and antifertility agents, vol 2.* New York: Pergamon Press, Oxford. 1972; 217-244.
32. Affandi B. Injectable contraceptives: a worldwide perspective. *J Fam Plann Reprod Health Care.* 2002; 28: 3-4.
33. Sitruk-Ware R, Nath A. The use of newer progestins for contraception. *Contraception.* 2010; 82: 410-417.
34. Rudel HW. Pharmacology of oral contraceptives. *Clin Obstet Gynecol.* 1968; 11: 632-644.
35. Di Carlo F, Gallo E, Conti G, Racca S. Changes in the binding of oestradiol to uterine oestrogen receptors induced by some progesterone and 19-nortestosterone derivatives. *J Endocrinol.* 1983; 98: 385-389.
36. Sasagawa S, Shimizu Y, Kami H, Takeuchi T, Mita S, Imada K, et al. Dienogest is a selective progesterone receptor agonist in transactivation analysis with potent oral endometrial activity due to its efficient pharmacokinetic profile. *Steroids.* 2008; 73: 222-231.
37. Fuhrmann U, Krattenmacher R, Slater EP, Fritzsche KH. The novel progestin drospirenone and its natural counterpart progesterone: biochemical profile and antiandrogenic potential. *Contraception.* 1996; 54: 243-251.
38. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Willis MY, Garibaldi S, et al. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology.* 2004; 145: 5745-5756.
39. Nilsen J, Brinton RD. Divergent impact of progesterone and medroxyprogesterone acetate (Provera) on nuclear mitogen-activated protein kinase signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 10506-10511.
40. Herkert O, Kuhl H, Busse R, Schini-Kerth VB. The progestin levonorgestrel induces endothelium-independent relaxation of rabbit jugular vein via inhibition of calcium entry and protein kinase C: role of cyclic AMP. *Br J Pharmacol.* 2000; 130: 1911-1918.
41. Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev.* 1998; 19: 3-17.
42. Watson CS, Gametchu B. Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 220: 9-19.
43. Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59: 365-393.
44. Ballare C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, et al. Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 1994-2008.
45. Boonyaratanakornkit V, Scott M, Ribon V, Sherman L, Anderson S, Maller J, et al. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinase. *Mol Cell.* 2001; 8: 269-280.
46. Boonyaratanakornkit V, McGowan E, Sherman L, Mancini MA, Cheskis BJ, Edwards DP. The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle. *Mol Endocrinol.* 2007; 21: 359-375.
47. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol.* 2005; 67: 335-376.
48. Faivre EJ, Lange CA. Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 466-480.
49. Migliaccio A, Piccolo D, Castoria G, Di Domenico M, Bilancio A, Lombardi M, et al. Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *Embo J.* 1998; 17: 2008-2018.
50. González-Flores O, Beyer C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Lima-Hernández FJ, Soto-Sánchez A, et al. A role for Src kinase in progestin facilitation of estrous behavior in estradiol-primed female rats. *Horm Behav.* 2010; 58: 223-229.
51. Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, et al. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem.* 1996; 271: 695-701.

52. Li Z, Hosoi Y, Cai K, Tanno Y, Matsumoto Y, Enomoto A, et al. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 341: 363-368.
53. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl AcadSci USA.* 1995; 92: 7686-7689.
54. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 6th ed. Australia: Academic Press; 2006.
55. Beyer C, González-Flores O, González-Mariscal G. Ring A reduced progestins potently stimulate estrous behavior in rats: paradoxical effect through the progesterone receptor. *Physiol Behav.* 1995; 58: 985-993.
56. Domínguez-Ordoñez R, García-Juárez M, Lima-Hernández FJ, Gómora-Arrati P, Blaustein JD, González-Flores O. Sexual receptivity facilitated by unesterified estradiol: Dependence on estrogen and progestin receptors and priming dose of estradiol benzoate. *Behav Neurosci.* 2015; 129: 777-788.
57. Hardy DF, DeBold JF. Effects of repeated testing on sexual behavior of the female rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1973; 85: 195-202.
58. Tallarida AJ, Murray RB. *Manual of pharmacological calculations with computer programs.* Verlag S, editor. New York. 1986.
59. Bruning JL, Kintz BL. *Computational handbook of statistics.* London: Foresman and Company; 1987.
60. Siegel S, Castellan NJ. *Estadística no paramétrica: aplicada a las ciencias de la conducta.* 4a ed. México: Trillas; 1995.
61. Kindl FP. Copulatory reflex response to steroids. In: Dorfman RI, editor. *Methods in Hormone Research.* New York and London: Academic Press. 1964; 477-484.
62. Bergink EW, van Meel F, Turpijn EW, van der Vies J. Binding of progestagens to receptor proteins in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem.* 1983; 19: 1563-1570.
63. Feil PD, Bardin CW. The use of medroxyprogesterone acetate to study progestin receptors in immature, pregnant, and adult rabbit uterus. *Adv Exp Med Biol.* 1979; 117: 241-254.
64. Philibert D, Bouchoux F, Degryse M, Lecaque D, Petit F, Gaillard M. The pharmacological profile of a novel norpregnane progestin (trimegestone). *Gynecol Endocrinol.* 1999; 13: 316-326.
65. Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, et al. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas.* 2003; 46: S7-S16.
66. González-Mariscal G, González-Flores O, Beyer C. Intrahypothalamic injection of RU486 antagonizes the lordosis induced by ring A-reduced progestins. *Physiol Behav.* 1989; 46: 435-438.
67. Cerliani JP, Giulianelli S, Sahores A, Wargon V, Gongora A, Baldi A, et al. Mifepristone inhibits MPA- and FGF2-induced mammary tumor growth but not FGF2-induced mammary hyperplasia. *Medicina (B Aires).* 2010; 70: 529-532.
68. Rey-Roldan EB, Grillo CA, Pietranera L, Libertun C, Nicola AF, Piroli GG. Levonorgestrel antagonism on estrogen-induced pituitary tumors is mediated by progesterone receptors. *HormMetab Res.* 2008; 40: 245-250.
69. Lamb CA, Helguero LA, Fabris V, Lucas C, Molinolo AA, Lanari C. Differential effects of raloxifene, tamoxifen and fulvestrant on a murine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat.* 2003; 79: 25-35.
70. Lima-Hernández FJ, Beyer C, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Encarnación-Sánchez JL, Etgen AM, et al. Src kinase signaling mediates estrous behavior induced by 5 $\beta$ -reduced progestins, GnRH, prostaglandin E2 and vaginocervical stimulation in estrogen-primed rats. *Horm Behav.* 2012; 62: 579-584.
71. Proietti C, Salatino M, Rosembit C, Carnevale R, Pecci A, Kornblihtt AR, et al. Progestins induce transcriptional activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-dependent mechanism in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 4826-4840.
72. Fadem BH, Barfield RJ, Whalen RE. Dose-response and time-response relationships between progesterone and the display of patterns of receptive and proceptive behavior in the female rat. *Horm Behav.* 1979; 13: 40-48.
73. Tennets BJ, Smith ER, Davidson J. The effect of estrogen and progesterone on female rat proceptive behavior. *Horm Behav.* 1980; 14: 65-75.
74. Ahola TM, Alkio N, Manninen T, Ylikomi T. Progestin and G protein-coupled receptor 30 inhibit mitogen-activated protein kinase activity in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 2002; 143: 4620-4626.

Cite this article

González-Flores O, Gómora-Arrati P, García-Juárez M, Encarnación-Sánchez JL, Lima-Hernández FJ, et al. (2018) Intracerebral infusion of Levonorgestrel, but not other Synthetic Progestins, Induces Estrous Behavior Entirely through Progesterone Receptor. *J Pharmacol Clin Toxicol* 6(6):1124.