

03062  
10  
2eje.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**EFEECTO ANTIPROGESTACIONAL DE LOS METABOLITOS  
REDUCIDOS EN EL ANILLO A DE LA NORETISTERONA A  
NIVEL GENOMICO.**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:**

**Maestra en Investigación Biomédica Básica**

**Presenta:**

**Biol. Ana María Pasapera Limón.**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue dirigido por el Dr. Marco Antonio Cerbón y el Dr. Gregorio Pérez-Palacios el cual se desarrolló en el Laboratorio de Endocrinología Molecular de Departamanto de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán con el apoyo de Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS).

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer particularmente al Dr. Marco Antonio Cerbón por la confianza que me dió al darme la libertad suficiente en la conducción de este trabajo estando siempre presente y dando consejo en los momentos de decisiones importantes así como su apoyo amistoso que he recibido en todo momento.

Al Dr. Gregorio Pérez-Palacios por su asesoría y sus valiosos comentarios los cuales contribuyeron grandemente a mejorar el presente trabajo así como el apoyo que me ha dado durante este período tan difícil que es mi formación académica.

A Elizabeth Langley, Ivone Castro, Rubén Gutierrez, Juanita González Ignacio Camacho y a todas aquellas personas con quién compartí muchos momentos muy agradables durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Edwin Milgrom por el estandar de UTG, por el anticuerpo Anti-UTG así como por el cDNA gentilmente donados.

Al Dr. Gustavo A. García de la Mora por la síntesis de los metabolitos reducidos de la NET empleados en este trabajo.

Al Dr. Carlos Villagrán por las facilidades otorgadas para la obtención de los animales utilizados en este trabajo.

A los Doctores Guillermo Alfaro y Lino Díaz de León quienes fueron miembros de mi comité tutorial en el transcurso de este trabajo y que sus valiosos comentarios ayudaron a mejorarlo.

Al PUIS por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

A los miembros del jurado quienes me hicieron el honor de revisar este trabajo: Dr. Gregorio Pérez-Palacios, Dr. Marco A. Cerbón, Dr. Alejandro García Carranca, Dr. Lino Díaz de León y Dr. Horacio Merchant

A los Laboratorios Roussel Uclaf por el RU 486.

**A mis Padres con todo mi amor y admiración.**

**A mis hermanos y sobrinos con todo mi cariño.**

**A Juan por todo su amor y su apoyo.**

## RESUMEN

La noretisterona (NET) es una progestina sintética capaz de inducir la síntesis y secreción de Uteroglobina (UTG) de una manera similar a como lo hace la Progesterona (P<sub>4</sub>). Esta progestina se biotransforma en órganos blanco dando como productos los metabolitos 5 $\alpha$ -DHNET y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -DHNET, los cuales son capaces de unirse a otros receptores hormonales diferentes al de P<sub>4</sub>, induciendo efectos biológicos.

Estudios preliminares de nuestro laboratorio han demostrado que el 5 $\alpha$ -DHNET un metabolito natural de la NET, aún cuando conserva una afinidad relativa por el receptor de P<sub>4</sub> (RP), exhibe, después de su administración, un efecto progestacional mínimo, evaluado a través del modelo de UTG, lo que sugirió que la interacción del 5 $\alpha$ -DHNET con el RP produjera un efecto antiprogestacional.

En el presente trabajo se evaluó la actividad de tipo progestacional y/o antiprogestacional inducida por la administración de dos metabolitos reducidos en el anillo A de NET (5 $\alpha$ -DHNET y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET) sólo o en combinación con P<sub>4</sub>, utilizando como modelo experimental la expresión del gen de UTG en el útero de la coneja prepúber.

Los resultados obtenidos indicaron que la administración durante cinco días consecutivos de 5 $\alpha$ -DHNET (0.5mg/Kg peso/día) en forma simultánea con P<sub>4</sub> (1.0 mg/Kg peso/día) incrementaron el contenido uterino de UTG y de su RNAm en la coneja, mientras que a dosis altas (>2.5mg/kg peso/día)lo disminuyeron significativamente (p > 0.005). Esta observación demuestra que la 5 $\alpha$ -DHNET modula la acción de P<sub>4</sub> en el útero en una forma dual dosis-dependiente y muy posiblemente al nivel transcripcional del gen de UTG. Sin embargo, no pudo ser descartada la posibilidad de que este efecto modulador del 5 $\alpha$ -DHNET pueda ser mediado por su metabolito reducido, el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET, el cual posee actividad estrogénica.

Para determinar la participación del 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET en este mecanismo, se realizaron estudios complementarios. Los resultados indicaron que la administración simultánea del 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET y P<sub>4</sub> a la misma dosis (1.0 mg/Kg peso/ día) inhibió la expresión del gen de UTG en el útero de la coneja prepúber. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con la administración simultánea de estradiol y P<sub>4</sub> o de RU 486 y P<sub>4</sub>.

Finalmente, se evaluó el efecto de los metabolitos reducidos de NET sobre la expresión del gen del RP en el útero de la rata. Los resultados indicaron que mientras que la administración de  $P_4$  induce un efecto de regulación a la baja (down-regulation) sobre su propio receptor, la administración del  $5\alpha$ -DHNET y del  $3\beta,5\alpha$ -THNET no modifican el contenido uterino del RP ni de su RNAm.

El análisis de estos resultados en conjunto, permiten concluir que la reducción enzimática de la molécula de NET modifica significativamente la expresión de los genes de UTG y RP en el útero de la coneja. En efecto, la  $5\alpha$ -DHNET pierde su actividad progestacional y adquiere actividad anti-progestacional. Los mecanismos involucrados en este cambio dramático en la actividad biológica de  $5\alpha$ -DHNET incluyen una actividad anti-hormonal intrínseca de esta molécula complementada con el efecto estrogénico de su derivado metabólico  $3\beta,5\alpha$ -THNET.

Será de interés investigar, en el futuro, si el efecto antiprogestacional de  $5\alpha$ -DHNET y  $3\beta,5\alpha$ -THNET descrito en este trabajo correlaciona con efectos antiimplantación.

El significado fisiológico de estos hallazgos es por lo tanto relevante al abrir nuevas opciones o estrategias en la búsqueda de agentes anti-hormonales para la regulación de la fertilidad poscoito.

## INTRODUCCION

### LA NORETISTERONA

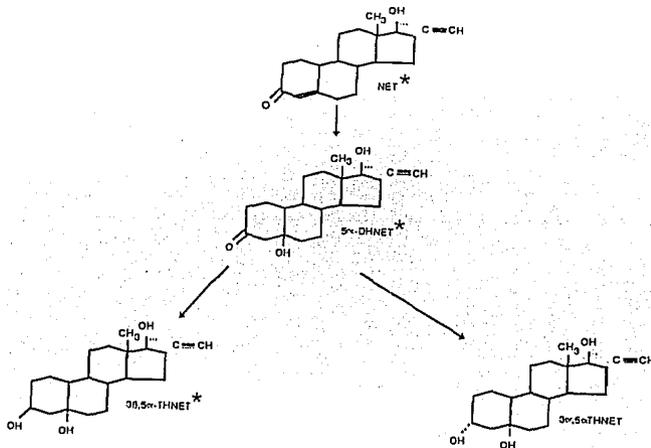
Se ha demostrado que las progestinas sintéticas se biotransforman a nivel de los órganos blanco y que los productos de transformación metabólica pueden interactuar con receptores localizados dentro de las células blanco. El efecto biológico de estas interacciones puede resultar en actividades agonistas, antagonistas y/o sinergistas, dependiendo de la naturaleza del receptor al que se unen (1,2). Estas progestinas se han clasificado en dos grupos de acuerdo a su estructura química: Las que derivan de la molécula 17-Hidroxi-progesterona (vgr: acetato de medroxiprogesterona, acetato de clormadinona) y aquellas que derivan de la 19-nortestosterona (3).

Dentro de este último grupo se encuentra la Noretisterona o NET (17 $\alpha$ -etilnil-17 $\beta$ -hidroxi-4-estrén-3-ona), la cual es ampliamente utilizada en diversas formulaciones empleadas en la regulación de la fertilidad y terapia clínica debido a sus propiedades biológicas (4).

En experimentos llevados a cabo en varias especies de mamíferos ha quedado demostrado que la NET presenta una gama de efectos hormonales (5), los cuales son el resultado de las interacciones de los diferentes productos de bioconversión de NET con los receptores a hormonas esteroideas sexuales (6,7).

A través de diversos estudios bioquímicos se ha establecido que la NET se metaboliza tanto *in vitro* como *in vivo*, a nivel de órganos blanco y que los productos de transformación metabólica son principalmente 5 $\alpha$ -reducidos (8). Varios estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los

metabolitos  $5\alpha$ -reducidos ( $5\alpha$ -DHNET) se unen a los receptores para andrógenos (RA) y  $P_4$  y que los metabolitos tetrahidrorreducidos ( $3\beta,5\alpha$ -THNET) interaccionan con los receptores para estrógenos (RE).



**Biotransformación metabólica de la molécula de Noretisterona (NET) en los órganos blanco.** La NET  $^3\text{H}$  se incubó *in vitro* con preparaciones de hipófisis, hipotálamo y próstata ventral de rata, los metabolitos resultantes de la conversión metabólica de la molécula fueron  $5\alpha$ -DHNET y dos metabolitos tetrahidro reducidos  $3\beta,5\alpha$  y  $3\alpha,5\alpha$ -THNET. Aquellos marcados con \* poseen la capacidad de interactuar con los receptores a hormonas esteroides sexuales.

Las características de unión de estos metabolitos con los receptores citoplasmáticos ya han sido informadas (6). La NET intacta se une con alta afinidad al RP y produce efectos biológicos a nivel de órganos blanco, el  $5\alpha$ -

DHNET también se une al RP, aunque con menor afinidad, así como al RA (9); sin embargo, los efectos biológicos resultantes de estas interacciones no han sido del todo evaluados. El metabolito  $3\beta,5\alpha$ -THNET se une específicamente al RE dando por resultado un efecto típicamente estrogénico (10).

ESTEROIDE	RECEPTOR	EFEECTO HORMONAL
NET	RP,RA	Agonista
$5\alpha$ -DHNET	RP,RA	Antagonista ?
$3\beta,5\alpha$ -THNET	RE	Agonista

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que la NET es capaz de inducir la síntesis y secreción de UTG de una manera importante (11), similar a la reportada para P4 (12). También se demostró que el metabolito  $5\alpha$ -DHNET, que presenta una afinidad moderada por el RP ( $2.0 \times 10^{-7}$  M), no ejerce el efecto biológico inherente al receptor que la une; sino por el contrario, pareciera ser que el resultado de esta interacción se traduce en un efecto de tipo inhibitorio para la inducción de la síntesis de UTG (13).

En 1979, Reel y col.(14) evaluaron por el método de McPhail (15), el efecto progestacional producido por los derivados de la 19-nortestosterona. Entre estos compuestos evaluaron las propiedades de unión de la  $5\alpha$ -DHNET

al RP y la respuesta biológica después de su administración. Ellos reportaron que el 5 $\alpha$ -DHNET producía un efecto antagonista a la acción de la P<sub>4</sub>; ya que no encontraron ninguna correlación entre la afinidad por RP y la actividad biológica de la progestina.

En base a esos resultados y aquellos obtenidos en nuestro laboratorio se planteó la siguiente hipótesis:

### **HIPOTESIS**

La reducción en el anillo A de la molécula de NET resulta en la disminución significativa de la potencia progestacional intrínseca de la molécula de tal forma que la 5 $\alpha$ -DHNET adquiere un efecto antagonista de P<sub>4</sub> y por lo tanto una inhibición en la expresión del gen de UTG.

### **MECANISMO GENERAL DE ACCION DE LAS ANTIPROGESTINAS.**

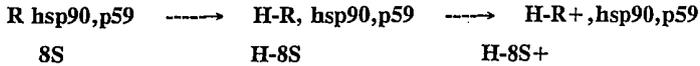
Se ha demostrado que el primer paso en el modo de acción de las antiprogestinas es su interacción con los RP (16) y para estudiar su modo de acción, varios cientos de dichas progestinas han sido sintetizadas, pero a la fecha , solo una, el mifepristone (RU-486), ha sido ampliamente estudiado tanto en animales de laboratorio como en el humano (17). Muchos estudios realizados con el RU-486 han sido enfocados para profundizar en el modo de acción a nivel molecular de las progestinas, así como sus efectos a nivel fisiológico.

Los mecanismos moleculares a través de los cuales esta antiprogestina lleva a cabo sus efectos, han sido motivo de estudio en los últimos años (18).

Para un mejor entendimiento del mecanismo de acción de una

antiprogestina, es importante conocer el modo de acción de la progestina, en el siguiente esquema se muestra el mecanismo general de acción hormonal.

hsp90,p59



H-R+ 4s

H=Hormona; R=Receptor; hsp="heat shock protein" P.M.90,000, p59.

Cuando una célula blanco recibe un estímulo con una hormona, ésta se une a un receptor intracelular específico formando el complejo hormona-receptor (H-R). Después de este evento, ocurre una transformación física importante, el receptor se vuelve más pequeño (de 8s a 4s), y se separan las proteínas hsp90 y p59 que están presentes en forma hetero-oligomérica (19,20). Esta transformación correlaciona de una forma directa con la afinidad elevada del receptor por el núcleo en el cual se une a elementos reguladores dentro del DNA (HRE) , a través de su dominio de unión al DNA (DBD).

Se ha observado que después de que el complejo H-R se ha unido al DNA ocurren dos eventos principales:

El primero es un efecto a nivel de la cromatina, donde se ha demostrado que en el caso del receptor de glucocorticoides (RG), la unión del complejo H-RG al DNA altera la estructura de la cromatina , específicamente al nucleosoma que contiene HREs para glucocorticoides (GRE) a nivel de la región del promotor (21).

Este cambio en la conformación de la cromatina, puede provocar que se modifique el acceso de los factores de transcripción al DNA de una manera positiva, para que se inicie la transcripción (22).

El segundo evento importante que sucede, es que la unión del receptor al DNA no tiene consecuencias en la sobreexpresión de los factores de transcripción.

Los factores de transcripción que regulan el proceso hormonal no sólo difieren en los elementos de cis-transactivación a los cuales se unen (activando o bloqueando la transcripción), sino que también son diferentes tanto cualitativa como cuantitativamente, lo cual depende del tipo celular al que pertenezcan. El papel que ellos tienen es el de factores limitantes para la actividad del receptor, situación que es crítica para la respuesta que estos receptores puedan presentar.

La unión del receptor al DNA entonces, puede facilitar la interacción de los factores de transcripción con sus sitios blanco, y con otros factores de transcripción para dar inicio a la transcripción.

En resumen podemos decir que el paso más inmediato después de que la P<sub>4</sub> se une al receptor, es el cambio conformacional que sufre la cromatina, la liberación de hsp90 (la cual está unida en una región cercana al dominio de unión al ligando (LBD)), provocando cambios en la región LBD. De esta forma los receptores se convierten en activadores transcripcionales, que a su vez pueden interactuar con otros factores de transcripción, desencadenando así el inicio de la transcripción de un gen que contiene dentro de las secuencias aledañas al promotor, elementos de respuesta a estos receptores (23,24).

## LA UTEROGLOBINA COMO MODELO DE ACCION PROGESTACIONAL.

La UTG es una proteína de secreción endometrial cuya expresión es regulada por la  $P_4$  (25); su peso molecular es de 14 kDa y se encuentra en las secreciones uterinas de la coneja. Es secretada principalmente durante los primeros 12 días de la gestación y sus niveles máximos se alcanzan el quinto día (26).

Se ha demostrado que la  $P_4$  administrada sola, tiene efectos importantes sobre la síntesis de UTG tanto a nivel de la transcripción como de la traducción, de tal forma que el contenido de UTG y de su RNAm se eleva (27). Sin embargo, los efectos provocados por  $E_2$  son principalmente a nivel de la transcripción y de una manera dosis-dependiente (28).

La expresión del gen de UTG ha sido ampliamente utilizada como modelo para evaluar la actividad progestacional de diversos compuestos, así como también ha sido utilizada para estudiar los efectos de varias anti-hormonas (29). Se ha demostrado que el RU-486 bloquea completamente la activación transcripcional inducida por  $P_4$  y que el tamoxifen inhibe la estimulación inducida por la administración de dosis bajas de estradiol (30,31).

### OBJETIVOS.

1. Evaluar la actividad antiprogestacional de la  $5\alpha$ -DHNET a través del modelo de la UTG.
2. Explorar los mecanismos involucrados en este cambio en el efecto progestacional de la molécula de NET, cuando es reducida en la posición 5 del anillo A.

## JUSTIFICACION

Los estudios enfocados al modo de acción de las hormonas esteroides han sido de gran importancia en el diseño de nuevas moléculas esteroidales con capacidad anticonceptiva y/o contraceptiva.

Debido al papel crucial que juega la  $P_4$  en la función reproductiva, el diseño o descubrimiento de antagonistas de  $P_4$  (antiprogestinas), los cuales actúan a través del bloqueo de los receptores celulares a la hormona en los órganos blanco, tienen un papel importantísimo no solo en la regulación de la fertilidad y terapia clínica, sino también en el estudio del modo de acción tanto de agonistas como de antagonistas a la acción de la  $P_4$ .

## MATERIALES Y METODOS.

### ANIMALES.

A lo largo de este trabajo se utilizaron conejas prepúberes de Nueva Zelanda (1.0 0.2 Kg.) las cuales fueron obtenidas del Bioterio de los Laboratorios de Salud de la Secretaría de Salubridad y Asistencia. Estos animales fueron separados en grupos (n= 5), donde cada grupo fue sujeto a diferente esquema de tratamiento. Durante el período experimental, los animales fueron alimentados *ad libitum* y en condiciones normales de luz y oscuridad.

### REACTIVOS.

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de la casa comercial Sigma Chemicals (St. Louis Mo.).

Ribonucleasa A (R-4875), Agarosa tipo II (A-6877), Glicina (G-1775), Trizma base (T-1503), Tris-Hcl (T-3253), Lauril Sulfato de Sodio (L-4509), HEPES (H-3375), Azul brillante de Coomasie (B-1131), Albúmina sérica de bovino (A-4503), Glicerol (G-7757), Propilenglicol (P-4792), Progesterona (P-0130), Noretisterona (N-4128), Estradiol (E-8875), Lactoperoxidasa liofilizada (L-2130), Bromuro de Etidio (E-8751), Sephadex G-50 (G-50-300). Sephadex G-100 (G-100-120), Sacarosa (S-9378), Formamida (7503). Azul de Bromofenol (B-6131), Sulfato de Amonio (A-4915), Acetato de Amonio (A-7262), EDTA (E-3218), Cloruro de Litio (L-0505), Aprotinina (A-4529).

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Richmond CA):

Acrilamida (161-0101), Bisacrilamida (161-0201), Azul de bromofenol (161-0404), TEMED (161-0801), Persulfato de Amonio (161-0700), Azul Brillante de Coomasie R-250 (161-0400), Marcadores de peso moléculár (161-0304), y  $\beta$ -mercaptoetanol (161-07010).

De Pharmacia Fine Chemicals. (Uppsala, Suecia) se obtuvieron los siguientes:

Ficol 400 (17-0400-02), Sephadex G-25 (17-0032-02).

El sistema de marcaje de DNA (8187 SA), Cloruro de Calcio (1511), Tioyanato de Guanidina (11049), y todas la enzimas de restricción empleadas en este trabajo se obtuvieron de la casa comercial BRL (Bethesda Research Laboratories).

El fenol líquido Q.P. (2864), Hidróxido de Sodio (3722), Cloruro de Sodio (3624), Alcohol Isoamílico (90338), Acido acético (9507), Cloroformo (90560), Etanol Absoluto (9000-60), Citrato de Sodio (3646), 1-butanol (9054), formaldehido (2106) y el Metanol (6009) se obtuvieron de J.T.Baker de México.

## **ESTEROIDES.**

Los esteroides empleados en este estudio, sintetizados en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Química de la UNAM a cargo del Dr. Gustavo García de la Mora, fueron los siguientes:

Los metabolitos reducidos en el anillo A; 5 $\alpha$ -Dihidronoretisterona (5 $\alpha$ -DHNET) y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidronoretisterona (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET). Para mayores detalles metodológicos consultar (32).

## MATERIAL RADIOACTIVO.

De la casa comercial Amersham (Buckinghamshire, Inglaterra) se obtuvieron los siguientes reactivos:

$^{32}\text{P}$ - $\alpha$ dCTP (A.E. 3000 Ci/mmol), y el  $\text{Na}^{125}\text{I}$  en  $\text{NaOH}$  1N (1 mCi),  $\text{E}_2$ - $^3\text{H}$  (A.E. 110 Ci/mmol),  $^3\text{H}$ -ORG-2058 (A.E. 58 Ci/mmol).

## METODOLOGIA.

### TRATAMIENTO HORMONAL.

Los animales fueron sujetos a diferentes esquemas de tratamiento siguiendo el protocolo siguiente:

GRUPO (n=5)	TRATAMIENTO (esteroide)	DOSIS (mg/kg de peso)	PERÍODO (días)
I	$\text{P}_4$	1.0	5
II	$\text{P}_4 + 5\alpha\text{-DHNET}$	1.0 + 0.5	5
III	$\text{P}_4 + 5\alpha\text{-DHNET}$	1.0 + 1.0	5
IV	$\text{P}_4 + 5\alpha\text{-DHNET}$	1.0 + 2.5	5
V	$\text{P}_4 + 5\alpha\text{-DHNET}$	1.0 + 5.0	5
VI	$\text{P}_4 + 3\beta,5\alpha\text{-THNET}$	1.0 + 1.0	5
VII	$\text{P}_4 + 17\beta \text{E}_2$	1.0 + 1.0	5
VIII	$\text{P}_4 + \text{RU-486}$	1.0 + 1.0	5
IX	VEHICULO	-	5

Todos los esteroides empleados fueron disueltos en propilenglicol el cual se utilizó como vehículo de administración. El volumen inyectado vía subcutánea fue de 500  $\mu$ l en todos los casos. Veinte horas después del último tratamiento los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y sangrado. Se colectaron las muestras de tejido uterino, así como los fluidos uterinos respectivos.

### **OBTENCION DE LOS FLUIDOS UTERINOS.**

Cada cuerno uterino se lavó con 500  $\mu$ l de solución salina estéril suplementada con inhibidores de proteasas (Aprotinina 5 mg/ml y PMSF 2mM). Los lavados resultantes (fluido uterino), se colectaron en tubos Eppendorf y se centrifugaron durante 10 min. a 5000 rpm a 4°C, con objeto de separar los residuos tisulares y restos de pelo del animal de las muestras biológicas. Posteriormente cada muestra fue etiquetada y guardada a -80°C hasta su procesamiento.

### **OBTENCION DE LOS CITOSOLES UTERINOS PARA ANALISIS ELECTROFORETICOS E INMUNOBLOTS.**

De cada uno de los animales de cada grupo se tomó uno de los cuernos uterinos (5 en total por cada grupo), se fragmentaron y se homogenizaron con polytron en 5 volúmenes (p/v) de solución salina suplementada con inhibidores de proteasas. Los tiempos de homogeneización no excedieron los 10 segundos. Posteriormente, los homogenizados se centrifugaron a 105 000  $\times$  g durante 1 h a una temperatura de 4°C. El sobrenadante o fracción soluble (citosol) obtenida, se separó en varias alícuotas, las cuales fueron empleadas para los análisis de inmunoblot para la detección del RP y de la UTG intracelular.

## **ESTEREOESPECIFICIDAD DEL RP**

Para estos ensayos se utilizaron 5 conejas prepúberes, las cuales fueron tratadas durante 3 días consecutivos con una dosis de 15  $\mu\text{g}$  de benzoato de estradiol disuelto en aceite de ajonjolí. 24 horas después de la última inyección, los animales fueron sacrificados y los úteros removidos. Posteriormente se obtuvo el citosol uterino en buffer TEDM (Tris-HCl 20 mM, p.H. 7.4; EDTA 1.5 mM; DTT 0.25 mM, suplementado con 5000 U/ml de aprotinina y Molibdato de Sodio 10 mM). El contenido de proteínas en los citosoles uterinos fue determinado por el método de Bradford(33).

Los análisis de desplazamiento se llevaron a cabo según lo descrito por Chávez et.al. (6). Diferentes fracciones de citosol fueron incubadas durante 4 hrs. a 4 C con  $^3\text{H}$ -ORG-2058 (25 000 cpm) 1 nM, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de los competidores radio-inertes incluyendo ORG-2058, P<sub>4</sub>, NET, 5 $\alpha$ -DHNET, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET, y RU-486. Al final de la incubación las fracciones que contenían el esteroide libre fueron separadas del unido utilizando una suspensión de carbón activado-dextrán.

## **ESTEREOESPECIFICIDAD DEL RE.**

Para estos ensayos el citosol uterino fue obtenido de la misma forma antes descrita, pero con la diferencia de que las conejas no recibieron ningún tipo de tratamiento previo con benzoato de estradiol. Los análisis de competencia por este receptor se hicieron utilizando  $^3\text{H}$ -17 $\beta$ -E<sub>2</sub> como radioligando y las incubaciones con los competidores se llevaron a cabo empleando concentraciones crecientes (ver pie de Figura en los Resultados correspondiente).

## **CUANTIFICACION DE UTEROGLOBINA.**

La cuantificación de uteroglobina se llevó a cabo por RIA, el cual fue previamente descrito por Mayol (34) y posteriormente estandarizado y optimizado en nuestro laboratorio (35). El antisuero anti-uteroglobina (obtenido en cabra) fue preparado en el Laboratorio del Profesor E. Milgrom (Labs. Bicetre, Francia) y fue utilizado a una dilución final de 1:60 000. El segundo anticuerpo fue obtenido de la casa comercial ICN, la dilución utilizada en los ensayos fue 1:7. La UTG fue radio-yodinada por el método de lactoperoxidasa y la a.e. fue alrededor de 40  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

## **ANALISIS ELECTROFORETICOS Y WESTERNBLOTS.**

### **FLUDOS UTERINOS**

Con el fin de analizar el patrón electroforético de los fluidos uterinos, se llevaron a cabo electroforesis en geles nativos de poliacrilamida, siguiendo la técnica descrita por Davis (36). Las electroforesis se llevaron a cabo en minigeles de 10 x 12 cm. y se corrieron a voltaje constante (100 v), después de la corrida los geles se tiñeron con Azul de Coomassie (Azul de Coomassie R-250 0.2%; 40% metanol; 10% Acido acético). Posteriormente se llevaron a cabo análisis de "Western blot", empleando geles nativos y transfiriendo las proteínas en membranas de Immobilon P (Millipore Inc.), utilizando la técnica descrita por el fabricante. La transferencia se llevó a cabo toda la noche en buffer TBS (Tris 25 Mm; glicina 192 Mm) a 4°C y a voltaje constante (25 V). Posterior a la transferencia las membranas fueron bloqueadas durante 1 hr en buffer TBS - Leche descremada (leche descremada 10% p/v; Trizma base 25 Mm; NaCl 0.9% p/v). Después del tiempo de bloqueo las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-uteroglobina (dil. 1:200) en TBS - Leche

descremada. Posteriormente se hicieron varios lavados y se incubó con un segundo anticuerpo anti IgG de cabra marcado con peroxidasa (dil. 1:1000) en TBS - Leche descremada, Tween 20 al 0.01%. La solución de revelado empleada contenía diaminobenzidina 0.6 mg/ml Tris-HCl 10 Mm p.H.7.6 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10<sup>3</sup>.

## **CITOSOLES UTERINOS**

Los análisis electroforéticos tanto del RP, y la UTG presentes en el citosol, se realizaron en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes, en presencia de urea 8M y SDS siguiendo la técnica descrita por Laemmli (37). El porcentaje de acrilamida empleado en los geles fue diferente para aquellos donde se analizó la UTG (12.5%) de aquellos del receptor de progesterona (7.5%), debido a las diferencias en el peso molecular de ambas proteínas (14 kDa y 110 kDa respectivamente) . Se corrieron a voltaje constante (100 V) y el buffer de corrida contenía urea (2 M) en buffer Tris-glicina.

Los Western blots se llevaron a cabo de la misma forma como se describió previamente para la detección de UTG en fluido uterino. Para la detección del RP se utilizó una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos contra este receptor (MI 60 dil. 1:300; Let 126 dil. 1: 400; y Let 181 dil 1: 300) (38) y como segundo anticuerpo se usaron inmunoglobulinas de ratón marcadas con peroxidasa.

## **DETECCION DE LOS RNAm DE UTG Y DEL RP POR NORTHERN BLOT.**

Las diferentes extracciones de RNA total de los tejidos uterinos se llevaron a cabo a partir de 0.5 g de tejido siguiendo la técnica descrita por Cathala (39). La eficiencia de recuperación de RNA por gramo de tejido fue de  $500 \pm 120 \mu\text{g}$ . Esta técnica se fundamenta básicamente en el empleo de monotiocianato de guanidina y cloruro de litio y posee la ventaja de poder preparar el RNA a partir de pequeñas cantidades de tejido.

Para llevar a cabo los análisis de "Northern blot " y localizar los transcritos correspondientes a UTG así como a los del RP, se llevaron a cabo varias electroforesis donde se fraccionaron  $10 \mu\text{g}$  de RNA por cada muestra de tejido proveniente de cada tratamiento. Las electroforesis se realizaron en geles desnaturalizantes de agarosa al 1.1 % - formaldehído 2.2 M, y posteriormente los RNAs fueron transferidos a una membrana de nylon "Gene Screen" por métodos convencionales (40). Las membranas fueron prehibridadas 4 hrs. en buffer H ( SSC 2x, SDS 0.2%, fosfato de sodio 120 mM p.H. 6.8, EDTA 10mM y  $10 \mu\text{g}$  de DNA de esperma de salmón). Para la hibridación se utilizaron como sondas, el cDNA de UTG (41) así como el cDNA del PR (42) los cuales fueron marcados radiactivamente con dCTP  $\alpha^{32}\text{P}$  utilizando la técnica de "random primer" (43).

Las hibridaciones se llevaron a cabo por separado para la UTG y para el RP, aún cuando los filtros fueron reutilizados después de cada hibridación. Las incubaciones fueron toda la noche con las sondas correspondientes ( a.e  $1-2 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ ) en buffer H, la temperatura de hibridación fue de  $42^\circ\text{C}$ . Pasado el tiempo de incubación las membranas se lavaron 2 veces a temperatura ambiente con una solución SSC 2X, SDS 0.1%, y otras 2 veces a  $50^\circ\text{C}$  en una solución SSC 0.1 X, SDS 0.1% y se expusieron con una placa

autorradiográfica " KODAC X-OMAT "..Después que las membranas fueron expuestas, éstas fueron lavadas exhaustivamente en una solución en ebullición de SDS 0.1% para despegar toda la sonda adherida ya que estos mismos filtros fueron rehibridizados con una sonda correspondiente al cDNA de histona H4-<sup>32</sup>P, la cual se utilizó para hibridar los RNAs correspondientes a la Histona H4 como control de expresión.

## RESULTADOS

### ESTEREOESPECIFICIDAD DE LOS RECEPTORES A $P_4$ Y $E_2$ .

Para evaluar la capacidad de unión de las progestinas usadas en este estudio a los receptores a  $P_4$  y a  $E_2$ , se llevaron a cabo los análisis de desplazamiento, incubando el RP con ORG-2058  $^3H$  y el RE con  $E_2$ - $^3H$ . Los resultados de la competencia por estos receptores, utilizando concentraciones crecientes de los diferentes competidores se muestran en las Figuras 1a y 1b.

Los esteroides utilizados en estos estudios de competencia por el RP fueron los siguientes: 1 nM ORG-2058- $^3H$  solo y en presencia de concentraciones incrementadas de los siguientes competidores, incluyendo ORG-2058 radioinerte: Progesterona ( $P_4$ ), Estradiol ( $E_2$ ), RU-486,  $5\alpha$ -DHNET, y  $3\beta,5\alpha$ -THNET. Aquellos realizados para el RE fueron:  $E_2$ - $^3H$ ,  $E_2$ , RU-486,  $5\alpha$ -DHNET, y  $3\beta,5\alpha$ -THNET.

Una vez determinada la estereoespecificidad de los RP y RE por NET y sus metabolitos, se estudió su efecto biológico a través de un modelo biológico que permita evaluar este tipo de efectos a nivel molecular, el modelo de la UTG ofrece ciertas ventajas debido a que permite evaluar un efecto agonista o antagonista a través de un producto génico discreto como lo es esta proteína  $P_4$ -regulada.

## ESTEREOESPECIFICIDAD DEL RP

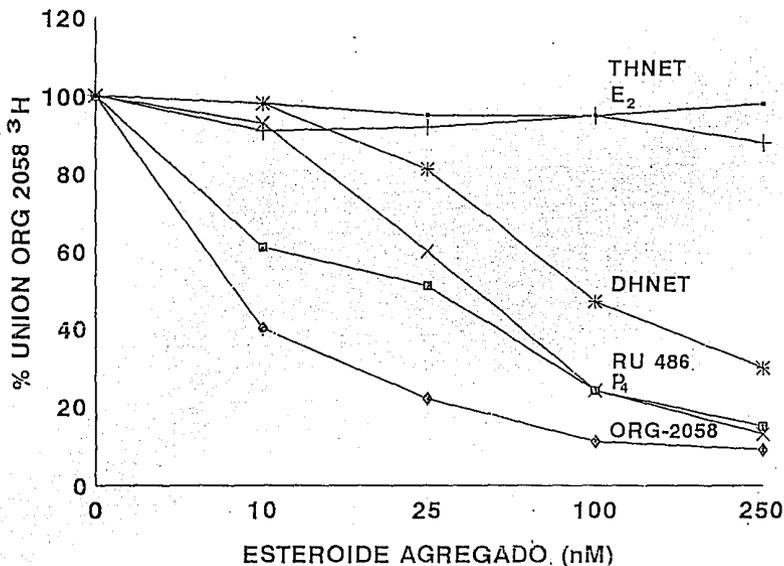


Figura 1a. Estereoespecificidad del PR. Los citosoles uterinos fueron incubados con ORG-2058  $^3\text{H}$  en presencia de diferentes concentraciones de las progestinas. Los competidores más potentes por el RP fueron, en orden de importancia, los siguientes: ORG-2058 y P<sub>4</sub>, seguidos por RU-486 y 5 $\alpha$ -DHNET, mientras que el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET y el E<sub>2</sub> no interactuaron con el receptor.

## ESTEREOESPECIFICIDAD DEL RE

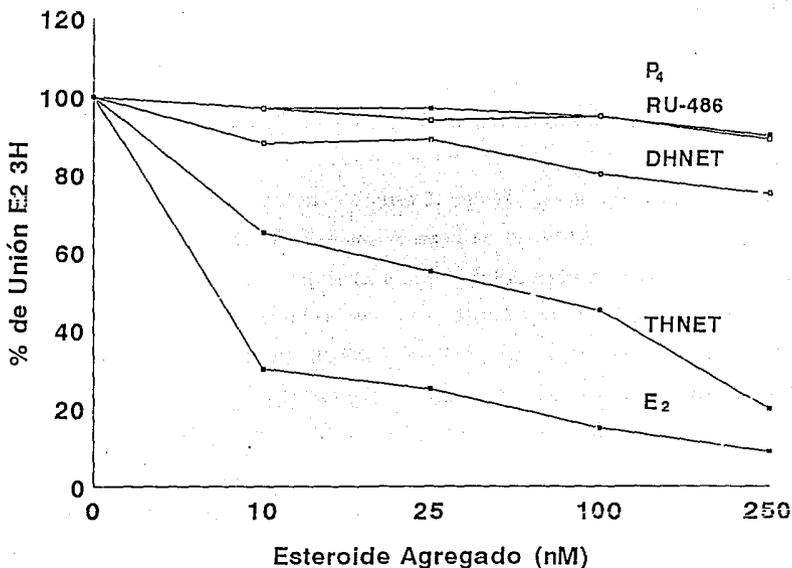


Figura 1b. Estereoespecificidad del RE analizada por desplazamiento del ligando marcado  $E_2-^3H$  con los diferentes competidores esteroideos. Los citosoles fueron incubados con  $E_2-^3H$  en presencia de diferentes concentraciones de las progestinas. Los únicos competidores capaces de desplazar al  $E_2-^3H$  del RE fueron el  $3\beta,5\alpha$ -THNET y el  $17\beta$ - $E_2$  radioinerte.

## **EFEECTO DE 5 $\alpha$ -DHNET Y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET SOBRE EL CONTENIDO DE UTG EN FLUIDOS UTERINOS.**

Diferentes grupos de animales (n=5) recibieron una dosis diaria de progesterona (1.0 mg/kg de peso) durante 5 días, sola o en combinación con diferentes dosis de 5 $\alpha$ -DHNET (0.5, 1.0, 2.5 y 5.0 mg/kg de peso). Otros grupos recibieron 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET (1.0 mg/kg de peso) simultáneamente con P<sub>4</sub>. El contenido de UTG en los fluidos uterinos fue determinado por RIA.

### **DETERMINACION DEL CONTENIDO DE UTG POR RIA.**

Como se muestra en la Figura 2, cuando se administró P<sub>4</sub>, se consideró que el contenido de UTG se incrementó en un 100% con respecto al grupo control (vehículo). La respuesta a la administración de 5 $\alpha$ -DHNET fue dual y dosis-dependiente de tal forma que a dosis bajas (0.5-1.0 mg/kg de peso) se incrementaron las concentraciones de UTG en fluido uterino en un 20% con respecto a aquellos inducidos por P<sub>4</sub>, mientras que la administración de dosis mayores (2.5-5.0 mg/kg de peso) disminuyó aproximadamente en un 80% dicha concentración. Como se esperaba, el efecto del RU 486 provocó una disminución cercana a un 90% en el contenido de UTG.

Por otra parte, el efecto producido por la administración del 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THNET y E<sub>2</sub>, en forma simultánea con P<sub>4</sub>, dio también por resultado una disminución en las concentraciones de UTG P<sub>4</sub>-inducida cercana a los valores basales.

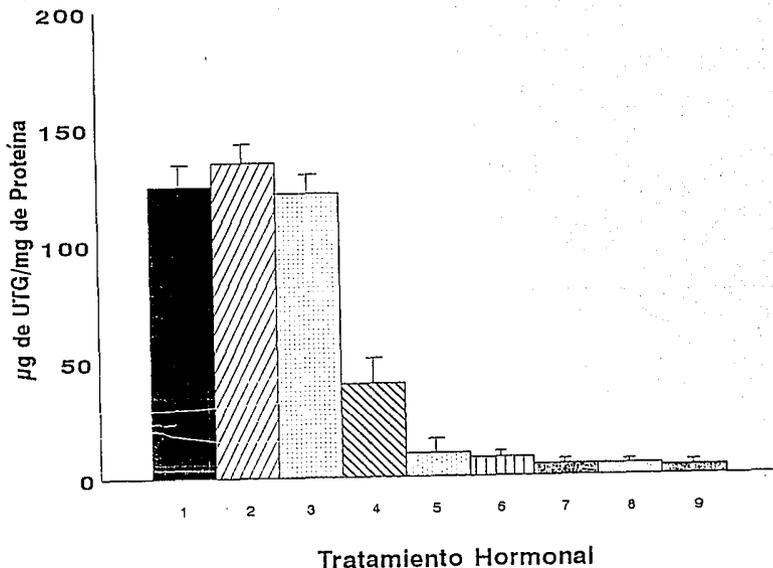


Figura 2. Determinación de las concentraciones de UTG ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína) contenidas en los fluidos uterinos por RIA. Se puede apreciar el efecto hormonal causado por los distintos esquemas de tratamiento. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0.005$ ) demuestra que las diferencias encontradas entre los diferentes grupos son estadísticamente diferentes.

#### ANÁLISIS ELECTROFORÉTICOS E INMUNOBLOTS DE LA UTG EN LOS FLUIDOS UTERINOS.

Quando se realizaron las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas se comparó el patrón electroforetico del contenido proteínico de los fluidos uterinos de los diferentes grupos. Se identificó la banda correspondiente a la movilidad electroforetica de la UTG utilizando como control la proteína pura (UG). Se encontraron diferencias las diferentes bandas incluyendo aquellas que no corresponden a UTG.

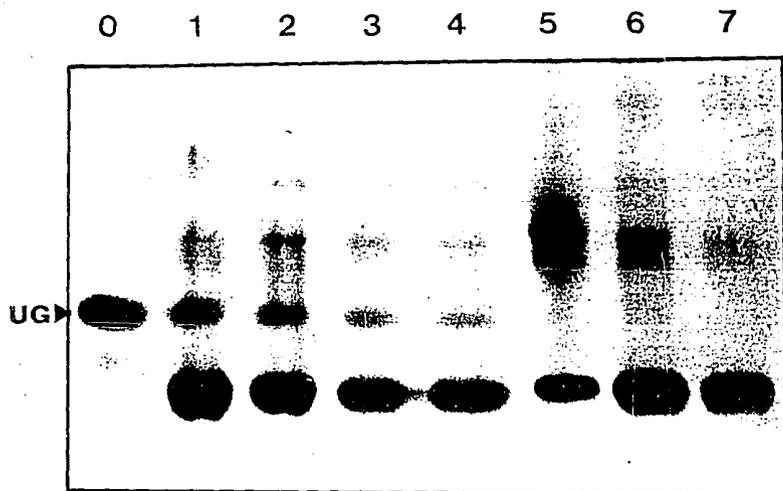


Figura 3a. Electroforesis de las proteínas presentes en los fluidos uterinos ( $10\mu\text{g}/\text{carril}$ ). Los carriles corresponden a: Estandar de UTG (0),  $P_4$  (1),  $P_4+5\alpha\text{-DHNET}$  (0.5 mg/kg peso)(2),  $P_4+5\alpha\text{-DHNET}$  (1.0 mg/kg peso)(3),  $P_4+5\alpha\text{-DHNET}$  (2.5 mg/kg peso)(4),  $P_4+5\alpha\text{-DHNET}$  (5.0 mg/kg peso)(5),  $P_4+3\beta,5\alpha\text{-THNET}$ (6) y vehículo(7) respectivamente.

Como se puede observar la banda correspondiente a UTG presentó variaciones de acuerdo al tratamiento que recibieron los animales, estas variaciones consistieron en el contenido de proteína presente, dato que confirmó los resultados previos obtenidos en el RIA. Estos datos demuestran que la capacidad de inducción de la síntesis de UTG causada por los tratamientos con  $P_4$  o  $P_4$  en combinación con dosis bajas de  $5\alpha\text{-DHNET}$ , y que sin embargo la administración de las dosis elevadas de este metabolito de NET traen por consecuencia el decaimiento de el contenido de UTG en los fluidos.

Cuando se analizaron estos fluidos por Western blot los resultados correlacionaron perfectamente con aquellos obtenidos por electroforesis, dato que confirma que la proteína analizada como UTG en los geles es reconocida por el anticuerpo específico para esta proteína y que el grosor de las bandas corresponde principalmente a la UTG. Figura 3b.

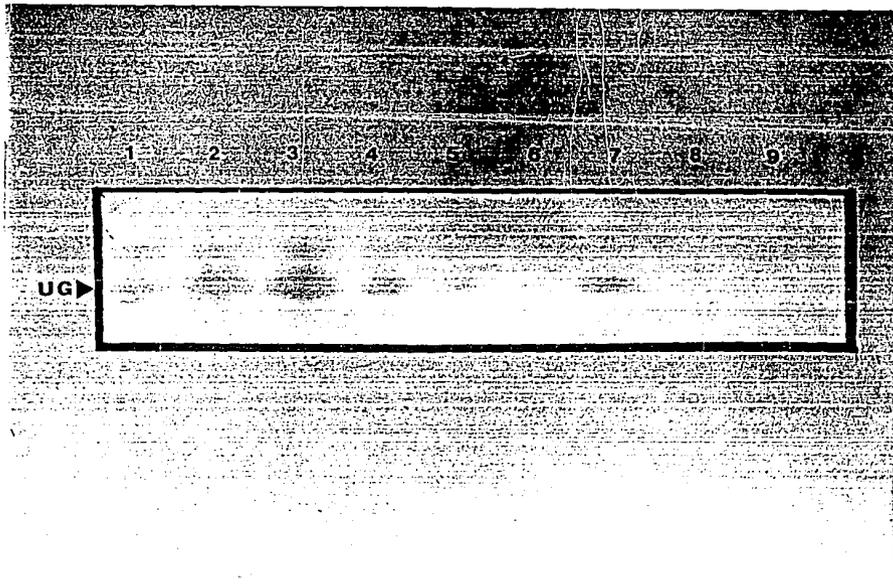


Figura 3b. Detección de la UTG en los fluidos por "Western blot". Los carriles corresponden a: Estandar de UTG (1)  $P_4$ (2),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (0.5 mg/kg peso)(3),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (1.0 mg/kg peso)(4),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (2.5 mg/kg peso)(5),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (5.0 mg/kg peso)(6),  $P_4+E_2$  (7),  $P_4+3\beta,5\alpha$ -T-HNET(8),  $P_4$ +RU 486 (9) y vehículo (10) respectivamente.

## ANALISIS DE LA UTG CONTENIDA EN EL CITOSOL UTERINO POR WESTERN BLOT.

El proposito de analizar la UTG en los citosoles uterinos fue para determinar si las diferencias encontradas en el contenido de UTG en los fluidos, no fue debida a una inhibición en su secreción, como un posible proceso de regulación post-traducciona Figura 3c.

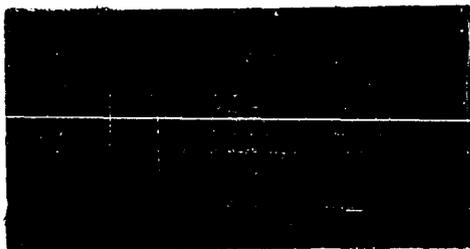


Figura 3c. Detección de la UTG en los citosoles uterinos por "Western blot". Los carriles corresponden a:  $P_4$ (1),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (0.5 mg/kg peso) (2),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (1.0 mg/kg peso)(3),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (2.5 mg/kg peso)(4),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (5.0 mg/kg peso)(5),  $P_4+E_2$  (6),  $P_4+3\beta,5\alpha$ -THNET(7),  $P_4+RU$  486 (8) y vehículo (9) respectivamente.

Los resultados obtenidos de estos "Western blots" concordaron con aquellos obtenidos en los análisis de los fluidos uterinos, aunque el contenido de UTG se encontró en menor proporción, el patrón fue exactamente el mismo, lo que descarta la posibilidad de que la regulación negativa de la UTG por efecto del tratamiento hormonal sea debido a una inhibición en la secreción de la proteína, ya que la mayor parte de la UTG que está siendo traducida es procesada y secretada al lumen uterino.

#### **ANÁLISIS DEL RP EN CITOSOLES UTERINOS POR WESTERN BLOT.**

Los análisis de "Western blot" para el RP, no presentaron diferencias en las bandas correspondientes al RP (110, 76 y 65 kD) en ninguno de los tratamientos lo que sugiere que el efecto causado por los diferentes tratamientos no alteran el contenido del RP intracelular.



**Figura 4.** Detección del RP en citosol uterino por inmunoblot. Los carriles corresponden a los siguientes tratamientos hormonales: Marcadores de peso molecular 110, 92, 66 y 48 kDa (1) vehículo (2)  $P_4$ +RU 486 (3),  $P_4$ + $E_2$  (4),  $P_4$ + $3\beta,5\alpha$ -THNET (5),  $P_4$ + $5\alpha$ -DHNET (5.0 mg/kg peso)(6),  $P_4$ + $5\alpha$ -DHNET (2.5 mg/kg peso)(7),  $P_4$ + $5\alpha$ -DHNET (1.0 mg/kg peso) (8),  $P_4$ + $5\alpha$ -DHNET (0.5 mg/kg peso)(9), y  $P_4$  (10) respectivamente.

## **DETECCION DEL RNAm DE UTG POR NORTHERN BLOT A PARTIR DE RNA TOTAL.**

El análisis de los RNAs por "Northern Blot" demuestra que la administración de  $P_4$  sola o en combinación con las diferentes progestinas altera los niveles de RNAm de UTG. En la figura 5a se puede observar el incremento en el contenido de RNAm para UTG en los RNAs provenientes de aquellos animales que fueron tratados con  $P_4$ . De igual forma como sucedió con la proteína, también se encontró que el RNAm de UTG disminuyó en aquellos animales tratados simultáneamente con  $5\alpha$ -DHNET (dosis altas),  $3\beta,5\alpha$ -THNET, RU 486 y  $E_2$  en combinación con  $P_4$ ; estos resultados apoyan la hipótesis de que este efecto antiprogestacional se lleve a cabo a nivel de la transcripción.

Para descartar la posibilidad de que estas variaciones pudieran ser efecto de diferencias en la concentración de los RNAs analizados, se utilizó un control de expresión constitutivo (cDNA de histona H4), el cual presenta una tasa de transcripción igual en todos los tejidos y no se ha reportado que sea inducido por hormonas esteroides.

Cuando se analizaron los transcritos del RP comparandolos con aquellos del grupo control (propilenglicol) se observó una disminución en el contenido de RNAm del RP en los animales que fueron tratados con  $P_4$  y no en aquellos que fueron tratados de manera simultánea con los metabolitos de NET y con  $E_2$  no es claro si este efecto observado se debe a la regulación a la baja del RP por  $P_4$  o fuera debido a a la estabilidad del mensajero en esas condiciones experimentales. (Figura 5b)

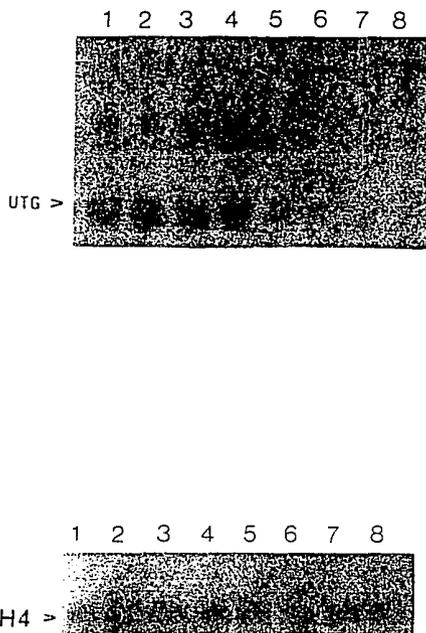


Figura 5a. Detección del RNAm de UTG por "Northern Blot". Se utilizó como sonda el cDNA de UTG marcado con  $P_{32}$ . Los carriles corresponden a:  $P_4$  (1),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (0.5 mg/kg peso)(2),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (1.0 mg/kg peso)(3),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (2.5 mg/kg peso)(4),  $P_4+5\alpha$ -DHNET (5.0 mg/kg peso)(5),  $P_4+E_2$ (6),  $P_4+3\beta,5\alpha$ -THNET(7) y el vehículo (8) respectivamente, en la parte inferior de la figura se muestra la hibridación del mismo filtro con el control de expresión (Histona H4)

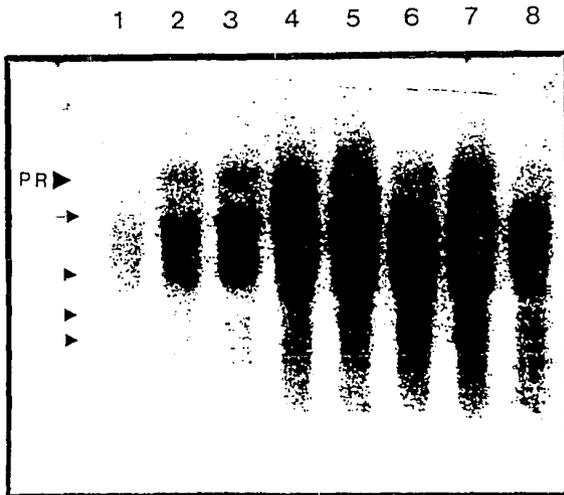


Figura 5b. Detección del RNAm del RP por "Northern Blot". Se utilizó como sonda el cDNA del RP marcado con  $^{32}\text{P}$ . Los carriles corresponden a:  $\text{P}_4$  (1),  $\text{P}_4 + 5\alpha\text{-DHNET}$  (0.5 mg/kg peso)(2),  $\text{P}_4 + 5\alpha\text{-DHNET}$  (1.0 mg/kg peso)(3),  $\text{P}_4 + 5\alpha\text{-DHNET}$  (2.5 mg/kg peso)(4),  $\text{P}_4 + 5\alpha\text{-DHNET}$  (5.0 mg/kg peso)(5),  $\text{P}_4 + \text{E}_2$ (6),  $\text{P}_4 + 3\beta, 5\alpha\text{-THNET}$  (7) y el vehículo(8) respectivamente. En la parte inferior de la figura se muestra la hibridación del mismo filtro con la sonda de la Histona H4.

## DISCUSION

La UTG es una proteína endometrial de secreción (45,46) cuya síntesis y secreción por las células del epitelio uterino es regulada por la P<sub>4</sub>. En este estudio, se evaluaron los efectos de los metabolitos de la progestina sintética NET sobre la expresión del gen de UTG, cuando estos fueron administrados en combinación con P<sub>4</sub> en conejas prepúberes.

En primera instancia se comprobó la regulación de UTG por P<sub>4</sub>, ya que la administración de esta última a una dosis de 1 mg/kg de peso durante 5 días incrementó significativamente la producción de UTG. Por otra parte, la administración de 5 $\alpha$ -DHNET reguló la síntesis de UTG inducida por P<sub>4</sub>, de una manera dual y dosis dependiente, ya que cuando se administraron dosis bajas del 5 $\alpha$ -DHNET (0.5 y 1.0 mg/kg de peso)+P<sub>4</sub> (1 mg/kg de peso) x 5 días el contenido de UTG inducida por P<sub>4</sub> no se redujo, sino que incluso se incrementó ligeramente. Sin embargo, a dosis altas (2.5 y 5.0 mg/kg de peso) el 5 $\alpha$ -DHNET disminuyó en un 80% el efecto de P<sub>4</sub> sobre la síntesis de UTG. En efecto, la disminución en el contenido de UTG evaluada por diversos procedimientos (electroforesis, western blot, y RIA) se observó tanto en la fracción citosólica de homogenados, como en los fluidos uterinos (Figs. 2, 3a, y 3b). El efecto de la administración del 5 $\alpha$ -DHNET, a dosis altas, sobre el contenido de UTG inducida por P<sub>4</sub>, fué similar al observado después de la administración de la antiprogestina sintética RU 486.

Cuando se analizó por "Northern blot" el contenido de RNAm de UTG presente en el útero de los diferentes grupos experimentales, se observó una disminución significativa tanto en los úteros de los animales que recibieron dosis altas de 5 $\alpha$ -DHNET como en aquellos que recibieron RU 486 (Fig 5a). Estos resultados sugieren que el efecto antiprogestacional inducido por 5 $\alpha$ -

DHNET ocurre a nivel de la transcripción de una manera similar a la observada con RU 486, cuyo mecanismo de acción hormonal a nivel transcripcional ha sido ampliamente establecido (31). Sin embargo, no podemos descartar a partir de estos estudios la posibilidad de un mecanismo alternativo sobre la tasa de degradación del RNAm de UTG para la explicación de estos hallazgos.

Los efectos antiprogestacionales causados por  $5\alpha$ -DHNET ya habían sido informados por Reel y cols.(14) quienes evaluaron los efectos de varias progestinas derivadas de la 19-nortestosterona y demostraron que  $5\alpha$ -DHNET además de ser un fuerte competidor antagonista de  $P_4$ , era capaz de interrumpir la gestación en ratas. Posteriormente, Schubert (47) comparó los efectos antiprogestacionales de  $5\alpha$ -DHNET con aquellos inducidos por el tratamiento con estriol. Sus resultados muestran de una manera contundente el efecto antiprogestacional de  $5\alpha$ -DHNET (evaluado por el análisis de Mc Phail), así como los efectos contragestacionales tanto en ratas como en ratones. Estos hallazgos indicaron que los efectos antiprogestacionales de  $5\alpha$ -DHNET fueron muy similares a los producidos por estriol, aunque al parecer los efectos de  $5\alpha$ -DHNET no estaban mediados por el RE ya que no existe interacción de este metabolito de NET con el RE.

Es interesante señalar que cuando evaluamos los efectos de  $5\alpha$ -DHNET y  $P_4$  sobre el contenido de RP en el citosol uterino utilizando la técnica de "western blot", se observó una disminución en el contenido de RP en aquellos grupos tratados con  $P_4$  sola, la cual se explica por la regulación a la baja, "down regulation", que ejerce la  $P_4$  sobre su propio receptor (48). La administración simultánea del  $5\alpha$ -DHNET con  $P_4$  antagonizó el efecto de la  $P_4$  sobre la regulación a la baja de su propio receptor.

Para investigar si la actividad antiprogestacional ejercida por la  $5\alpha$ -DHNET se lleva a cabo vía un efecto intrínseco de la molécula o que pudiera ser mediada por los efectos estrógenicos causados por uno de sus productos de bioconversión, el  $3\beta,5\alpha$ -THNET, se diseñaron otros experimentos complementarios. A otros grupos de animales se les administró este metabolito tetrahidro reducido de NET junto con  $P_4$  a dosis iguales (1 mg/kg de peso) durante 5 días. Otro grupo experimental que se utilizó como control positivo de actividad estrogénica, recibió  $E_2$  en combinación con  $P_4$ . Los resultados demostraron que la actividad antiprogestacional del  $3\beta,5\alpha$ -THNET fue similar a la observada con el  $5\alpha$ -DHNET. Sin embargo la potencia antihormonal del  $3\beta,5\alpha$ -THNET fué mayor (1:5) que la del  $5\alpha$ -DHNET.

Por otra parte, tanto  $3\beta,5\alpha$ -THNET como  $E_2$  undujeron una disminución en el contenido de UTG inducida por  $P_4$ , un hallazgo obtenido, tanto en los fluidos como en las fracciones citosólicas uterinas. La disminución del contenido uterino de UTG ocurrió en forma paralela con una disminución en el contenido tisular de su RNAm. Estos datos sugieren la presencia de dos mecanismos diferentes de los metabolitos de NET para ejercer sus efectos antiprogestacionales, ya que el  $5\alpha$ -DHNET interactúa con el RP pero no con el RE, mientras que el  $3\beta,5\alpha$ -THNET solo interacciona con el RE. Es importante señalar que el  $5\alpha$ -DHNET se biotransforma en los órganos blanco a  $3\beta,5\alpha$ -THNET por lo que es probable que los efectos observados en los grupos que recibieron  $5\alpha$ -DHNET sean el producto de un efecto sumatorio de la actividad propia o intrínseca de el  $5\alpha$ -DHNET y de la actividad estrogénica de su metabolito  $3\beta,5\alpha$ -THNET.

LaPolt et.al. (49) demostró que concentraciones altas de  $E_2$  en suero, inducen un efecto antagonista al de la  $P_4$  causando efectos deletereos en el desarrollo embrionario temprano, así como en el proceso de implantación en

la rata. Por otro lado Stone y Hammer (50), informaron que en presencia de concentraciones circulantes elevadas de  $E_2$ , los oviductos de conejas gestantes producen una sustancia de bajo peso molecular que es capaz de inhibir la embriogénesis temprana y de la misma manera Gidley-Baird et.al (51) demostraron que en ratones gestantes y en mujeres sometidas a procedimientos de fertilización *in vitro*, en las que existían concentraciones elevadas de  $E_2$  en plasma, se presenta un efecto inhibitorio en la implantación embrionaria. Por otra parte se ha demostrado que los estrógenos también inhiben la respuesta a progesterona de las células deciduales en el útero de las ratas ovariectomizadas (52).

Estas observaciones indican que la inhibición de la síntesis de UTG progesterona-inducida no es el único evento donde los estrógenos se comportan como una anti-progestina. Los datos obtenidos en el curso de este trabajo demuestran el efecto antiprogestacional ejercido por un derivado de NET con actividad intrínseca estrogénica, sobre la síntesis de UTG.

En apoyo a nuestros hallazgos debe señalarse que en 1979, Janne y cols informaron el efecto inhibitorio de los estrógenos y anti-estrógenos sobre la síntesis de UTG y de su RNAm. Estos autores sugirieron que este efecto ocurría principalmente a nivel de la transcripción, y no por una inhibición en la secreción de UTG por las células endometriales, lo cual concuerda con los datos obtenidos en este trabajo. Los mecanismos por los cuales los estrógenos o esteroides sintéticos con actividad estrogénica, actuando via RE, interfieren en los efectos de  $P_4$  son desconocidos, por lo que se requiere mayor investigación.

Diversos estudios han demostrado que la administración de  $E_2$  en conejas ovariectomizadas tratadas con  $P_4$  exógena induce, una disminución acelerada del contenido uterino de UTG y de su RNAm (53). La explicación a este fenómeno es que la administración de estrógenos produce un bloqueo

en la síntesis de RNAm de UTG.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios no permiten determinar a que nivel de la transcripción se lleva a cabo el efecto antiprogestacional de los esteroides con actividad estrogénica ni cual es el papel que tienen los RE y RP en estos fenómenos.

La regulación de la síntesis de UTG a través del RP ha sido ampliamente demostrada (30) y se han determinado las secuencias de DNA dentro de la región del promotor en el gen de UTG a las cuales se une el RP (54). En 1990 Beato y cols.(55) informaron la existencia de una secuencia parecida al ERE ( Elemento de Respuesta a Estrógenos) GGTCA...TGCCC, el cual presenta una diferencia de una base con respecto al palindroma perfecto previamente reportado para el ERE del promotor del gen de la Vitelogenina A2 de *Xenopus leavis*, GGTCA...TGACC (56). Este grupo de investigadores informó que este ERE presente en el promotor del gen de UTG es capaz de unir al RE *in vitro* e iniciar la transcripción (55). Con estos datos es factible proponer que ésta secuencia génica interviene en la regulación negativa de la transcripción del gen de UTG inducida por compuestos con actividad estrogénica.

Varios autores han sugerido la interferencia entre receptores a hormonas esteroides en la expresión del mecanismo hormonal (57,58 ), por lo que es plausible sugerir una competencia por factores de transcripción entre estos receptores (RPy RE), o bien que la unión del RE al ERE del gen de UTG pudiera interfiera con el proceso de transcripción inducida por el RP.

Para resolver estos cuestionamientos sería de interés en el futuro diseñar nuevos estudios que involucren estas secuencias de regulación del promotor de UTG, y estudiar la influencia de los RP y RE en la transcripción en células transfectadas que lleven un vector con estas secuencias delante de

de un gen reportero, así como también investigar si el efecto antiprogestacional del  $5\alpha$ -DHNET y de  $3\beta,5\alpha$ -THNET, descrito en este trabajo correlaciona con efectos anti-implantación como los descritos para el RU 486 y el  $E_2$ .

La importancia de estos hallazgos a nivel fisiológico es muy relevante, ya que abre nuevas opciones o estrategias en la búsqueda de agentes anti-hormonales para la regulación de la fertilidad post-coito. (59,60,61)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## BIBLIOGRAFIA

- 1). Pérez-Palacios, G., Fernández-Aparicio, M.A., Medina, M., Zacarías-Villarreal, J. and Ulloa.Aguirre, A. 1981. On the mechanism of action of progestins. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 97: 320-328.
- 2). Pérez-Palacios, G. Chávez, B. Escobar, N., Vilchis, F., Larrea, F., Lince, M., and Pérez, A. E. 1981. Mechanisms of action of contraceptive synthetic progestins. *J. Steroid Biochem.* 15: 125-130.
- 3). McGynty D. A., Djeressi, C. 1958. Some chemical and biological properties of 19-nor-17-ethynyltestosterone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 71: 500-515.
- 4). Hilliard, J., Croxatto, H. B., Hayward, J. N. y Sawyer, C. H. 1966. Norethindrone blockade of LH release to intrapituitary infusion of hypothalamic extract. *Endocrinology.* 79: 411-419.
- 5). Revez, C., Chappel, C. I., Gaudry, R. 1960. Masculinization of female fetuses in the rat by progestational compounds. *Endocrinology.* 66:140-144.
- 6). Chávez, B., Vichis, F., Pérez, A.E., García, G. A., Grillazca, I. and Pérez-Palacios, G. 1985. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-rind reduced metabolites. *J. Steroid. Biochem.* 22: 121-126.
- 7). Braselton, W. E., Lin, T. J., Ellegood, J. O., Mills, T. M. and Mahesh. V. B. 1979. Acumulation of norethisterone and individual metabolites in human plasma during short and long term administration of contraceptive dosage. *Am. J. Obstet. Gyneco.* 133: 154-160.

- 8). Cerbón, M. A., Lemus, A. E. Vilchis, F., Pasapera, A. M. García, G. A. and Pérez-Palacios G. 1991 A-Ring reduced derivatives of Norethisterone exert antihormonal effects. In: *Reproduction Growth and Development.* ( A. Negro Vilar and G. Pérez-Palacios Eds.) Raven Press. Vol. 71 : 175-187.
- 9). Larrea, F., Vilchis, F., Chávez, B., Pérez, A. E. Garza-Flores, J. and Pérez-Palacios G. 1987. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity et the neuroendocrine level. *J. Steroid. Biochem.* 27: 657- 663.
- 10). Vilchis, F., Chavéz, B., Pérez, A.E., García, G.A., Angeles, A. and Pérez-Palacios, G. 1986. Evidence that a non-aromatizable metabolite of Norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *J. Steroid. Biochem.* 24: 525-531.
- 11) Cerbón, M. A., Pasapera, A. M., Gutierrez-Sagal, R., García, G. A. and Pérez-Palacios, G. 1990. Variable expression of the Uteroglobin gene following the administration of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J. Steroid. Biochem.* 36: 1-6.
- 12) Loosfelt, H., Fridlansky, F., Savouret, J. F., Atger, M. and Milgrom, E. 1981. Mechanism of Action of Progesterone in the Rabbit Endometrium. *J. Biol. Chem.* 256, 3465.
- 13) Cerbón, M. A., Castro, I., Pasapera, A. M., Gutierrez-Sagal, R., Anzaldúa, R., and Pérez-Palacios, G. 1992. Molecular mechanisms involved in the antihormonal and anti-implantation of 5 -dihydroneethisterone ( 5 -NET) in rabbits. Ninth International Congress of Endocrinology. Abs. p.14.04.099. pp. 501.

- 14) Reel, S. R., Humphrey, R. R., Windson, B. L. Sakowski, R, Creger, P. L. and Edgren, R. A. 1979. Competitive progesterone antagonists: Receptor Binding and biologic activity of testosterone and 19-nor-testosterone derivatives. *Fertil. Steril.* 31: 552-561.
- 15) McPhail, M. K. 1934. The assay of progestin. *J. Physiol. (London)* 83: 146-149.
- 16) Philibert, D., Moguilewsky, M., Mary, I., Lecaque, D., Tounemine, C., Secchi, J., Deraedt, R. 1985. Pharmacological profile of RU 486 in animals. In: Baulieu E. E., Segal, S. J. (eds) *The Antiprogestin Steroid RU 486 and human fertility control.* Plenum. Press. New York, pp. 49-68.
- 17) Garfield, R. E., Baulieu, E. E. 1987. The antiprogestone steroid RU 486: A short pharmacological and clinical review, with emphasis on the interruption of pregnancy. *Bailliers Clin. Endocrinol. Metab.* 1: 207-221.
- 18) Meyer, M., Pornon, A. J. J., Bocquel, M. Chambon, P., Gronemeyer, A. 1990. Agonistic and antagonistic activities of RU 486 of the functions of the human progesterone receptor. *EMBO J.* 9: 3923-3932.
- 19) Beato, M. 1989. Gene Regulation by Steroid Hormones. *Cell.* 56, 335.
- 20) Green, S. and Chambon, P. 1988. Nuclear Receptors enhance our understanding of Transcription Regulation. *Trends in Genet.* 4, 309.
- 21) Von-der Ahe, D., Janich, S., Scheiderei, C., Renkawitz, R., Schütz, G. and Beato, M. 1985. Glucocorticoids and Progesterone Receptors bind to the same sites in two hormonally regulated Promoters.

- 22) Tsai, S.V., Tsai, M. and O'Malley, B. W. 1989. Cooperative Binding of Steroid Hormone Receptors contributes to Transcriptional Synergism at Target Enhancer Elements. *Cell*. 57, 443.
- 23) Ham, J. Thomson, A., Neddham, M., Webb, P. and Parker, M. 1988. Characterization of Response Elements for Androgens, Glucocorticoids and Progestins in Mouse Mammary Tumor Virus. *Nucl. Acid. Res.* 16, 5263.
- 24) Tsai, S. Y., Caristede-Duke, J., Weigel, N. L., Dahlman, K., Gustafsson, J. A., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. 1988. Molecular Interactions of Steroid Hormone Receptor with Its Enhancer Element: Evidence for Receptor Dimer Formation. *Cell*. 55, 361.
- 25) Beier, H. M. 1968. Uteroglobulin: A hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochim. Biophys. Acta.* 160, 289.
- 26) Heins and Beato, M. 1981. Hormonal Control of Uteroglobulin Secretion and preuteroglobulin mRNA content in rabbit endometrium. *Mol. Cel. Endocrinol.* 21, 139.
- 27) Kopu, T., Kokkonen E. K. T. and Janne, O. A. 1981. Acute antiprogesterational action of estradiol in the rabbit uterus. *Endocrinology.* 109, 1479.
- 28) Bullock, D. W. and Willen, G. F. 1974. Regulation of a specific uterine Protein by estrogens and progesterone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146, 294.
- 29) Savouret, J. F. and Milgrom, E. 1983. Uteroglobulin: A Model for the Study of Progesterone Action in Mammals. *DNA.* 2, 99.

- 30) Bailly, A., Le Page, C., Rauch, M. and Milgrom, E. 1986. Sequence-specific DNA binding of the Progesterone Receptor of the Uteroglobin Gene: effects of the hormone, antihormone and receptor phosphorylation. *EMBO J.* 5, 3235.
- 31) Rauch, M., Loosfelt, H., Philibert, D. and Milgrom, E. 1985. Mechanisms of Action of an antiprogestone, RU-486 in the rabbit endometrium. *Eur. J. Biochem.* 148, 213.
- 32) Bowers, A. Ringöld H.J. Denot. E. 1958. Steroids CI 19-nordihydro testosterone Derivatives. *Journal Chemical Society.* 80. pp.6115
- 33) Bradford, M. 1976. Assay for protein by dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- 34) Mayol, R, F. and Longenecker, D. E. Development of a Radioimmunoassay for Blastokiniu. 1974. *Endocrinology* g5: 1534-1542.
- 35) Pasapera, L. A. M., Gutierrez-Sagal, Ruben., 1989. Efectos de la Noretisterona y de sus metabolitos 5&-dihidronoretisterona y 3&,5 tetrahidronoretisterona sobre la expresión del gen de uteroglobina. Tesis de Licenciatura ENEP-Iztacala-UNAM México, D.F. 1989.
- 36) Davis, B.J. 1964 Disc Electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. *Ann NY. Acad Sci.* 121: 404-427.
- 37) Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of estructural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- 38) Groyer-Picard, M.T., Vu-Hai M.T., Jolivet, A., Milgrom, E., Perrot-Applanat M. 1990. Monoclonal antibodies for Immunocytochemistry of progesterone receptor (PR) in various laboratory rodents, livestock, humans and Chickens: Identification of two epitopes conserved in PR of all these Species. *Endocrinology* 126: 1485-1491.
- 39) Cathala, G., Savouret, J.F. Mendez, B, West, B. L., Karin, M., Marhal, J.A. and Baxter, J. D. A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *DNA*. 2. 329-335.
- 40) Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Expression of Cloned genes in cultured mammalian cells. In: *MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL*. J. Sambrook., E.F. Fritsch and T. Maniatis eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) pp. 16.28.)
- 41) Milgrom E. 1983 "Cloning of marker" cDNA's. Perspectives in clinical and experimental endocrinology. *J. Steroid Biochem.* 18 (4) 511-512.
- 42) Loosfelt, H., Atger, M., Misrahi, M., Guichon-Mantel, A., Meriel, C., Logeat, F., Benarous, R. and Milgrom, E. 1986. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone receptor complementary DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83: 9045-9049.
- 43) Feinberg A, Vogelstein B. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137: 6-13.
- 44) Abelson, N., and Simon, M. I. *Methods in enzymology . Guide to molecular cloning techniques.* 1987 (Shelby, L. Berger; Alan, R. Kimmel eds.) Academic press. Inc. NY. Vol. 152 pp. 240-250.

- 45) Miele, L., Cordela-Miele, E., Mukherjee, A.B. 1987. Uteroglobin: Structure, Molecular Biology and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor. *Endocrine Rev.*8: 474-490-
- 46) Bailly, A., Atger, M., Atger, P., Cerbon, M. A., Alizon, M., Thu Vu Hai, M., Logeat, F., and Milgrom, E. 1983. The Rabbit Uteroglobin Gene: Structure and interaction with the progesterone receptor. *J. Biol. Chem.* 258, 10384.
- 47) Shubert., Stolzner, W., Freund, R., Kurischko, A. and Freund, H. 1983. Endocrinological investigation of 5 -dihydronorethisterone. WHO Scientific Report.
- 48) Savouret, J., F., Bailly, A., Misrahi. M., Rauch, C., Redeuilh, G. Chaucherau , A., and Milgrom, E. Characterization of hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor. *EMBO J.* 10: 1875-1883.
- 49) LaPolli, P. S., Matt, D. W. Judd, H. L. Lu J. K. H. 1986. The relation of ovarian levels in young female rats to subsequent estrous cyclicity and reproductive function during aging. *Biol. Reprod.* 35: 1131-1139.
- 50) Stone, S. L. Hammer, C. E. 1977. Hormonal and regional influences of the oviduct on the development of rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 28: 766-771.
- 51) Gidley-Baird, A. A., O'Neill C., Sinosich, M. J. Porter, R. N., Pike, I. L. 1986. Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients: The effects of altered progesterone/estrogen ration in humans and mice. *Fertil. Steril.* 45: 69-74.

- 52) Glasser, S. R. and McCromack, S. A. 1979. Estrogen modulated uterine gene transcription in relation to decidualization . *Endocrinology*. 104, 4: 1112-1118.
- 53) Bullock, D., W., Lamb. D. J., Rider, C., V. and Kima, P. E. The rabbit progesterone receptor and uteroglobin gene expression. In: *Cell and Molecular Biology of the uterus*. (Wendell W. Leavitt ed.)1987. Plenum, Publishing Corporation.pp 79-97.
- 54) Rider, V. and Bullock, D. W. 1988. Progesterone Dependent Binding of a trans-acting factor to the Uteroglobin Promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 1368.
- 55) Slater, E., Redeuilh, G., Theis, K., Suske, G. and Beato, M. 1990. The uteroglobin promoter contains a noncanonical estrogen responsive element. *Mol. Endocrinol.* 6: 604-610.
- 56) Klein-Hitpass, L., Ryffel, G., V., Heitlinger, E., and Cato, A. B. C. 1988. A 13 pb palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res.* 16: 647-663.
- 57) Meyer, M. E., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M. T., Tasset, D. and Chambon, P. 1989. Steroid Hormone Receptors Compete for Factors that mediate Their Enhancer Function. *Cell*. 57. 433.
- 58) Schüle, R., Muller, M., Kaltschmidt, C. and Renkawitz, R. 1988. Many Transcription Factors Interact Synergistically with steroid Receptors. *Science*. 242, 1418.

- 59) **Lei, H.P., Hu, Z. P. 1981. The mechanisms of action of vacation pills. In: Recent advances in fertility Regulation. C.C. Fen. D. Griffin and A. Woolman. Eds. Atar. S.A. Geneva. pp. 78-82.**
- 60) **Van Look, P.F.A. (1986-1987). Post Ovulatory Methods of Fertility Regulation. In Research in Human Reproduction Bienial. Report , World Health Organization. pp. 153-173.**
- 61) **Prasad, M.R.N. 1983. Post-coital agents and menses inducers, W.H.O. International Symposium of Human Fertility. Stockolm, Sweden. pp. 678**