

1/28/96  
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**DEPARTAMENTO DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA**

**Efecto antiprogestacional y anti-implantación de la  
Noretisterona y sus metabolitos reducidos en el  
anillo A: evaluación a nivel genómico.**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias Biomédicas**

Presenta:

**M.en C. Julieta Ivone Castro Romero**

México, D.F. 1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## **DIRECTOR DE TESIS**

**DR. GREGORIO PEREZ-PALACIOS**

Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción (INNSZ)  
Actualmente Director General de Salud Reproductiva . Secretaria de Salud

**DR. MARCO A. CERBON C.**

Departamento de Biología de la Reproducción  
INNSZ  
Actualmente Investigador del  
Departamento de Biología  
Facultad de Química  
División de Estudios de Posgrado

## **COMITE ACADEMICO**

**DR. Guillermo Alfaro**  
Hospital de Oncología  
SSA

**Dr. Horacio Merchant L.**  
Instituto de Investigaciones  
Blomédicas. UNAM

**Dr. Gustavo García de la Mora**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado (UNAM)

## **JURADO DE TESIS**

**Dr. Gregorio Pérez-Palacios**

Director General de Salud Reproductiva. Secretaría de Salud.

**Dr. Marco Antonio Cerbón C.**

Departamento de Biología. Facultad de Química. UNAM

**Dr. Alejandro García Carrancá**

Instituto de Investigaciones Biomédicas.

**Dr. Fernando Larrea Gallo**

Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción.

Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán"

**Dr. Horacio Merchant Larios**

Departamento de Fisiología

Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM

**Dra. Susana Koffmann**

Departamento de Genética Hospital General de México.SSA

**Dr. Gustavo García de la Mora**

Jefe de la División de Posgrado. Facultad de Química. UNAM

**ANTIPIROGESTATIONAL AND ANTIIMPLANTATION EFFECTS OF NORETHISTERONE AND ITS A-RING REDUCED METABOLITES: AT MOLECULAR LEVEL.**

Norethisterone (NET) has been used as a contragestational poscoital agent. It is biotransformed to  $5\alpha$  dihydro-NET ( $5\alpha$ -NET) and  $3\beta 5\alpha$ -tetrahydroNET ( $3\beta 5\alpha$ -NET) in the target tissues. The participation of these metabolites in NET effects is unknown. We have examined the intiimplantation and antiprogestational effects of NET and its metabolites, in adult mated female rabbits, by assessing the number of implantation sites and the expression products of the uteroglobin (UTG) gene in the uterus, and by comparing them with those of RU-486 and estradiol. Steroids were daily administered s.c. at several doses for seven consecutive days, starting 24 HS after coitus. To assure that fertilization occurred in all animals, the presence of early pregnancy factor was detected.

The results showed that high doses (5mg/kg) of NET reduced both implantation and expression of the UTG gene. On the other hand, lower doses (1.5 mg/kg) of  $5\alpha$ -NET produced an antiimplantation effect and suppressed UTG synthesis and its mRNA. These effects were similar to those of RU-486. At lower doses (1mg/kg), both estradiol and the estrogenic metabolite  $3\beta 5\alpha$ -NET were also effective in inhibiting implantation and UTG gene expression. The general results suggest that NET metabolites exert antiimplantation and antiprogestational effects through their interaction with progesterone and estrogen receptors, and provide an explanation for the molecular mechanisms involved in the poscoital contraceptive action of NET.

*Ready, R. L. (signature)  
G. J. (signature)*

EFFECTO ANTIPROGESTACIONAL Y ANTIIMPLANTACION DE LA NORETISTERONA Y SUS METABOLITOS REDUCIDOS EN ANILLO A: EVALUACION A NIVEL GENOMICO.

La noretisterona (NET) ha sido utilizada como agente contragestacional poscoito. Después de su administración se biotransforma a 5 -dihidro-NET (5 -NET) y a 3 ,5 -tetrahidro-NET en los órganos blanco. La participación de estos metabolitos en los efectos de esta progestina sintética no han sido completamente evaluados. En el curso del presente estudio experimental se examinó los efectos antiprogestacional y antiimplantación de este compuesto "per se", así como de sus productos de bioconversión metabólica. El estudio se realizó en conejas adultas apareadas (fertilizadas) durante el período de la gestación temprana mediante la identificación y registro de los sitios de implantación en útero, así como la de expresión del gene de Uteroglobina (UTG) endometrial. Como control positivo se utilizaron mifepristona (RU-486) y el 17 -estradiol. Los esteroides fueron administrados en forma diaria por siete días, vía subcutánea, a diferentes dosis, siendo el primer día de aplicación 24 hs postcoito. La fertilización en los animales apareados se documentó por la presencia en el suero del factor de embarazo temprano, mediante el uso del método inmunológico de inhibición de rosetas (Orozco y cols, 1984). Los resultados demostraron que dosis altas de NET (5 mg/KG) inhibieron tanto la implantación como la expresión del gene de la uteroglobina, mientras que su metabolito reducido, 5 -NET a bajas dosis (1.5 mg/Kg) ejerció un potente efecto anti-implantación y además inhibe tanto las concentraciones de uteroglobina secretada al lumen uterino, como la expresión del ARN mensajero (ARNm) de la uteroglobina en las células del endometrio. Estos efectos fueron similares a los observados en animales tratados con RU486. En forma adicional, se demostró que el 3 ,5 -NET, un derivado metabólico con actividad estrogénica intrínseca, también fue efectivo a dosis bajas en términos de inhibición de la implantación y la expresión de uteroglobina y su ARN mensajero, en forma similar a lo observado después de la administración de 17 -estradiol. Los resultados obtenidos en este estudio permitieron delinear el mecanismo de acción de NET como potencial anticonceptivo poscoito.

*Marta Rosendo*  
*14/11/86*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Coordinación de Maestrías y Doctorado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y a la ENEP Zaragoza su apoyo académico y económico para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada durante el desarrollo de esta tesis .

Al Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Prof. DR. Miguel Beato del Instituto de Biología Molecular e Investigación en Cáncer. Universidad de Marburgo, Alemania por sus comentarios y sugerencias al presente documento.

## AGRADECIMIENTOS

### **A mis padres**

Por su cariño y apoyo incondicional

### **A mis hermanos**

Gracias por su apoyo constante

### **A mis compañeros de grupo**

Marco, Ana, Elizabeth, Ruben , Juanita , Ignacio  
Fué muy agradable contar con su compañía  
compartiendo momentos buenos y malos.

### **A todos mis amigos (as)**

Ellos(as) saben quienes son.

### **A Jorge Castro**

Por su tiempo en la  
elaboración de las  
figuras y el formato

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Esta tesis fue desarrollada con la dirección del Dr Gregorio Pérez-Palacios y el Dr. Marco Antonio Cerbón, a quienes quiero decir "MUCHAS GRACIAS". Gracias por su confianza , apoyo e interés en el diseño, desarrollo del trabajo experimental, así como para la revisión del presente manuscrito.

Mi agradecimiento a los integrantes del Comité académico, quienes con sus comentarios ayudaron al mejoramiento de este proyecto.

A todos los miembros del Jurado que en forma desinteresada invirtieron parte de su tiempo en la revisión de este manuscrito. Mil gracias por sus valiosos comentarios.

## INDICE GENERAL

	<u>página</u>
<b>RESUMEN EN ESPAÑOL</b> .....	1
<b>RESUMEN EN INGLES</b> .....	2
 <b><u>INTRODUCCION</u></b>	
Progesterona y embarazo temprano en la coneja .....	3
Uteroglobina y su papel en la fisiología del embarazo temprano en la coneja .....	4
Estructura del gen de uteroglobina .....	8
 <b><u>Progestinas</u></b>	
a) Noretisterona y sus metabolitos .....	10
b) Antiprogestinas .....	12
Factor de embarazo temprano .....	13
 <b>JUSTIFICACION DEL TRABAJO EXPERIMENTAL</b> .....	 14
<b>HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS</b> .....	16
 <b><u>MATERIAL Y METODOS</u></b>	
Esteroides, material radiactivo, unidad de estudio .....	17
Análisis de inhibición de rosetas (RIT) .....	18
Radioinmunoanálisis de uteroglobina .....	20
Análisis de Northern Blot .....	21
Análisis estadístico .....	21
Análisis de desplazamiento .....	22
<b>RESULTADOS</b> .....	24
<b>DISCUSIÓN</b> .....	
<b>CONCLUSIONES</b> .....	36
<b>REFERENCIAS</b> .....	37

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	<u>página</u>
<b>TABLA 1.</b> Resultados de la estandarización del método de análisis de inhibición de rosetas (RIT) .....	19
<b>TABLA 2.</b> Efecto de NET y sus metabolitos sobre la síntesis de uteroglobina y su ARN mensajero .....	25
<b>FIGURA 1.</b> Parámetros de evaluación del "Pseudoembarazo" en la coneja .....	5
<b>FIGURA 2.</b> Estructura del gen de uteroglobina .....	8
<b>FIGURA 3.</b> Biotransformación de noretisterona .....	11
<b>FIGURA 4.</b> .....	20
<b>FIGURA 5.</b> Análisis de competencia de los diferentes esteroides sintéticos .....	23
<b>FIGURA 6.</b> Concentración de UTG en flúidos uterinos de las conejas fertilizadas y tratadas con diferentes esteroides sintéticos.....	26
<b>FIGURA 7.</b> Concentración de UTG en flúidos uterinos de las conejas fertilizadas y tratadas con 17 $\beta$ -estradiol y 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET .....	28
<b>FIGURA 8.</b> Análisis del ARN mensajero de UTG en el endometrio de las conejas tratadas con 5 $\alpha$ -NET y RU486 .....	29
<b>FIGURA 9.</b> Efecto de 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET y 17 $\beta$ -estradiol sobre la expresión del ARN mensajero de uteroglobina.....	30

**ABSTRACT**

Norethisterone (NET) has been used as a contraceptual poscoital agent. It is biotransformed to  $5\alpha$ -dihydro-NET and  $3\beta 5\alpha$ -tetrahydro-NET ( $3\beta 5\alpha$ -NET) in the target tissues. The participation of these metabolites in NET effects is unknown. We have examined the antiimplantation and antiprogestational effects of NET and its metabolites, in adult mated female rabbits, by assessing the number of implantation sites and the expression products of the uteroglobin (UTG) gene in the uterus, and by comparing them with those of RU-486 and estradiol. Steroids were daily administered s.c. at several doses for seven consecutive days, starting 24 HS after coitus. To assure that fertilization occurred in all animals, the presence of early pregnancy factor was detected.

The results showed that high doses (5mg/kg) of NET reduced both implantation and expression of the UTG gene. On the other hand, lower doses (1.5 mg/kg) of  $5\alpha$ -NET produced an antiimplantation effect and suppressed UTG synthesis and its mRNA. These effects were similar to those of RU-486. At lower doses (1mg/kg), both estradiol and the estrogenic metabolite  $3\beta 5\alpha$ -NET were also effective in inhibiting implantation and UTG gene expression. The general results suggest that NET metabolites, exert antiimplantation and antiprogestational effects through their interaction with progesterone and estrogen receptors, and provide an explanation for the molecular mechanisms involved in the poscoital contraceptive action of NET.

## RESUMEN

La noretisterona (NET) ha sido utilizada como agente contragestacional poscoito. Después de su administración se biotrasforma a  $5\alpha$ -dihidro-NET ( $5\alpha$ -NET) y a  $3\beta 5\alpha$ -tetrahidro-NET ( $3\beta 5\alpha$ -NET) en los órganos blanco. La participación de estos metabolitos en los efectos de esta progestina sintética no han sido completamente evaluados. En el curso del presente estudio experimental se examinaron los efectos antiprogestacional y anti-implantación de este compuesto "per se", así como de sus productos de bioconversión metabólica.

El estudio se realizó en conejas adultas apareadas (fertilizadas) durante el período de la gestación temprana, mediante la identificación y registro de los sitios de implantación en el útero, así como la expresión del gen de Uteroglobina (UTG) en el endometrio.

Como control positivo del efecto antiprogestacional de estos compuestos, se utilizó mifepristona (RU-486), una anti-progestina sintética y  $17\beta$ -estradiol. Los esteroides fueron administrados durante siete días por vía subcutánea, a diferentes dosis, siendo el primer día de aplicación las 24 horas poscoito.

La fertilización en los animales apareados se documentó por la presencia en el suero del factor de embarazo temprano, el cual se identificó mediante el uso del método inmunológico de inhibición de rosetas (RIT) (Orozco y cols, 1984).

Los resultados demostraron que dosis altas de NET (5 mg/Kg) reduce o inhiben tanto la implantación como la expresión del gen de la uteroglobina, mientras que su metabolito reducido,  $5\alpha$ -NET a bajas dosis (1.5 mg/kg) ejerce un potente efecto anti-implantación y además inhibe tanto las concentraciones de uteroglobina secretada al lumen uterino, como la expresión del ARN mensajero (ARNm) de la uteroglobina en la células del endometrio. Estos efectos fueron en todo similares a los observados en animales tratados con RU486.

En forma adicional, se observó que el  $3\beta 5\alpha$ -NET, un derivado metabólico de  $5\alpha$ -NET con actividad estrogénica intrínseca, también fue efectivo a dosis bajas en términos de inhibición de la implantación y la expresión de uteroglobina y su ARN mensajero, en una forma similar a lo observado después de la administración de  $17\beta$ -estradiol.

Los resultados obtenidos en este estudio permitieron delinear el mecanismo de acción de NET como potencial anticonceptivo postcoito. En efecto, los datos demostraron que dos metabolitos resultantes de la bioconversión de noretisterona ejercen un potente efecto antiprogestacional y anti-implantación a menores dosis, sugiriendo que el efecto anti-implantación de noretisterona se ejerce vía sus derivados reducidos en el anillo A. La observación de que  $5\alpha$ -NET interactúa con alta afinidad relativa con el receptor de progesterona, pero no expresa actividad progestacional sugiere que la  $5\alpha$ -NET posee actividad anti-progestacional intrínseca en forma similar a la observada con RU486. Por otra parte el hallazgo que el  $3\beta 5\alpha$ -NET, un esteroide no fenólico interactúa con el receptor de estrógenos y que su actividad biológica es estrogénica sugiere que su efecto anti-implantación es parecido o similar al de  $17\beta$ -estradiol.

Los datos en su conjunto permiten postular el concepto de que el efecto anti-implantación de la NET es debido a la acción antiprogestacional y estrogénica de sus productos de conversión metabólica. Estos hallazgos permitirán el desarrollo de nuevas formulaciones farmacológicas de uso potencial como anticonceptivos poscoitales ó de inhibición de la gestación.

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el fenómeno de la reproducción en el humano ha ofrecido una gama de oportunidades para el diseño de estrategias de intervención encaminadas a su regulación, iniciando desde la producción de los gametos hasta la implantación del óvulo fecundado en la pared uterina. Esto ha dado como resultado una verdadera revolución en tecnología anticonceptiva que ha facilitado la planeación y ejecución de programas nacionales de planificación familiar. El avance en el conocimiento de los procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que participan en la reproducción, permitió el desarrollo de compuestos esteroidales sintéticos con actividad estrogénica y/o progestacional con potencias superiores al de las propias hormonas naturales.

Aunque en la actualidad existen diversas estrategias anticonceptivas, las hormonas esteroides continúan siendo una de las mayores opciones en la regulación de la fertilidad. La administración de estrógenos se emplea en diversas formulaciones anticonceptivas, sin embargo, la obtención de progestinas sintéticas, derivadas de la hidroxí-progesterona y de la 19-nor-testosterona han permitido la generación de nuevos agentes anticonceptivos, siendo la Noretisterona (NET) la primera progestina sintética que se ha administrado en forma oral, en formulaciones inyectables de larga acción, dispositivos intrauterinos, anillos vaginales y en parches transdérmicos.

El mecanismo de acción a nivel celular de estos compuestos aún no se conoce en su totalidad, pero en los últimos años se han diseñado modelos experimentales a través del uso de marcadores moleculares regulables por las propias hormonas esteroides naturales. Tal es el caso del modelo de la expresión de uteroglobina en el endometrio de la coneja. Además de este órgano, la UTG se sintetiza en el endometrio y en otros órganos como el pulmón, donde su papel fisiológico es desconocido, pero existen evidencias de su importancia en el embarazo temprano en esta especie. El hecho de que la síntesis de esta proteína es mayormente dependiente de las concentraciones de progesterona para su expresión endometrial, ha servido a algunos investigadores como marcador de actividad progestacional.

El poder contar con un modelo de esta naturaleza nos permite disponer de una herramienta experimental para evaluar y estudiar los mecanismos de acción de diversos esteroides sintéticos, como noretisterona y RU-486, agentes farmacológicos con actividad antihormonal cuya aplicación es importante para el campo de regulación del proceso de fertilización.

### **Progesterona y embarazo temprano en la coneja.**

El cuerpo lúteo juega un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la gestación en la mayoría de los mamíferos, incluyendo al humano, esto se estableció desde principios de siglo por Corner y Allen, quienes observaron que la inyección de extractos de esta glándula a conejas ovariectomizadas poco tiempo después del apareamiento, resultó en el desarrollo de condiciones progestacional similares a las observadas en el embarazo temprano.

Actualmente se sabe que los cambios que ocurren en el útero por acción progestacional durante el período temprano de la gestación son de vital importancia para que el proceso de implantación del blastocisto se lleve a cabo, para lo cual se requiere que el folículo productor de estrógenos se convierta en corto tiempo a un cuerpo lúteo productor de progesterona.

En la coneja pseudoembarazada se demostró que el cuerpo lúteo tiene una vida media de 12 a 13 días. El pseudoembarazo en esta especie está definida como la función del cuerpo lúteo del primero al doceavo día después de la estimulación con hCG, reflejándose en un incremento en las concentraciones circulantes de progesterona y cambios en el patrón de secreción de proteínas uterinas (Fig. 1).

La progesterona, sintetizada en el cuerpo lúteo, es esencial en la preparación del endometrio, la

Implantación y mantenimiento del embarazo a través de sus múltiples acciones como: a) inhibición de la contractilidad del miometrio, b) proporcionar protección inmunológica al embrión, c) reducción en la síntesis de prostaglandinas, d) mantenimiento del crecimiento y la plasticidad uterina, e) inducción de proteínas como uteroglobina, uteroferrina etc.

Por otro lado, se ha demostrado ampliamente que para que el proceso de la implantación ocurra, es necesario la sincronía entre el endometrio y el blastocisto en un ambiente hormonal adecuado. En el conejo, la implantación del blastocisto se lleva a cabo en el día 7 después del coito, y se ha postulado que los estrógenos provenientes del blastocisto son de gran importancia (Edwards, 1982); sin embargo, el blastocisto, en el período pre-implantación, también contiene cantidades importantes de progesterona (Dickman, 1976, 1979; Psychoyos, 1976).

Algunos investigadores analizaron la relación entre el blastocisto y el endometrio en las primeras etapas de la gestación, cuantificando las concentraciones de estrógenos, progesterona y sus receptores intracelulares en ambos compartimientos; pero no se pudo establecer una correlación entre el contenido hormonal de la unidad blastocisto-endometrio y las detectadas en circulación. (El-Banna, 1977; Browning, 1980; Firyal, 1984; Gutiérrez-Sagal, 1992).

A pesar de que los resultados experimentales han sido controversiales y no se ha podido establecer un patrón de comportamiento que explique claramente esta relación; se han establecido algunos principios: 1) no existe ninguna relación entre las concentraciones en suero de estrógenos y progesterona con los cuantificados en el blastocisto, el endometrio y el lumen uterino; 2) las concentraciones de progesterona en el endometrio y lumen uterino aumentan en forma progresiva durante los primeros días poscoito y se mantienen altas hasta el día de la implantación; 3) la concentración de estrógenos en el endometrio no varía en forma importante en los primeros días poscoito; pero una vez que se ha llevado a cabo la implantación, su concentración es menor en el lumen uterino que dentro del blastocisto.

Estos cambios hormonales en la coneja durante el período preimplantación, ejercen un efecto regulador del número de los receptores para estrógenos y progesterona en el endometrio, lo cual prepara al útero para la implantación del blastocisto. En esta especie existen altas concentraciones de receptores nucleares de progesterona y una baja en el compartimiento citoplasmático en el blastocisto un día antes de la implantación (Pury, 1980).

#### **Uteroglobina y su papel en la fisiología del embarazo temprano en la coneja.**

La uteroglobina como otras proteínas de secreción es sintetizada como precursor que contiene un péptido señal, el cual es cortado en la membrana del retículo endoplásmico (Nieto, 1985). Esta molécula fue inicialmente descubierta como el mayor componente proteínico del fluido uterino en la coneja durante el embarazo temprano (Beier, 1968; Krishnan, 1967). La producción endometrial y la secreción de esta proteína son dependientes de las concentraciones de progesterona circulantes en la coneja (Artur, 1972; Loosfelt, 1981) (fig 1) por lo cual es considerada como marcador bioquímico de la acción de esta hormona.

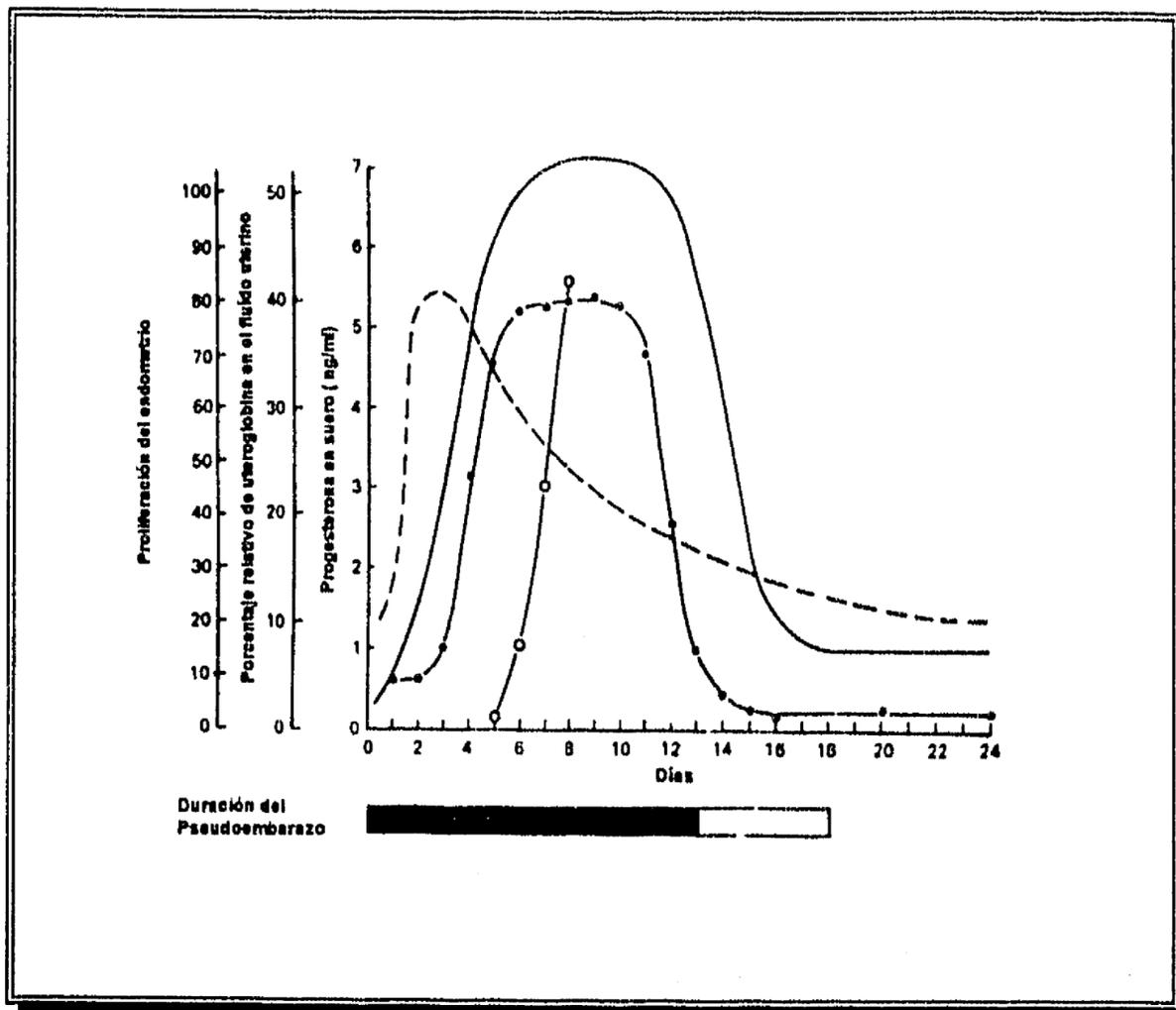


Figura 1 Parámetros que definen el "Pseudoembarazo" en la coneja. (—) Índice de proliferación del endometrio, ( ) % relativo de secreción de UTG en fluido uterino, (- - -) Progesterona en suero, ( ° ) % de UTG del 5º al 8º día. [ J. Reprod. Fert(1991)92,511-523 ].

Esta proteína, cuya secuencia de aminoácidos está bien establecida, fue purificada por Nieto y Cols, en 1977. Su estructura primaria y cuaternaria fueron descritas un año después por diferentes grupos de investigación (Pstingl, 1978; Atger, 1979). La molécula de uteroglobina está compuesta de dos subunidades de 70 aminoácidos cada una y presenta un peso molecular de 16,000 daltones. Ambas subunidades se encuentran unidas por dos puentes disulfuro y otras uniones no covalentes (Pstingl, 1978).

Recientemente se ha demostrado que la secuencia de aminoácidos de la uteroglobina tiene poca similitud con el dominio (región) de unión al esteroide del receptor de progesterona (Fawell, 1990) por lo que ha servido como modelo experimental en el estudio y análisis de las interacciones específicas entre la progesterona y otras proteínas.

La uteroglobina fue originalmente identificada en el fluido uterino de la coneja gestante durante la fase de preimplantación y subsecuentemente se informó la presencia de proteínas similares en diversos órganos del conejo, incluyendo el oviducto (Goswami & Feigelson 1975; Kirchner, 1976), el blastocisto (Beier, 1968), y el pulmón tanto en hembras como machos (Noske, 1976; Beier, 1976; Savouret, 1980). La expresión de uteroglobina uterina y pulmonar fue descrita recientemente en ratas y en otras especies como en humanos (Singh, 1987, 1988), pero su papel fisiológico no es claro. Se ha postulado que, esta proteína pueda servir como inhibidor de proteasas, como inmunodepresor y como antiinflamatorio debido a su capacidad de inhibir la fosfolipasa A2. Ninguna de estas funciones han sido totalmente aclarada y la única actividad que ha sido

demostrada después de su purificación *in vitro* (UTG recombinante), es su habilidad selectiva para unirse a progestinas (Beato & Beier, 1975) y a los metabolitos metil/sulfonil del bifenil policlorinados (PCB) (Lund, 1985).

Esta uteroglobina recombinante, expresada en *E. Coli* es capaz de formar dímeros y unirse con alta afinidad a la molécula de progesterona (Peter. Beato & Suske, 1989), lo cual demuestra que la alta afinidad de este ligando es una propiedad intrínseca de la molécula de uteroglobina. Hasta ahora no se conoce si su afinidad por este esteroide está relacionada con su papel fisiológico.

Los resultados de los estudios de mutagénesis dirigida muestran que existen dos sitios de interacción directa entre la molécula de progesterona y la de uteroglobina a través de los grupos carbonilo (C<sub>3</sub> y C<sub>20</sub>) con los grupos OH de la tirosina 21 y de la treonina 60, respectivamente (Werner, 1991).

La uteroglobina interactúa con la progesterona (P<sub>4</sub>) con una constante de disociación de  $4 \times 10^{-7}$  M, se une pobremente a las progestinas sintéticas como R-5020, noretisterona, acetato de clormadinona y no muestra ninguna afinidad por los estrógenos naturales (Atger, 1980). A pesar de que la afinidad por esta proteína es relativamente baja si se le compara con la afinidad por el receptor intracelular de progesterona, la unión UTG-P<sub>4</sub> es biológicamente relevante.

Durante el embarazo temprano en la coneja, la progesterona se acumula en el lumen uterino, coincidiendo con la secreción de uteroglobina, por lo cual se forman abundantes complejos UTG-P<sub>4</sub> (Bochkani, 1981).

Algunos estudios bioquímicos e histoquímicos utilizando uteroglobina y/o progesterona marcada radiactivamente han demostrado que ambas moléculas son captadas por las células epiteliales en el útero (Bochkani, 1984, 1988). En tanto que la progesterona es metabolizada en pocos minutos, la uteroglobina se mantiene inmunológicamente estable por períodos largos y preserva su capacidad de unión a la progesterona. Persiste como la única proteína de unión en el período pre-implantación ya que el receptor intracelular de progesterona desaparece del endometrio en los primeros días de la gestación (Bochkani, 1988).

Los resultados de estudios en varias especies sugieren que la composición de las secreciones endometriales al lumen uterino varía en forma temporal durante las diferentes fases del ciclo estral y esto depende de la relación estrógeno/progesterona en el suero. La uteroglobina representa el 40% del total de las proteínas secretadas al lumen uterino del conejo en el embarazo temprano, alcanzando su máxima concentración en el quinto día de la gestación y disminuyendo a concentraciones no detectables 5 días después de que ha ocurrido la implantación del blastocisto en el séptimo día (Krishnam, 1967; Beier, 1968; Olly Janne, 1983; Gutiérrez-Sagal, 1993). Estos hallazgos fueron recientemente apoyados por el estudio de Krusche & Beier, (1993) relacionado a la localización y distribución de la uteroglobina y de su ARN mensajero en el tejido endometrial en el embarazo temprano en el conejo utilizando técnicas de hibridación *in situ* no radiactiva. Krusche & Beier demostraron que la localización de la uteroglobina está confinada al epitelio de la mucosa del oviducto y del endometrio.

En el oviducto, el contenido de ARN mensajero de uteroglobina está presente en forma constante durante todo el embarazo temprano (día 0 p.c - 10 p.c), en tanto que existe una fluctuación importante en la superficie epitelial del endometrio proliferativo. En el día 2 poscoito (p.c) toda la superficie epitelial del endometrio inicia la expresión del gen de uteroglobina, incrementándose hasta el día 5 donde las concentraciones de expresión son las más altas, para disminuir paulatinamente en el sexto día. Siete días poscoito, cuando la implantación del blastocisto se lleva a cabo, la expresión del gen de uteroglobina desaparece en esta zona.

Cuando el embarazo está establecido (día 10 p.c), el contenido de ARNm de uteroglobina desaparece por completo tanto en el epitelio glandular como en la superficie. Sus resultados fueron corroborados por análisis de Northern blot midiendo expresión cuantitativa del mensajero.

En el endometrio de la coneja se ha demostrado que el contenido de uteroglobina y de su RNAm son regulados por hormonas esteroideas sexuales ( progesterona y estrógeno); mientras que los mecanimos que regulan la expresión constitutiva de la uteroglobina y de su ARNm en el oviducto no han sido claramente establecidos.

Estas observaciones aunadas al hallazgo de que la uteroglobina esta presente dentro del blastocisto (Beier, 1968, Krishnan, 1967) ha sugerido que esta proteína pudiera estar ejerciendo un efecto fisiológico importante en el proceso reproductivo. Arthur, (1972) y Loosfelt, (1981) han sugerido un efecto de uteroglobina sobre la implantación del blastocisto. Se sabe que el blastocisto presenta un retraso dentro del lumen uterino durante el proceso de la implantación, tiempo en donde la uteroglobina estaría actuando como un modulador de la actividad de progesterona y/o del transporte dentro del blastocisto (Rudolf, 1988). Por otro lado, para que el embarazo se mantenga es necesario una concentración alta de progesterona en el sitio de implantación, pero a éstas concentraciones, la progesterona causa efectos nocivos para el propio blastocisto. La capacidad de unión de la UTG a su propio regulador ha sugerido que esta proteína puede estar funcionando como un secuestrador de la progesterona presente en el lumen uterino, impidiendo su transporte al interior del blastocisto.

Existe la hipótesis que sugiere que una de las funciones de la uteroglobina pueda ser la protección del embrión contra la respuesta inmune de la madre y el proceso inflamatorio presente durante la implantación (Siistery, 1977; Mukherjee, 1982). Existen evidencias de una alta homología en la secuencia de UTG con los inhibidores de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, los cuales están altamente involucrada en los procesos anti-inflamatorios (Miele, 1988). Algunos otros mecanismos propuestos para explicar esta acción van desde la inhibición de las proteasas hasta la interacción con antígenos de superficie (histocompatibilidad) del blastocisto para prevenir el rechazo por los linfocitos maternos (Arthur, 1972; Miele, 1988).

Independientemente de su papel fisiológico, la uteroglobina ha sido ampliamente utilizada como marcador de respuesta hormonal en células epitellales de los mamíferos. La inducción de la expresión del gen de uteroglobina está documentado para células epitellales del endometrio de la coneja después de la administración de estrógenos, pero su máxima inducción requiere además la administración de progesterona.

La inducción de UTG por ambas hormonas esteroideas se lleva a cabo a nivel de la transcripción de su propio gen, sin embargo no se puede excluir un efecto sobre la estabilidad de su RNA mensajero. En el pulmón, la producción de uteroglobina es también regulada por hormonas; siendo la hidrocortisona su inductor, pero sus efectos son menos dramáticos que los observados en el útero con progesterona. La expresión de UTG en la línea celular Clara del pulmón de rata es mayor en ausencia de glucocorticoides. También existen evidencias que en el tracto genital masculino su expresión es dependiente principalmente de andrógenos.

### **Gen de la uteroglobina**

Los estudios de caracterización del gen de uteroglobina indican que consta de 3 exones y dos intrones, la región codante tiene 465 nucleótidos y los intrones son de 2270 y 332 nucleótidos, respectivamente y presenta una región TATA Box con una sustitución de una citocina por una timina, es decir TACA (Bailly, 1983.)

La región del promotor del gen de uteroglobina se extiende de -395 a +14 y contiene los elementos regulatorios involucrados en su actividad específica para cada tejido. El promotor dirige la transcripción de un gen reportero trasfetao a células epitellales endometriales (Ishikawa) y del pulmón (NCI-H441); pero no en fibroblastos, lo cual correlaciona muy bien con la situación in vivo, en donde la uteroglobina se expresa exclusivamente en células epitellales (Misseyanni, 1991).

El gen de UTG contiene además otras secuencias entre las posiciones -2.5 Kb y -3.7 Kb, donde se han identificado sitios de hipersensibilidad a la DNasa en el endometrio después de la estimulación hormonal (Janzen, 1987) involucradas en la inducción de la transcripción.

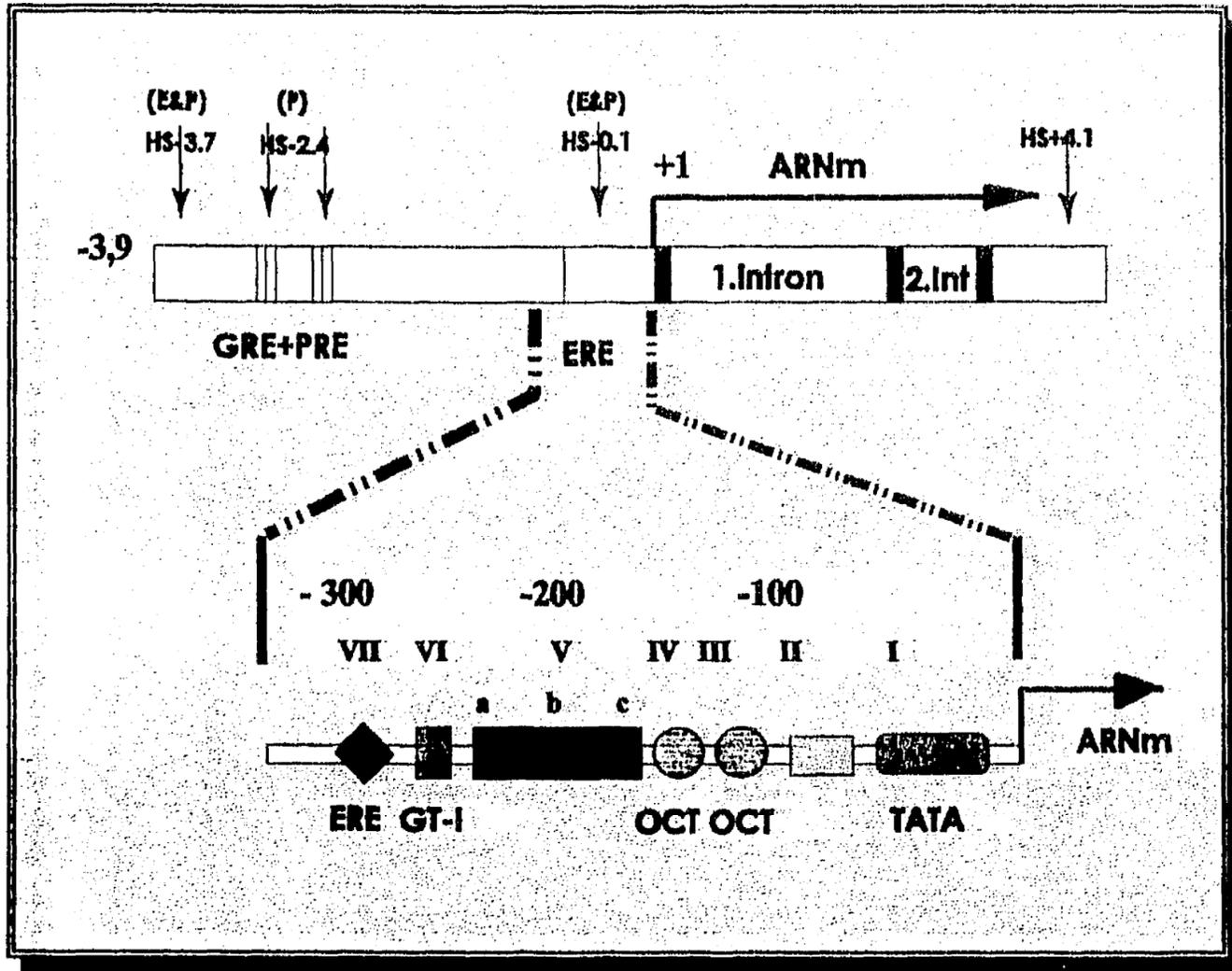


Figura 2 Estructura del gen de uteroglobina

El análisis de mutaciones utilizando "Linker scanning" han mostrado la existencia de 7 regiones diferentes dentro de este promotor que son sensibles a mutaciones (arriba de -270), que reducen la actividad del promotor de UTG. Los experimentos "DNase I footprinting", utilizando extractos nucleares de células endometriales (Ishikawa) demuestran que todas estas regiones están protegidas por proteínas nucleares (Misseyni, 1991).

Recientemente se han identificado y clonado dos proteínas que se unen a la "caja" GT (GT box), relacionadas con la familia de los factores de transcripción SP1, a pesar de que este promotor no es rico en sitios G y C (Hagen, 1992).

Otro elemento importante dentro de este promotor es la región "TATA-box motif" (TACA). Una secuencia no canónica que parece reducir la expresión de la uteroglobina en las células que no expresan el "TATA core factor" (TCF). Este factor y el TATA palíndrome Factor (TPF) son dos distintos factores que se unen a la región del TATA-box del gen de uteroglobina y que son muy importantes para la transcripción. Se ha demostrado que el TCF es expresado en forma específica en las líneas celulares derivadas de tejidos que sintetizan uteroglobina (Jörg K y Cols, 1994).

A pesar de que se ha informado que la proteína de unión a la región del TATA-box (TBP/TFIID) es capaz de unirse a secuencias no canónicas del TATA-box, las evidencias apuntan a un débil reconocimiento para esta proteína. Por lo que, este promotor está relacionado a una subclase de

promotores no ricos en GC y ("TATA-less promoters") y promotores sin TATA, los cuales son regulados durante el desarrollo o diferenciación e inician la transcripción en un sitio especial (Smale, 1989).

Los experimentos de transcripción *in vitro* y de hibridación molecular han demostrado que la expresión del gen para esta proteína está regulada principalmente por progesterona (Heins, 1981), sin embargo el estradiol también es capaz de inducir la síntesis de uteroglobina y su ARN mensajero (Loosfelt, 1981; Michel, 1985). Este efecto hormonal está probablemente mediado a través de la interacción de los receptores hormonales con alguna(s) secuencias localizadas en la región de regulación anterior al sitio de iniciación de la transcripción en el extremo 5' del gen de uteroglobina.

El análisis de hipersensibilidad a la ADNasa y los resultados de estudios de unión al receptor han demostrado que existen secuencias de nucleótidos conocidos como elementos de respuesta a la hormona (Hormone Response Elements) específicos para progesterona (PRE) y glucocorticoides (GRE) localizados aproximadamente a 2.6 kilobases (Kb) del sitio de inicio de la transcripción (Cato, 1984; Jantzen, 1987). Además se ha demostrado que dentro de la región del promotor del gen de uteroglobina se localizan elementos de respuesta a estrógenos (ERE) entre los nucleótidos -265 y -252 los cuales muestran una gran homología con las secuencias de los ERE del gen de la Vitelogenina (Nishida, 1985; López de Haro, 1990).

Los estudios de transfección y de unión al DNA con estos fragmentos han revelado que el receptor de estrógenos se unen en forma específica a estos elementos y que funcionan como mediadores de la inducción del promotor de uteroglobina (Slater, 1990).

Las progestinas sintéticas regulan en forma específica la síntesis de uteroglobina en el endometrio de la coneja (Arthur, 1974; Isomma, 1981; Cerbón 1990). Estudios previos en nuestro laboratorio, utilizando el modelo de expresión del gen de uteroglobina en conejas prepúberes han demostrado que la reducción de noretisterona a su metabolito 5 $\alpha$ -NET disminuye su capacidad progestacional en varias especies de mamíferos (Bullock, 1977; Larrea, 1984).

La disminución en la actividad progestacional de la 5 $\alpha$  NET no sólo fue demostrada en términos de la síntesis de uteroglobina, sino también se le encontró relacionado a la disminución significativa en el contenido endometrial del ARN mensajero específico para esta proteína, sugiriendo que este efecto está mediado a nivel transcripcional o postranscripcional (Cerbón, 1990). Además, se observó que este metabolito reducido de la NET posee un efecto anti-progestacional, el cual persiste cuando ésta molécula es reducida a su posición 3 $\beta$ . La potencia antiprogestacional de estos dos metabolitos de la NET se demostró cuando fueron administrados junto con dosis iguales de progesterona en la coneja prepúber (Cerbón, 1991).

Reel y cols demostraron en 1979 que la 5 $\alpha$ -NET posee efectos anti-implantación, a través de la inhibición de la gestación en ratas y en la interrupción de la gestación durante el período posnidación en el hámster.

A pesar de que el mecanismo de acción aún no es claro, se ha sugerido que pudiera tratarse de un efecto estrogénico, pero aún esta propuesta no ha sido claramente entendida. Por lo anterior y en base a que la expresión del gen de uteroglobina es inducida por la progesterona natural y poco por los metabolitos 5 $\alpha$ -NET y 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET, nosotros consideramos necesario el evaluar el probable efecto de éstos compuestos sobre el proceso de la gestación e implantación.

## PROGESTINAS

Las progestinas sintéticas son esteroides que de acuerdo a su estructura química se han clasificado en dos grandes grupos: las derivadas de la 17 $\alpha$ -OH- progesterona (vrg. acetato de medroxiprogesterona) y de la 19-nor-testosterona como la Noretisterona y el Levonorgestrel. De éste

último grupo, la Noretisterona (NET) es usada en México en forma de pastillas, inyectables de larga acción, dispositivos intrauterinos, anillos vaginales e implantes subdérmicos.

**a) Noretisterona y sus metabolitos.**

La noretisterona ( 17 $\alpha$ -etnil-17 $\beta$ -hidroxi-4-estene-3-ona ) (Fig 3) posee actividad progestacional y tiene la capacidad de inhibir la ovulación a través de la supresión de la liberación de las gonadotropinas hipofisarias (Pérez-Palacios y cols, 1981 a y b ). Este efecto antigonadotrópico está ampliamente documentado para la progesterona natural vía el receptor de progesterona. La NET utiliza este mismo mecanismo; sin embargo en circunstancias fisiológicas ó experimentales no necesariamente actúa vía este receptor para ejercer su actividad, sugiriendo con esto que existen otro(s) mecanismo(s) de acción de este compuesto a través de su bioconversión metabólica.

Existen evidencias que sugieren que esta progestina pudiera estar utilizando el receptor de estrógenos para ejercer su acción, entre las cuales se encuentran los estudios de

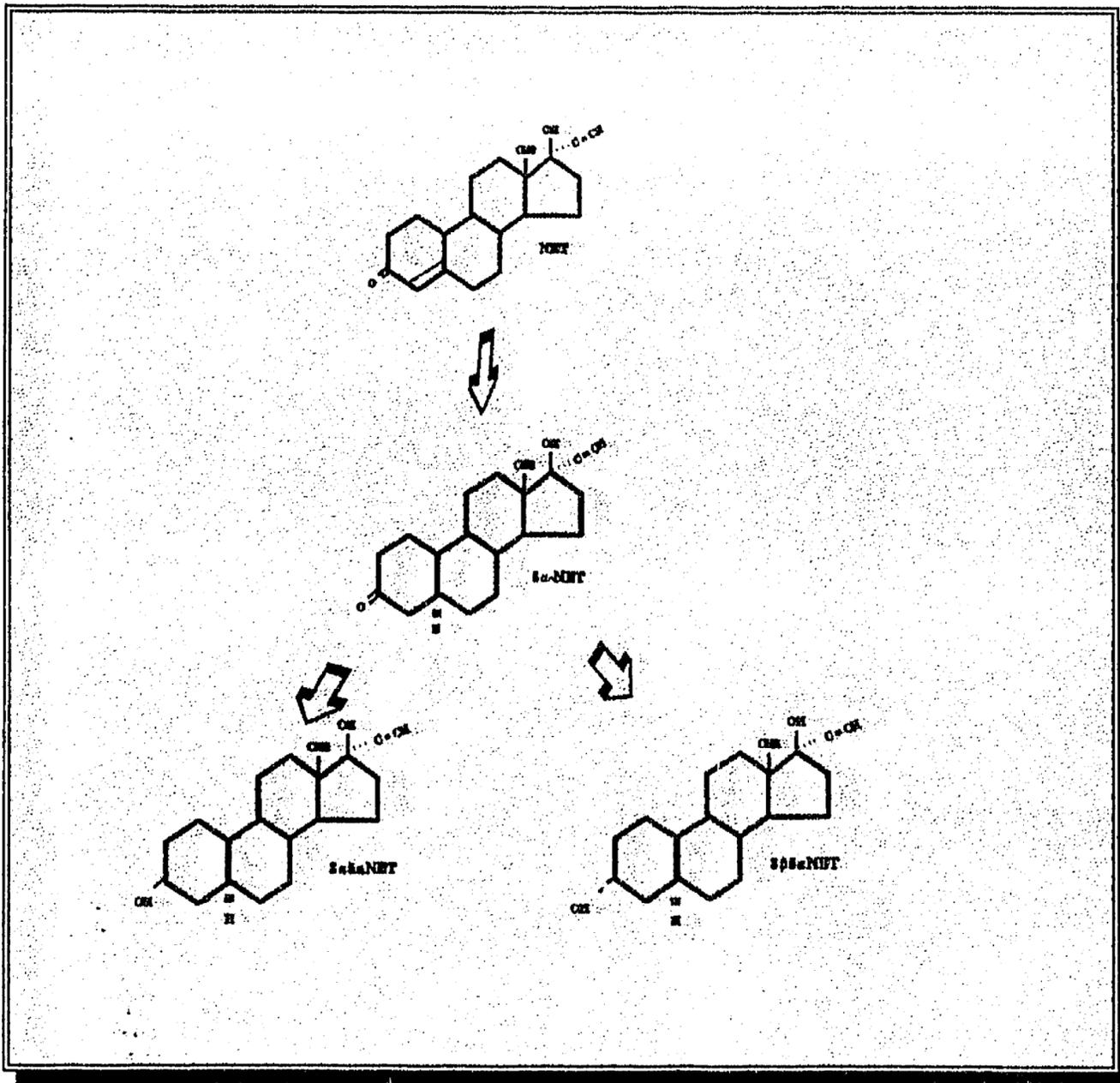


Figura 3 Biotransformación de noretisterona

estereoespecificidad realizados por Chávez y Cols (1985), quienes demostraron que la noretisterona

fué incapaz de unirse al receptor de estrógenos en la rata castrada, sin embargo, el metabolito 3B5 $\alpha$ -NET, adquiere una gran capacidad para interactuar con este receptor con una alta afinidad en el tejido hipofisario. Así mismo se demostró que NET y otro de sus metabolitos (5 $\alpha$ -NET) presentan una gran capacidad para unirse al receptor de progesterona, pero con afinidades diferentes de ( $1.9 \times 10^{-8}$  M y  $1.0 \times 10^{-8}$  respectivamente); en tanto que fueron incapaces de unirse con el receptor de estrógenos. Por último estos autores demostraron que 5 $\alpha$ -NET, pero no el 3B5 $\alpha$ -NET es un competidor por el receptor de andrógenos.

Estos resultados sugieren que la noretisterona después de su administración sufre modificaciones estructurales a nivel de su anillo A orienta su unión específica con otros receptores intracelulares diferentes al de progesterona en el órgano blanco y por consiguiente modifica la expresión de su actividad biológica.

### b) Antiprogestinas

La importante dependencia por progesterona en el mantenimiento de la gestación durante el período periimplantación, ha servido como base para el desarrollo de nuevos compuestos sintéticos con actividad antiprogestacional, capaces de interferir con la acción de esta hormona en los órganos blanco progesterona dependientes a diferentes niveles. A estos compuestos se les ha denominado genéricamente como antiprogestinas.

La molécula de RU-486 (Mifeprestona) es considerada como antiprogestina típica que a diferencia de la estructura de la progesterona, presenta un grupo  $\alpha$ -fenil-amino adicional en C11 del anillo C (Teutsch, 1985), el cual le confiere la característica de unirse al receptor de progesterona (PR) con una afinidad mayor que la propia hormona natural (Phillibert, 1984; Moguilewsky & Phillibert, 1985; Gravanis, 1985, Hurd & Moudgill, 1988). Tiene una vida media de aproximadamente 20 horas y bloquea la acción de la progesterona mediante la unión al receptor para este esteroide (Baulieu, 1989, 1991). Presenta además, efectos agonistas cuando es administrado a animales castrados o a mujeres posmenopáusicas (Gravanis, 1985; Koering, 1986); pero su acción es de menor potencia cuando se compara con su actividad antiprogestacional.

El RU-486 es utilizado en algunos programas de planificación familiar en países como Francia, Inglaterra, como anticonceptivo poscoital, en abortos terapéuticos y en la prevención y/o tratamiento de algunas enfermedades dependientes de esteroides sexuales (Baulieu and Segal, 1985; Baulieu, 1989, 1990).

En la coneja prepúber, Rauch & Milgrom (1985) demostraron que el RU-486 ejerce un efecto antiprogestacional, ya que inhibió la síntesis de uteroglobina y su RNA mensajero en el endometrio, después de cinco días de administración de este compuesto. Con las dosis inhibitorias, el RU-486 no ejerció efectos agonistas sobre la inducción del ARNm por progesterona. Estos hallazgos fueron corroborados posteriormente en nuestro laboratorio, mediante que la administración a una dosis de 1 mg/Kg de peso de RU-486, la cual mostró actividad anti-hormonal y antiprogestacional cuando fué administrado en forma conjunta con la progesterona a dosis similares, adicionalmente se observó que este compuesto ejerce su acción a nivel transcripcional y postranscripcional del gen de UTG (Cerbón, 1991).

A pesar de que no se conoce con precisión el mecanismo de acción del RU-486; se ha sugerido que este compuesto puede interactuar con el sitio de unión del ligando del receptor de progesterona, cambiando su conformación y generando complejos RU-486-RP "inactivos", diferentes a los Progesterona - RP, activos.

A este respecto, Meyer (1990) demostró que si ambas formas, A y B del receptor de progesterona, se unen a un mismo agonista ó antagonista (RU-486) forman un heterodímero activo; pero, si la forma A se une a un agonista y la B al antagonista (RU486), entonces el heterodímero, adquiere una

conformación "anormal" e "inactiva" que puede interferir con la interacción de alguno(s) factor(es) de transcripción, necesarios para la expresión génica.

Otro de los mecanismos de acción propuestos para el RU-486, es la estabilización de la interacción entre la "heat shock protein( hsp90) con el receptor de progesterona, facilitado por el RU-486, lo cual evita la unión del complejo antihormona-receptor al sitio de unión del DNA. Se sabe que la hsp90 debe de estar separada del receptor de progesterona para que el complejo hormona-receptor se pueda unir a los elementos de respuesta específicos ubicados en el DNA (Baulieu, 1991).

Otra posible explicación para los efectos antagonistas del RU-486 es a través de su acción sobre la concentración del receptor de progesterona. Se ha demostrado que en muchos mamíferos, las progestinas ejercen un efecto de regulación a la baja sobre el número de moléculas y la actividad del receptor de progesterona, lo que estaría sugiriendo el efecto sobre la síntesis este receptor; en el caso de RU-486, se sabe que puede antagonizar la regulación a la baja producida por las progestinas, pero su mecanismo no se conoce (Baulieu, 1991).

#### **Factor de embarazo**

Uno de los campos de interés en el área de la fertilización *in vitro* ha sido entender el mecanismo(s) que permitan el reconocimiento materno temprano del embarazo. El entendimiento de tales eventos es importante debido a que puede conducir al desarrollo de nuevos métodos para seguir la viabilidad embrionaria durante el período preimplantación, así como el potencial para diseñar nuevos métodos de anticoncepción.

Sin embargo, solo se conocen dos fenómenos indicadores de viabilidad fetal. El primero de ellos, tiene el potencial para el desarrollo de métodos que permiten monitorear el proceso de la fertilización y la viabilidad del huevo hasta el momento de la implantación, por medio del análisis de una señal temprana de origen embrionario, conocido como "Factor del Zigoto" (Cavanagh, 1982). Este Factor del Zigoto induce la expresión y la actividad del factor de embarazo temprano (EPF) presente en el suero materno durante el período preimplantación (Morton y cols., 1980). Dicha actividad puede ser cuantificada en el suero materno por medio de la "prueba de la inhibición de rosetas" (Morton y cols., 1986). El fundamento de esta prueba se basa en el siguiente hecho: cuando linfocitos son expuestos a la presencia de eritrocitos heterólogos en presencia de complemento, una subpoblación de linfocitos se une a los eritrocitos para formar rosetas. La formación de estas rosetas puede ser inhibida de una manera dosis dependiente por el tratamiento previo de los linfocitos con suero anti-linfocítico (ALS), por lo que para cierta dilución de ALS, un título de inhibición de rosetas puede ser definido (Bach & Antonie., 1968; Morton y cols., 1975).

Esta demostrado que cuando los linfocitos son previamente incubados en suero de mujeres embarazadas, existe un incremento en el título de la inhibición de rosetas, y es precisamente este incremento lo que se define como la actividad del factor de embarazo temprano (Morton y cols., 1976; Clarke & Wilson 1982). De esta forma, la actividad del factor de embarazo temprano puede ser medida a horas de haber ocurrido la fertilización y cuando menos durante las dos terceras partes del período de gestación (Morton y cols, 1976; 1980).

### JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

La uteroglobina sintetizada por las células del endometrio en el conejo es un marcador bioquímico para estudiar los mecanismos de acción hormonal (Savouret y cols, 1983). Su síntesis en el endometrio de la coneja es altamente dependiente de las concentraciones de progesterona, tiene una gran capacidad para interactuar en forma específica con este esteroide. Esta proteína es considerada como un agente protector del embrión, contra algunos procesos inmunes que se activan en el periodo alrededor de la implantación y es considerada como el transportador de progesterona al lumen uterino.

El análisis de la síntesis de uteroglobina y la expresión de su ARN mensajero, utilizada por Savouret y colaboradores (1980) para medir la actividad anti-progestacional y contragestacional del RU-486 en conejas gestantes permitió el avance en el estudio del mecanismo de acción de algunos agentes reguladores de la fertilidad. Sin embargo, este modelo no ha sido utilizado para la evaluación de los efectos de Noretisterona. A pesar de que a principios de esta década se demostró el efecto anti-implantación de 5 $\alpha$ -NET en la rata, no existen otros estudios subsecuentes de carácter confirmatorio, ni tampoco se determinó su mecanismo de acción a nivel celular y molecular.

Algunos de hallazgos recientes de este laboratorio muestran que la molécula de 5 $\alpha$ -NET posee una actividad antiprogestacional en la coneja prepúber, mostrada por una inhibición en la concentración de uteroglobina y su RNAm en el fluido y tejido uterino. Por lo cual se consideró conveniente examinar los efectos de la administración de noretisterona y dos de sus metabolitos a conejas adultas en el embarazo temprano.

La relevancia de este estudio reside en la contribución al conocimiento en el mecanismo de acción de las progestinas sintéticas, ampliamente utilizadas como anticonceptivos poscoito, que permita el diseño de nuevas alternativas en la regulación de la fertilidad y fecundidad.

### HIPÓTESIS

Dos productos de conversión metabólica de Noretisterona: 5 $\alpha$ dihidronoretisterona (5 $\alpha$ -NET) y el 3 $\beta$ 5 $\alpha$ tetrahidronoretisterona (3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET) poseen actividad anti-progestacional y estrogénica, respectivamente. En estudios previos hemos demostrado que estos compuestos sintéticos, a diferencia del compuesto original (NET), reducen la síntesis de uteroglobina por las células endometriales e inhiben la expresión del gen de uteroglobina dependiente de progesterona en la coneja prepúber. Por lo que resulta interesante evaluar el efecto de estos metabolitos reducidos en su anillo A sobre el proceso de implantación en la coneja gestante.

Nuestra hipótesis es que la Noretisterona, a través de su bioconversión a 5 $\alpha$ -NET y al 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET, puede actuar como inhibidor del proceso de implantación del blastocisto en el embarazo temprano de la coneja, bloqueando la acción de la progesterona sobre la expresión del gen de uteroglobina ó por otros mecanismos alternos.

### OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente estudio es el demostrar el efecto antiprogestacional y contragestacional de Noretisterona, utilizando la uteroglobina endometrial del conejo como un marcador molecular y establecer si esta acción antihormonal se efectúa a nivel trascricional o postrascricional.

### Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de Noretisterona y dos de sus metabolitos reducidos, administrados a conejas adultas apareadas, establecer la dosis efectiva y comparar su potencia con dosis idénticas de la antiprogestina sintética RU-486. La fertilización en los animales del grupo experimental se establecerán mediante la cuantificación del factor de embarazo temprano.
2. Evaluar la actividad de estos compuestos sintéticos a través de su efecto sobre la concentración de uteroglobina en el fluido uterino y el contenido de su ARNm en el endometrio.
3. Establecer si el efecto de NET se debe a una capacidad antihormonal intrínseca de la molécula ó esta mediado por su transformación a  $5\alpha$  ó  $3\beta 5\alpha$ .

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Esteroides

Noretisterona (NET) fue generosamente proporcionada por Schering Mexicana, S.A. El proceso químico de reducción este compuesto, a sus metabolitos, fué realizado por el Dr. Gustavo García de la Mora y colaboradores, en la Facultad de Química de la UNAM. La síntesis del metabolito 5 $\alpha$ -dihidro noretisterona (5 $\alpha$ -NET) se realizó mediante la reducción con litio-amoniaco por un procedimiento similar al descrito por Bowers, 1958; mientras que el derivado 3 $\beta$ 5 $\alpha$ - tetrahidro noretisterona (3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET) se sintetizó a partir del 5 $\alpha$ -NET mediante la reducción con borohidruro. La pureza química de estos compuestos se estableció por sus propiedades físicas descritas y sus propiedades espectroscópicas. El 17 $\beta$ -estradiol se adquirió de los laboratorios Steraloids (Pauling, NY) y la antiprogestina sintética RU-486 (Mefiprestone) fué donada por los laboratorios Roussel Uclaf (Francia). Todos los esteroides se administraron por vía subcutánea, utilizando el proplenglicol (PPG) como vehículo.

### Material radiactivo.

El material radiactivo, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (AE: 3,000 Ci/mmol) y <sup>125</sup>I (AE: 16.4 mCi/ $\mu$ g) fueron utilizados para la elaboración de sondas de ADN y el marcaje de uteroglobina, respectivamente. Ambos fueron adquiridos a Amersham International (Inglaterra). La actividad específica de las sondas se midió con el espectrofotómetro de centelleo líquido, Packard Tri-Carb, modelo 2660, utilizando Instagel (Packard, Downers Grove, IL) como solución de conteo, y un contador Packard auto gamma 500 para la cuantificación del <sup>125</sup>I.

### Unidad de estudio

El estudio se realizó en conejas adultas New Zeland de 3.5 a 4.5 Kilogramos de peso corporal, mantenidas en jaulas individuales un mes antes de ser incluidas en el estudio, con el objetivo de descartar un posible estado de gravidez. Las conejas fueron apareadas (día 0) con machos cuya fertilidad había sido probada con anterioridad, asegurándose de que la monta se efectuara, y dejando juntos a los animales durante toda la noche. Al día siguiente (día 1), se tomó una muestra de sangre de la arteria marginal con el fin de evaluar si había ocurrido la fertilización, mediante el análisis de inhibición de rosetas (ver métodos).

Dos muestras adicionales se tomaron en los días 3 y 7 de la gestación para la misma prueba. Todos los tratamientos con los esteroides fueron iniciados a las 24 hs del apareamiento y se continuaron durante siete días consecutivos. Los esquemas de tratamiento para cada esteroide se muestran en la tabla 1. Un grupo de conejas gestantes que solo recibieron 500  $\mu$ l del vehículo, se tomaron como control positivo en el séptimo día de gestación.

Un día después de que la última dosis de esteroide, los animales se sacrificaron por dislocación cervical, se disecó el útero completo y se colocó sobre una base fría durante su manipulación. Las muestras de fluido uterino fueron obtenidas por medio de un lavado con 500 $\mu$ l de solución salina (0.15 M de NaCl) para cada cuerno uterino. La muestra se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 min para eliminar el contaminante de sangre y posteriormente se almacenaron a -70°C hasta su uso. Un de los cuernos uterinos fué rápidamente congelado con una mezcla de hielo seco y acetona y almacenado a -70°C. Esta muestra se usó para la extracción del ARNm y el análisis de Northern Blot. El otro cuerno se fijó en una solución de paraformaldehído para su utilización posterior en los estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

### Ensayo de inhibición de rosetas (RIT)

Esta técnica se estandarizó previamente en nuestro laboratorio con algunas modificaciones. El procedimiento incluye varias etapas, que cuales se describen a continuación:

**a) Preparación de células del bazo de ratón.**

Se utilizaron ratones machos BALB/C de 5 semanas de edad, se sacrificaron con una guillotina y se disecó el bazo por medio de una incisión para-medio dorsal. El tejido se colocó en 2 ml de solución balanceada de sales de Hanks (HBSS). Las células se disgregaron y homogeneizaron en forma mecánica. Posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos y la pastilla se resuspendió en 2 ml de una solución de lisis ( 0.2M Tris-HCl pH 7.2 1:9 NH<sub>4</sub>Cl 0.15 M ) para eliminar el contaminante de células rojas, y se incubó 5 min a 37° C, se centrifugándose 1,000 rpm. Finalmente la pastilla de células linfocíticas se ajustó a una concentración final de  $15 \times 10^6$  células/ml.

**b) Incubación de los linfocitos sueros problema.**

Se tomaron 300  $\mu$ l de células por análisis y se depositaron en diferentes tubos, se centrifugaron a 2,000 rpm por 5 min, y la pastilla se resuspendió en 98  $\mu$ l de PBS 0.1 M. Posteriormente se añadieron 2  $\mu$ l del suero problema a diferentes diluciones (  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  en PBS/BSA 0.02 % ) y se incubaron durante 30 min a 37° C.

**c) Incubación con suero antilinfocítico en presencia del complemento**

Una vez concluida la incubación, se centrifugó y la pastilla fue nuevamente resuspendida en 500  $\mu$ l de HBSS. Se tomaron 50  $\mu$ l de la suspensión celular y 25  $\mu$ l de complemento humano diluido (1:90) y se adicionaron a otros tubos conteniendo el anticuerpo monoclonal Anti-T3 (CD3) de ratón en diferentes diluciones, y se incubó a 37° C por 80 min. Este anticuerpo fue probado y estandarizado para este ensayo antes de su uso, encontrándose que podía ser utilizado en sustitución del suero anti-linfocítico que describe en la técnica original.

**d) Formación y cuantificación de rosetas.**

Este análisis se hizo con un homogenado de eritrocitos cuya concentración final fue de  $10^8$  células/ml, el cual se obtuvo de una muestra de sangre donada por un varón. Después de la última incubación, a cada tubo se le agregaron 100  $\mu$ l de células rojas, se centrifugó a 500 rpm por 5 minutos para asegurar el contacto de los linfocitos con las células rojas. Posteriormente se resuspendió el pellet con agitación suave y se hizo el conteo de rosetas con una cámara de Neubauer. En todos los casos, el título de inhibición de rosetas se registró como la dilución mas alta del anticuerpo en la cual el número de rosetas formadas fue menor del 75 % del registrado en los tubos control, en ausencia del anticuerpo.

Con respecto a la sensibilidad de esta prueba, la **tabla 1** nos muestra los valores de RIT obtenidos en muestras de 2 microlitros de suero tomado el día 1 de animales gestantes y tratados, diluidos  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  veces. Aquí podemos observar que el suero de la coneja gestante dió títulos positivos desde una dilución  $10^{-6}$ .

La titulación máxima observada fue de 28 a una dilución de  $10^{-2}$ . Estos resultados son similares a los previamente demostrados por Orozco y cols (**Figura 4**). Así mismo, en en la gráfica 1a se puede observar un índice de titulación de 12 para los sueros de los animales tratados.

Tratamiento	Muestra	Diluciones del suero			
		10 <sup>-2</sup>	RIT 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-8</sup>
<b>Controles</b>					
No apareadas		12	12	--	--
Apareadas	Día 1	28	28	28	12
	Día 4	28	28	28	12
	Día 7	28	28	28	12
<b>Con tratamiento</b>					
NET <sup>(5mg/kg)</sup>	Día 1	28	28	20	12
	Día 4	12	12	--	--
	Día 7	12	12	--	--
5 $\alpha$ -NET <sup>(1.5mg/kg)</sup>	Día 1	28	28	20	12
	Día 4	12	12	--	--
	Día 7	12	12	--	--
3B5 $\alpha$ <sup>(1mg/kg)</sup>	Día 1	28	28	24	12
	Día 4	12	12	--	--
	Día 7	12	12	--	--
RU-486 <sup>(1mg/kg)</sup>	Día 1	28	28	20	12
	Día 4	12	12	--	--
	Día 7	12	12	--	--

Tabla I Resultados de la estandarización del método de análisis de inhibición de rosetas ( RIT ).  
Mol. Reprod. & Develop. 40:157(1995)

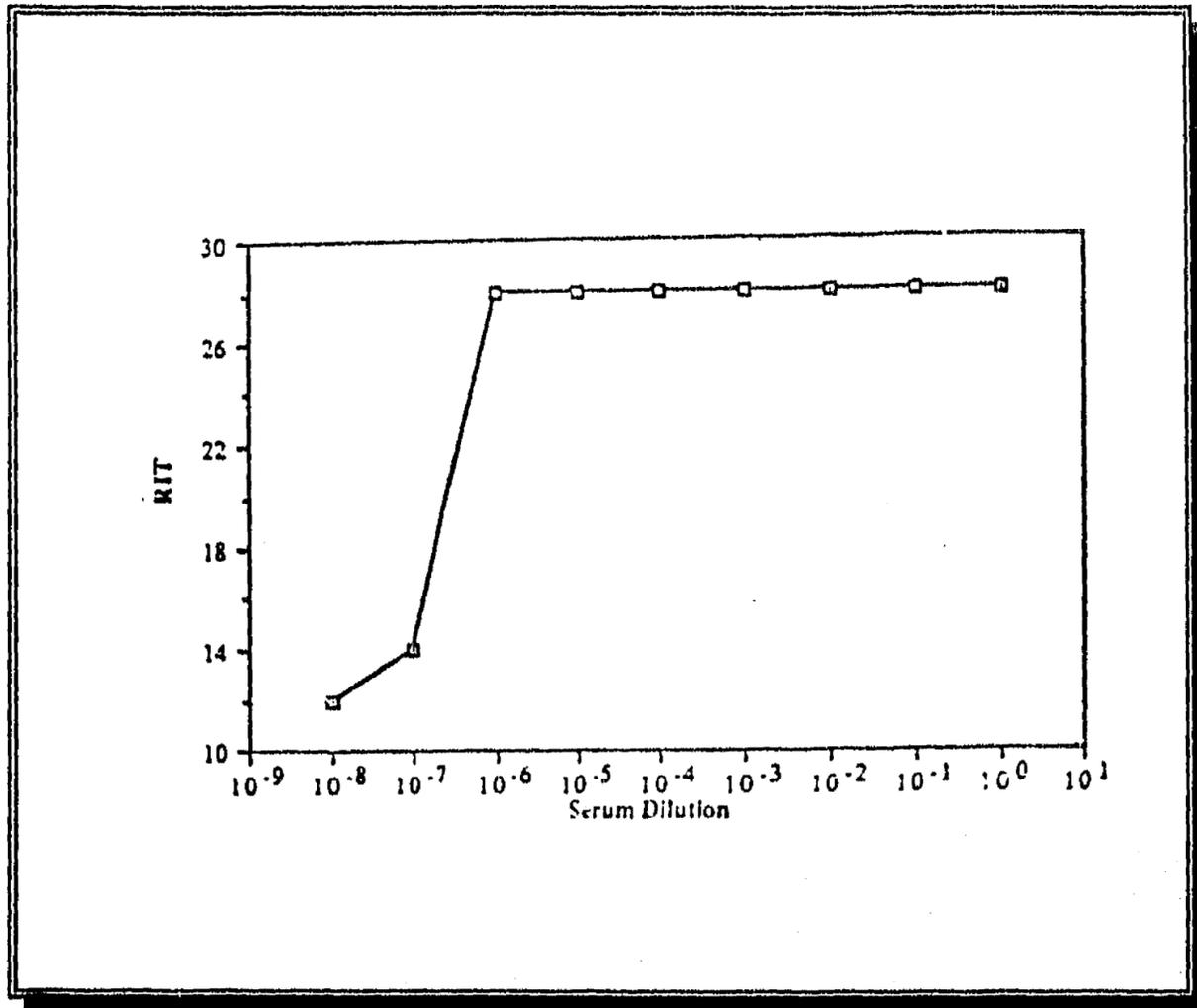


Figura 4 Títulos de inhibición de la formación de rosetas obtenido por Orozco y cols (1986).

#### Radioinmunoanálisis para uteroglobina (UTG)

Con el fin de conocer el contenido de uteroglobina presente en el lumen uterino tanto en los grupos control, como en los que recibieron tratamiento, las muestras de fluido uterino fueron analizadas a través del radioinmunoensayo de doble anticuerpo, específico para esta proteína, previamente descrito por Mayol y Longenecker (1974), y estandarizado en nuestro laboratorio (Cerbón & Pasapera, 1990). La uteroglobina pura fue donada por el Dr. Beato (Alemania) y el marcaje con  $^{125}\text{I}$  se hizo en el laboratorio mediante la utilización de lactoperoxidasa y el suero de conejo anti-cabra se utilizó como segundo anticuerpo. El primer anticuerpo (suero de cabra anti-UTG) fue también donado por el grupo del Dr. Beato. La sensibilidad del radioinmunoanálisis fue de 0.5 ng/ml, en tanto que los coeficientes de variación intra e inter ensayo fueron de orden del 10 % y 12 %, respectivamente.

Los resultados del contenido de uteroglobina, están expresados en  $\mu\text{g}$  de UTG por miligramos de proteínas. La cuantificación de proteínas totales presentes en los fluidos se hizo con la técnica de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

**Análisis de Northern Blot.****a) Extracción del ARN total.**

La obtención de ARN total a partir del útero total se llevo a cabo por el método descrito por Cathala, el cual involucra la homogeneización del tejido en un buffer de lisis [5M Iso-tiosianato de guanidina, 10 mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 7.5 y 8% de  $\beta$ -mercapto etanol (v/v)], la precipitación del ARN con cloruro de Litio 4 M y una extracción con fenol equilibrado con 50 mM EDTA/ 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Este método ha demostrado ser efectivo para la obtención de muestras de ARN con las cuales se pueden analizar moléculas de ARNm y algunos precursores de ARNm por arriba de 10 Kb. Las muestras de ARN así obtenidas se separaron en sus diferentes tamaños a través de su migración en geles desnaturantes de agarosa 1.1% , 6 % de formaldehido y un amortiguador (10 mM Hepes/ 1 M EDTA) durante 3 hs a 100 volts. Posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de etidio (0.5  $\mu$ g/ml) durante 15-30 minutos para su observación en una cámara de UV.

**b) Transferencia del ARN a membranas de nylon-nitrocelulosa.**

Para la transferencia de los ARN's se usaron los geles que no fueron teñidos previamente con bromuro de etidio, con el fin de evitar la transferencia inadecuada por el bromuro de etidio. La transferencia se hizo a membranas de nylon-nitrocelulosa ( GeneScreen, New England Nuclear, Boston, MS ) por elusión capilar, utilizando el método descrito por Thomas y cols (1980), el cual se lleva a cabo en 16 hs, en presencia de SSC 10 x. Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron lavadas con SSC 2x y posteriormente dejaron a 80°C , 2 hs en un horno de vacío.

**c) Prehibridación e hibridación del ARNm**

Las membranas se incubaron 3hs en una solución amortiguadora de prehibridación (Formamida 50%, Denhart's 4x, SSC 2x, SDS 1% , fosfatos 120 mM pH 6,8 y 10 $\mu$ g/ml de DNA de esperma de salmón), a 42°C en un baño y con agitación suave. Posteriormente la mitad del volumen de esta solución se descartó y se adicionó en cada caso la sonda específica para ARNm-UTG ó histona H4.

Las membranas se hibridaron 24 hs a 42°C . Posteriormente, la sonda de and se eliminó y las membranas se lavaron dos veces con SSC 2x durante 15 min a temperatura ambiente y dos veces adicionales con una solución de mayor astringencia ( SSC 0.1 x , SDS 1 % ) a 50°C en periodos de 30 minutos cada uno, y fueron expuestas a una placa X-OMAT-AR radiosensibles (Eastman Kodak, NY).

El fragmento de cDNA de uteroglobina se obtuvo de un plásmido recombinante (pUG12) el cual tiene un sitio de restricción Pst-I . El cDNA de la histona h4 estaba insertado en el plásmido pBR322 con un sitio Hind-III. Los plásmidos fueron cortados con su enzima específica ,los fragmentos purificados y electroeluidos a partir de geles de agarosa 1 % en TBE 0.5x y marcados con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP por el método de random primer (AE: 1-2 x 10 cpm/ $\mu$ ).

**Análisis estadístico**

Las diferencias entre grupos fueron evaluados por el análisis de varianza.

**Análisis de desplazamiento.**

Para el análisis de afinidad de unión relativa de la noretisterona y sus metabolitos, así como del RU-486 con el receptor de progesterona intracelular en el útero de la coneja, se usó  $^3\text{H}$ -ORG 2058 como radioligando. Un grupo de tres conejas prepúberes entre 0.8 y 1.2 kilogramos de peso corporal se trataron con 5 $\mu\text{g}$  de benzoato de estradiol durante tres días consecutivos. El cuarto día los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron los úteros completos.

Los úteros fueron homogeneizados en una solución amortiguadora TEDM con aprotinina ( 20mM Tris-HCl, pH 7.4 a 4°C, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM Dithiothreitol, 5.000 UK/ml Aprotinina y 10 mM Molibdato de Sodio) en una relación 1:6 (w/v) conteniendo glicerol al 10% (v/v). La mezcla se centrifugó a 105,000 g por 1 h a 2°C en un rotor SVV 50.1 (Beckman, Instruments, Palo Alto, CA).

Las alícuotas de citosol obtenidas, se incubaron durante 14 hs a 4 grados centígrados en presencia del ligando específico ORG 2058 marcado con  $^3\text{H}$ , en presencia de concentraciones crecientes de los esteroides no radiactivos: Progesterona ( $\text{P}_4$ ), NET, 5 $\alpha$ -NET, 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET, Estradiol ( $\text{E}_2$ ) y RU-486; incluyendo al ORG 2058 radioinerte, por un período de 14 hs, a 4°C. Las fracciones libres y unidas se separaron con carbón Dextran ( 250 mg Norit-A, 25 mg Dextran T-70 ) en 100 ml de buffer TEDM sin aprotinina . Se incubó durante 2 minutos, se centrifugó a 800 g a 4°C por 15 min y la radiactividad de los sobrenadantes se cuantificó en el espectrómetro de centelleo líquido.

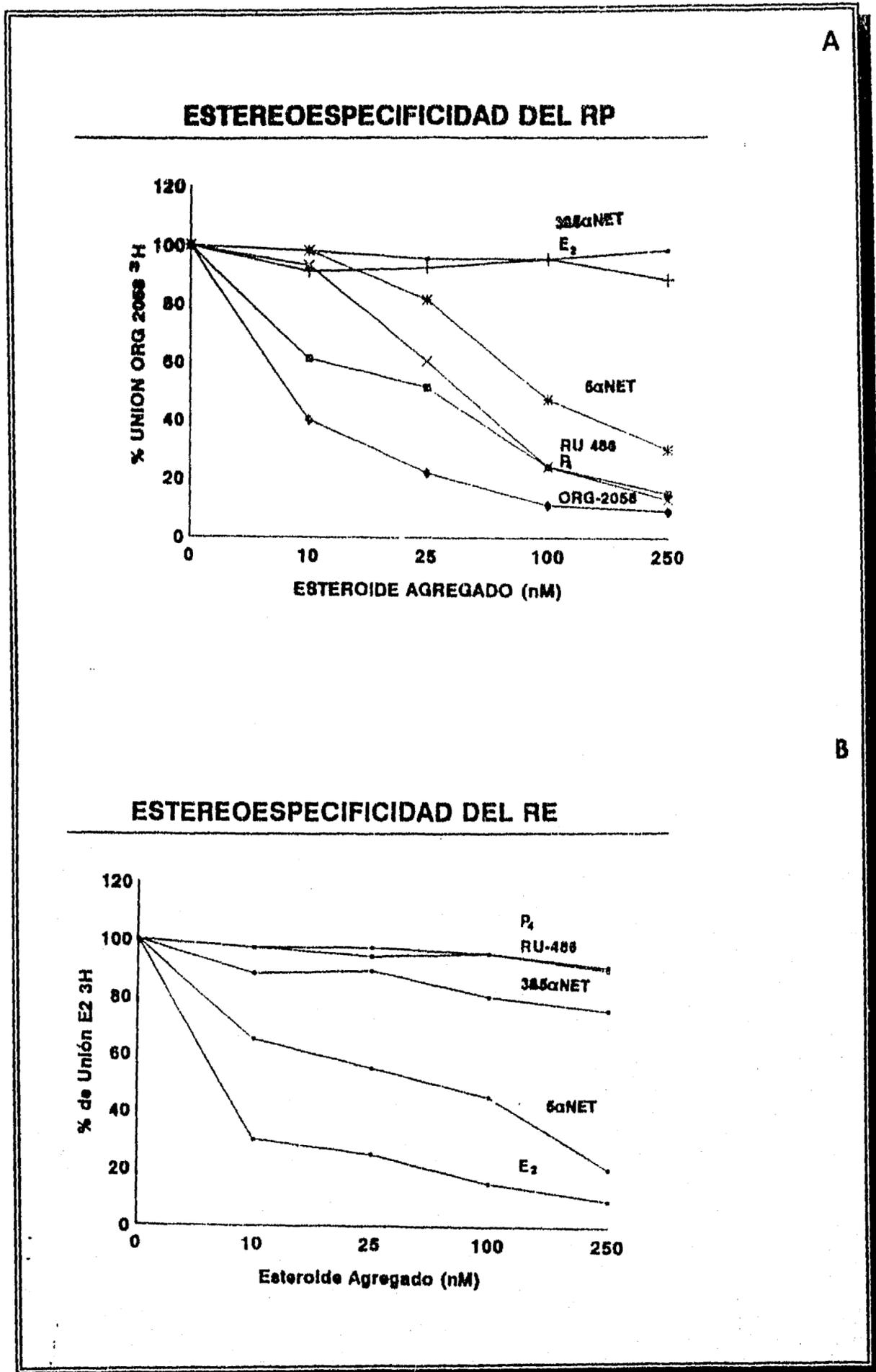


Figura 5. Análisis de competencia de los esteroides sintéticos y naturales no marcados al sitio de unión del receptor de progesterona ( A ) ó estradiol ( B ), en citosoles de útero de coneja prépuberes.

## RESULTADOS

### Interacción de NET y sus metabolitos con los receptores de progesterona y estrógenos.

Como se puede observar en la **figura 5 (a y b)**, tanto la  $P_4$  como las progestinas sintéticas NET y RU-486 muestran una afinidad de unión al receptor de progesterona (RP) muy alto, lo cual confirma los datos previamente reportados por Chávez y cols (1985) en la rata. Así mismo, la reducción de noretisterona a su metabolito  $5\alpha$ -NET ocasionó una disminución discreta en su afinidad por el RP cuando lo comparamos con la unión de la progesterona natural ó el ORG-2058. Por el contrario, el  $3\beta$ - $5\alpha$  derivado de NET no mostró ninguna interacción con este receptor al igual que el  $E_2$ .

### Inhibición de la gestación por Noretisterona y sus metabolitos.

Como se muestra en la **tabla II**, la noretisterona a la dosis diaria de 1 mg/kg no fué capaz de inhibir la gestación, sin embargo cuando se administró una dosis 5 veces mayor ( 5mg/Kg de peso/7 días) se observó inhibición completa de la gestación, ya que no se observó ningún sitio de implantación, a pesar de que la prueba de rosetas en el primer día demostró que la fertilización había ocurrido.

La administración de  $5\alpha$ -NET a la dosis de 1 mg/Kg de peso durante siete días inhibió parcialmente el proceso de la gestación, encontrándose que de 9 animales tratados, siete no mostraron evidencias de gestación en el día 8, ya que no se observaron sitios de implantación en el endometrio. Dos animales presentaron un número promedio de 3-5 sitios de implantación, siendo este promedio inferior al número de sitios de implantación para las conejas gestantes que recibieron solamente vehículo ( 9-10 sitios de implantación ).

Cuando la dosis de  $5\alpha$ -NET se incrementó a 1.5, 2.5 y 5.0 mg/kg de peso durante 7 días consecutivos, se indujo la inhibición completa de la gestación en todos los grupos tratados. Resultados similares se encontraron cuando el  $3\beta$  $5\alpha$ -NET se administró a la dosis de 1 mg/Kg de peso durante 7 días consecutivos, en todos los animales tratados.

La administración de la antiprogestina, RU-486, utilizada como control, mostró su acción contragestacional a las dosis utilizadas ( 1.0 ó 2.5 mg/kg de peso) demostrado por la ausencia de sitios de implantación en el endometrio después de siete días consecutivos de tratamiento en las conejas que habían sido fertilizadas. La correlación entre el efecto antiimplantación del  $5\alpha$ -NET y la ausencia de señal de del factor de embarazo temprano (FET) se demostró mediante la prueba de inhibición de rosetas en el grupo de conejas apareadas (día 0) y posteriormente tratadas con NET (5mg/kg),  $5\alpha$ -NET (1.5 mg),  $3\beta$  $5\alpha$ -NET (1 mg/kg) ó RU-486 (2.5 mg/kg) por 7 días consecutivos. El análisis del FET se hizo en muestras de suero de los días 1, 4 y 7 de la gestación. El suero de una coneja no gestante se empleó como control negativo y 3 muestras de suero tomadas también en los días 1, 4 y 7 de una coneja apareada que solo recibió el vehículo, fue considerado como control positivo de embarazo.

Tratamiento	Dosis* (mg/Kg)	No. Conejos E / A	Sitios de Implantación	FET
Vehículo	-	6/6	9-10	+
NET	1.0	6/6	9-10	+
	5.0	0/3	0	-
5 $\alpha$ -NET	1.0	7/9	3-4	+
	1.5	0/6	0	-
	2.5	0/6	0	-
	5.0	0/6	0	-
3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET	1.0	0/6	0	-
17 $\beta$ -E <sub>2</sub>	1.0	0/6	0	-
RU-38486	1.0	0/6	0	-
	2.5	0/6	0	-

\* 7 días consecutivos. Todas las muestras fueron analizadas 8 días después del apareamiento.

Tabla II Efecto del NET y sus metabolitos sobre la implantación y la actividad del factor de embarazo temprano. ( FET ). E = Embarazo. A = Apareadas. *Mol. Reprod. & Develop* 40:157(1995)

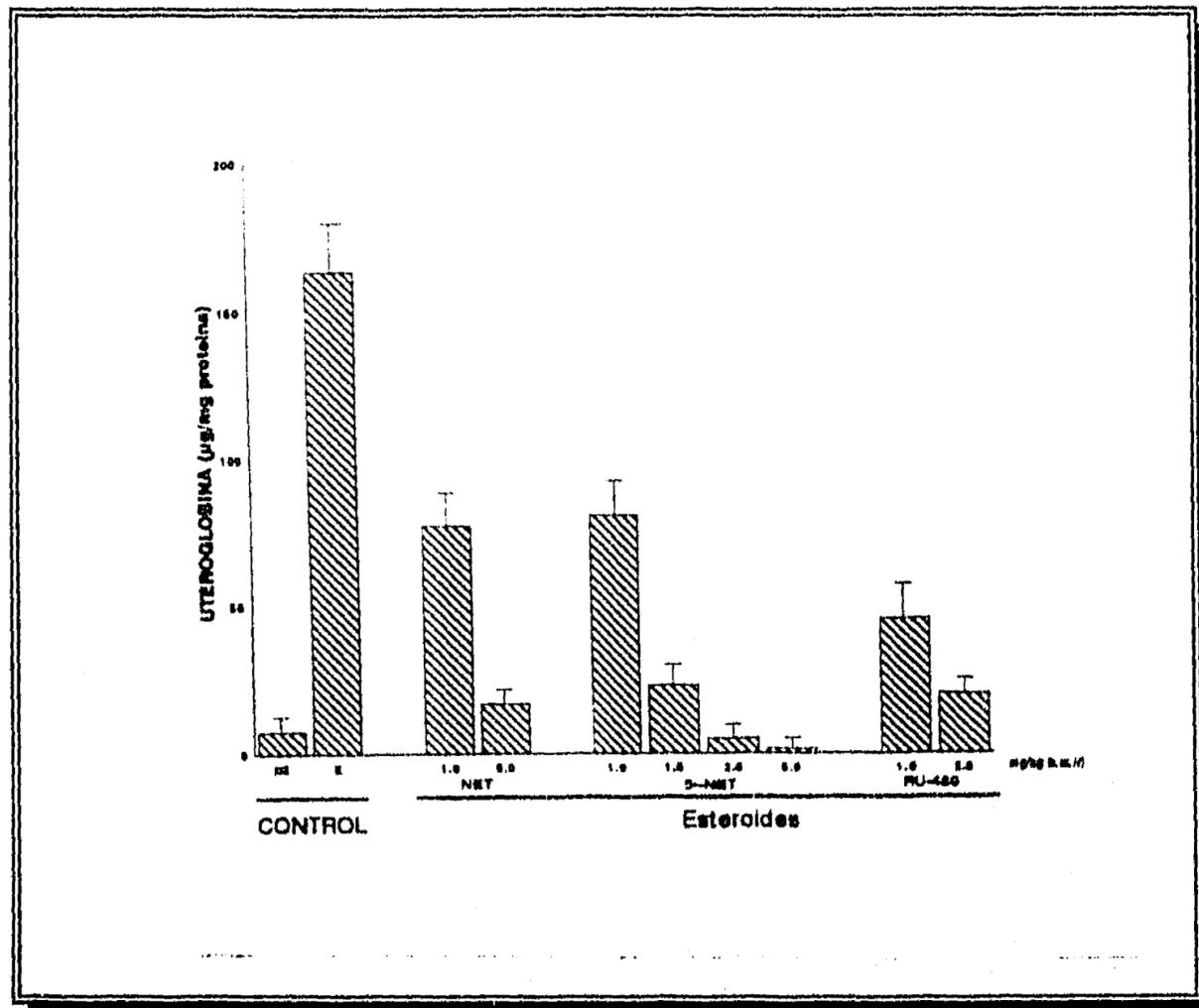
### Efecto de la Noretisterona y sus metabolitos sobre la síntesis de uteroglobina y su ARN mensajero en el útero de la coneja gestante.

#### 1. Concentración de uteroglobina en el fluido uterino.

##### 1.1 Después del tratamiento con dosis iguales y variables de esteroide.

Con el objeto de correlacionar los efectos contragestacionales de la noretisterona y sus metabolitos sobre la expresión del gen de uteroglobina se cuantificó la concentración de esta proteína en el lumen uterino por radioinmunoanálisis. En la **figura 6** se muestra que la administración de Noretisterona a conejas fertilizadas a la dosis de 1mg/Kg de peso, produjo una reducción del 50% en la concentración de uteroglobina. Sin embargo, cuando este compuesto se administró a una dosis 5 veces mayor (5mg/kg) la concentración de uteroglobina en el fluido uterino disminuyó en un 90%, de manera similar al observado con RU486 a la dosis de 2.5 mg/kg/7d, que correspondió a un 88%.

Por el contrario, la administración de 5 $\alpha$ -NET a la dosis de 1mg/kg/7d indujo una inhibición significativa (90%) en la concentración de uteroglobina que se acompañó de la inhibición del proceso de implantación. Además, se observó la reducción importante en la concentración de esta proteína, tanto en los animales tratados con 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET y RU-486; en ambos casos la inhibición de la implantación fue total en todos los animales.



**Figura 6. Concentración de uteroglobina en los fluidos uterinos de conejas fertilizadas tratadas con diferentes esteroides sintéticos.** Todos los animales (n=6) fueron tratados con NET, 5 $\alpha$ -NET, ó RU486 por siete días consecutivos. Las muestras fueron analizadas el día 8 después del coito por RIA. Los resultados están expresados en ug de UTG/mg de proteína (X DS). Animales no apareados (NP), y gestantes de 8 días fueron utilizados como controles negativo y positivo, respectivamente. *Mol. Reprod & Develop* 40:157(1995)

Como

se muestra en esta misma figura, la concentración de uteroglobina disminuyó en forma significativa en los grupos de animales fertilizados que fueron tratados con 5 $\alpha$ -NET a las dosis de 1.5, 2.5 y 5.0 mg/kg de peso por siete días consecutivos. Este efecto de 5 $\alpha$ -NET mostró ser dependiente de la dosis y la concentración de uteroglobina para la dosis de 5 mg/kg de este compuesto no fueron detectables por el radioinmunoanálisis.

### 1.2. Efecto de la administración de 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET y 17 $\beta$ -estradiol.

En la figura 7 se puede observar que 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET a la dosis de 1 mg por kilogramo de peso, administrado durante siete días consecutivos a un grupo de conejas apareadas, resultó en la disminución significativa de la concentración de uteroglobina en el fluido uterino. En la figura 6 demostramos que el 5 $\alpha$ -NET ejerce el mismo efecto inhibitorio sobre la concentración de UTG observado para el 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET, pero se necesitaron dosis mayores a un miligramo de este compuesto para que este efecto se llevara a cabo. El hallazgo sugiere un posible efecto estrogénico del 5 $\alpha$ -NET mediado a través de su biotransformación al 3 $\beta$ 5 $\alpha$ , por lo que se decidió estudiar la cinética de inhibición para el 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET y compararlo con el 17 $\beta$ -estradiol.

Tres grupos de animales (n=6) cada uno fueron apareados y tratados de acuerdo al siguiente esquema de tratamiento:

Controles		
Apaboda <sup>TM</sup>	3 días	Día 4
	5 días	Día 6
	7 días	Día 8
Tratados		
3B5 $\alpha$ -NET (1mg/kg)	3 días	Día 4
	5 días	Día 6
	7 días	Día 8
17B-E <sub>2</sub> (1mg/kg)	3 días	Día 4
	5 días	Día 6
	7 días	Día 8

En la **figura 7** se puede observar que el 3B5 $\alpha$ -NET tiene actividad inhibitoria importante en la cantidad de uteroglobina secretada al lumen uterino desde los primeros días de tratamiento, incrementándose esta actividad conforme se va aumentando el número de días de permanencia de este compuesto. Así mismo se demuestra que este metabolito tiene una potencia similar, pero no idéntica al del 17B-Estradiol, ya que como se puede ver en la gráfica, este esteroide disminuye en una forma importante la concentración de uteroglobina desde el tercer día de tratamiento.

Los resultados de las pruebas de inhibición de rosetas en los sueros de estos animales indicaron que la señal de fertilización positiva en el día uno, desaparece al cuarto día como resultado de tres días consecutivos del tratamiento con 3B5 $\alpha$ -NET, estos resultados son similares en los animales tratados con 5 $\alpha$ -NET a las dosis de 1.5 mg/kg.

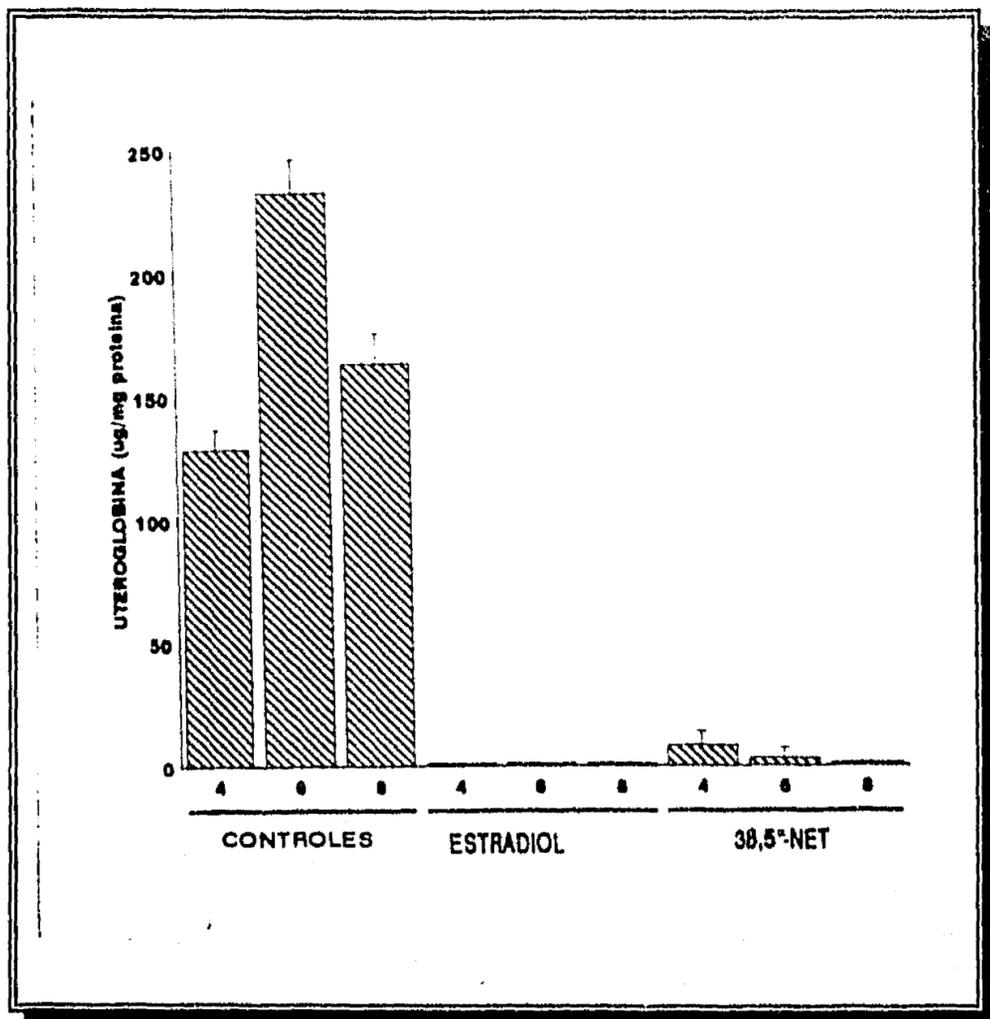


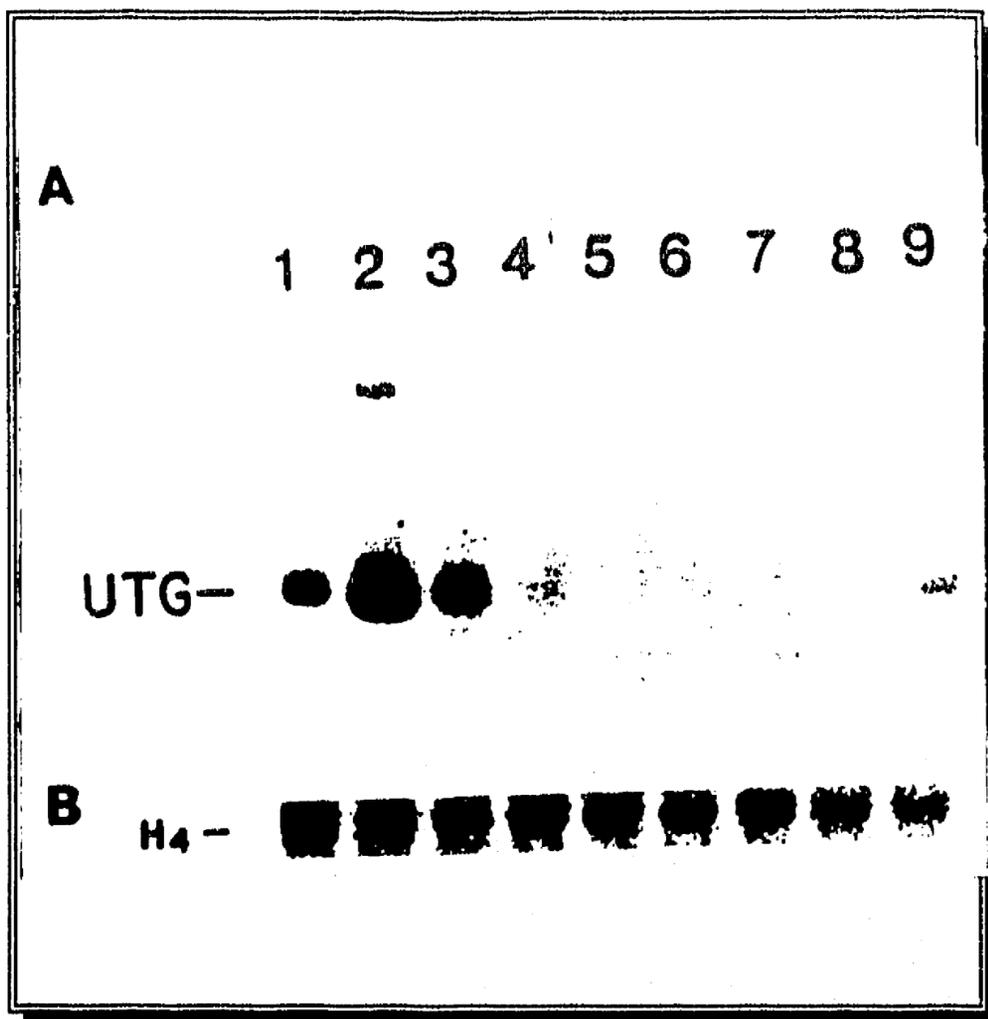
Figura 7. Concentración de UTG en los fluidos uterinos de las conejas fertilizadas y tratadas con 17β-estradiol y 3β5α-NET. Animales apareados y fertilizados (n=6) fueron tratados con cada esteroide por separado con una dosis igual de 1 mg/kg durante 3, 5 ó 7 días consecutivos. Los fluidos se colectaron un día después de la última inyección. Los resultados están expresados en μg de UTG/mg proteína (X DS). Conejas fertilizadas que sólo recibieron el vehículo por 3, 5 ó 7 días fueron usados como control. *Mol. Reprod & Develop* 40:157(1995)

## 2. Efecto de diferentes compuestos sobre la expresión del ARN mensajero de uteroglobina en el endometrio.

### 2.1 Efecto de 5α-NET y RU486 a diferentes dosis (Fig 8).

Para estudiar la correlación de los efectos de Noretisterona y sus metabolitos, así como del 17β-estradiol y la anti-progestina RU486, sobre la expresión del gen de uteroglobina y su actividad contragestacional, el contenido de ARN mensajero de uteroglobina en el útero de las conejas control y tratadas con los diferentes esteroides fué analizada a través de la técnica de Northern Blot. El contenido de ARN mensajero en estos grupos fué comparado con los grupos control, correspondientes a animales no gestantes (fig 8, panel 1) y de 3, 5 y 7 días de gestación (fig 8, panel: 2, 3 y 4, respectivamente) que únicamente recibieron el vehículo.

En la **figura 8** se puede observar que la expresión de ARN mensajero de uteroglobina en los



**Figura 8.** Análisis del ARN mensajero de UTG en el endometrio de las conejas fertilizadas y tratadas con 5 $\alpha$ -NET y RU486. 20  $\mu$ g de RNA total extraídos de conejas fertilizadas que fueron tratadas 7 días consecutivos con 5 $\alpha$ -NET (1.0, 1.5, 2.5 y 5 mg/kg, paneles 4 al 7); RU486 (1.0 y 2.5 mg/kg, paneles 8 y 9) fueron fraccionados en geles de agarosa 1.1%, transferidos a una membrana e hibridada con una sonda de ADN marcada con  $^{32}$ P para UTG e Histona H4. El tiempo de exposición fue de 16 hs. Controles: Panel 1) no embarazo; panel 2 y 3) embarazo de 5 y 8 días. (A) Hibridado con cDNA-UTG, (B) Histona H4. *Mol. Reprod & Develop* 40:157(1995)

animales que fueron tratados con 5 $\alpha$ -NET a diferentes dosis (**fig 8, panel: 5,6,7 y 8**), correlaciona positivamente con la concentración de uteroglobina en los fluidos uterinos, cuantificados por radioinmunoanálisis. Así podemos ver que la cantidad de ARNm hibridado en estos grupos, fue significativamente menor (dependiente de la dosis) que en el grupo control (**fig 8, panel 2,3 y 4**). Este mismo fenómeno se observó en animales tratados con RU-486; sin embargo, no existe correlación dosis-respuesta con respecto a las concentraciones de UTG en los fluidos uterinos y la expresión del ARNm (panel 8 y 9, **fig 7**) en donde se observa un pequeño incremento en la expresión del mensajero cuando se utilizó la dosis de 2.5 mg/Kg. Estos resultados sugieren un mecanismo de inhibición de estos compuestos a nivel transcripcional y una potencia muy similar entre ambos.

## 2.2 Cambios en la expresión del ARN mensajero de uteroglobina por la administración de 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET y 17 $\beta$ -estradiol.

Para establecer si existe correlación, en función del tiempo de administración de estos compuestos y la concentración de uteroglobina en el fluido uterino, se examinó la expresión del ARNm mensajero para esta proteína en el útero de las conejas tratadas con 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -NET a una misma dosis, pero diferentes días de estimulación y se comparó con los grupos de animales controles de 3, 5 y 7 días de gestación que solo recibieron vehículo, así como con los que recibieron 17 $\beta$ -estradiol con el mismo esquema (**figura 9**)

Los resultados indicaron que ambos compuestos inhibieron la expresión del ARNm, pero de manera diferente. Por un lado, el  $3\beta 5\alpha$ -NET, en forma dosis-dependiente, fué capaz de inhibir la expresión del ARNm de UTG. Si comparamos la cantidad de mensajero expresado en el día 3 de la gestación (fig 9, panel 2) con el el grupo tratado con  $3\beta 5\alpha$ -NET durante 3 días consecutivos (Panel 8), vemos no hay diferencia significativo en la expresión de este mensajero (fig 9, panel 8), sin embargo se hace significativa conforme se aumentan los días de tratamiento (fig 9, panel 3 vs 9; 4 vs 10). Por el contrario, el  $17\beta$ -estradiol indujo la expresión total del mensajero desde el inicio de su administración (fig 9, panel: 5,6 y 7).

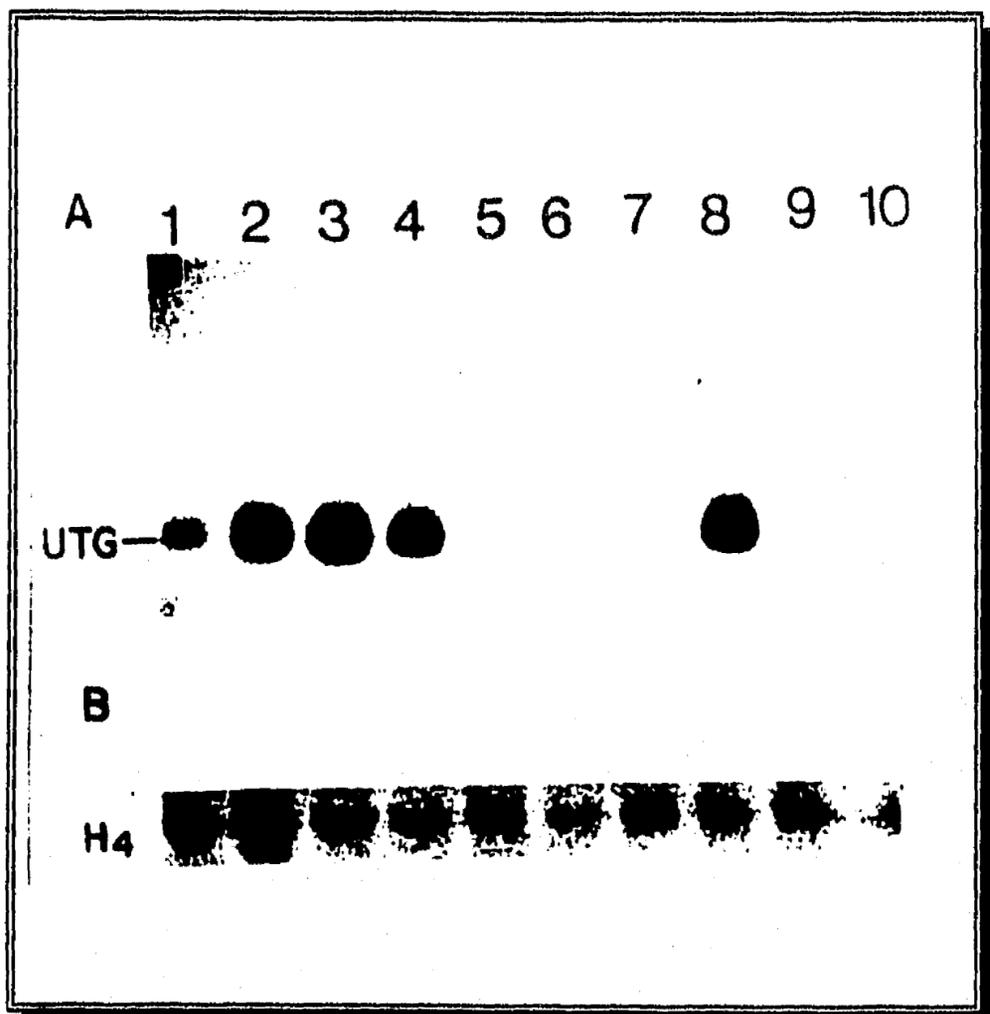


Figura 9. Efecto de  $3\beta 5\alpha$ -NET y  $17\beta$ -estradiol sobre la expresión del ARN mensajero de UTG. 20  $\mu$ g de ARN total de endometrio de conejas no gestantes (panel 1) y gestantes tratadas por 3, 5 ó 7 días consecutivos con: vehículo (panel 2-4); estradiol (1 mg/Kg, panel 5-7) y  $3\beta 5\alpha$ -NET a la misma dosis (panel 8-10) fueron procesados como se indicó en la fig.5. (A) Hibridización con cADN-UTG y (B) con Histona H4. Tiempo de exposición: 16 hs. *Mol. Reprod & Develop* 40:157(1995)

## DISCUSIÓN

El trabajo experimental de esta tesis fué orientado a la evaluación del efecto de Noretisterona y dos de sus metabolitos en el embarazo temprano en la coneja, utilizado como marcador bioquímico a la uteroglobina.

Los resultados de los experimentos de afinidad de estos compuestos por el receptor de progesterona muestran que la NET mantiene su afinidad por el receptor de progesterona, cuando es reducido en su anillo A en posición  $5\alpha$ . Sin embargo, cuando se hace una segunda reducción química pierde totalmente su afinidad por dicho receptor e interactúa con otro receptor diferente al de progesterona. Este es el caso de la reducción a  $3\beta 5\alpha$ -NET, metabolito que presenta afinidad por el receptor de estrógenos, (Fig 5).

Estos resultados confirman y amplían los datos informados previamente por Chávez y cols (1985) en la rata, así también explican la observación previa de que noretisterona, disminuye en forma significativa las concentraciones de LH en mujeres posmenopáusicas (Pérez-Palacios, 1981a, 1981b) y en ratas castradas (Larrea, 1983, 1984), que sugieren que esta progestina es reconocida por los sitios de unión a esteroides intracelulares diferentes al receptor de progesterona.

Estudios de funcionalidad de estos compuestos en la coneja prepúber, indicaron que si bien el metabolito  $5\alpha$ -NET no pierde su afinidad por el receptor de progesterona, adquiere un efecto antiprogestacional importante. Además, la formación de  $3\beta 5\alpha$ -NET le confiere capacidad para estimular eventos que son considerados bajo el control de los estrógenos (Pérez-Palacios, 1985; Chávez, 1985; Vilchis, 1986; Garza-Flores, 1986, 1991; Larrea, 1987). Estos hallazgos experimentales nos sugirieron que los derivados químicos de noretisterona podrían ser usados como agentes anticonceptivos poscoito y posfertilización, es decir, en el embarazo muy temprano.

Con el propósito de evaluar el efecto antiprogestacional, anticonceptivo y contragestacional de NET y sus derivados químicos, se utilizaron múltiples indicadores, tales como el registro de los sitios de implantación, la actividad del factor de embarazo temprano (FET), así como la expresión de la uteroglobina y su ARNm considerando que la uteroglobina es un buen marcador de actividad progestacional en el endometrio.

Nuestros resultados demostraron que la administración crónica (7 días) con Noretisterona a la dosis de 1.0 mg/kg no redujo en el número de sitios de implantación en las conejas fertilizadas, comparado con los encontrados en el grupo control; sin embargo, a dosis altas (5mg/kg) el efecto anti-implantación fué muy claro, ya que no se encontraron sitios de implantación en los animales tratados con esta dosis (Tabla II).

La administración de  $5\alpha$ -NET (1.5 mg/kg/7d) como de  $3\beta 5\alpha$ -NET (1mg/Kg/7d) resultó en un efecto anti-implantación más potente a dosis bajas, que aquellas utilizadas para NET, ya que en los animales tratados con estos metabolitos inhibieron completamente el proceso de implantación (Tabla II). Estos datos nos indican que la reducción de la noretisterona le confiere a sus metabolitos más efectividad como inhibidores del proceso de implantación.

Con el fin de correlacionar el efecto anti-implantación con el efecto antiprogestacional de estos compuestos, analizamos la expresión del gen de uteroglobina cuya regulación por progesterona y estrógenos es bien conocida (Bullok & Willen, 1974; Loosfelt y cols, 1981; Helftebein y cols).

Los resultados de estos experimentos demostraron que la administración de NET a la dosis mayor utilizada (5 mg/kg) reduce la concentración de uteroglobina en un 90% en el fluido uterino, y por el contrario, las dosis bajas de los dos de metabolitos reducidos fueron suficientes para reducir la producción de esta proteína (fig 6), sugiriendo que los efectos biológicos de la noretisterona pueden estar mediados vía sus productos reducidos.

Debe subrayarse que esta disminución en la concentración de uteroglobina está altamente relacionada con la reducción en la expresión de su ARN mensajero. Como se puede observar en la figura 8, la administración de  $5\alpha$ -NET a la dosis de 1.5 en adelante inhibió completamente la expresión del mensajero, indicando que su efecto se ejerce a nivel transcripcional, aunque, no se puede descartar que sea a nivel postranscripcional por incremento en la degradación del mensajero. Así mismo se demostró que el efecto inhibitorio de  $5\alpha$ -NET sobre la expresión del este mensajero, es similar al efecto ejercido por el antiprogéstágeno RU486, cuando se administró a dosis bajas (1 mg/Kg), lo que hace suponer que el mecanismo de acción es similar entre ambos esteroides sintéticos.

Estudios previos hechos en nuestro laboratorio demostraron que en conejas prepúberes, NET y sus metabolitos tienen la capacidad de inhibir la transcripción del gen de uteroglobina, inducida por progesterona, en una manera dependiente de la dosis administrada (Pérez-Palacios, 1992, Pasapera A, 1994). Estos hallazgos, aunados a la similitud de efectos del RU486 y  $5\alpha$ -NET, así como su especificidad de unión al receptor de progesterona (Reel, 1979; Rauch, 1985), sugieren que el efecto antihormonal de ambos compuestos está mediado a través del efecto intrínseco de la molécula sobre la actividad del receptor de progesterona.

Esta propuesta, se apoya con los datos obtenidos en conejas prepúberes, por Pasapera y cols (1995), quienes demostraron que estos metabolitos con acción antiprogéstacional, son capaces de bloquear la regulación a la baja del receptor de progesterona (RP) inducida por la progesterona. Estas observaciones sugieren que los efectos de  $5\alpha$ -NET y  $3\beta 5\alpha$ -NET se llevan a cabo a nivel transcripcional ó postranscripcional, a través del incremento de la síntesis o degradación del ARN mensajero del propio receptor.

Es posible que la inhibición inducida por el  $5\alpha$ -NET y el  $3\beta 5\alpha$ -NET se lleva a cabo por diferentes mecanismos, a través de sus uniones específicas a diferentes receptores (Reel, 1979; Vilchis, 1986). Así,  $5\alpha$ -NET y RU486 pueden bloquear la regulación a la baja inducida por progesterona en forma directa, por su interacción con el RP; en tanto que el  $3\beta 5\alpha$ -NET y estradiol estarían utilizando otro mecanismo alterno.

Está documentado que en el útero, el metabolito  $3\beta 5\alpha$ -NET se une específicamente al receptor de estrógenos e incrementa la expresión del RNA mensajero del RP y que la estimulación de la transcripción de este gen se lleva a cabo a través de los elementos de respuesta a estrógenos (ERE), localizados en la región +698/+723 del gen de RP del conejo (Savouret, 1991).

Es importante mencionar que en este estudio, el efecto inhibitorio del RU486 sobre la expresión del ARNm fue mucho más importante a la dosis baja utilizada (1 mg) que a la dosis alta (2.5 mg); sin embargo, este patrón no correspondió con la concentración de uteroglobina en el fluido uterino, en donde la dosis más alta indujo una importante disminución en la concentración de esta proteína.

Una posible explicación para este efecto dual del RU486, es la existencia de otros factores reguladores de la transcripción que producen patrones de regulación específicos para un determinado gen y/o tipo celular. De tal manera que un determinado promotor puede ser regulado por uno ó múltiples factores de transcripción. Tal es el caso, por ejemplo, del receptor de glucocorticoides que es capaz de regular la transcripción del gene de proliferina en forma positiva ó negativa a través de la formación de complejos de unión al ADN con Jun y Fos (Akerblom, 1988, Diamond, 1990). Otro ejemplo de ello, es el sinergismo y cooperatividad entre el receptor de progesterona y el factor de respuesta al estímulo con 8-Br-cAMP para incrementar la actividad transcripcional del promotor de MMTV-CAT en células T47D.

Además, algunos estudios in vitro han demostrado que el RU-486 administrada a altas dosis, presenta actividad estrogénica débil, incrementando la proliferación celular e induciendo la

actividad de la expresión de CAT bajo el control del elemento de respuesta a estrógenos, derivado del gene de Vitellogenina del *Xenopus Leavis*, en células humanas de cáncer de mama (Meei-Hue, 1993). Es por lo tanto posible que el incremento en la expresión del mensajero estimulado por el RU-486, se lleve a cabo a través de esta vía en el endometrio de la coneja.

Interesantemente, cuando se administró dosis altas de  $5\alpha$ -NET la expresión del mensajero de UTG fué abolida totalmente, lo cual difiere de lo encontrado para RU486, lo que sugiere la existencia de mecanismos diferentes entre ambos esteroides sintéticos cuando se administran a dosis mayores. Existen estudios que demuestran que la administración de de altas dosis de estrógenos en la coneja, tienen producen efectos opuestos al ejercido por la progesterona, ya que disminuyen las concentraciones de uteroglobina en el fluido uterino (Bullock, 1974, 1977; Pasapera, 1994), pero el mecanismo no se conoce.

Con los datos obtenidos en este estudio con NET y sus metabolitos, no podemos explicar esta diferencia, sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que estos compuestos estén activando ó inactivando algún(os) factor(s), necesarios para la transcripción del gen de UTG, como sucede para otros genes.

En los últimos años se han identificado algunos factores transactivadores que se unen a los elementos de unión de genes de respuesta en varios tejidos (Faisst, 1992). Estos factores funcionan como "reguladores maestros" que activan en forma coordinada la transcripción selectiva de algunos genes cuyos productos están correlacionados con funciones especiales de un tejido ó célula en particular (Maniatis, 1991). Es por ello sugestivo que la activación y regulación de un número de genes codificadores de las proteínas asociadas al estado de embarazo estén gobernadas por factores transactivadores, únicos en el endometrio y que pudieran ser reguladas por las propias progestinas sintéticas utilizadas en nuestro estudio, pero esto deberá ser evaluado en otro estudio.

Existen pocos estudios orientados a la búsqueda de éstos factores durante el embarazo en el conejo, pero existen claras evidencias de la existencia de proteínas nucleares expresadas en células endometriales que se unen a sitios específicos de la región del promotor de uteroglobina que son importantes para la activación de la transcripción. Asimismo, está demostrado que esta actividad es dependiente del tipo celular utilizado, ya que no todas las células contienen la maquinaria necesaria para la activación de la transcripción del gen de uteroglobina.

Un ejemplo de ello es la diferente regulación en la expresión de este gen en el oviducto y el endometrio en esta especie. Esta demostrado que mientras la expresión de este gen en el endometrio es altamente dependiente de la progesterona, en el oviducto es constitutiva; es decir, no depende de una estimulación hormonal para su expresión. El mecanismo de ello aún no se conoce, pero la presencia ó ausencia de algunos factores, regulados o no por las hormonas esteroides podría explicar esta situación.

Estos resultados también se apoyan de estudios de "ADNsa I footprinting" en donde se demostró que la región del TATA-box (-40 a -18) del promotor de uteroglobina es protegida específicamente por extractos nucleares de células Ishikawa provenientes de adenocarcinomas humanos, pero no por extractos de células Hela (cervix) (Klug y cols, 1994), además se observó que en las células Ishikawa, la transcripción del gene de uteroglobina es más eficiente que en Hela (Misseyanni, 1991; Suzke, 1992).

Por otro lado, como se señaló en párrafos anteriores, la reducción de  $5\alpha$ -NET a la forma  $3\beta$  hace que este último adquiera actividad estrogénica (Larrea, 1987) por lo que en el presente estudio comparamos su efecto con el ejercido por el  $17\beta$ -estradiol cuya actividad anti-progestacional y anti-implantación a altas dosis ha sido previamente bien confirmado (Kopu, 1981; Gidley-Baird, 1986).

Nuestros resultados demostraron que ambos compuestos, el 3B5 $\alpha$ -NET y el 17 $\beta$ -estradiol a la misma dosis, ejercen un potente efecto antiprogestacional reflejado por una inhibición importante tanto de la síntesis de uteroglobina como en el contenido de su RNA mensajero (fig 7,9), sugiriendo que el 3B5 $\alpha$ -NET puede inhibir la expresión del gen a través de su interacción con el receptor de estrógenos; lo cual confirma nuestros resultados previos en animales prepúberes (Cerbón 1990).

A pesar de que se ha demostrado que el estradiol a bajas dosis puede estimular la transcripción del gen de uteroglobina (Loosfelt, 1981), nuestros resultados demuestran una regulación negativa para esta proteína cuando se administra a dosis altas. Resultados similares a los nuestros han sido previamente informado por Kopu, 1981, quien demostró una inhibición de la transcripción de UTG dependiente de la dosis de estrógeno administrada y a pesar de que el mecanismo molecular involucrado en esta regulación negativa no es bien entendido, la presencia de elementos de respuesta no canónicos a estrógenos (ERE) dentro de la región del promotor del gen de uteroglobina (Slater, 1990), sugieren que estos ERE y el receptor de estrógenos pudieran estar implicados.

El compuesto 3B5-NET es capaz de unirse con alta afinidad al receptor de estrógenos, lo que sugiere que utilice la misma vía de inhibición que la hormona natural como lo señalamos anteriores en el caso de los animales prepúberes.

Otra explicación posible para entender el mecanismo antiimplantación ejercido por la 5 $\alpha$ -NET es un efecto inductor sobre los mecanismos de regulación del crecimiento y proliferación celular en el endometrio. En efecto, una posibilidad podría ser su participación en el proceso de muerte celular programada (Apoptosis) en las células epiteliales del endometrio. En el endometrio del conejo, un 97.5% de las células epiteliales presenta este tipo de muerte celular (Nawaz, et al, 1987; Rotello et. al. 1989) y ha sido demostrado que los esteroides ováricos juegan un papel importante en su regulación.

En el sistema reproductor existen evidencias claras de esta dependencia y como ejemplo de ello es el hecho de que durante el ciclo endometrial existe una importante pérdida de células epiteliales glandulares durante las fases secretora, premenstrual y menstrual (Hopwood, 1975). Parr y col, 1987 demostraron que una proporción importante de células cercanas al sitio de implantación del blastocisto en la rata, presentan una morfología típica de muerte celular por apoptosis y asimismo se ha demostrado la inducción de la apoptosis en otros órganos hormona-dependientes como la próstata y la glándula mamaria (Thompson EB, 1994).

Estudios de células endometriales de conejo mantenidas en cultivo, demostraron que la relación de muerte y proliferación celular cambia con respecto al tiempo en cultivo con la misma periodicidad que los cambios en el DNA, por lo que se postuló la existencia de un mecanismo de regulación mediado por factores de proliferación y factores de muerte celular producido por las propias células para mantener la homeostasis de la masa del cultivo total.

Algunos estudios *in vivo*, han demostrado que la administración de 17 $\beta$ -estradiol (1 mg/kg) o progesterona (2.5 mg/kg) no solo incrementan la proliferación celular del epitelio uterino del conejo, sino que también disminuyen el número de células apoptóticas, siendo la progesterona la más eficiente (Newaz y cols, 1987)

En muchas especies, la ovulación y la formación subsecuente del cuerpo lúteo son procesos fisiológicos que se requieren para iniciar y mantener la proliferación y diferenciación celular, eventos importantes para la implantación del blastocisto.

La progesterona es una hormona muy importante en el mantenimiento de la glándula mamaria y el crecimiento endometrial durante el embarazo. Su conexión con el proceso de muerte celular proviene de los hallazgos de Hopwood and Levison, (1976) quien observa un incremento en el

número de células apoptóticas en el endometrio de mujeres en la etapa premenstrual.

Existen fuertes evidencias de que la progesterona es un supresor de la apoptosis del epitelio uterino, ya que la administración de este esteroide a conejas pseudo-embarazadas ovariectomizadas es capaz de prevenir la muerte celular por apoptosis. Por el contrario, la administración RU-486 a conejas pseudo-embarazadas induce la apoptosis celular de una forma similar al observado en los animales ovariectomizados (Rotello, 1992).

Es posible que si el  $5\alpha$ -NET tiene un efecto bloqueador de la acción de la progesterona- como previamente lo demostramos- entonces pudiera estar ejerciendo un efecto inductor de apoptosis de las células epiteliales del endometrio desde el inicio de su administración, desfasando de esta manera la maduración del endometrio necesario para la implantación del blastocisto.

En conejas prepúberes se ha demostrado que el RU-486 se une con una alta afinidad al receptor de progesterona, inhibe la proliferación celular (Philliberth et al, 1985) y disminuye la síntesis de uteroglobina (Rauch, 1985). En el presente trabajo, nosotros demostramos que al igual que el RU-486, el metabolito  $5\alpha$ -NET tiene afinidad por el receptor de progesterona y disminuye los niveles de uteroglobina en el lumen uterino y de su RNA mensajero. Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de este compuesto se lleva cabo a nivel transcripcional y postranscripcional, pero no podemos descartar que la disminución a concentraciones endometriales tanto de uteroglobina como de su ARN mensajero puede deberse también a un aumento en el número de células secretoras de uteroglobina que entran en apoptosis. Creemos que esta última posibilidad no puede ignorarse y que sería muy interesante explorarla en un futuro, ya que hasta la fecha no existen evidencias directas de que la uteroglobina "per se" sea la molécula responsable de que se lleve a cabo el proceso de la implantación.

A pesar de que no existen evidencias experimentales en el conejo que involucren a los estrógenos con la muerte celular programada en ningún órgano ó tejido en particular, Sandow y cols, 1976 demostraron la inducción de la apoptosis en el endometrio del hámster, secundaria a una privación de estimulación estrogénica. Sería también importante descartar esta posibilidad en el endometrio del conejo, lo cual nos ayudaría a disecar aún más el efecto antiprogestacional y anti-implantación de los derivados reducidos de NET observado en nuestros estudios.

### CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la potencia y efectividad de la progestina sintética NET como anticonceptivo poscoital documentada previamente en la rata, podría estar mediada por su reducción en el anillo A; que da como resultado la formación de  $5\alpha$ -NET y  $3\beta 5\alpha$ -NET.
2. La potencia anti-progestacional y anti-implantación demostrada para este metabolito en la coneja es similar a lo observado para la antiprogestina sintética RU486 en cuanto a la reducción en la concentración endometrial de uteroglobina, posiblemente por su interacción con el receptor de progesterona; pero de acuerdo a nuestros resultados, dosis altas de ambos compuestos ejercen un efecto diferente sobre la expresión de su ARN mensajero, indicando la existencia de un mecanismo de acción diferente para estos compuestos.
3. El efecto anti-progestacional de  $5\alpha$ -NET durante el embarazo temprano en estos animales podrían estar mediados a través de la formación de otro metabolito con actividad estrogénica,  $3\beta 5\alpha$ -NET, vía los elementos de respuesta para estrógenos presentes dentro del promotor del gene de uteroglobina ó a través de la activación ó inactivación de otros factores importantes para la actividad transcripcional de este gen.
4. Nuestros resultados en general demuestran que los derivados sintéticos de noretisterona, reducidos en su anillo A, adquieren actividad antiprogestacional y por consiguiente son capaces de bloquear el proceso de implantación en el embarazo temprano de la coneja, lo cual tiene implicaciones importantes en el diseño de nuevos compuestos contraceptivos poscoitales. Así mismo nos proporcionan la explicación del mecanismo de acción molecular de NET, que será de gran utilidad para futuras investigaciones en este campo.

## REFERENCIAS

- Arthur AT, Cowan BD, Daniel JC (1972). Steroid binding to blastokinin. **Fertil Steril 23:85-92**.
- Arthur AT & Chang MC (1974). Induction of blastokinin by oral contraceptive steroids: implication for fertility control. **Fertil Steril 25:217-221**.
- Atger M, Mercier JC, Haze G, Fridlansky F & Milgrom E (1979). N-terminal sequence of uteroglobin and its precursor. **Biochem J 177:985-988**.
- Atger M, Perricaudet M, Tiollais P & Milgrom M (1980). Bacterial cloning of the rabbit uteroglobin structural gene. **Biochem Biophys Res Commun 93:1082-1088**.
- Bach JF & Antonie B (1968). In vitro detection of immunosuppressive activity of anti-lymphocyte sera. **Nature, London 217:658-659**.
- Baker ME (1983). Amino acid sequence homology between rat prostatic steroid binding protein and rabbit uteroglobin. **Biochem Biophys Res Commun 114:325-330**.
- Bally A, Atger M, Atger P, Cerbón MA, Allison M, Vo Hai MT, Logeat F & Milgrom E (1983). The rabbit uteroglobin gene. Structure and interaction with the progesterone receptor. **J Biol Chem 258:10384-10389**.
- Beato M & Beler R (1975). Binding of progesterone to uteroglobin. **Biochim Biophys Acta 392:346-356**.
- Beier HM. (1968). Uteroglobin: A hormone sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. **Biochem Biophys Acta 16:289-291**.
- Beier HM (1976). Uteroglobin and related biochemical changes in the reproductive tract during early pregnancy in the rabbit. **J Reprod Fertil Supp 25:53-69**.
- Belser HM, Elger W, Hegele-Hartung, Mootz O & Belser-Hellwing K (1991). Dissociation of corpus luteum, endometrium and blastocyst in human implantation research. **J Reprod Fertil 92:511-523**.
- Bochskanl R, Kirchner C (1981). Uteroglobin and the accumulation of progesterone in the uterine lumen of rabbit. **Wilhelm Roux's Arch 190:127-131**.
- Bochskanl R, Thle M, Kirchner C (1984). Progesterone dependent uptake of uteroglobin by rabbit endometrium. **Histochemistry 80:581-589**.
- Bochskanl R, Thle M, Wirth B, Kirchner C (1988). Uteroglobin as progesterone-binding protein in the preimplantation uterine epithelium of the rabbit: Histochemical studies. **Cell Tiss Res 252:625-630**.
- Bochskanl R, Wirth B, Kirchner C (1988). Uteroglobin as a progesterone-binding protein in the preimplantation uterine epithelium of the rabbit: Biochemical studies. **Human Reprod 3:844-850**.
- Bowers A, Ringold HJ, & Denot E (1958). Steroids C19-Nordihydrotestosterone derivatives. **J Am Chem Soc 80:6115-6121**.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem 72:248-254**.
- Browning JY, Keyes PL, Wolf RC (1980). Comparison of serum progesterone, 20 -dihydroprogesterone and estradiol 17 $\beta$  in pregnant and pseudopregnant rabbit: evidence for postimplantation recognition

of pregnancy. **Biol Reprod** 23:1014-1019.

Bullock DW & Villen GF (1974). Regulation of a specific uterine protein by estrogen and progesterone. **Proc Soc Exp Biol Med** 146:294.

Bullock DW (1977). In vitro translation of messenger RNA for uteroglobin like protein from rabbit lung. **Biol Reprod** 17:104.

Cathala G, Savouret JF, Mendez B, West BL, Karin M, Martial JA, Baxter JD (1983). A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. **DNA** 2:329-335.

Cato AC, Geisse B, Wenz M, Westphal & Beato M (1984). The nucleotide sequences recognised by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin gene region are located far upstream from the initiation of transcription. **Embo J** 3:2731-2736.

Cavanagh AC, Morton H, Rolfe BE & Gidley-Baird AA (1982). Ovum factor: a first signal of pregnancy?. **Am J Reprod Immunol** 2:97-101.

Castro I; Cerbón MA; Pasapera AM; Gutierrez-Sagal R; Orozco C; García GA; Camacho-Arroyo I; Anzaldúa R; and Pérez-Palacios G (1995). Molecular mechanisms of the anti-hormonal and anti-implantation effects of norethisterone and its A ring reduced metabolites. **Molecular Reproduction and Development** 40: 157-163.

Cerbón MA, Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, García GA 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.

Cerbón MA, Lemus AE, Vilchis F, Pasapera AM, García GA, Pérez-Palacios (1991). A ring reduced derivatives of norethisterone exert antihormonal effects: In: Negro Villar A, Pérez-Palacios G (eds). **Reproduction, Growth and Development**. New York Raven Press, pp:175-187.

Clarke FM & Wilson S (1982). Biochemistry of early pregnancy factor. In: JC Grudzinskas, B Teisner & M Seppala. **Pregnancy proteins**. Acad Press, Sydney, pp: 407-412.

Clarke FM, Wilson S, McCarthy R, Perkins T, Orozco C (1987). Early pregnancy factor: large scale isolation of rosette inhibition test active polipeptides from ovine placental extracts. **J Reprod Immunol** 10:133-156.

Chavez BA, Vilchis F, Pérez AE, García AG, Grillasca I & Pérez-Palacios G (1985). Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. **J Steroid Biochem** 22(1):121-126.

Dickmann Z., Dey SK & Gupta JJ. (1975). Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. **Proc Natl Acad Sci Usa** 72:298-300.

Dickmann Z, Dey SK, Gupta JJ. (1976). A new concept : control of early pregnancy by steroid hormones originating in the perimplantation embryo. **Vitam Horm.** 34:215.

El-Banna & Sacher Bernhard (1977). Study on steroid hormone receptors in rabbit oviduct and uterus during the first few days after coitus and during egg transport. **Biology of Reproduction** 17:1-8.

Edwards RG, Fishel SB. (1982). The human uterus in the luteal phase and early pregnancy. In: Edwards RG, Purdi JM (eds). **Human conception in vitro**. New York Acad Press, pp:257-288.

English HF, Kuprianov N, Isaacs JT (1989). Relationship between DNA fragmentation and apoptosis

in the programmed cell death in the rat prostate following castration. **Prostate** 15:233-250.

Feinberg A & Vogelstein B (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal Biochem** 137:6-13.

Firyal S, Khan-Dawood & M Yusoff Dawood (1984). Implantation of the rabbit blastocyst: sequential change in estradiol and progesterone and their receptors. **Am J Obstet Gynecol** 150(5):450.

Garza-Flores J, Menjivar M, Cardenas M, Reynoso M, Garcia GA & Pérez-Palacios G. (1991). Further studies on the antigonadotropic mechanism of action of norethisterone. **J Steroid Biochem Molec Biol** 38:89-93.

Gidley-Baird AA, O'Neill C, Sinosich MJ, Porter RN, Pike IL (1986). Failure of implantation in human "in vitro" fertilization and embryo transfer patients: the effects of altered progesterone/estrogen ratio in human and mice. **Fertil Steril** 45:69-74

Ghosh D, De P, Sengupta J (1992). Effect of RU486 on the endometrial response to deciduogenic stimulus in ovariectomized rhesus monkeys treated with estrogen and progesterone. **Human Reprod** 7:1048-1060.

Goswami A & Feigelson M (1975). Differential regulation of a low molecular weight protein in oviductal and uterine fluids by various hormones. **Endocrinology** 95:669-675.

Gutiérrez-Sagal R, Pérez-Palacios G, Langley E, Pasapera AM, Castro I, Cerbón MA (1993). Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. **Mol Reprod Develop** 34:244-249.

Heins B & Beato M (1981). Hormonal control of uteroglobin secretion and preuteroglobin mRNA content in rabbit endometrium. **Mol Cell Endocrinol** 21:139-150.

Hopwood D & DA Levison (1976). Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. **J Pathology** 119:159-166.

Isomaa V (1981). In vitro binding to and in vivo effects on the cytosol and nuclear progesterone receptors of various progestins, and their relation to synthesis of uteroglobin in rabbit uterus. **Biochem Biophys Acta** 675:9-16.

Janne O, Isomaa UV, Torkkel TK, Isotalo HE, Kopu HT (1983). Hormonal regulation of uteroglobin synthesis in the rabbit uterus. In: Wayne Bardin C, Millgrom E, Mauvais Jarvis P (eds). **Progesterone and progestins**. New York Raven Press. pp:33.

Jantzen C, Fritton HP, Igo-Kemenes T, Espel E, Janich S, Cato ACB, Mugele K & Beato M (1987). Partial overlapping of binding sequences for steroid hormone receptors and DNase hypersensitive sites in the rabbit uteroglobin gene region. **Nucleic Acids Res** 15:4535-4552.

Kirchner C (1976). Uteroglobin in the rabbit. **Cell Tiss Res** 170:415-424.

Klug Jorg; Knapp Stefan, Castro Ivone, Beato M (1994). Two distinct factors bind to the rabbit uteroglobin TATA-box region and are required for efficient transcription. **Molecular and Cell Biology** 14(9): 6208-6218.

Kopu HT, Esko K, Kokkonen T, Janne O (1981). Acute antiprogesterone action of estradiol in the rabbit uterus. **Endocrinology** 109:1479-1483.

- Krishnan RS & Daniel JC (1967). Blastokinin inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. **Science** **158:490-492**.
- Krushe Claudia & Beier HM (1993). Localization of uteroglobin mRNA during pregnancy in the uterus and oviduct of the rabbit. **J Reprod & Fertil . Abstracts series (12): abst 77, pp 44**.
- Larrea F, Escobar N, Garza-Flores J, Moctezuma O, Martinez CA & Pérez-Palacios G (1983). Nuclear translocation of estradiol receptors by the in vivo administration of norethisterone: an alternate mechanism for gonadotropin inhibition. **J Steroid Biochem** **19:1747-1752**.
- Larrea F, Moctezuma O & Pérez-Palacios G (1984). Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. **J Steroid Biochem** **20:841-847**.
- Larrea F, Vilchis F, Chavez B, Pérez AE, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G (1987). The metabolism of 19-Nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. **J Steroid Biochem** **27:657-663**.
- Loosfelt F, Fridlansky F, Savouret JF, Atger M & Milgrom E (1981). Mechanism of action of progesterone in the rabbit endometrium: induction of uteroglobin and its messenger RNA. **J Biol Chem** **256:3465-3470**.
- Lopez de Haro MS, Garcia C, Nieto A (1990). Localization of an estrogen receptor binding site near the promoter of the uteroglobin gene. **FEBS Lett** **265:20-22**.
- Lund J, Brant I, Poellinger L, Bergman A, Klasson E, Wehler & Gustafsson JA (1985). Target cells for the polychlorinated biphenyl metabolite 4,4'-bis(methylsulfonyl)-2,2',5',5'-tetrachlorobiphenyl. Characterization of high affinity binding in rat and mouse lung cytosol. **Mol Pharmacol** **27:314-323**.
- Martikainen P, Isaacs JT (1990). An organ culture system for study of programmed cell death in the rat ventral prostate. **Endocrinology** **127:1268-1277**.
- Mayol RF & Longenecker DE (1974). development of radioimmunoassay for blastokinin. **Endocrinology** **95:1534-1542**.
- Michel R, Huges L, daniel F, Milgrom E (1985). Mechanism of action of an progesterone, RU486, in the rabbit endometrium: effects of RU486 on the progesterone receptor and the expression of the uteroglobin gene. **European J Biochem** **148:213-218**.
- Miele L, Cordella-Miele E, Mukherjee AB (1987). Uteroglobin: structure, molecular biology and new perspectives on its function as a phospholipase A2 inhibitor. **Endocrine Review** **8:474-490**.
- Morton H, Hegh V & Clunie GJA (1975). Antilymphocyte serum: studies of the rosette -inhibiting antibody in rabbit anti-mouse ALS. **J Exp Biol Med Sci** **53:373-380**.
- Morton H, Hegh V & Clunie GJA (1976). Studies of rosette inhibition test in pregnant mice: evidence of immunosuppression. **Proc Res Soc B** **193:413-419**.
- Morton H, Rolfe B, Clunie GJA, Anderson MJ & Morrison J (1977). An early pregnancy factor: detected in human serum by the rosette inhibition test. **Lancet** **i:349-397**.
- Morton H, Rolfe BE, McNeill L, Clarke P, Clarke FM & Clunie GJA (1980). Early pregnancy factor: tissue involved in its production in the mouse. **J Reprod Immunol** **2:73-82**.
- Mukherjee AB, Ulane RE, Agrawal AK (1982). Role of uteroglobin and transglutaminase in masking the

antigenicity of implanting rabbit embryos. **Am J Reprod Immunol Microbiol** 2:135-141.

Nishida M, Kasahara K, Kaneko M & Iwasaki H (1985). Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells containing estrogen and progesterone receptors. **Acta Obst Gynecol Jpn** 37:1103-1111.

Noske IG & Feigelson M (1976). Immunological evidence of uteroglobin (blastokinin) in the male reproductive tract and non-reproductive ductal tissues and their secretion. **Biol Reprod** 15:704-713.

O'Neill C (1985) Thrombocytopenia is an initial maternal response to fertilization in mice. **J Reprod Fertil** 73:559-566.

O'Neill C (1985) Embryo derived platelet activating factor. In: Ellendorf P & Koch E (eds). **Early pregnancy factors**. Perinatology Press, New York. pp:261-266.

O'Neill C (1985). Examination of causes of early pregnancy associate thrombocytopenia in mice. **J. reprod Fertil** 73:567-577.

Orozco C, Perkins & Clarke FM (1986). Platelet-activating factor induces the expression of early pregnancy factor activity in female mice. **J Reprod Fertil** 78:549-555.

Orozco C, Cock I, Perkins AV, Clarke FM (1990). Platelet-activating factor and serum components from oestrous mice co-operate to mimic the activity of early pregnancy factor in the rosette inhibition assay. **J Reprod Fertil** 88:447-457.

Pasapera AM, Cerbón MA, Castro I, gutierrez-Sagal R, Camacho I, García GA & Pérez-Palacios G (1995). Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. **Biology of Reproduction** 52:426-432

Pérez-Palacios G, Chavez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M & Pérez AE (1981a). Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. **J Steroid Blochem** 15:125-130.

Pérez-Palacios G, Fernandez-Aparicio MA, Medina M, Zacarías-Villarreal J & Ulloa-Aguirre A (1981b). On the mechanism of action of progestins. **Acta Endocrin Copenh** 97:320-328.

Pérez-Palacios G, Cerbón MA, Pasapera AM, Castro I, Enriquez J, Vilchis F, García GA, Morali G, Lemus AE (1992). Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. **J Steroid Blochem Mol Biol** 41:479-485.

Peter W, Beato M & Suske G (1989). Recombinant rabbit uteroglobin expressed at high levels in E coli forms stable dimers and binds progesterone. **Protein Eng** 3:61-66.

Philibert D, Moguilewsky M, Mary I, Lecaque D, Tournemine C, Secch J, Deraedt R (1985). Pharmacological profile of RU486 in animals. The antiprogestin steroid RU 486 and Human fertility control. Edited by Baulieu E, Segal J. New York, Plenum Publishing Co. pp 49-68.

Pollard JW, Pacey j, Cheng SU, Jordan EG (1987). Estrogen and cell death in murine uterine luminal epithelium. **Cell Tiss Res** 249:533-540.

Ponstingl H, Nieto A, Beato M (1978). Amino acid sequence of progesterone induced rabbit uteroglobin. **Biochem** 17:3908-3912.

Psychoyous A (1976). Hormonal control of uterine receptivity for nidation. **J Reprod Fertil Suppl** 25:17.

Puri RK, Roy SK (1980). The binding of progesterone in different part of the rabbit uterus during

implantation. **J Bio Sci** 2:349.

Rauch M, Loosfelt H, Philibert D, Milgrom E (1985). Mechanism of an antiprogestrone, RU486, in the rabbit endometrium. **European J Biochem** 148:213-218.

Reel JR, Humphrey RR, Shih Y, Widsor BL, Sakowski, Creger PL & Edgreen RA (1979). Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biological activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives. **Fertil Steril** 31:552-561.

Rotello RJ, Liebermann RC, Lepoff RB, Gerschenson LE (1992). Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU486. **Am J Pathol** 140:449-456.

Rotello RJ, Liebermann RC, Purchio AF, Gerschenson LE (1992). Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor  $\beta$ 1 in cell cultured epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:3412-3415.

Rudolf B, Michael T, Birgit W & Christoph K (1988). Uteroglobin as progesterone-binding protein in the preimplantation uterine epithelium of the rabbit: Histological studies. **Cell Tissue Res** 252:625-630.

Rumpel E, Michna H, Kuhnel W (1993). Morphology of the rat uterus after long-term treatment with progesterone antagonist. **Anat Anz** 175:141-149.

Savouret JF, Loosfelt H, Atger M & Milgrom E (1980). Differential hormonal control of a messenger RNA in two tissues; uteroglobin in RNA in the lung and endometrium. **J Biol Chem** 255:4131-4136.

Savouret JF & Milgrom E (1983). Uteroglobin: a model for the study of progesterone action in mammals. **DNA** 2(2):99-104. (rev).

Savouret JF, Bailly A, Misrahi M, Rauch C, Redevilh G, Chauchereau A, Milgrom E (1991). Characterization of hormone responsive element involved in the regulation of progesterone receptor. **Embo J** 10:1875-1883.

Scholz A, Castro I & Beato M (1993). Withdrawal of progesterone and/or glucocorticoids induces apoptosis in a rat endometrial cell line. **Second Conference on the Endometrium. September, Bologna, Italy. pp 17.**

Silsteri PK, Febris F, Clemens LE, Chang RJ, Gonds B, Stites D (1977). Progesterone and maintenance of pregnancy. Is progesterone nature immunosuppressant?. **Ann NY Acad Sci** 286:384.

Singh G, Singel S, Katyal SL, Brown WE & Gottron SA (1987). **Exp Lung Res** 13:299-309.

Singh G, Katyal SL, Brow WE, Phillips S, Kennedy AL, Anthony J & Squeglia (1988). Amino-acid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell 10KDa protein. **Biochim Biophys Acta** 950:329-337.

Slater EP, Redevilh G, Theis K, Suske G & Beato M (1990). The uteroglobin promoter contains a noncanonical estrogen response element. **Mol Endocrinol** 4:604-610.

Snyder F (1985). Chemical and biochemical aspects of platelet activating factor: a novel class of acetylated ether-linked choline-phospho-lipids. **Med Res Rev** 5:107-140.

Tenniswood MP, Guenette Rs, Lakins J, Mooibroek M, Wong P, Welsh JE (1992). Active cell death in hormone-dependent tissues. **Cancer Metastasis Rev** 11:197-220.

Thomas PS (1980). Hybridization of denatured RNA and DNA fragments transferred to nitrocellulose. **Proc Natl Acad Sci USA** 77:5201-5205.

Thompson E. Brad (1994). Apoptosis and steroid hormones. **Molecular Endocrinol 8(6):665-673.**

Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, García GA, Angeles A, Pérez-Palacios G (1986). Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. **J Steroid Blochem 24:525-531.**

Von Schenck H, Larson I, Thorell JI (1976). Improved radioiodination of glucagon with lactoperoxidase method; influence of pH on iodine substitution. **Clin Chim Acta 69:225-232.**

Werner P, Hans-Joachim B, Gert U, Beato M & Suske G (1991). Identification of residues essential for progesterone binding to uteroglobin by site-directed mutagenesis. **J Steroid Blochem Molec Biol 38(1):27-33.**