

UTILIDAD DE LOS AGONISTAS, MODULADORES SELECTIVOS Y ANTAGONISTAS PUROS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS EN ESTUDIOS MORFOFUNCIONALES DEL ÚTERO DE LA RATA

¹LINARES N, ¹MILLÁN Y, ²GARRIDO-GRACIA JC, ²AGUILAR R, ²GORDON A, ²SÁNCHEZ CRIADO JE, ¹MARTÍN DE LAS MULAS J.

RESUMEN

De acuerdo con el Instituto Nacional de la Salud, la especie murina es una de las especies más importantes en el estudio de la fisiología y de un gran número de procesos que tienen lugar en el organismo, tanto en la especie humana como en los animales. Se estima que en el 90-95 % de los estudios realizados en biomedicina se utilizan ratones y ratas.

En la rata, la función reproductora es debida a las hormonas esteroideas ováricas, estrógenos (E) y progesterona (P). Durante las distintas fases del ciclo estral, el útero sufre cambios morfológicos y funcionales que dependen de la acción de los E y la P y que incluyen la proliferación celular y la síntesis de receptores de progesterona en el epitelio, y la proliferación celular del estroma y su consecuente deciduización, respectivamente. La acción de los E y la P en el útero está mediada por receptores intracelulares, los receptores de E (RE) y los receptores de P (RP). Ambos receptores tienen dos isoformas, α y β para los RE y A y B para los RP. **Estudios previos realizados tanto en ratones knock-out (KO) para una de las isoformas del RE y las dos del RP, como en ratas ovariectomizadas (OVX) a las que se administran agonistas estrogénicos selectivos para una de las isoformas del RE, han revelado que la mayoría de**

¹Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas; ²Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología; Universidad de Córdoba.
e-mail: an1magoj@uco.es

las acciones de los E en el útero son mediadas por la isoforma α del RE, aunque en la actualidad el papel específico de cada una de las isoformas se conoce solo parcialmente. Tanto el conocimiento molecular del RE como los avances farmacológicos han permitido el desarrollo de nuevos agentes agonistas y antagonistas para las distintas isoformas del RE que hacen posible estudiar la acción que desempeña en el útero cada una de las isoformas del RE.

Palabras Clave: *rat, rata; uterus, útero; estrogens, estrógenos; progesterone, progesterona; estrous cycle, ciclo estral; ER α , ER β , RE α , RE β .*

CICLO SEXUAL EN LA RATA

Las ratas son animales poliestrales que presentan un ciclo reproductor (estral) ultracorto (Rothchild, 1981) de 4 días de duración. El ciclo estral se encuentra influenciado por factores ambientales como la longitud del fotoperiodo, la temperatura, la humedad ambiental o factores olfatorios (Sánchez-Criado y cols., 1982). El ciclo estral se divide en cuatro fases perfectamente diagnosticables mediante frotis vaginal: estro (día 1), metestro, diestro y proestro. En el estro, que dura aproximadamente 15 horas, se aprecian numerosas células epiteliales cornificadas y ausencia de infiltración leucocitaria en el frotis vaginal. En metestro, que dura 21 horas, el frotis vaginal está caracterizado por la aparición de infiltrado leucocitario junto con algunas células epiteliales cornificadas. Durante la fase de diestro, con una duración de algo más de 24 horas, el exudado vaginal está caracterizado por la presencia exclusiva de leucocitos. Finalmente, el día de proestro está caracterizado por la presencia de células epiteliales nucleadas, y dura aproximadamente 15 horas. Las células epiteliales nucleadas y cornificadas son un efecto directo de los E secretados por los folículos ováricos, mientras que la infiltración leucocitaria es un síntoma de acciones de E y/o P de origen lúteo. Durante los días de proestro y estro, pero fundamentalmente en el día de proestro, el útero se encuentra bajo los efectos de los E. Durante el metestro y diestro el útero está bajo los efectos de la P. La dependencia de las hormonas ováricas de las fluctuaciones morfológicas del útero se puede demostrar por ovariectomía. Tras ella desaparece la ritmicidad vaginal (anestro) y el útero sufre un proceso reversible de atrofia. El tratamiento sustitutivo con E y/o con P revierte los efectos de la ovariectomía sobre el útero y la vagina (Sánchez-Criado y cols., 1999).

REGULACIÓN HORMONAL DEL CICLO SEXUAL (EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO)

Durante los días de estro, metestro y diestro, la secreción de las gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH), se encuentra en niveles basales debido a la acción inhibidora (*feedback*-negativo) de las hormonas ováricas, fundamentalmente estradiol aunque también participan P e inhibinas (Freeman, 1988).

Por el contrario, en la tarde del día de proestro los E ejercen un *feedback*-positivo sobre el eje hipotálamo-hipofisario (a nivel de las secreciones de la hormona liberadora de gonadotropinas [GnRH] por neuronas GnRH y de LH y FSH por las células gonadotropas). Entre las acciones positivas de los E a nivel hipotalámico se pueden destacar: a) la participación junto a la GnRH en la síntesis de sus receptores a nivel hipofisario, b) la sensibilización de la hipófisis a la GnRH (de 20 a 50 veces), probablemente a través de un mecanismo post-receptor, c) la síntesis a nivel hipofisario e hipotalámico de RP, d) la regulación de la síntesis de la GnRH, colaborando en la aparición de la secreción preovulatoria del decapeptido hipotalámico y e) la disminución del metabolismo de la GnRH en la hipófisis, aumentando su efectividad (Fink, 1988). En la hipófisis, los E llevan a cabo sus acciones inhibidoras y estimuladoras sobre la secreción de gonadotropinas activando sus receptores en el gonadotropo, entre los que se encuentran diferentes tipos de localización e isoformas (intracelulares o de membrana, α ó β) (Alonso y cols., 2006).

Los E son esenciales para que se produzca la secreción preovulatoria de gonadotropinas, que podríamos considerar como la culminación de una serie de influencias positivas de los estrógenos en la hipófisis y el hipotálamo. Cuando la concentración de E supera un valor umbral, se produce un cambio en la actividad de las células gonadotropas, de tal manera que el *pool* de reserva pasa a ser *pool* de liberación y, en consecuencia, la GnRH provoca la liberación masiva de gonadotropinas. Esta liberación masiva se produce gracias al fenómeno de *self-priming*, que se define como el aumento en la magnitud de la respuesta de LH por la hipófisis frente al segundo de dos pulsos de GnRH de la misma magnitud y separados por un periodo de tiempo determinado. La frecuencia óptima de los pulsos de GnRH, para que tenga lugar la liberación masiva de LH en la rata, es aproximadamente de uno cada hora (Fink, 1995). Ningún otro neuropéptido o transmisor no peptídico presenta este fenómeno en la hipófisis o en otras células efectoras. No se conoce porqué la GnRH presenta esta propiedad única, aunque se piensa que podría estar relacionado con el hecho de que la secreción preovulatoria de LH es indispensable para la reproducción de las especies

(provoca luteinización de las células de la granulosa, rotura folicular y ovulación) y gracias a esta característica, una cantidad mínima de GnRH provoca una secreción no proporcional de LH, por lo que el proceso es muy económico y eficaz (Fink, 1995).

HISTOLOGÍA DEL ÚTERO

Histológicamente, el útero de la rata, como en la mayoría de las especies de mamíferos, está constituido por tres capas: la mucosa o endometrio, la muscular o miometrio y la serosa o perimetrio. El endometrio está constituido por un epitelio de superficie de tipo simple cilíndrico y una lámina propia de tejido conjuntivo. La lámina propia es muy celular y contiene las glándulas endometriales, que son glándulas tubulares simples ramificadas que se extienden hasta el miometrio. El endometrio se compone de 2 zonas que difieren tanto en la estructura como en la función, la capa superficial o zona funcional y la capa profunda o zona basal. La zona funcional degenera total o parcialmente durante el ciclo estral y se encuentra constituida por un epitelio de revestimiento de tipo simple cilíndrico y por una capa amplia de tejido conjuntivo vascularizado. Por otro lado, la zona basal es una capa delgada de tejido conjuntivo laxo vascularizado con menos células que la zona funcional que permanece persistente durante todo el ciclo. El miometrio se encuentra constituido por 2 capas de músculo liso, una capa interna con células dispuestas de forma circular y una capa externa dispuesta longitudinalmente, y entre ambas capas musculares se sitúa una capa de tejido conjuntivo - vascular que contiene grandes arterias, vasos linfáticos y venas. El perimetrio está constituido por tejido conjuntivo laxo recubierto por el mesotelio peritoneal en el que podemos encontrar fibras musculares lisas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (Priedkalns, 1993; Samuelson, 2007).

ACCIONES DE LOS ESTRÓGENOS Y LA PROGESTERONA EN EL ÚTERO

Durante las distintas etapas del ciclo estral, los diferentes compartimentos que constituyen el útero de la rata sufren cambios morfológicos y funcionales que dependen de la hormona ovárica que esté actuando en cada momento. Las concentraciones de hormonas ováricas no permanecen constantes durante todo el ciclo estral. Así, los E aumentan su concentración conforme se van desarrollando los folículos ováricos desde el final del día de estro del ciclo anterior, alcanzando su máxima concentración al inicio del día de proestro y disminuyendo al final del proestro para mantener sus niveles basales durante el resto del ciclo estral. Por el contrario, la P mantiene sus concentraciones máximas desde el final del metestro hasta el inicio del día de diestro.

En el útero, los E inducen proliferación celular en el epitelio de superficie y en el epitelio glandular del endometrio (Martin, 1980; Quarmby y Korach, 1984; Zhang y cols., 2005). Sin embargo, se ha observado que la proliferación de ambos epitelios endometriales tiene lugar durante las fases de metestro y diestro, es decir, no coincidiendo con la máxima concentración de E durante el ciclo, que tiene lugar desde finales del diestro hasta el final del proestro. Esto es debido a que la respuesta a los E en el útero es una respuesta tardía, que implica la activación de un gran número de genes así como complejas interacciones entre las diferentes células del estroma y del epitelio endometrial. Los E también inducen cambios morfológicos en el epitelio de superficie durante la fase de estro, que presenta células cilíndricas con el núcleo en posición basal y numerosas células en apoptosis. Estas últimas también se observan en el epitelio glandular. Además, los E inducen la proliferación del miometrio uterino, que tiene lugar, en el útero de la rata, durante el proestro, cuando las concentraciones de E son máximas. Por el contrario, la correlación existente entre la concentración de P y la proliferación de células epiteliales es totalmente inversa. Así, la P inhibe la proliferación celular inducida previamente por los E al inicio del metestro (Clark, 1971; Martin y cols., 1973; Couse y Korach, 1999).

Por otro lado, los cambios observados en el estroma endometrial durante las diferentes etapas del ciclo estral dependen, primero, de la estimulación por parte de los E ováricos, que inducen la expresión de RP en el estroma endometrial (Aronica y Katzenellenbogen, 1991) y después, de la secreción de P, que induce, al final de la fase de diestro, la proliferación y decidualización del estroma endometrial, que consiste en hipertrofia e hiperplasia celulares y edematización del tejido.

RECEPTORES DE ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA

Los E y la P ejercen su acción uniéndose a sus receptores específicos, RE y RP, respectivamente. Los RE y RP son receptores protéicos intranucleares cuya función es regular factores de transcripción de gran variedad de genes que se encuentran en los diferentes tejidos uterinos (Carson-Jurica y cols., 1990). Los niveles de receptores influyen en la respuesta celular a las hormonas esteroideas, mientras que, por su parte, las hormonas esteroideas son capaces de regular la expresión de receptores (Lee Kraus y Katzenellenbogen, 1993). Por ejemplo, los RE son regulados por los E (Manni y cols., 1981; Shupnik y cols., 1989) y la P (Hsueh y cols., 1976; Pavlik y Coulson, 1976). De igual modo, los RP también son regulados por los E y la P, en concreto, los E aumentan el número de RP en el tejido uterino y la P los disminuye (Milgrom, 1973; Nardulli y cols., 1988; Read y cols., 1988; Wei y cols., 1988).

Las acciones fisiológicas que desempeñan los E en el útero se encuentran mediadas por 2 tipos de RE, RE α y RE β (Katzenellenbogen y Korach, 1997; Kuiper y cols., 1997; Couse y Korach, 1999; Enmark y Gustafsson, 1999; Dechering y cols., 2000; Pettersson y Gustafsson, 2001). Aunque el papel específico de cada una de estas isoformas en el útero se conoce solo parcialmente, estudios previos han revelado que la mayoría de las acciones de los E en el útero están mediadas por los RE α (Frasor y cols., 2003), siendo los RE β solo responsables de mediar en algunos efectos de los E en el útero, entre los que se encuentra la expresión de RP (Weihua y cols., 2000, Kurita y cols., 2001) y la decidualización (Vallejo y cols., 2005) en el estroma endometrial.

Los datos conocidos actualmente sobre la acción que desempeña cada una de las isoformas del RE derivan, casi exclusivamente, del uso de ratones KO para una de las isoformas del RE, pero estos modelos de animales presentan algunas limitaciones que pueden complicar la interpretación de los resultados obtenidos. Se ha observado que, en ocasiones, este tipo de ratones puede llegar a desarrollar mecanismos de compensación que enmascaran la verdadera fisiología de los RE α y los RE β (Korach y cols., 1998), y en otras ocasiones, se han producido alteraciones en los perfiles hormonales que pueden influir en la respuesta a los E. Es por eso que una alternativa muy eficaz para el estudio de las acciones de las diferentes isoformas del RE es el uso de ratas OVX a las que se administran agonistas estrogénicos selectivos para cada una de ellas (Frasor y cols., 2003).

TIPOS DE AGENTES QUE INTERACCIONAN CON LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Los E realizan su acción en el tejido uterino al interactuar con una de las isoformas de los RE. La unión tiene lugar en una zona del receptor denominada dominio, provocando un cambio conformacional en el receptor, el cual pasa a un estado activado que le confiere la capacidad de interactuar directamente con el ADN y controlar así la expresión genética. Los conocimientos adquiridos sobre la estructura y la función de los RE en los últimos años han permitido el diseño de cientos de compuestos capaces de interactuar con los RE consiguiendo en ellos cambios conformacionales similares o totalmente diferentes a los que producen los E. Dentro del grupo de sustancias capaces de interactuar con los RE podemos encontrar:

1) Agonistas de los RE: Estas sustancias interactúan con todas las isoformas de los RE induciendo una acción similar a la que desempeñan los E endógenos en el organismo. El más conocido y el que se utiliza habitualmente es el benzoato de

estradiol (BE), que actúa a nivel del endometrio induciendo proliferación celular del epitelio endometrial y expresión de RP en el estroma endometrial.

2) Agonistas selectivos de los RE: Estas sustancias actúan interaccionando exclusivamente con una de las isoformas del RE (α y/o β) induciendo una acción agonista. Entre ellos encontramos el agonista estrogénico selectivo para el RE α , propylpirazoletriol (PPT) y el agonista estrogénico selectivos para el RE β , diarylpropionitrile (DPN). Se ha demostrado que el PPT es un potente agonista del RE α debido a que tiene una afinidad de unión 400 veces mayor al RE α que al RE β (Kraichely y cols., 2000; Stauffer y cols., 2000) mientras que, por el contrario, el DPN es un agonista selectivo para el RE β , presentando una afinidad de unión 70 veces mayor con el RE β que con la isoforma α del RE (Meyers y cols., 2001). Desde su descubrimiento, estos agonistas selectivos se han utilizado como alternativa al uso de ratones KO en estudios realizados para determinar el papel que desempeña cada una de las isoformas del RE.

3) Antagonistas de los RE: Actúan uniéndose a los RE bloqueando la acción de los E. De acuerdo con McGregor y Jordan (1998) los antiestrógenos pueden clasificarse en dos grupos:

a) Los antiestrógenos tipo I o SERMs tienen propiedades estrógenicas y antiestrógenicas en el laboratorio. Presentan una actividad agonista parcial o antagonista de la acción de los E dependiendo de la especie y tejido donde actúan (Bryant y Dere, 1998). Dentro de este grupo encontramos los derivados del trifeniletileno (como tamoxifeno, toremifeno, idoxifeno, o droloxifeno) y derivados del benzotiofeno (raloxifeno) (Bryant y Dere, 1998). Los más conocidos y estudiados, tamoxifeno (TX) y raloxifeno (RX), se usan con frecuencia en el tratamiento del cáncer de mama y la osteoporosis en la mujer, respectivamente. El TX también disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, la mayoría de los estudios descriptivos y estudios de cohorte realizados en la especie humana han demostrado que la acción agonista parcial que ejerce el TX a nivel endometrial aumenta el riesgo de cáncer endometrial en mujeres (Fornander y cols., 1989; Andersson y cols., 1991, 1992; Fisher y cols., 1998).

b) Los antiestrógenos de tipo II, o SERDs (Howell y cols., 2004) no presentan propiedades estrogénicas en los ensayos laboratoriales. Los antiestrógenos puros fueron descubiertos en la década de los ochenta por Wakeling y cols. (1987). Todos ellos presentan la capacidad de unirse al RE y no tener actividad estrogénica, tanto *in vitro* como *in vivo*, en ninguna de las especies estudiadas o tejidos, incluyendo todos los tejidos que actúan como diana para los E como el útero, la glándula mamaria, el ovario y el hueso. Entre los diferentes compuestos que han demostrado tener una

actividad antiestrogénica pura están los derivados del 17β -estradiol, como ICI 164384, ICI 182780, RU58668 y EM-139. La mayor utilidad de los antiestrógenos puros en la actualidad es su uso como tratamiento contra el cáncer de mama avanzado o resistente al TX, aunque podría ser también de aplicación en el futuro en ginecología y en algunas enfermedades benignas (Gradishar y Jordan, 1997). Su acción en el útero bloquea el crecimiento uterino, disminuye el tamaño y el volumen del endometrio y el miometrio, atrofia el endometrio e inhibe el crecimiento tumoral.

Los antiestrógenos puros y los SERMs se diferencian principalmente en su mecanismo de acción, aunque ambos actúan mediante la unión con las dos isoformas de los RE. Los SERMs compiten con el estradiol en su unión con el RE, pero forman con este un complejo que mantiene una parte de su actividad transcripcional debido a que los cambios que inducen en la estructura terciaria del receptor son imperfectos, presentando como consecuencia una actividad biológica que va desde el antagonismo completo hasta el agonismo parcial. Los antiestrógenos puros también actúan como inhibidores competitivos del estradiol, pero bloquean por completo la acción del RE impidiendo la dimerización del complejo receptor-ligando, bloqueando su unión con el ADN y como consecuencia la activación genética (Fawell y cols., 1990), formando una unidad de transcripción metabólicamente inactiva tras su unión al ADN (Pink y Jordan, 1996) o directamente disminuyendo los niveles de RE intracelulares (Wakeling, 2000).

MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LOS RECEPTORES HORMONALES

Los métodos utilizados en la detección de receptores de hormonas esteroideas se pueden clasificar en dos tipos: los métodos basados en la unión al receptor de la hormona con trazador (métodos bioquímicos) y los métodos basados en la unión al receptor de un anticuerpo específico (métodos inmunohistoquímicos, IHQ) (Greene y cols., 1980; Greene y cols., 1988; Goussard, 1998).

Tradicionalmente se han utilizado de forma rutinaria los métodos bioquímicos para la detección de receptores de hormonas esteroideas, pero debido a su coste y a que son poco accesibles en la práctica diaria, se han ido sustituyendo hasta que, en la actualidad, se utilizan casi exclusivamente los métodos IHQ para la detección de receptores de hormonas esteroideas (De Mascarel y cols., 1995; MacGrogan y cols., 1996; Allred y cols., 1998).

Todos los métodos IHQ que se utilizan rutinariamente en la detección de receptores de hormonas esteroideas son de tipo puente y se basan en la unión no inmunológica entre la avidina o la estreptavidina y la biotina (particularmente el de la Avidina-Biotina- Peroxidasa ó ABC), y se aplican sobre muestras de tejido procesadas rutinariamente (fijadas en formol e incluidas en parafina) utilizando métodos de desenmascaramiento antigénico por calor (De Negri y cols., 1991; Soomro y cols., 1992; Wilbur y cols., 1992; Goldberg y cols., 1994; 1994; Katoh y cols., 1997).

CONCLUSIÓN

El estudio de los distintos agonistas, moduladores selectivos y antagonistas puros del RE en la rata OVX es buena alternativa al uso de ratones KO, ya que permite conocer la función que desempeñan los RE y cada una de sus isoformas en los cambios morfológicos y funcionales que se producen durante las distintas etapas del ciclo estral en el útero. Por otro lado, la detección inmunohistoquímica de los receptores de estrógenos permite identificar de forma precisa las células de los distintos estratos uterinos y la cantidad de receptores implicados en cada momento del ciclo estral.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con financiación de la Junta de Andalucía (P07-CVI-2559) y del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2008-0048).

BIBLIOGRAFÍA

- Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Palbiology* 11:155-168, 1998.
- Alonso R., Marín F., González M., Guelmes P., Bellido C., Hernández G., Marín R., Díaz M. y Sánchez-Criado J.E. The hypothalamus-pituitary-ovarian axis as a model system for the study of SERM effects: An overview of experimental and clinical studies. En: *Selective estrogen receptor modulators. A new brand of multitarget drugs*. Cano A., Calaf i Alsina J. y Dueñas-Diez J.L. (Eds.). Springer, Germany, capítulo 5, págs. 103-139, 2006.
- Andersson M., Storm H.H., Mouridsen H.T. Carcinogenic effects of adjuvant tamoxifen treatment and radiotherapy for early breast cancer. *Acta Oncology* 31:259-263, 1992.
- Andersson M., Storm H.H., Mouridsen H.T. Incidence of new primary cancers after adjuvant tamoxifen therapy and radiotherapy for early breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 83:1013-1017, 1991.
- Aronica S.M. y Katzenellenbogen B.S. Progesterone receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, and insulin-like growth factor I and suppression by antiestrogens and protein kinase inhibitors. *Endocrinology* 128:2045-2052, 1991.

- Bryant H.U. y Dere W.H. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *Proc. Soc. Exp Biol. Med* 217:45-52, 1998.
- Carson-Jurica M.A., Schrader W.T., O'Malley B.W. Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrine Review* 11:201-220, 1990.
- Clark B.F. The effects of estrogen and progesterone on uterine cell division and epithelial morphology in spayed, adrenalectomized rats. *Journal of Endocrinology* 50:527-528, 1971.
- Couse J.F. y Korach K.S. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews* 20:358-417, 1999.
- De Mascarel I., Soubeyran I., MacGrogan G., Wafflart J., Bonichon F., Durand M., Avril A., Mauriac L., Trojani M., de Coindre J.M. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in 938 breast carcinomas. Concordance with biochemical assay and prognostic significance. *Applied Immunohistochemistry* 3:222-231, 1995.
- De Negri F., Campani D., Sarnelli R., Martini L., Gigliotti A., Bonacci R., Fabbri R., Squartini F., Pinchera A., Gianci C. Comparison of monoclonal immunocytochemical and immunoenzymatic methods for steroid receptor evaluation in breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 96:53-58, 1991.
- Dechering K., Boersma C., Mosselman S. Estrogen receptors α and β : two receptors of a kind? *Current Medicinal Chemistry* 7: 561-576, 2000.
- Enmark E. y Gustafsson J. Oestrogen receptors-an overview. *Journal of Internal Medicine* 246:133-138, 1999.
- Fawell S.E., White R., Hoare S., Sydenham M., Page M., Parker M.G. Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proceeding of the National Academic of Sciences of the USA* 87:6883-6887, 1990.
- Fink G. Gonadotropin secretion and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. & Dely J.D. (Eds.) Raven Press, págs 1349-1378, 1988.
- Fink G. The self-priming effect of LHRH: A unique servomechanism and possible cellular model for memory. *Frontiers in Neuroendocrinology* 16: 183-190, 1995.
- Fisher B., Costantino J.P., Wickerhman L., Redmond C.K., Kavanahk M., Cronin W.M. Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J. Natl. Cancer Inst.* 90:1371-1388, 1998.
- Fornander T., Rutqvist L.E., Cedermark B., Glas U., Mattsson A., Silfversward C. Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: Occurrence of new primary cancers. *Lancet* 1(8630):117-120, 1989.
- Frasor J., Barnett D.H., Danes J.M., Hess R., Parlow A.F., Katzenelenbogen B. S. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) α activity by ER β in the uterus. *Endocrinology* 144:3159-3166, 2003.
- Freeman M.E. The ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. & Nelly J.D (Eds.) Raven Press, págs 1893-1928, 1988.
- Goldberg D.E., Stuart J., Koerner F.C. Progesterone receptor detection in paraffin sections of human breast cancer by an immunoperoxidase technique incorporating microwave heating. *Modern Pathology* 7:401-406, 1994.
- Goussard J. Paraffin section immunocytochemistry and cytosol-based ligand-binding assay for ER and PR detection of breast cancer: the time has come for more objectivity. *Cancer Letters* 132:61-66, 1998.
- Gradishar W.J. y Jordan V.C. Clinical potential of new antiestrogens. *Journal of Clinical Oncology* 15:840-852, 1997.
- Greene G.L., Harris K., Bova R., Kinders R., Moore B. Nolan C. Purification of T47D human progesterone receptor and immunochemical characterization with monoclonal antibodies. *Molecular Endocrinology* 2:714-726, 1988.

- Greene G.L., Nolan C., Engler J.P., Jensen E.V. Monoclonal antibodies to human estrogen receptors. *Proceeding of the National Academic of Sciences of the USA* 77:5115-5119, 1980.
- Howell S.J., Johnston S.R.D., Howell A. The use of selective estrogen receptor modulators and selective estrogen receptor down-regulators in breast cancer. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 18:47-66, 2004.
- Hsueh A.J.W., Peck Jr. E.J., Clark J.H. Control of uterine estrogen receptor levels by progesterone. *Endocrinology* 98:438-444, 1976.
- Katoh A.K., Stemmler N., Specht S., Dámico F. Immunoperoxidase staining for estrogen and progesterone receptors in archival formalin fixed, paraffin embedded breast carcinomas after microwave antigen retrieval. *Biotechnic and Histochemistry* 72:291-298, 1997.
- Katzenellenbogen B.S. y Korach K.S. A new actor in the estrogen receptor drama-enter ER- β . *Endocrinology* 138:861-862, 1997.
- Korach K., Gustafsson K.A., Smithies O. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proceeding Of the National Academic of Sciences of the USA* 95:1677-1682, 1998.
- Kraichely D.M., Sun J., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S. Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor- α and estrogen receptor- β : Correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology* 141:3534-3545, 2000.
- Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β : *Endocrinology* 138:863-870, 1997.
- Kurita T., Lee K., Saunders P.T., Cooke P.S., Taylor J.A., Lubahn D.B., Zhao C., Makela S., Gustafsson J.A., Dahiya R., Cunha G.R. Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor- α knockout mouse. *Biology of Reproduction* 64:272-283, 2001.
- Lee Kraus W. y Katzenellenbogen B.S. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: Modulation of estrogen action by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology* 132:2371-2390, 1993.
- MacGregor J. y Jordan V.C. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacological Review* 50:151-196, 1998.
- MacGrogan G., Subeyran I., de Mascarel I., Wafflart J., Bonichon F., Durand M., Avril A., Maurac L., Trojani M., Coindre J.M. Immunohistochemical Detection of Progesterone Receptors in Breast Invasive Ductal Carcinomas. *Applied Immunohistochemistry* 4:219-227, 1996.
- Manni A., Baker R., Arafah B.M., Pearson O.H. Uterine oestrogen and progesterone receptors in the ovariectomized rat. *Journal of Endocrinology* 91:281-287, 1981.
- Martín L. Estrogens, antiestrogens and the regulation of cell proliferation in the female reproductive tract in vivo. En: *Estrogens in the Environment*. McLachlan J.A. (Ed.). Elsevier, North Holland, Inc, New York, págs. 103-130, 1980.
- Martin L., Das R.M., Finn C.A. The inhibition by progesterone of uterine epithelial proliferation in the mouse. *Journal of Endocrinology* 57:549-554, 1973.
- Martin L., Finn C.A., Trinder G. Hypertrophy and hyperplasia in the mouse uterus after oestrogen treatment: an autoradiographic study. *Journal of Endocrinology* 56:133-144, 1973.
- Meyers M.J., Sun J., Carlson K.E., Marriner G.A., Katzenellenbogen B.S., Katzenellenbogen J.A. Estrogen receptor- β potency selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *Journal of Medicinal Chemistry* 44:4230-4251, 2001.
- Milgrom E., Thi M.T.; Atger M.; Baulieu E.E. Mechanism regulating the concentration and conformation of progesterone receptor(s) in the uterus. *The Journal of Biological Chemistry* 248:6366-6374, 1973.

- Nardulli A.M., Greene G.L., O'Malley B.W., Katzenellenbogen B.S. Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: Analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology* 122:935-944, 1988.
- Pavlik E.J. y Coulson P.B. Modulation of estrogen receptors in four different target tissues: differential effects of estrogen vs progesterone. *Journal of Steroid Biochemistry* 7:369-376, 1976.
- Pettersson K. y Gustafsson J.A. Role of estrogen receptor β in estrogen action. *Annual Review of Physiology* 63:165-192, 2001.
- Pink J.J. y Jordan V.C. Models of estrogen receptor regulation by estrogens and antiestrogens in breast cancer cell lines. *Cancer Research* 56:2321-2330, 1996.
- Priedkalns J. Sistema reproductor femenino. En: *Histología veterinaria*. Dieter Dellman H. (Ed.). Acirbia, Zaragoza, capítulo 13, págs. 267-290, 1993.
- Quarmby V.E. y Korach K.S. The influence of 17 β -estradiol on patterns of cell division in the uterus. *Endocrinology* 114:694-702, 1984.
- Read L.D., Snider C.E., Mille J.S., Greene G.L., Katzenellenbogen B.S. Ligand-modulated regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in human breast cancer cells lines. *Molecular Endocrinology* 2:263-271, 1988.
- Rothchild I. The Regulation of the mammalian corpus luteum. *Recent Progress in Hormona Research* 37:183-298, 1981.
- Samuelson A. Female reproductive system. En: *Textbook of veterinary histology*. Samuelson A. (Ed.). Elsevier, Philadelphia, capítulo 19, págs. 442-486, 2007.
- Sánchez Criado J.E. Fisiología del ovario. En: *Fisiología Humana*. Tresguerrres J.A.F. (Ed.). MacGraw Hill- Interamericanan págs 1020-1032, 1999.
- Sánchez Criado J.E. Involvement of the vomeronasal system in the reproductive physiology of the rat: En: *Olfaction and Endocrine Regulation*. Breipohl W. (Ed). IRL press, Ltd., págs 209-221, 1982.
- Shupnik M.A., Gordon M.S., Chin W.W. Tissue-specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Molecular Endocrinology* 3:660-665, 1989.
- Soomro S., Shousha S., Sinnott H.D. Oestrogen and progesterone receptors in screen-detected breast carcinoma: An immunohistological study using paraffin sections. *Histopathology* 21:543-547, 1992.
- Stauffer S.R., Coletta C.J., Tedesco R., Nishiguchi G., Carlson K., Sun J., Katzenellenbogen B.S., Katzenellenbogen J.A. Pyrazole ligands: Structure-affinity/activity relationships and estrogen receptor- α -selective agonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 43:4934-4947, 2000.
- Vallejo G., Ballaré C., Lino Baraño J., Beato M., Saragüeta P. Progesterin activation of nongenomic pathways via cross talk of progesterone receptor with estrogen receptor β induces proliferation of endometrial stromal cells. *Molecular Endocrinology* 19:3023-3037, 2005.
- Wakeling A.E. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocrine-related Cancer* 7:17-28, 2000.
- Wakeling A.E. y Bowler K. Steroidal pure antioestrogens. *Journal of Endocrinology* 112:7-10, 1987.
- Weihua Z., Saji S., Makinen S., Cheng G., Jensen E.V., Warner M., Gustafsson J.A. Estrogen receptor (ER) β a modulator of RE α in the uterus. *Proceeding of the National Academic Sciences of the USA* 97:5936-5941, 2000.
- Wei L.L., Krett N.L., Francis M.D., Gordon D.F., Wood W.M., O'Malley B.W., Horwitz K.B. Multiple human progesterone receptor messenger ribonucleic acids and their autoregulation by progesterin agonists and antagonist in breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 2:62-72, 1988.
- Wilbur D.C., Willis J., Mooney R.A., Fallon M.A., Moynes R., di Sant'agnese P.A. Estrogen and progesterone receptor detection in archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from breast

carcinoma: A comparison of immunohistochemistry with the dextran-coated charcoal assay. *Modern Pathology* 5:79-84, 1992.

Zhang H., McElrath T., Tong W., Pollard J.W. The molecular basis of tamoxifen induction of mouse uterine epithelial cell proliferation. *Journal of Endocrinology* 184:129-140, 2005.