

00346 4  
24.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFEECTO DE LA  $5\alpha$ -REDUCCION ENZIMATICA DE DERIVADOS  $19\text{-NOR}$  Y  $17\alpha$ -ETINILO DE LA TESTOSTERONA SOBRE SUS ACTIVIDADES ANDROGENICAS.

## T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)

P r e s e n t a:

BIÓL. JUANA ENRIQUEZ JIMENEZ

Director de Tesis:  
Méd. Cir. y Part. Gregorio Pérez Palacios

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

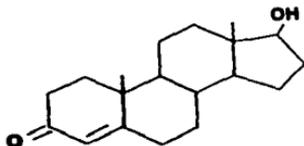
*Agradezco, al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán por brindarme el apoyo y las facilidades para la realización de este trabajo de tesis. Expresó mi gratitud especialmente al Dr. Gregorio Pérez Palacios por sus valiosos consejos en la dirección de este trabajo y a la Profesora Ana Elena Lemus Bravo por su confianza y su interés en mi formación científica. Agradezco, la valiosa colaboración en la revisión de esta tesis al Dr. Enrique Pedemera Astegiano, al Dr. Gustavo García de la Mora, a la Dra. María Alicia Menjivar Iraheta, al Dr. Gerardo Heber Vázquez Nin y al Dr. Fernando Larrea Gallo.*

## INDICE

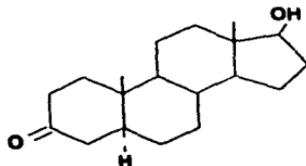
Estructuras químicas y nombres triviales y sistemáticos y de los esteroides utilizados en esta tesis	3
<b>I INTRODUCCION</b>	6
<b>II HIPOTESIS</b>	13
<b>III OBJETIVOS</b>	14
1.- Objetivos generales	14
2.- Objetivos específicos	14
<b>IV MATERIALES</b>	14
1.- Material biológico	14
2.- Reactivos y disolventes	15
3.- Material radiactivo	16
<b>V METODOS</b>	16
1.- Diseño experimental	16
2.- Síntesis química de esteroides utilizados en este trabajo no disponibles comercialmente	17
3.- Caracterización de la unión de MB- <sup>3</sup> H con el receptor de andrógenos	18
A).- Obtención de la fracción soluble o citosol	18
B).- Cinética de saturación del receptor de andrógenos	19
C).- Determinación del coeficiente de sedimentación del receptor de andrógenos	20
4.- Estudios de competencia de los esteroides naturales y sintéticos por el receptor de la próstata ventral de la rata	21
5.- Determinación de la actividad androgénica de los esteroides naturales y sintéticos sobre la β-glucuronidasa en el riñón del ratón	22

6.- Evaluación de la actividad androgénica de los esteroides naturales y sintéticos sobre el crecimiento de los órganos sexuales accesorios de la rata macho	24
<b>VI ANALISIS ESTADISTICO</b>	24
<b>VII RESULTADOS</b>	25
1.- Síntesis química de los esteroides no disponibles comercialmente	25
2.- Características unión del receptor de andrógenos en el órgano blanco	26
3.- Interacción de esteroides naturales y sintéticos con el receptor andrógenos prostático	27
A).- Interacción de Noretisterona, Testosterona y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos	27
B).- Interacción de 19-Nortestosterona, 17 $\alpha$ -Ethiniltestosterona y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos	28
4.- Actividad androgénica de los esteroides naturales y sintéticos sobre la $\beta$ -glucuronidasa en el riñón del ratón y el crecimiento de los órganos sexuales accesorios de la rata	30
A).- Actividad de Noretisterona, Testosterona y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos	32
B).- Actividad de 19-Nortestosterona, Acetato de 17 $\alpha$ -Ethiniltestosterona y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos	35
<b>VIII DISCUSION</b>	38
<b>IX CONCLUSIONES</b>	42
<b>X COMENTARIOS FINALES</b>	42
<b>XI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>	43
<b>PUBLICACION DEL TRABAJO DE TESIS</b>	Anexo

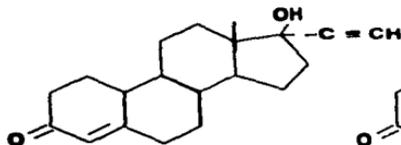
Estructuras químicas y nombres triviales y sistemáticos de los esteroides utilizados en esta tesis.



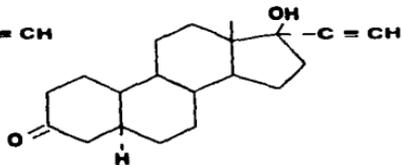
**TESTOSTERONA**  
17 $\beta$ -hidroxi-4- $\Delta$ -androsteno-3-ona



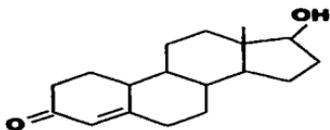
**DIHIDROTESTOSTERONA**  
17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstano-3-ona



**NORETISTERONA**  
17 $\alpha$ -etnilo-17 $\beta$ -hidroxi-19nor  
-4-androsteno-3-ona

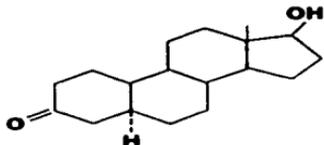


**5 $\alpha$ -DIHIDRONORETISTERONA**  
17 $\alpha$ -etnilo-17 $\beta$ -hidroxi-19nor  
5 $\alpha$ -androstano-3-ona



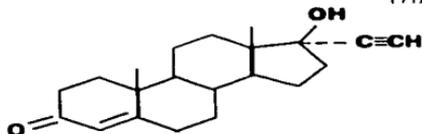
**19-NORTESTOSTERONA**

17 $\beta$ -hidroxi-19nor-4-androsteno-3-ona



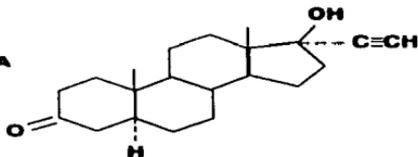
**5 $\alpha$ -DIHIDRONORTESTOSTERONA**

17 $\beta$ -hidroxi-19nor-5 $\alpha$ -androstano-3-ona



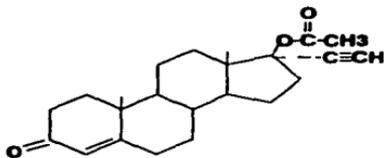
**17 $\alpha$ -ETINILTESTOSTERONA**

17 $\alpha$ -etinilo-17 $\beta$ -hidroxi-4-androsteno-3-ona

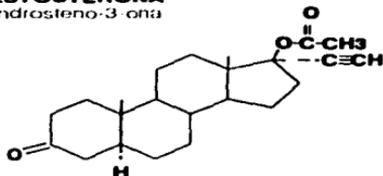


**5 $\alpha$ -DIHIDROETINILTESTOSTERONA**

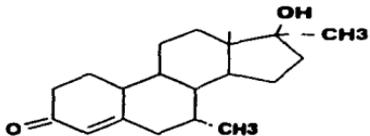
17 $\alpha$ -etinilo-17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstano-3-ona



**ACETATO DE ETINILTESTOSTERONA**  
 17 $\beta$ -acetoxi-17 $\alpha$ -etinilo-4-androsteno-3-ona



**ACETATO DE 5 $\alpha$ -DIHIDROETINILTESTOSTERONA**  
 17 $\beta$ -acetoxi-17 $\alpha$ -etinilo-5 $\alpha$ -androstano-3-ona



**MIBOLERONA**  
 7 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -dimetil-17 $\beta$ -hidroxi-4-androsteno-3-ona

## I INTRODUCCION

La testosterona (T) es el principal andrógeno sintetizado *de novo* por el testículo, órgano que constituye su más importante fuente de producción. Por mucho tiempo la T fue considerada como la única hormona masculina, responsable de los efectos virilizantes en el humano. Su papel en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios típicos del fenotipo masculino fue una de las primeras funciones endócrinas que se demostraron experimentalmente. El entendimiento temprano de la importancia de la función del testículo se obtuvo, gracias al estudio y la observación de individuos hipogonádicos y de eunucos, quienes presentaban un deficiente desarrollo o ausencia total de las características sexuales masculinas comunes en los hombres normales.

Los aportes substantivos a este respecto se inician realmente en 1849 con los estudios experimentales de Berthold (1), quién relacionó la atrofia de la cresta de los gallos producida por la castración y su restauración después de implantar los testículos. Años más tarde, en 1911, los estudios de Pézard contribuyeron de manera importante a la fisiología testicular (2) al demostrar que extractos de esta gónada contenían el factor responsable de la estimulación del crecimiento de la cresta de los gallos atrofiada por la castración. Pero no fue sino hasta 1935 en Amsterdam, cuando el grupo de Laqueur (3) logró aislar en forma pura y cristalina, el factor virilizante de origen testicular el que denominaron **Testosterona**. Estudios posteriores dieron evidencia de que el efecto hormonal de la T no sólo se hallaba confinado al aparato genital sino que incluía otras estructuras tales como: la piel, el músculo esquelético, las cuerdas vocales y tejidos neuroendócrinos tales como el hipotálamo y la hipófisis, entre otros (4-6). El conocimiento del mecanismo íntimo por medio del cual la T ejercía su diversidad de efectos a nivel de los diferentes órganos blanco fue poco entendido hasta que se logró disponer de T marcada radioisotópicamente con tritio (T-<sup>3</sup>H) y con elevada actividad específica (7,8). Con la disponibilidad de T-<sup>3</sup>H fue posible

determinar, tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, que la T-<sup>3</sup>H fue selectivamente retenida en aquellos tejidos sensibles a la acción androgénica. Un hallazgo notable derivado de estos experimentos fue que la mayor parte del material radiactivo extraído después de incubar un órgano blanco con T-<sup>3</sup>H, se hallaba en la forma de un metabolito 5 $\alpha$ -reducido, la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) (9-11), que resultó ser en diversos bioensayos, un andrógeno con mayor potencia biológica que la T. (9,12-14). A inicios de la década de los años 70's. se demostró que la DHT, es el andrógeno responsable de la inducción del programa de diferenciación del fenotipo durante el desarrollo del embrión masculino, que permite la virilización de los genitales externos (15,16) y el mantenimiento en la vida del adulto de la morfología y función de algunos de los órganos sexuales accesorios tales como la próstata y las vesículas seminales (17). Otros estudios realizados en tejidos andrógeno-sensibles y andrógeno-dependientes, demuestran que la DHT es capaz de competir por los sitios de unión del receptor de andrógenos con una afinidad mayor que la T (18-21). Fue entonces, que se hizo evidente que muchas de las acciones androgénicas clásicamente atribuidas a la T tales como, la diferenciación sexual de los genitales externos, el crecimiento de la próstata, el crecimiento de la barba, la recesión de la línea de crecimiento del cabello, entre otras son en efecto mediadas por su producto de bioconversión, la DHT. La especificidad de las funciones de la T y de la DHT permiten postular de que se trata en realidad de dos hormonas diferentes.

La vía a través de la cual, la T y la DHT realizan sus acciones biológicas tejido-específicas es aún una pregunta sin resolver, ya que las dos hormonas ejercen sus efectos a nivel celular a través de un mismo receptor. Por otro lado, la formación a nivel del órgano blanco de un andrógeno más potente, adquiere gran importancia cuando se relaciona con su participación en varias anomalías endócrinas que incluyen: la hiperplasia benigna de la próstata (22), acné (23), hirsutismo (24) y calvicie (25) por lo que el estudio de la regulación de la 5 $\alpha$ -esteroide reductasa (E.C.1.3.99.5), enzima que cataliza

la bioconversión de T a DHT atrajo la atención de muchos investigadores. La  $5\alpha$ -esteroide reductasa es una proteína hidrofóbica que se encuentra de manera abundante en las células de tejidos andrógeno-sensibles constituyendo un elemento integral de la envoltura nuclear y del retículo endoplásmico (26). La enzima tiene un requerimiento absoluto del cofactor NADPH para reducir el anillo A de una variedad de esteroides además de la T. La capacidad de la  $5\alpha$ -esteroide reductasa para reducir los esteroides con estructuras  $\Delta^4$ , 3-ceto sin sustituciones químicas en los C-11, en los órganos blanco tales como la adenohipófisis, próstata entre otros (27) sugirió la presencia de una sola enzima (31) a diferencia de lo que ocurre, en el hígado donde se demostró bioquímicamente la existencia de varias reductasas con capacidad específica para reducir los esteroides 11 $\beta$ -hidroxilados (28-30); sin embargo, una serie de estudios posteriores demuestran la existencia de varias isoenzimas en estos tejidos-blanco. La mayor evidencia la aportan los primeros estudios realizados en cultivos de fibroblastos humanos obtenidos de piel del área genital en los que se detectan actividades de  $5\alpha$ -reductasas con pHs óptimos muy diferentes (32,33). Posterior a estos estudios, y con el uso de sondas específicas de DNA complementario de la enzima del hígado de la rata (34,35), se logran identificar en diversos tejidos tales como la próstata, vesículas seminales, epidídimo, ovario entre otros, por lo menos dos isoenzimas de la  $5\alpha$ -esteroide reductasa ( $5\alpha$ -esteroide reductasa 1 y 2); ambas enzimas son muy similares entre sí y comparten las mismas preferencias por los sustratos, pero difieren en sus niveles de expresión génica así como en su sensibilidad a ciertos inhibidores aza-esteroides (36-38), aún más, fue posible determinar que distintas mutaciones puntuales en el gen que transcribe la  $5\alpha$ -esteroide reductasa del tipo 2 (pH óptimo ácido) son la causa del pseudohermafroditismo masculino en individuos con deficiencia en la  $5\alpha$ -esteroide reductasa (39,40).

En virtud de que todas las hormonas esteroides ejercen sus efectos a través de un proceso complejo que requiere la cooperación de numerosos factores, que modulan la expresión génica aumentando o disminuyendo la transcripción, es necesario señalar que una vez que la T se libera de su lugar de síntesis al torrente circulatorio, ésta se une a proteínas plasmáticas específicas que la transportarán hasta su órgano efector. Posteriormente la T difundirá pasivamente al interior de las células andrógeno-sensibles y pueden suceder dos hechos: uno es que la hormona se metabolice a DHT antes de unirse a su receptor intracelular, o bien que la T no transformada interactúe directamente con el receptor de andrógenos.

El receptor intracelular para hormonas con actividad androgénica, al igual que el resto de los receptores para hormonas esteroides, pertenece a una superfamilia de proteínas que se unen al DNA. La clonación del gen del receptor de andrógenos (41,42) permitió la caracterización de sus dominios funcionales y de la secuencia primaria de aminoácidos en su estructura. La molécula de este receptor posee cinco dominios funcionales: los dominios A y B se localizan en la región amino-terminal y participan en los procesos de la activación transcripcional; el dominio C es una región altamente conservada rica en cisteína, que comprende dos estructuras, cada una contiene un átomo de zinc unido a residuos de cisteína "dedos de zinc", este dominio tiene la propiedad de unirse al DNA; el dominio D es una región hidrofílica que sirve como una bisagra entre el dominio de unión al DNA y el dominio E, este último corresponde a la región que une al esteroide y se distingue por la existencia de secuencias específicas que determinan su interacción con los andrógenos. Una vez que se forma el complejo androgéno-receptor ocurre una serie de cambios que conllevan a su activación, este proceso implica la separación de ciertos factores proteicos que se hallan asociados al dominio del receptor que se encarga de unir al esteroide y de una serie de fosforilaciones en sitios específicos del receptor (43), estos cambios facilitan la translocación del complejo hormona-receptor al interior del núcleo y su interacción con elementos de respuesta hormonal

específica localizados cerca o dentro de los genes regulados por la hormona (44), resultando en la síntesis de RNAs mensajeros que traducirán posteriormente su mensaje a nivel ribosomal para la síntesis de proteínas específicas.

La activación o represión génica también es inducida por la administración exógena de esteroides sintéticos, que poseen una estructura similar a la de los andrógenos como sucede con algunas progestinas anticonceptivas. Estos compuestos exhiben actividades hormonales similares a las de la progesterona (P) y la T con quienes comparten algunas características estructurales. Esta similitud estructural permite que sean reconocidas por los diversos receptores intracelulares para hormonas esteroides de la serie natural, que los convierten en receptores putativos para las progestinas sintéticas, con los cuales forman complejos esteroide-receptor capaces de activar o reprimir la expresión génica.

La **noretisterona (NET)** es una progestina sintética con potente actividad progestacional, con una estructura molecular similar a la de la T pero se distingue de ésta en que carece del carbono 19 (19 nor) y que tiene un grupo etinilo en el carbono 17 en posición  $\alpha$ . La NET fue sintetizada por primera vez en México por Miramontes, Rosenkranz y Djerassi en 1952 (45) y desde entonces, ha sido ampliamente usada en el mundo como anticonceptivo, por su capacidad para inhibir la ovulación a través de suprimir la liberación cíclica de las gonadotropinas hipofisarias (hormona luteinizante, LH, y hormona estimulante del folículo, FSH) (46,47). Para su administración la NET se presenta en diferentes formulaciones particularmente: orales (combinada con estrógenos o como progestina sola) (48), e inyectables de larga acción (como enantato de noretisterona o combinada con estrógenos) (49). La NET además de su efecto progestacional (50) exhibe, después de su administración, otras actividades hormonales típicamente consideradas como estrogénicas, androgénicas y antihormonales (51-52).

El mecanismo mediante el cual la NET lleva a cabo su diversidad de acciones ha sido recientemente investigado en nuestro laboratorio (53-59). Los estudios clínicos iniciales demostraron que esta progestina puede ejercer su efecto antigonadotrópico a través de un mecanismo distinto al de la progesterona. La administración de la NET a mujeres posmenopáusicas no sensibilizadas con estrógenos y por lo tanto carentes del receptor de progesterona (proteína estrógeno dependiente) inhibe significativamente las concentraciones circulantes de las gonadotropinas a diferencia de lo que ocurre con la progesterona que no induce ningún cambio en los niveles de LH y FSH (53). Similarmente, en los individuos gonadectomizados con el síndrome de feminización testicular completa, en quienes existe una resistencia completa a la acción de los andrógenos que se combina con la ausencia de estrógenos, la administración de la NET provoca una inhibición significativa de las gonadotropinas.

Estos resultados permitieron postular que la NET ejerce su efecto a través de su unión al receptor de estrógenos y bajo ciertas circunstancias lo hace ocupando el receptor de andrógenos (53). Sin embargo, aún cuando se demuestra en los estudios de intercambio nuclear, que la NET administrada a ratas hembras castradas es capaz de translocar el receptor de estrógenos al núcleo de las células hipofisarias (54), y que el efecto antigonadotrópico inducido por la NET es inhibido al administrar un antiestrógeno no esterooidal (Tamoxifen) (55), un número importante de estudios experimentales demostraron categóricamente que la NET no interactúa con el receptor de estrógenos (56-58). En los estudios de metabolismo *in vitro* se demuestra que la NET es biotransformada en tejidos neuroendócrinos a diferentes metabolitos: la 5 $\alpha$ -dihidroNET (5 $\alpha$ NET), el 3 $\alpha$ -5 $\alpha$ -tetrahidroNET y el 3 $\beta$ -5 $\alpha$ -tetrahidroNET (56). La interacción de estos metabolitos con los receptores intracelulares para hormonas sexuales se investiga y los resultados de los estudios demuestran que los dos derivados tetrahidros de la NET se unen al receptor de estrógenos siendo el isómero 3 $\beta$  el más afín por el receptor, en tanto que la NET y su derivado 5 $\alpha$ -reducido (5 $\alpha$ NET)

interactúan con el receptor de progesterona así como con receptor de andrógenos, en este caso la  $5\alpha$ -NET exhibe una mayor afinidad relativa por el receptor de andrógenos que la NET (57). A este respecto es interesante señalar que el comportamiento de la unión de la NET y de la  $5\alpha$ NET por el receptor intracelular es similar al observado con el de los andrógenos naturales T y  $5\alpha$ DHT.

Estos hallazgos en su conjunto, ofrecieron una explicación alterna para entender el efecto multihormonal de la NET, la confirmación de esta propuesta fue la determinación de la actividad biológica de cada metabolito, los resultados de los estudios realizados demuestran que los derivados tetrahidros de la NET son capaces de inducir respuestas estrogénicas como la síntesis del receptor de progesterona estrógeno-dependiente en hipófisis de rata castrada (58), así como de estimular la apertura vaginal e inducir la ciclicidad de la función ovárica en ratas hembras prepúberes (59).

La NET y la  $5\alpha$ NET son los únicos metabolitos con efectos androgénicos, ya que son capaces de inducir la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en el riñón del ratón. Los resultados de estos estudios, demuestran sorprendentemente que el derivado  $5\alpha$ -reducido de la NET es menos potente como andrógeno que la NET, e inclusive exhibe efectos antiandrogénicos cuando se administra simultáneamente con la T (60).

Estos resultados preliminares sugieren que la  $5\alpha$ -reducción enzimática de la NET induce efectos contrarios a los observados por la  $5\alpha$ -reducción enzimática del andrógeno natural T. En otras palabras la  $5\alpha$ -reducción de la T incrementa su potencia biológica a diferencia de la  $5\alpha$ -reducción de la NET que la disminuye.

Los resultados de otros estudios sobre la actividad androgénica de la NET y la  $5\alpha$ NET, evaluando la restauración de la conducta sexual masculina en ratas macho castradas confirman la pérdida de actividad androgénica de la NET después de su  $5\alpha$ -reducción. Así mientras que la NET es efectiva para restaurar la conducta copulatoria, el derivado  $5\alpha$ -reducido es inefectivo como andrógeno (61). En conclusión, estos datos permiten postular que la

**5 $\alpha$ -reducción enzimática de la T induce el incremento en la afinidad por el receptor de andrógenos y el aumento concomitante de su potencia biológica androgénica; la 5 $\alpha$ -reducción enzimática de la NET el esteroide sintético si bien aumenta su afinidad por el receptor de andrógenos, disminuye significativamente su potencia androgénica.**

**Este efecto paradójico de la 5 $\alpha$ -reducción enzimática de la NET, representa el motivo principal para la realización del presente trabajo de tesis que tiene la intención de confirmar esta observación e investigar de manera sistemática su naturaleza.**

## **II HIPOTESIS**

**La 5 $\alpha$ -reducción enzimática del andrógeno natural T, induce un incremento tanto en su afinidad por el receptor de andrógenos, así como en la expresión de su actividad biológica; sin embargo en el caso de la progestina sintética, NET, la 5 $\alpha$ -reducción incrementa su afinidad por el receptor de andrógenos pero ejerce efectos paradójicos al disminuir su potencia androgénica. Por lo tanto, la presencia del grupo 17 $\alpha$ -etinilo o la ausencia del metilo angular C-19 en la molécula de la NET son los responsables de este efecto.**

### **III OBJETIVOS DEL ESTUDIO**

#### **1.- Objetivo general**

Identificar las características estructurales específicas de la molécula de la NET que determinan que su derivado enzimáticamente  $5\alpha$ -reducido ( $5\alpha$ NET) presente una disminución de su potencia androgénica. El logro de este objetivo requiere del cumplimiento de los siguientes objetivos específicos.

#### **2.- Objetivos específicos**

**A).-** Determinar el papel que la ausencia del metilo angular C-19 tiene en la NET sobre su interacción con el receptor de andrógenos y en la expresión de su actividad androgénica.

**B).-** Determinar el papel que la presencia del grupo  $17\alpha$ -etnilo tiene en la molécula de la NET sobre su capacidad de unión al receptor de andrógenos, así como en la expresión de su actividad androgénica.

### **IV MATERIALES**

#### **1.- Material biológico**

En este trabajo de tesis se utilizaron ratones machos adultos intactos y castrados de 30 a 35 g de peso corporal de la cepa Balb/c y ratas machos adultas intactas y castradas de la raza Wistar de 250 a 300 g de peso corporal. La procedencia de los animales fue del Instituto Nacional de la

**Nutrición Salvador Zubirán** donde se mantuvieron en condiciones de luz y oscuridad de 14 por 10 h y tuvieron libre acceso al alimento y agua. El manejo experimental de los animales fue evaluado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de la Nutrición para el uso de animales de laboratorio.

## **2.- Reactivos y disolventes**

Todos los compuestos químicos, reactivos y disolventes utilizados en este estudio fueron de grado analítico y se adquirieron comercialmente.

Tris-HCl (clorhidrato de tris hidroximetilaminometano), EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetracético), molibdato de sodio, ditiotreitól, reactivo de Coomassie G, estuche (Kit) para la determinación de la  $\beta$ -glucuronidasa, albúmina de suero de bovino (ASB), 19-Nortestosterona (NorT), 17 $\alpha$ -Ethiniltestosterona (ET), Dihidrotestosterona (DHT), Testosterona (T) y Miboleron (MB) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA). La Noretisterona (NET) fue donada generosamente por Schering de México, S.A. de C.V.

El carbón activado y el dextrán T-70 se obtuvieron de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia) y la solución de centelleo para muestras acuosas (Ready to Safe) de Beckman Instruments Inc. (Palo Alto, California, EUA).

Los esteroides no disponibles comercialmente se sintetizaron en la Facultad de Química de la UNAM (ver la sección de Métodos).

El ácido fosfórico, glicerol y los disolventes: cloroformo, acetona, benceno, acetato de etilo, metanol y hexano se adquirieron de J. T. Baker de México (Edo. Méx.)

### **3.- Material radiactivo**

La ( $17\alpha$ -metil- $^3\text{H}$ )-Mibolerona ( $\text{MB-}^3\text{H}$ ) con una actividad específica de 85 Ci/mmola se obtuvo de Amersham International pl. (Buckinghamshire, Inglaterra). Su pureza radioquímica se estableció por su movilidad en cromatografía de partición en papel utilizando dos sistemas diferentes.

## **V METODOS**

### **1.- Diseño experimental**

Para alcanzar los objetivos específicos de esta tesis se realizaron una serie de experimentos, utilizando esteroides estructuralmente intermedios entre la T y la NET incluyendo a sus derivados  $5\alpha$ -reducidos, estos fueron: 19NorT,  $5\alpha$ NorT y ET y  $5\alpha$ ET.

Se diseñaron estudios de cinética para establecer las condiciones al equilibrio y la constante de disociación ( $K_d$ ) de la unión de Mibolerona tritjada ( $\text{MB-}_3\text{H}$ ) con los receptores de andrógenos de la fracción soluble de la próstata ventral de la rata. Estos datos se utilizaron en los subsecuentes estudios de competencia para determinar las constantes de inhibición ( $K_i$ ) y las afinidades relativas de la unión ( $\text{ARU}$ ) de los esteroides. Los experimentos incluyeron a la MB como control experimental así como a la T, la DHT, la NET y la  $5\alpha$ NET que se usaron como referencia del estudio.

Para la evaluación de la actividad androgénica de los esteroides se usaron dos bioensayos específicos: 1).- la inducción de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en el riñón del ratón y 2).- el incremento del peso de la próstata ventral y de las vesículas seminales de la rata.

Los esteroides disueltos en el propilenglicol (PPG= vehículo) se administraron a los grupos de animales castrados, en las dosis mínimas efectivas, con el propósito de observar diferencias entre las actividades androgénicas inducidas por los esteroides.

La administración particularmente de la ET y la  $5\alpha$ ET fue en la forma de acetatos (ETAc y  $5\alpha$ ETAc) para aumentar sus solubilidades en el vehículo empleado.

Los grupos de animales intactos y castrados tratados sólo con el vehículo fueron los controles de los experimentos *in vivo*. Como referencia del efecto de la  $5\alpha$ -reducción se utilizaron como testigos positivos a los grupos tratados con la T y la DHT y como testigos negativos a los tratados con la NET y la  $5\alpha$ NET. La variabilidad de los resultados entre los grupos se analizaron aplicando la prueba de análisis de varianza (Anova) y posteriormente la prueba t-Student para establecer diferencias significativas entre los siguientes grupos: el control castrado contra el control intacto; el control castrado contra los tratados con la NorT, la ETAc, la T, la NET y sus correspondientes derivados  $5\alpha$ -reducidos; los tratados con la NorT, la ETAc, la T y la NET contra sus respectivos derivados  $5\alpha$ -reducidos y finalmente los tratados con la NorT, la ET, la  $5\alpha$ NorT y la  $5\alpha$ ETAc contra los tratados con la T y la NET.

## 2.- Síntesis química de esteroides no disponibles comercialmente

### $5\alpha$ -Dihidronoretisterona ( $5\alpha$ NET)

La  $5\alpha$ NET se sintetizó por reducción de NET, empleando como agente reductor, litio en amoníaco líquido, de acuerdo al método descrito por Bowers y Cols. (62), con algunas modificaciones.

El derivado  $5\alpha$ -reducido se purificó por cromatografía en columna de sílice eluyendo con hexano, acetato de etilo en una proporción v/v (70:30) y por cristalizaciones.

### **5 $\alpha$ -Dihidro-19-nortestosterona (5 $\alpha$ NorT)**

La 5 $\alpha$ NorT se obtuvo reduciendo NorT con litio en amoníaco líquido. La purificación de la 5 $\alpha$ NorT resultante se realizó por cromatografía de "flash" (63).

### **Acetato (17 $\beta$ ) de 17 $\alpha$ -etinitestosterona (ETAc)**

La acetilación en 17 $\beta$  de la 17 $\alpha$ -etinitestosterona (Etisterona: ET) se realizó en tetrahidrofurano con 4-dimetilaminopiridina y cloruro de acetilo a 0°C. El ETAc formado se purificó por cromatografía de "flash" y cristalización.

### **Acetato de 5 $\alpha$ -dihidro-17 $\alpha$ -etinitestosterona (5 $\alpha$ ETAc)**

El 5 $\alpha$ ETAc se obtuvo por reducción del acetato de etisterona con litio metálico, obteniéndose un rendimiento del 65% del compuesto puro después de la cromatografía de "flash" y cristalización.

## **3.- Caracterización de la unión de MB-<sup>3</sup>H con el receptor de andrógenos**

Para la determinación de la  $K_d$ , el NSU y del coeficiente de sedimentación (S) de la unión del receptor de andrógenos con la MB-<sup>3</sup>H se utilizó la fracción soluble (citosol) de la próstata ventral de las ratas, castradas 48 h antes del inicio de los experimentos.

### **A).- Obtención de la fracción soluble o citosol**

Los animales se decapitaron y el tejido se removió inmediatamente, se lavó con una solución amortiguadora (TEDM) compuesta de Tris-HCl 20 mM, EDTA 1.5 mM, ditioneitol 0.25 mM, molibdato de sodio 10 mM y 10% de glicerol (v/v) con un pH de 7.4 a 4°C, se pesó y se homogeneizó en

solución TEDM, en una relación 1:6 (p/v) con un politrón Brinkmann PT 10/35 (Brinkmann, Instruments Co. Houston, TX EUA). El homogeneizado se centrifugó a 105.000 veces la gravedad ( $\times g$ ) durante 60 minutos a 4°C en una ultracentrífuga Beckmann modelo L5-50B (Beckmann, Instruments Inc. Palo Alto, CA. EUA), y el sobrenadante (fracción soluble o citosol) se utilizó inmediatamente.

#### **B).- Cinética de saturación del receptor de andrógenos**

Los estudios de la unión al equilibrio de MB-<sup>3</sup>H, con el receptor de andrógenos, permitieron determinar  $K_d$  y el NSU del receptor de andrógenos.

Se tomaron alcuotas de la fracción soluble de la próstata ventral de la rata ( $3.1 \pm 0.2$  mg proteína/ ml) y se incubaron con una concentración fija de MB-<sup>3</sup>H (1 nM) y concentraciones crecientes (0.5 a 6.0 nM) de MB radioinerte durante 18 h a 4°C. Para la determinación de la unión no específica, se incubó otro grupo de tubos conteniendo 1 nM de radioligando y un exceso de 100 veces de la MB radioinerte. El esteroide libre se separó del complejo esteroide-receptor con la adición de 0.8 ml de una suspensión de carbón-dextrán (0.25% de carbón activado y 0.025% de dextrán T-70 disuelto en solución TEDM), los tubos se agitaron durante 5 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min en una centrifuga Beckmann modelo J-6B, utilizando un rotor JS-4.2 de radio máximo de 254 mm. El contenido de radiactividad se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido Packard TRI-CARB modelo 2660 (Packard Downers Grove, IL. EUA) después de la adición de 5 ml de una solución de centelleo para muestras acuosas. La eficiencia del espectrómetro para la medición del <sup>3</sup>H fue del 45%.

La unión específica se determinó substrayendo la unión no específica de la unión total, como ha sido previamente descrito (64).

Los resultados se graficaron a la manera de Scatchard (64) para la determinación de la  $K_d$  y los NSU.

**C).- Determinación del coeficiente de sedimentación del receptor de andrógenos**

El patrón de sedimentación del complejo MB-<sup>3</sup>H-receptor de andrógenos se estudió en gradientes lineales de densidad de sacarosa (20-35%).

Una alícuota de citosol de próstata ventral de rata (15 mg de proteína/ ml) se incubó durante 18 h a 4 °C con una concentración 2 nM de MB-<sup>3</sup>H en ausencia o presencia de 200 nM de MB radioinerte, la adición de este exceso sirvió para determinar la unión específica del ligando con el receptor de andrógenos. El esteroide libre se separó del complejo esteroide-receptor con la adición de 0.8 ml de la suspensión de carbón-dextrán, los tubos se agitaron durante 5 min y se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C.

Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 0.5 ml (7.5 mg proteína/ ml) y se depositaron en la parte superior de cada gradiente preparado previamente en un formador de gradientes (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ. EUA). En forma paralela se preparó un gradiente conteniendo albúmina sérica de bívino (ASB) como referencia teñida con azul naftol que tiene un coeficiente de sedimentación de 4.6 unidades Svedberg (S). Los gradientes se centrifugaron a 370,000 x g a 4 °C durante 2.30 h en una ultracentrífuga Beckmann modelo L8-70 en un rotor vertical VTi 65 con radio máximo de 84.5 mm. Posteriormente, el fondo de los tubos se perforó y se colectaron fracciones de 5 gotas para determinar el contenido de radiactividad de cada fracción en un espectrómetro de centelleo líquido. El coeficiente de sedimentación del complejo MB-<sup>3</sup>H-receptor de andrógenos se determinó por el método de Martin y Ames (65).

#### **4.- Estudios de competencia de los esteroides naturales y sintéticos por el receptor de andrógenos**

Alícuotas ( $4.6 \pm 0.5$  mg proteína/ ml) de la fracción soluble de las próstatas ventrales de las ratas se incubaron durante 18 h a  $4^\circ\text{C}$  con una concentración 2 nM de MB- $^3\text{H}$  en presencia de concentraciones crecientes (10-500 nM) de los siguientes esteroides radioinertes: MB, T, NET, NorT, ET y de sus correspondientes derivados  $5\alpha$ -reducidos. El esteroide libre se separó del complejo esteroide-receptor al adicionar 0.8 ml de la suspensión de carbón-dextrán. Los tubos se agitaron durante 5 min y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  y se tomaron alícuotas del sobrenadante para determinar el contenido de radiactividad en un espectrómetro de centelleo líquido. Las afinidades relativas de unión (ARU) se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación descrita por Reel y Cols. (66)

$$\text{ARU} = [\text{L}]_{50\%} / [\text{C}]_{50\%}$$

donde

$[\text{L}]_{50\%}$  = Es la concentración molar de ligando que disminuye al 50% la unión de radioligando del receptor.

$[\text{C}]_{50\%}$  = Es la concentración molar de competidor que disminuye el 50% de la unión del radioligando del receptor.

y las constantes de inhibición ( $K_i$ ) fueron determinadas mediante la ecuación del método descrito por Cheng y Prussoff (67)

$$K_i = IC_{50} + C/K_d$$

donde

$IC_{50}$  = Es la concentración molar del inhibidor que disminuye el 50% la unión del radioligando del receptor

$C$  = Es la concentración molar del radioligando

$K_d$  = Es la constante de disociación del ligando

#### **5.- Determinación de la actividad androgénica de los esteroides naturales y sintéticos sobre la $\beta$ -glucuronidasa en el riñón del ratón.**

La determinación de la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en el riñón del ratón se realizó mediante el método de Fishman (68), con algunas modificaciones. Seleccionamos este modelo para evaluar la actividad androgénica de los esteroides debido a que en esta especie, el riñón no posee actividad detectable de  $5\alpha$ -reductasa, lo cual facilita el estudio de esteroide sin la interferencia de la reducción enzimática y además porque en este tejido, la  $\beta$ -glucuronidasa, enzima lisosomal que hidroliza los glucurónidos de las esteroides, es andrógeno dependiente por lo que puede ser estimulada por la administración de estas hormonas (69,70).

Inicialmente se realizaron varios estudios para establecer las condiciones experimentales de la incubación, incluyendo experimentos bajo diferentes condiciones, variando: la concentración del monoglucurónido de fenolftaleína (1.0-30.0 mM); la concentración de proteínas de riñón (0.6 - 4.5 mg/ml); la temperatura (30-80 °C) y el tiempo de incubación (0 a 150 min).

La actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa renal se cuantificó en preparaciones del tejido de ratones machos adultos con 5 días de castración.

Los esteroides, previamente purificados por cromatografía en papel se disolvieron en el PPG y se administraron durante 5 días consecutivos, por vía subcutánea (sc) en las siguientes dosis: T y DHT a  $125\mu\text{g}/40\mu\text{l}$ ; NET,  $5\alpha\text{NET}$ , NorT,  $5\alpha\text{NorT}$ , ETAc y  $5\alpha\text{ETAc}$  a la dosis de  $400\mu\text{g}/40\mu\text{l}$ . Los grupos de animales intactos (I) y castrados (C) tratados sólo con el PPG sirvieron como testigos experimentales.

Al término de los tratamientos, los animales se decapitaron para obtener los riñones, los cuales se lavaron con agua bidestilada y desionizada, se pesaron y se homogeneizaron con agua en una proporción 1:40 (p/v) en un politrón por dos períodos de 5 segundos a 5000 rpm. Alcuotas de 0.2 ml (1.5 mg proteína/ml) del homogeneizado se incubaron durante 1h, con una concentración de 30 mM de monoglucurónido de fenoltaleína disuelto en una solución amortiguadora de acetato de sodio 0.2 M a un pH de 4.5 a 60 °C en un incubador metabólico Dubnoff (Precision Scientific Co. Chicago, EUA.) con agitación constante. La reacción se detuvo con la adición de 5 ml de una solución amortiguadora de 2-amino-2-metil-1-propanol 0.1 M a un pH de 11. (amp) La intensidad del color generado por la fenoltaleína liberada se determinó a 550 nm en un espectrofotómetro Beckmann modelo DU-6. La concentración de fenoltaleína se derivó de su curva patrón ( $2-8\mu\text{g}$ ) y se usó para calcular la actividad de la enzima, la cual fue proporcional a la fenoltaleína liberada.

## **6.- Evaluación de la actividad androgénica de los esteroides naturales y sintéticos sobre el crecimiento de los órganos sexuales accesorios de la rata macho**

A ratas machos adultos con 8 días de castración se les administraron por vía sc y durante 10 días consecutivos los siguientes esteroides disueltos en el PPG: T y DHT en una dosis de 250 $\mu$ g/100 $\mu$ l y NET, 5 $\alpha$ NET, NorT, 5 $\alpha$ NorT, ETAc y 5 $\alpha$ ETAc en dosis de 2 mg/100 $\mu$ l. Los grupos de animales intactos (I) y los castrados (C) tratados solamente con el PPG fueron utilizados como controles en los experimentos. Al finalizar los tratamientos, los animales se decapitaron para remover la próstata ventral y las vesículas seminales, eliminándose del último tejido el fluido por medio de presión manual. Los órganos se lavaron con una solución isotónica de NaCl (0.15 M), se secaron y se registraron los pesos.

La determinación de la concentración de proteínas en los experimentos se realizó por el método de Bradford (71) cuando así se requirió.

## **VI ANALISIS ESTADISTICO**

Los resultados del peso de los órganos sexuales accesorios de la rata macho y de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en el riñón del ratón fueron analizados mediante la prueba de análisis de varianza (Anova) y la t-Student (72). Las diferencias entre los grupos comparados se consideraron significativas cuando los valores de "p" fueron menores de 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## VII RESULTADOS

### 1.- Síntesis química de los esteroides no disponibles comercialmente

#### 5 $\alpha$ -Dihidronortetosterona (5 $\alpha$ NET)

En la síntesis de 5 $\alpha$ NET, el rendimiento de la reacción para obtener el compuesto puro fue del 85%. Las constantes determinadas para establecer el grado de su pureza química incluyeron: punto de fusión (225°C); rotación específica en cloroformo (+ 5.5°); absorción de infrarrojo (KBr) 3300,2950,2910,1710 cm<sup>-1</sup> y resonancia magnética nuclear [CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  2.57ppm(s,1H) y 0.9ppm( $\delta$ ,3H).

#### 5 $\alpha$ -Dihidro-19-nortestosterona (5 $\alpha$ NorT)

En la síntesis de 5 $\alpha$ NorT, el rendimiento de la reacción para obtener el compuesto puro fue del 94%. Las constantes para establecer el grado de su pureza química fueron: punto de fusión (135°C); rotación específica en cloroformo (+61.6°); absorción de infrarrojo (KBr) 3300, 2950,2910,2850,1710 cm<sup>-1</sup> y resonancia magnética nuclear [CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  3.6ppm(t,J=7.5 Hz,1H), 1.5ppm(s,desp. D<sub>2</sub>O,1H),0.77ppm(s,3H).

#### Acetato (17 $\beta$ ) de 17 $\alpha$ -Ethiniltestosterona (ETAc)

En la síntesis de ETAc, el rendimiento de la reacción para la obtención del compuesto puro fue del 60%. La pureza química de ETAc se estableció determinando su: punto de fusión (160°C); rotación específica en cloroformo (+18.27°); absorción de infrarrojo (KBr) 3275, 2950, 1740, 1670, 1245, 1225 cm<sup>-1</sup>. y resonancia magnética nuclear [CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  5.6ppm(s,1H), 2.53ppm(s,1H), 2.03ppm(s,3H), 1.16ppm(s,3H), 0.9ppm(s,3H).

### **Acetato de 5 $\alpha$ -Dihidro-17 $\alpha$ -Etiltestosterona (5 $\alpha$ ETAc)**

**En la síntesis de 5 $\alpha$ ETAc, el rendimiento de la reacción para la obtención del compuesto puro fue del 65%. Las constantes determinadas para establecer su pureza química incluyeron: punto de fusión (185°C); rotación específica en cloroformo (-21.4); absorción de infrarrojo (KBr) 3275, 2950, 1740, 1250, 1225 cm<sup>-1</sup> y resonancia magnética nuclear [CDCl<sub>3</sub>]  $\delta$  2.55ppm(s,1H), 2.03ppm(s,3H), 1.03ppm(s,3H), 0.86ppm(s,3H).**

### **2.- Características de unión del receptor de andrógenos en el órgano blanco**

Los resultados del análisis de saturación y del estudio en gradientes de densidad de sacarosa, utilizando MB-<sup>3</sup>H (un esteroide sintético con elevada afinidad por el receptor de andrógenos, que no se metaboliza ni se une a las proteínas transportadoras para hormonas sexuales (73-74)) demuestran la presencia de receptores de andrógenos en la fracción soluble de la próstata ventral de la rata. El estudio cinético del complejo MB-<sup>3</sup>H-receptor de andrógenos se caracteriza por una K<sub>d</sub> de 1.71 nM, y un número estimado de sitios de unión (NSU) de 2.3 nmolas/mg de proteína (figura 1A). El análisis de los gradientes lineales de sacarosa indican que el coeficiente de sedimentación del receptor de andrógenos es de 8.2 Unidades Svedberg (S) (figura 1B).

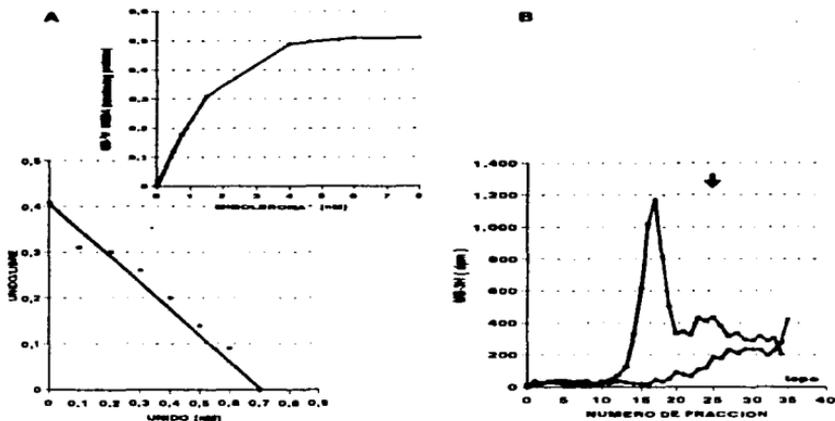


Fig. 1. Determinación de las características de unión y del coeficiente de sedimentación del receptor de andrógenos de la próstata ventral de la rata castrada. A) Representación a la manera de Scatchard de la unión in vitro de MB-<sup>3</sup>H (inserto del panel A). Curva de saturación del receptor de andrógenos en presencia de concentraciones crecientes del ligando MB-<sup>3</sup>H incubados a 4°C durante 18 h. La  $K_d$  obtenida fue de 1.71 nM y el NSU de 2.3 (nmoles/mg proteína). B) Análisis del complejo MB-<sup>3</sup>H-receptor de andrógenos mediante gradientes de densidad de sacarosa. Aliquotas de 100 µl se incubaron con MB-<sup>3</sup>H en ausencia (●—●) y presencia (○—○) de MB-3H-inerte. El marcador interno fue ratón PMSA (♦—♦). El coeficiente de sedimentación del complejo interactivo receptor-est. de 4.2 S.

### 3.- Interacción de esteroides naturales y sintéticos con el receptor prostático de andrógenos

#### A).- Interacción de la Noretisterona, la Testosterona y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos.

La competencia de las concentraciones crecientes de NET, 5 $\alpha$ NET, T y DHT por los sitios de unión del receptor de andrógenos ocupados por la MB-<sup>3</sup>H se muestran en la figura 2 (Panel A y B) y las ARU y  $K_i$  se informan en la tabla 1. Los resultados demuestran que la afinidad relativa de la 5 $\alpha$ NET por el receptor de andrógenos es mayor que la de NET. La  $K_i$

del derivado  $5\alpha$ -reducido de la NET es en consecuencia menor que la de la NET, de manera similar como ocurre con los andrógenos naturales T y DHT. En efecto, la  $K_i$  de la DHT y de la  $5\alpha$ NET son significativamente menores que las de la T y la NET.

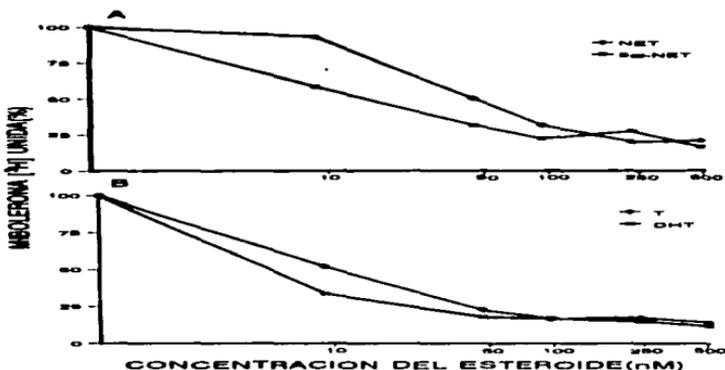


Fig. 2 Competencia de Norquetosterona y Testosterona y de sus derivados  $5\alpha$ -reducidos por los sitios de unión del receptor de andrógenos. Alcuotas de citosol de próstata ventral de rata se incubaron con MB-3H en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de los siguientes esteroides radioetiquetados: Panel A) Norquetosterona (NET) y  $5\alpha$ -dihidroNET ( $5\alpha$ NET); Panel B) Testosterona (T) y  $5\alpha$ -dihidroT (DHT).

### B).- Interacción de 19-Nortestosterona, $17\alpha$ -Ethiniltestosterona y sus derivados $5\alpha$ -reducidos

La competencia de NorT, ET y sus derivados  $5\alpha$ -reducidos por los receptores de andrógenos ocupados con MB-3H se muestra en la fig 3 (panel A y B). Las afinidades relativas y las  $K_i$  de NorT, ET y sus derivados  $5\alpha$ -reducidos se presentan en la tabla 1. Los resultados demuestran que la afinidades relativas de la  $5\alpha$ NorT y de la NorT son semejantes. Las  $K_i$  de los dos esteroides 19-nor son similares entre sí (tabla 1). Sin embargo, las

afinidades relativas de ET y  $5\alpha$ ET son diferentes, el competidor con mayor afinidad por los sitios de unión del receptor de andrógenos es el derivado  $5\alpha$ -reducido de la ET (fig 3 Panel B), el valor su  $K_i$  fue menor que la de la ET (tabla 1). Una observación interesante de estos resultados es que comparando las afinidades relativas de la NorT y de la  $5\alpha$ NorT con las de la ET y  $5\alpha$ ET, es evidente que los esteroides etinilados son los competidores con menor afinidad.

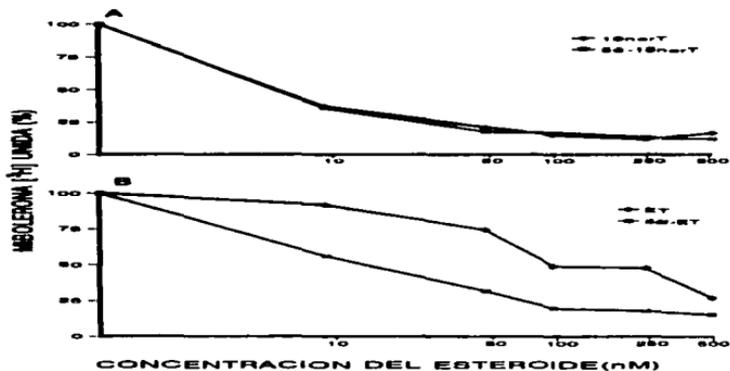


Fig. 3 Competencia de 19-Nortestosterona y 17 $\alpha$ -Ethiniltestosterona y de sus derivados  $5\alpha$ -reducidos con  $^3$ H-MIB por los sitios de unión del receptor de andrógenos de citosol de próstata ventral de rata incubaciones con  $^3$ H-MIB en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de los siguientes esteroides radiolabelados. Panel A) 19-Nortestosterona (19norT) y  $5\alpha$ -dihidronorT ( $5\alpha$ -19norT). Panel B) 17 $\alpha$ -Ethiniltestosterona (ET) y  $5\alpha$ -dihidroET ( $5\alpha$ -ET).

**Tabla 1. Constantes de inhibición (K<sub>i</sub>) y afinidades relativas de unión (ARU) de los esteroides naturales y sintéticos por el receptor de andrógenos.**

ESTEROIDE	ARU* (%)	K <sub>i</sub> ** (nM)
MB	100.0	8.1
T	63.6	12.1
DHT	125.0	6.1
NET	14.0	51.1
5 $\alpha$ NET	41.0	18.1
NorT	112.9	7.3
5 $\alpha$ NorT	116.6	7.1
ET	7.0	101.1
5 $\alpha$ ET	46.6	16.1

(\*) ARU se determinó de acuerdo a Reel y cols.(66)

(\*\*) Los valores de K<sub>i</sub> se calcularon de acuerdo a Cheng y Prusoff (67)

#### 4.- Actividad androgénica de los esteroides naturales y sintéticos sobre la $\beta$ -glucuronidasa en el riñón del ratón y el crecimiento de los órganos sexuales accesorios de la rata.

Para determinar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en el riñón del ratón Balb/c, experimentos previos se realizaron para establecer las condiciones experimentales de las incubaciones. Los resultados de estos estudios nos permitieron asegurar que la concentración de monoglucurónido de fenoltálcina utilizada en los experimentos (fig. 4 Panel A) es suficiente para saturar la enzima de las preparaciones del tejido renal. La estimación de la constante de Michaelis (K<sub>m</sub>) de la  $\beta$ -glucuronidasa en la gráfica tipo Eadie-Hofstee (fig. 4 Panel B) es de 0.22 mM. Las concentraciones de proteína renal adecuadas para evitar un mayor factor de dilución se establecen entre

1.5 a 2.0 mg/ml (fig. 5 Panel A) mientras que, la temperatura y el tiempo de incubación óptimos son 60°C y 1 hora respectivamente (fig. 5 Panel B y C).

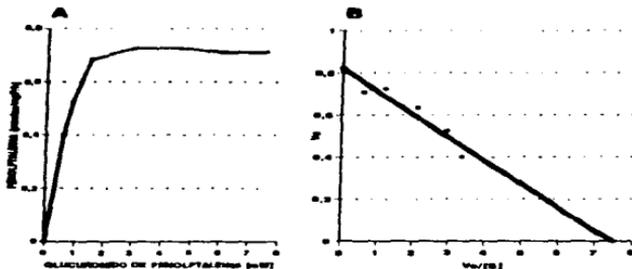


Fig. 4 Determinación de las características cinéticas de la  $\beta$ -glucuronidasa del riñón del ratón. Panel A) Curva de saturación de la enzima en presencia de concentraciones crecientes de glucuronido de fenolftaleína. Panel B) Representación gráfica a la manera de Eadie-Hofstee. La constante  $K_m$  estimada fue de 0.22 mM.

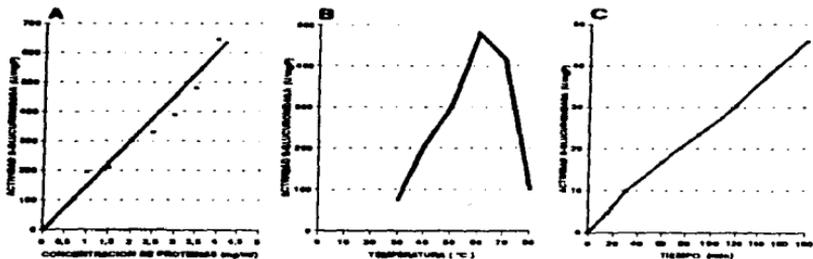


Fig. 5 Optimización de las condiciones experimentales para la determinación de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa de riñón de ratón. Panel A) Variación de la concentración de proteína. Panel B) Actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en función de la temperatura. Panel C) Actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en función del tiempo de incubación.

**A).- Actividad androgénica de Noretisterona, Testosterona y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos**

La administración de la NET (400 $\mu$ g/día/5 días) a los ratones castrados, incrementa significativamente la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa en el riñón ( $p < 0.0001$ ) cuando se compara con la actividad enzimática de los animales castrados que sólo recibieron el vehículo. De manera similar, la administración de dosis idénticas de la 5 $\alpha$ NET a los ratones castrados, aumenta la actividad de la enzima pero en menor grado ( $p < 0.01$ ) tal y como se muestra en la figura 6 y en la tabla 2. Los resultados demuestran que la actividad androgénica de la 5 $\alpha$ NET es menor que la de la NET. La administración de la T (125  $\mu$ g/día/5 días) a los ratones castrados aumenta significativamente la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa ( $p < 0.001$ ), restaurando completamente la actividad enzimática a los niveles observados en los animales intactos, mientras que con la administración de la DHT en la misma dosis, el incremento es significativamente mayor que el que se produce por la administración de la T ( $p < 0.0001$ ) ver la figura 6 y la tabla 2.

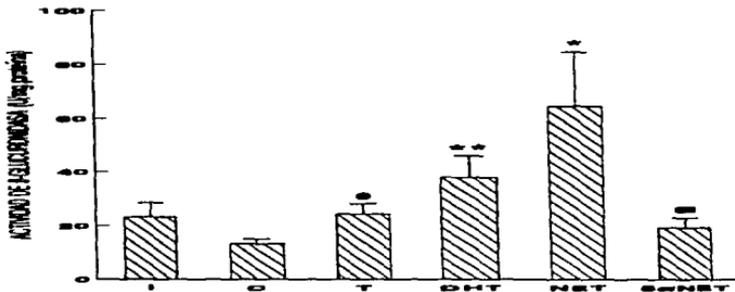


Fig. 6 Efecto de Noretisterona (NET), Testosterona (T) y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos (5 $\alpha$ NET y DHT) sobre la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa del riñón del ratón. Ratones (Ratb/c) castrados se trataron con NET y 5 $\alpha$ NET (400  $\mu$ g/día) y con T y DHT (125  $\mu$ g/día) durante 5 días consecutivos. Los animales intactos (I) y castrados tratados con el vehículo (C) sirvieron como grupos control. En cada barra se representa el promedio de la actividad de la enzima y la desviación estándar (media  $\pm$  DE) de grupos de 7-9 animales. ●  $p < 0.0001$  en comparación con el grupo control castrado, ●●  $p < 0.001$  comparando con el grupo control castrado, ●●●  $p < 0.001$  comparando con el grupo control castrado, ●  $p < 0.001$  comparando con el grupo control castrado.

**Tabla 2. Actividad de 6-Glucuronidasa renal de ratones castrados con los esteroides naturales y sintéticos**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>ACTIVIDAD 6-GLUCURONIDASA (U/mg de proteína)<sup>o</sup></b>
Sin trat. C/I	23.2 ± 5.3 *
(PPG) C/C	13.3 ± 1.8
T	24.3 ± 3.8 ○
DHT	37.8 ± 8.1 **
NET	64.4 ± 20.1 *
5 $\alpha$ NET	19.2 ± 3.7 -
NorT	32.8 ± 4.0 *
5 $\alpha$ NorT	46.5 ± 9.2 **
ETAc	41.7 ± 8.3 *
5 $\alpha$ ETAc	29.3 ± 4.0 †

C/I Control de animales intactos sin tratamiento; C/C Control de animales castrados con propilenglicol (PPG); (\*) Actividad enzimática (U/mg de proteína): media  $\pm$  desviación estándar. La variabilidad de los resultados entre los grupos, se analizó mediante la prueba Anova resultando un valor de F = 18.39 y una p < 0.00005.

El análisis mediante la prueba t-Student demuestra las siguientes diferencias significativas: (\*) p < 0.0001 para los grupos tratados con NET, NorT, ETAc cuando fueron comparados con el grupo control castrado; (\*\*) p < 0.01 para los grupos tratados con DHT y 5 $\alpha$ NorT cuando fueron comparados con el grupo tratado con T y NorT respectivamente; (†) p < 0.01 para el grupo tratado con 5 $\alpha$ ETAc cuando fue comparado con el grupo tratado con ETAc; (-) p < 0.01 para el grupo tratado con 5 $\alpha$ NET cuando fue comparado con el grupo control castrado; (○) p < 0.001 para el grupo tratado con T cuando fue comparado con el grupo control castrado.

Los resultados son similares cuando se examinan las actividades androgénicas de la NET, la T y las de sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos para incrementar el peso de los órganos sexuales accesorios de las ratas castradas. La administración de la NET a la dosis diaria de 2 mg durante 10 días consecutivos a las ratas castradas incrementa significativamente el peso de la próstata ventral y de las vesículas seminales cuando se compara con los animales castrados tratados con el vehículo ( $p < 0.0001$ ) ver la figura 8 y la tabla 3. Por el contrario, el tratamiento con la 5 $\alpha$ NET a la misma dosis, no aumenta el peso de los órganos sexuales accesorios de los animales castrados resultando similar al del grupo control castrado tal como se observa en la figura 8 y la tabla 3. A diferencia de estos resultados, la administración de la DHT (250  $\mu$ g/día/ 10 días), incrementa el peso de los órganos sexuales accesorios de los animales castrados ( $p < 0.0001$ ), mientras que con la administración de idénticas dosis de la T, el aumento es menor ( $p < 0.001$ ). La actividad androgénica de la DHT es significativamente mayor que la de la T ( $p < 0.001$ ) particularmente cuando se compara el crecimiento de la próstata ventral (fig 8; tabla 3).

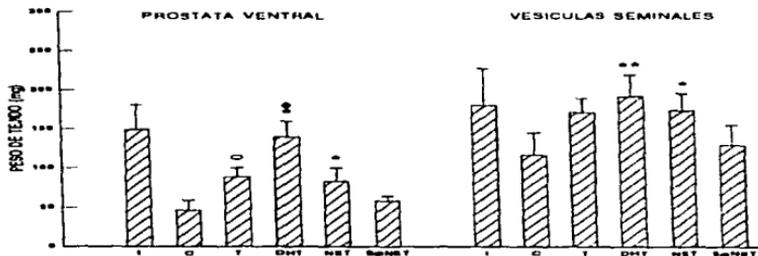


Fig 8. Efecto de Nortisterona (NET), Testosterona (T) y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos (5 $\alpha$ NET y DHT) sobre el crecimiento de los órganos sexuales accesorios en ratas machos adultos castrados. Los animales se trataron con NET y 5 $\alpha$ NET (2 mg/día), T y DHT (250  $\mu$ g/día) durante 10 días consecutivos. Animales intactos (I) y castrados tratados con el vehículo (C) sirvieron como grupos control. Cada barra representa la media y la desviación estándar (media  $\pm$  DE) del peso de la próstata ventral y de las vesículas seminales (mg) de grupos de 7 - 9 animales. \*  $p < 0.0001$  cuando se compara con el grupo control castrado. \*\*  $p < 0.001$  en comparación con el grupo control castrado. \*\*\*  $p < 0.0001$  cuando se compara con el grupo control castrado con T.  $p < 0.001$  cuando se compara con el grupo control castrado.

**B).- Actividad androgénica de 19-Nortestosterona, 17 $\alpha$ -Ethiniltestosterona y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos**

La administración de la NorT (400 $\mu$ g/día/5 días) a los ratones castrados incrementa la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa renal alcanzando niveles significativamente mayores que los observados en los animales castrados tratados con el vehículo ( $p < 0.0001$ ), tal y como se observa en la figura 7. Cuando el derivado 5 $\alpha$ -reducido de NorT se administra a la misma dosis, su actividad es significativamente mayor que la de la NorT ( $p < 0.01$ ) para inducir la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa renal (fig. 7; tabla 2).

El tratamiento de la ETAc (400 $\mu$ g/día/5 días) incrementa significativamente la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa renal en los animales castrados cuando se compara con el grupo control castrado ( $p < 0.0001$ ) (fig. 7; tabla 2). Mientras que, la administración de dosis idénticas de la 5 $\alpha$ ETAc a los animales castrados aumenta aunque en menor grado la actividad de la enzima ( $p < 0.001$ ). La actividad androgénica de la 5 $\alpha$ ETAc sobre la  $\beta$ -glucuronidasa renal es menor que la de la ETAc ( $p < 0.01$ ) (fig. 7; tabla 2).

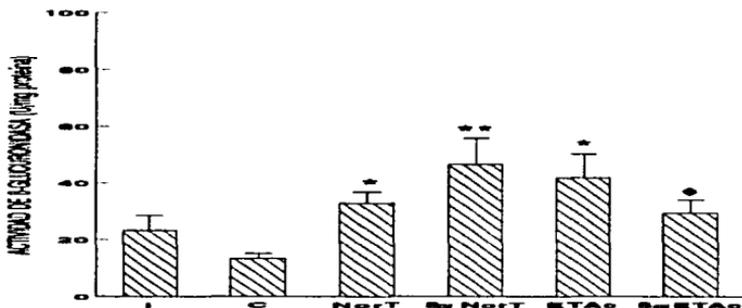


Fig. 7 Efecto de 19-Nortestosterona (NorT), acetato de 17 $\alpha$ -Ethiniltestosterona (ETAc) y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos (5 $\alpha$ NorT y 5 $\alpha$ ETAc) sobre la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa del riñón del ratón. Dosis de 400  $\mu$ g/día durante 5 días consecutivos se administraron a ratones machos Balb/c castrados. Los animales intactos (I) y castrados tratados con el vehículo (C) sirvieron como grupos control. Cada barra representa el promedio de la actividad de la enzima y la desviación estándar (media  $\pm$  DE) de grupos de 7 - 9 animales; \*  $p < 0.0001$  en comparación con el grupo control castrado, \*\*  $p < 0.01$  cuando se compara con el grupo tratado con NorT, ◆  $p < 0.01$  comparando con el grupo tratado con ETAc.

Cuando se evalúa la actividad de la NorT, la ETAc y de sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos sobre el incremento del peso de los órganos sexuales accesorios en las ratas castradas, los resultados muestran algunas diferencias, con los obtenidos en el bioensayo de la  $\beta$ -glucuronidasa en el riñón del ratón.

La administración de la NorT (2mg/día/10días) a las ratas castradas incrementa significativamente el peso de la próstata ventral ( $p < 0.0001$ ) y de las vesículas seminales ( $p < 0.001$ ) en comparación con el de los animales castrados tratados con el vehículo (fig. 9; tabla 3). Con el tratamiento de la 5 $\alpha$ NorT a la misma dosis, el incremento en el peso de los órganos sexuales accesorios es significativamente mayor que el de la NorT ( $p < 0.001$ ) ver la figura 9 y la tabla 3.

Interesantemente, el tratamiento de la ETAc (2mg/día/10días) a las ratas castradas, no induce cambios significativos en el peso de la próstata ventral ni de las vesículas seminales (fig. 9), los resultados son similares a los observados con el grupo control castrado (tabla 3). Esta falta de actividad androgénica también se observa en el peso de los órganos sexuales accesorios de los animales castrados tratados con dosis idénticas de 5 $\alpha$ ETAc (fig. 9; tabla 3)

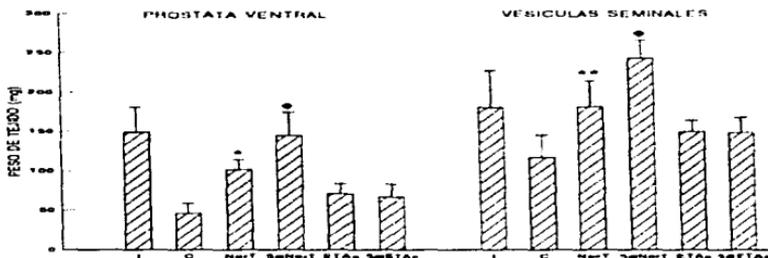


Fig. 9. El efecto de 17 $\beta$ -Estradiolacetato (EAc), acetato de 5 $\alpha$ -Estradiol (5 $\alpha$ ETAc) y NorEstradiol (NorT) sobre el crecimiento de los órganos sexuales accesorios de ratas castradas, recibiendo diariamente 100 mg de acetato de estradiol (E) durante 10 días consecutivos. Los animales intactos (I) y castrados (C) tratados con el vehículo (C) sirvieron como grupo control. Cada barra representa el promedio y la desviación estándar (error estándar) del peso de la próstata ventral y de las vesículas seminales (mg) de grupos de 7-8 animales. \*  $p < 0.0001$  comparado con control con el grupo castrado; \*\*  $p < 0.001$  comparado con el grupo castrado; •  $p < 0.001$  comparado con control con el grupo tratado con EAc.

**Tabla 3. Peso de la próstata ventral y vesículas seminales de ratas tratadas con los esteroides naturales y sintéticos.**

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>PROSTATA VENTRAL (mg)●</b>	<b>VESICULAS SEMINALES (mg)●</b>
Sin trat. C/I	148.9 ± 31.7	179.8 ± 47.0
(PPG) C/C	46.0 ± 13.0	116.4 ± 28.4
T	88.3 ± 11.4 ○	171.0 ± 17.8
DHT	139.4 ± 19.7 * ♦	183.4 ± 35.7 **
NET	82.5 ± 17.0 *	173.2 ± 20.5 *
5αNET	58.0 ± 6.3	121.1 ± 14.8
NorT	101.2 ± 12.7	180.7 ± 32.6
5αNorT	144.1 ± 29.8	236.2 ± 16.4
ETAc	70.9 ± 12.5	149.2 ± 14.0
5αETAc	66.7 ± 16.4	147.9 ± 19.2

C/I Control de animales intactos sin tratamiento; C/C Control de animales castrados tratados con propilenglicol (PPG); (●) Peso (mg) de órganos sexuales accesorios: media ± desviación estándar. La comparación entre los grupos mediante la prueba Anova demostró variabilidad en: los pesos de la próstata ventral, resultando el valor de  $F = 32.46$  y la  $p < 0.00005$  y en los pesos de las vesículas seminales con el valor de  $F = 17.24$  y la  $p < 0.00005$ .

El análisis mediante la prueba t-Student demuestra las siguientes diferencias significativas: (\*)  $p < 0.0001$  para los grupos tratados con NET y DHT cuando fueron comparados con el grupo control castrado; (\*\*)  $p < 0.001$  para el grupo tratado con DHT cuando fue comparado con el grupo control castrado; (♦)  $p < 0.001$  para el grupo tratado con DHT cuando fue comparado con el grupo tratado con T; (○)  $p < 0.001$  para el grupo tratado con T cuando es comparado con el grupo control castrado.

## VIII DISCUSION

Un número creciente de evidencias experimentales han establecido claramente que la  $5\alpha$ -reducción enzimática del doble enlace en el anillo A de la molécula de la T, a nivel de ciertos órganos andrógeno-sensibles, modifica tanto su interacción con el receptor intracelular de los andrógenos, aumentando su afinidad de unión así como su potencia androgénica (9-14, 17, 21). Estas observaciones han permitido adoptar el concepto, ahora clásico, del efecto amplificador que la  $5\alpha$ -reducción induce a nivel de una diversidad de órganos blanco para los andrógenos. Estos hallazgos invalidaron la hipótesis de que la saturación del doble enlace del C-4 de las hormonas esteroideas solamente constituía un mecanismo de inactivación (28).

Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio confirman y amplían las evidencias que la reducción enzimática del doble enlace de la NET (progestina sintética anticonceptiva derivada de la T) la biotransforma en un derivado con mayor afinidad relativa por los sitios de unión del receptor intracelular de andrógenos, de manera similar a lo que se ha observado con la  $5\alpha$ -reducción del andrógeno natural T (57, 60, 61). Sin embargo, revelan que la  $5\alpha$ -reducción de la NET disminuye su actividad androgénica a diferencia de lo que ocurre con la  $5\alpha$ -reducción enzimática de la T la que amplifica su actividad biológica, asimismo, los resultados aportan información relevante que permite identificar la relación entre las características estructurales de la progestina con la expresión de este efecto paradójico de la  $5\alpha$ -reducción.

El análisis de los resultados obtenidos de la cinética de unión de la  $MB\text{-}^3H$  con los receptores de andrógenos de la próstata ventral de la rata demuestran que el valor de la  $K_d$  de 1.71 nM así como el del coeficiente de sedimentación de 8.2 S del complejo  $MB\text{-}^3H$ -receptor de andrógenos son similares a los obtenidos en estudios previos realizados en éste (75) y en otros laboratorios (76-81) para el receptor de andrógenos, tanto de la próstata como de otros tejidos andrógeno-sensibles de otras especies de mamíferos que utilizan la  $MB\text{-}^3H$  u otros radioligandos. Lo que indica que el radioligando utilizado en este estudio se une con alta afinidad a los receptores de andrógenos, por lo que asegura que la competencia de los esteroideas naturales y sintéticos por los sitios de unión del receptor sea específica.

El aumento de la afinidad resultante de la  $5\alpha$ -reducción de NET por el

receptor de andrógenos confirma los resultados reportados por Chávez y cols. (57), quienes determinan la estereoespecificidad de la NET y de sus derivados  $5\alpha$ -reducidos por los diferentes receptores para hormonas esteroideas sexuales y además demuestran que  $5\alpha$ NET se une al receptor con mayor afinidad que NET. Sin embargo, el aumento producido en la afinidad por la  $5\alpha$ -reducción no se reproduce en la actividad androgénica de la progestina, que por el contrario la disminuye.

Una posible explicación de la disminución inesperada de la actividad androgénica de la NET después de su  $5\alpha$ -reducción podría ser que la forma reducida ( $5\alpha$ NET) experimente mayor actividad metabólica biotransformándose a moléculas androgénicamente inactivas. Sin embargo, un estudio comparativo del metabolismo *in vitro* de NET y T tritadas en la próstata ventral de la rata (56), demuestra que ambos esteroideos son eficientemente bioconvertidos a varios compuestos  $5\alpha$ -reducidos que incluyen a sus correspondientes derivados  $5\alpha$ -dihidro y  $3\alpha$  y  $3\beta$  tetrahidros; los estudios de cinética indican que la velocidad de formación de los derivados reducidos de la NET y de la T presentan un patrón similar. Por lo tanto, se descarta la posibilidad de que la disminución observada de la actividad androgénica de la  $5\alpha$ NET obedezca a su rápido metabolismo a moléculas menos activas, ya que no se encuentran diferencias significativas en la velocidad de bioconversión de la NET y de la T.

Otra posibilidad es de que la  $5\alpha$ NET sea bioconvertida a estrógenos, como un medio fisiológico para eliminar su efecto androgénico, esto resulta poco probable ya que existen datos en la literatura que indican que la presencia del carbono 19 así como la presencia del doble enlace en el carbono 4 en la molécula del andrógeno son requerimientos estereoquímicos indispensables en la molécula del esteroide para que se lleve a cabo la reacción de aromatización biológica, la cual procede vía una hidroxilación en el carbono 19 seguida de la formación de un doble enlace en el carbono 1 y la remoción del metilo angular (82-84). Barbieri y Cols. han informado que la NET puede biotransformarse a  $17\alpha$ -etilnilestradiol en preparaciones de microsomas de placenta ricas en aromatasas (85) sin embargo, dada la extraordinaria pequeña formación del esteroide fenólico, en condiciones de gestación, la posibilidad de que NET sea aromatizable en condiciones fisiológicas de no embarazo es muy poco probable.

Una tercera alternativa para explicar el efecto paradójico de la  $5\alpha$ -reducción de la NET es examinar la relación de las características estructurales de la progestina con este efecto. Por lo que los resultados de los estudios de

competencia de la NorT y su derivado la 5 $\alpha$ NorT por los sitios de unión del receptor de andrógenos indican que la 5 $\alpha$ -reducción no aumenta ni disminuye la afinidad relativa de la NorT. Una observación por demás interesante es que tanto la NorT como la 5 $\alpha$ NorT presentan afinidades relativas mayores que la de T lo cual, significa que la ausencia del carbono 19 favorece la unión de la T con los receptores de andrógenos, debido a un aumento de su afinidad por los sitios específicos de unión. Estudios similares de unión *in vitro*, realizados en varios órganos andrógeno sensibles confirman estos hechos (86-88). Es interesante señalar que otros estudios con esteroides derivados de la progesterona también demuestran que la remoción del metilo angular incrementa la afinidad del esteroide por el receptor de progesterona (89).

El comportamiento de la interacción de la molécula de ET y de su derivado 5 $\alpha$ -reducido con el receptor de andrógenos es diferente. La 5 $\alpha$ -reducción de la ET incrementa su afinidad relativa por el receptor de andrógenos de manera similar como ocurre con la reducción del andrógeno natural T, lo que permite sugerir que la presencia del grupo 17 $\alpha$ -etinilo no interfiere con el aumento de su afinidad relativa inducido por la 5 $\alpha$ -reducción; sin embargo, la observación que las afinidades de la ET y de la 5 $\alpha$ ET son menores que las de los esteroides naturales T y DHT y las de la NorT y la 5 $\alpha$ NorT sugiere que la presencia del grupo 17 $\alpha$ -etinilo en la molécula de la T disminuye su afinidad relativa por los sitios de unión de los receptores de andrógenos. Respecto a este hallazgo, Shain y Boesel (90) propusieron que debido a un impedimento alostérico producido por el grupo 17 $\alpha$ -etinilo, el radical 17 $\beta$ -hidróxilo de la molécula de T no interactúa adecuadamente con el receptor de andrógenos, disminuyendo la afinidad del esteroide; hallazgos similares en estudios de competencia fueron informados por Zakár y Tóth (91) y por Ojasso y Raynaud (92) quienes estudiaron el efecto la 17 $\alpha$ -alquilación particularmente la sustitución 17 $\alpha$ -etinilo, sobre la afinidad relativa de diferentes esteroides por los receptores andrógenos de vesículas seminales y próstata ventral de la rata, respectivamente.

Los resultados hasta aquí discutidos, confirman la observación de que la 5 $\alpha$ -reducción del doble enlace en la molécula de T favorece un aumento en la afinidad por los receptores de andrógenos y demuestran que la ausencia del metilo angular (C-19) y la presencia del grupo 17 $\alpha$ -etinilo afectan de modo diferente la afinidad del andrógeno natural T. La ausencia del metilo incrementa su unión mientras que la presencia del grupo etinilo la

disminuye. El incremento de la afinidad que se produce por la remoción del metilo angular en la T no se modifica después de su  $5\alpha$ -reducción, mientras que la presencia del grupo etinilo en la molécula del andrógeno a pesar de que disminuye la afinidad no impide el efecto amplificador de la  $5\alpha$ -reducción. Estos resultados por lo tanto, ofrecen una explicación plausible para comprender el aumento de la afinidad de la NET por el receptor de andrógenos como resultado de la  $5\alpha$ -reducción.

La observación de que la  $5\alpha$ -reducción de la NorT amplifica sus actividades androgénicas de un modo similar a como ocurre con la  $5\alpha$ -reducción de la T demuestra que la ausencia del metilo angular C-19 no interfiere con el aumento de la actividad androgénica que induce la  $5\alpha$ -reducción enzimática y revela que esta modificación en la NET no está relacionada con la disminución de su actividad androgénica cuando se  $5\alpha$ -reduce el doble enlace de su anillo A.

Por el contrario, la disminución de la actividad androgénica que resulta con la  $5\alpha$ -reducción de ETAc particularmente cuando se examinan los resultados de la inducción de la  $\beta$ -glucuronidasa renal demuestra que la presencia del grupo  $17\alpha$ -etinilo impide el aumento que la  $5\alpha$ -reducción induce en la actividad biológica de la T y ofrece una explicación plausible para entender el efecto paradójico de la  $5\alpha$ -reducción de NET sobre su actividad androgénica. La incapacidad de ETAc y de su derivado reducido para incrementar el peso de los órganos sexuales accesorios indica que carecen de completamente de actividad en estos tejidos.

Los resultados obtenidos durante la evaluación de la actividad androgénica de NET en su forma  $5\alpha$ -reducida, empleando dos diferentes bioensayos cuantitativos, confirman y amplían los estudios de Morafí y cols. (61) quienes han demostrado que la administración simultánea de NET con  $17\beta$ -estradiol a ratas machos, castrados por largo tiempo, restaura el comportamiento sexual señalando una gran actividad androgénica de la molécula de NET, mientras que la  $5\alpha$ -reducción de NET induce una disminución significativa en su potencia androgénica conductual cuando se administra con el estrógeno.

Este efecto paradójico de la  $5\alpha$ -reducción sobre la actividad androgénica de NET también parece ocurrir con su actividad progestacional. Gutierrez-Sagal y cols. (93) demostraron que la reducción del doble enlace en el anillo A de

la NET no sólo disminuye significativamente su actividad progestacional estudiada a través de la determinación del contenido endometrial de los productos de la expresión del gen de la uteroglobina en conejas prepúberes, sino que además la  $5\alpha$ NET exhibe una potente actividad antiprogestacional. Reel y cols. (68) también demostraron que la  $5\alpha$ NET inhibe la proliferación endometrial inducida por la progesterona. Muy recientemente Castro y cols. (94) informaron que la administración de la  $5\alpha$ NET induce un potente efecto anti-implantación cuando se administra a las conejas fertilizadas.

## **IX CONCLUSIONES**

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio confirman que la  $5\alpha$ -reducción de la NET no amplifica sino por el contrario suprime la actividad androgénica a nivel de los órganos blanco, aún cuando induce un incremento en la afinidad por el receptor de andrógenos. Tal efecto paradójico de la reducción de la  $5\alpha$ -reducción de la NET parece ser debido al grupo  $17\alpha$ -etinilo presente en su molécula.

## **X COMENTARIOS FINALES.**

En su conjunto este estudio confirma la importancia del metabolismo de las progestinas a nivel de los órganos efectores como un mecanismo modulador de la expresión de sus actividades hormonales. Sin embargo, surgen algunas preguntas sobre la participación del grupo  $17\alpha$ -etinilo en: el proceso de activación del receptor de andrógenos, que involucra cambios conformacionales inducidos por su unión al esteroide y su fosforilación necesarios para la translocación nuclear del complejo esteroide-receptor; en la unión y activación del complejo a las secuencias específicas de los genes andrógeno-regulados. Por lo que se sugiere el diseño de estudios en sistemas celulares aislados o en fracciones sub-celulares que permitan un mayor entendimiento del mecanismo íntimo de acción de la NET y de otras progestinas sintéticas, incluyendo a las de la tercera generación.

## **IX REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- 1.- Klein, M. Sur l' Article de Berthold. Transplantation des testicules. Arch. Anat. Histol. Embryol. (Strasb.) 51:381-386, 1841.
- 2.- Dorfman L. R. **Physiology of Androgens en The Hormones Vol.2 G. Pincus and Kenneth V. Thimann (Eds) Acad. Press Inc. Publishers, New York. pp. 35, 1950.**
- 3.- David, K., Dengemanse, E., Freud, J. and Laqueur, E. Uber krystallinisches mannliches hormon and hoden (testosteron) wirksamer als aus harn oder aus cholesterin bereitetes androsteron. Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem. 233:281-284, 1935.
- 4.- Bardin, C.W. and Catterall, J.F. Testosterone: A mayor determinant of extragenital sexual dimorfism. Science 211:1285-1293, 1981.
- 5.- Dorfman, R.I. **Physiology of androgens: En The Hormones Vol.2 G. Pincus and K.V. Thimann (Eds) Acad. Press Inc. New York, 1950.**
- 6.- Mooradian, A.D., Morley, J.E. and Korenman S.G. Biological actions of androgens. Endocr. Rev. 8:1-28, 1987.
- 7.- Wang, D.Y. The distribution of [1,2-3H]testosterone in the tissues of female rats. J. Endocr. 34:491-496, 1966.
- 8.- Wilson, J.D. and Walker, J.D. The conversion of Testosterone to 5 $\alpha$ -Androstan-17 $\beta$ -ol-3-one (Dihydrotestosterone) by skin slices of man. J. Clin. Invest. 48:371-379, 1969.
- 9.- Bruchowsky, N. and Wilson, J.D. The conversion of testosterone to 5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ ol-3-one by rat prostate *in vivo* and *in vitro*. J. Biol. Chem. 243: 2012-2021, 1968.

- 10.- Wilson, J.D. and Gloyna, R.E. The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction. **Rec. Prog. Horm. Res.** **26:309-336, 1970.**
- 11.- Tvetter, K.J. and Attramadal, A. Autoradiographic localization of androgen in the rat ventral prostate. **Endocrinology** **85:350-354, 1969.**
- 12.- Liao, S., Liang, T. Fang, S., Castañeda, E. and Shao, T.S. Steroid structure and androgenic activity. **J. Biol. Chem.** **248:6154-6162, 1973.**
- 13.- Dorfman, R.I. and Shipley, R.A. **Androgens, Biochemistry, Physiology and Clinical Significance.** John Wiley & Sons Inc. New York, 1956.
- 14.- Liao, S. and Fang, S. Receptor proteins for androgens and mode of action of androgens on gene transcription in ventral prostate. **Vit. Horm.** **27:17-20, 1969.**
- 15.- Wilson, J.D. and Laznitzki, I. Dihydrotestosterone formation in fetal tissues of the rabbit and rat. **Endocrinology** **89:659-668, 1971.**
- 16.- Siitleri, P.K. and Wilson J.D. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. **J. Clin. Endoc. Metab.** **38:113-125, 1974.**
- 17.- Schmidt, H., Noack, I. and Voigt, K.D. Metabolism and mode of action of androgens in target tissues of male rats. **Acta Endocrinol. (Copenh.)** **69:165-173, 1972.**
- 18.- Bruchowsky, N. and Wilson, J.D. The intranuclear binding of testosterone and  $5\alpha$ -androstane- $17\beta$ -ol-3-one by rat prostate. **J. Biol. Chem.** **243:5953, 1968.**
- 19.- Mainwaring, W.I.P. A soluble androgen receptor in the cytoplasm of rat prostate. **J. Endocrinol.** **45:531-541, 1969.**

- 20.- Mainwaring, W.I.P. and Milroy, E.J.G. Characterization of the specific androgen receptors in the human prostate gland. **Endocrinology** **57:371-384, 1973.**
- 21.- Mainwaring, W.I.P. The binding of (1-2-<sup>3</sup>H)testosterone within nuclei of the rat prostate. **J. Endocrinol.** **44:323-333, 1969.**
- 22.- Wilson, J.D. The pathogenesis of benign prostate hyperplasia. **Am. J. Med.** **68:745, 1980.**
- 23.- Sansone, G. and Reisner, R.M. Differential rates of conversion of testosterone to dihydrotestosterone in acne and in normal human skin a possible pathogenic factor in acne. **J. Invest. Dermatol.** **56:366, 1977.**
- 24.- Kurtenn, P., Nowoszowicz, I., Schaison, G. and Mauvais-Jarvis, P. Androgen production and skin metabolism in hirsutism. **J. Endocr.** **75:83, 1977.**
- 25.- Bingham, K. D. and Shaw, D.A. The metabolism of testosterone by human male scalp skin. **J. Endocrinol.** **57:111, 1973.**
- 26.- Moore, R.J. and Wilson, J.D. Localization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: 4-3-ketosteroid 5 $\alpha$ -oxidoreductase in the nuclear membrane of the rat ventral prostate. **J. Biol. Chem.** **247:958-968, 1972.**
- 27.- Frederiksen, D.M. and Wilson, J.D. Partial characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: 4-3-ketosteroid-5 $\alpha$ -oxidoreductase of rat prostate. **J. Biol. Chem.** **246:2584-2593, 1971.**
- 28.- Forchielli, E. and Dorffman, R.I. Separation of delta 4-5 $\alpha$  and delta 4-5 $\beta$ -hydrogenases from rat liver homogenate. **J. Biol. Chem.** **223: 443-448, 1956.**
- 29.- Tomkins, G.M. The enzymatic reduction of delta 4-3-ketosteroids. **J. Biol. Chem.** **225:13-24, 1957.**

- 30.- McGuire, J.S., Jr., and Tomkins, G.M. The heterogeneity of 4-3-ketosteroid reductases ( $5\alpha$ ). **J. Biol. Chem.** **235:1634-1638, 1960.**
- 31.- Voigt, W., Fernández, P.E. and Hsia, S.L. Transformation of testosterone into  $17\beta$ -hydroxi- $5\alpha$ -androstan-3-one by microsomal preparations of human skin. **J. Biol. Chem.** **245:5594-5599, 1970.**
- 32.- Moore, R.J., Griffin, J.E. and Wilson, J.D. Diminished  $5\alpha$ -reductase activity in extracts of fibroblasts cultured from patients with familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. **J. Biol. Chem.** **251:7168-7172, 1975.**
- 33.- Moore, R.J., and Wilson J.D. Steroid  $5\alpha$ -reductase in cultured human fibroblasts: biochemical and genetic evidence for two distinct enzyme activities. **J. Biol. Chem.** **251:5895-5900, 1976.**
- 34.- Andersson, S., Bishop, R.W. and Russell, D.W. Expression, cloning and regulation of steroid  $5\alpha$ -reductase an enzyme essential for male sexual differentiation. **J. Biol. Chem.** **264:16249-16255, 1989.**
- 35.- Andersson, S. and Russell, D.W. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid  $5\alpha$ -reductases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **87:3640-3644, 1990.**
- 36.- Normington, K. and Russell, D.W. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid  $5\alpha$ -reductase isozymes. **J. Biol. Chem.** **267:19548-19554, 1992.**
- 37.- Jenkins, E.P., Andersson, S., Imperato-McGinley, J., Wilson, J.D. and Russell, D.W. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid  $5\alpha$ -reductase. **J. Clin. Invest.** **89:293-300, 1992.**
- 38.- Thigpen, A.E., Silver, R.I., Guileyardo, J.M., Casey, M.L., McConnell, J.D. and Russell, D.W. Tissue distribution and ontogeny of steroid  $5\alpha$ -reductase isozyme expression. **J. Clin. Invest.** **92:903-910, 1993.**

- 39.- Andersson, S., Berman, D.M., Jenkins, E.P. and Russell, D.W. Deletion of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. **Nature** **354:159-161, 1991.**
- 40.- Thigpen, A.E., Davis, D.L., Milatovich, A., Mendoca, B.B., Imperato-Meglin, J., Griffin, J.E., Francke, U., Wilson J.D. and Russell D.W. Molecular genetics of steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. **J. Clin. Invest.** **2:799-809, 1992.**
- 41.- French, F. and Wilson, E.M. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. **Science** **240:327-330, 1988.**
- 42.- Chang, C., Kokontis, J. and Liao, S. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. **Science** **240:324-326, 1988.**
- 43.- Jenster, G., Korput, A.G.M., Vroonhoven, C., Kwast, T.H., Trapman, J. and Brinkmann, A.O. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding transcriptional activation and subcellular localization. **Mol. Endocrinol.** **5:1396-1404, 1991.**
- 44.- Ryffel, G.V., Klein-Hitpass, L., Druége, P., Doebbeling, V., Heitlinger, E. and Cato, A.C.B. The estrogen responsive DNA element: Structure and interaction with the estrogen receptor. **J. Cell Biochem.** **35:219-227, 1988.**
- 45.- Djerassi, C., Miramontes, L. and Rosenkranz, G. **Am. Chem. Soc. Milwaukee, Abstr.** **18J, 1952.**
- 46.- Goebelsman, U., Stancyk, F.Z. and Brenner, P. Serum norethisterone concentrations following intramuscular norethindrone oenanthate injection: effect upon serum LH, FSH, estradiol and progesterone. **Contraception** **19:283-315, 1979.**

- 47.- Hilliard, J., Croxatto, H.B., Hayward, J.N. and Sawyer, C.H. Norethindrone blockade of LH release to intrapituitary infusion of hypothalamic extract. **Endocrinology** 79:411-419, 1966.
- 48.- Landgren, M. and Diczfalusy, E. Hormonal effects of the 300 $\mu$ g Norethisterone (NET) minipill. I. Daily steroid levels in 43 subjects during a pretreatment cycle and during the second month of the NET administration. **Contraception** 2:87-113, 1980.
- 49.- World Health Organization. Multinational comparative clinical evaluation of two-long-acting injectable contraceptive steroids: norethisterone enanthate and medroxyprogesterone acetate. **Contraception** 15:513-533, 1977.
- 50.- Hertz, R., Tullner, W. and Raffelt, E. Progestational activity of orally administered 17 $\alpha$ -ethinyl-19-nortestosterone. **Endocrinology** 54:228-230, 1954.
- 51.- Revesz, C., Chappel, C.I. and Gaundry, R. Masculinization of female fetuses in the rat by progestational compounds. **Endocrinology** 66:140-144, 1960.
- 52.- Jacobson, B.D. Hazards of norethisterone therapy during pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynec.** 84: 962-968, 1962.
- 53.- Pérez-Palacios, G., Fernández-Aparicio, M.A., Medina, M., Zacarias-Villareal, J. and Ulloa-Aguirre, A. On the mechanism of action of progestins. **Acta Endocrinol. (Copenh.)** 97:320-328, 1981.
- 54.- Larrea, F., Escobar, N., Garza, F.J., Moctezuma, O., Martínez-Campos, A. and Pérez-Palacios, G. Nuclear translocation of estradiol receptors by the in vivo administration of norethisterone: An alternate mechanism for gonadotropin inhibition. **J. steroid Biochem.** 19:1747-1752, 1983.
- 55.- Larrea, F., Moctezuma, O. and Pérez-Palacios, G. Estrogen like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. **J. steroid Biochem.** 20: 841-847, 1984.

- 56.- Pérez, A.E., Hernández, A., Cervantes, P., Chávez, B., Vilchis, F. and García, G. Metabolismo in vitro de noretisterona-<sup>3</sup>H en hipotálamo e hipófisis de ratas hembras castradas. **XXV Reunión Anual de la Soc. Mex. Nutr. Endocr. (Mex.) R50, 1985.**
- 57.- Chávez, B.A., Vilchis, F., Pérez, A.E., García, G.A., Grillasca, I. and Pérez-Palacios, G. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. **J. steroid Biochem. 22:121-126, 1985.**
- 58.- Vilchis, F., Chávez, B., Pérez, A.E., García, G.A., Angeles, A. and Pérez-Palacios, G. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. **J. steroid Biochem. 24:525-531, 1986.**
- 59.- Lemus, A.E., Damsky, R., Enríquez J., García, G.A., Vilchis, F. and Pérez-Palacios, G. Efecto de la noretisterona y de sus metabolitos  $5\alpha$ -reducidos sobre la inducción de la pubertad en la rata hembra. **XI Reunión Bianual de la Asoc. Lat. Invest. Reprod. Hum. (ALIRH) y XIII Reunión Anual Acad. Invest. Biol. Reprod. (Mex.) R2, 1988.**
- 60.- Martínez, M., Vilchis, F., García, G. Evaluación de la potencia androgénica de noretisterona y  $5\alpha$ -dihidronoretisterona. Efectos sobre la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa. **XXV Reunión Anual de la Soc. Mex. Nutr. Endocr. (Mex.) R49, 1985.**
- 61.- Moralf, G., Lemus, A.E., Oropeza, M.V., García G.A. and Pérez-Palacios, G. Induction of male sexual behaviour by norethisterone: Role of its A-ring reduced metabolites. **Pharm. Biochem. Behav. 37:477-484, 1990.**
- 62.- Bowers, A., Ringold, H.J. and Denot, E. C1 19-nordihydrotestosterone derivatives. **J. Am. Chem. Soc. 80:6115, 1958.**
- 63.- Still, W.C., Kahan, M., and Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. **J. Org. Chem. 43:2923-2925, 1978**

- 64.- Scatchard, G. An attraction of protein for small molecule and ions. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 51:660-672, 1949.
- 65.- Martin, R.G. and Ames, B.N. A method for determining the sedimentation behaviour of enzymes: application of mixtures. **J. Biol. Chem.** 236:1272-1379, 1961.
- 66.- Reel, J.R., Humphrey, R.R., Shin, Y., Windson, B.L., Sakowsky, R., Creger, P.L. and Edgren, R.A. Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biological activity of testosterone derivatives. **Fertil. Steril.** 31:552-561. 1979.
- 67.- Cheng, Y.C. and Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $IC_{50}$ ) of enzymatic reaction. **Bioch. Pharm.** 22:3099-3108, 1973.
- 68.- Fishman, W.H., Springer, B. and Brunetti, R. Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood  $\beta$ -glucuronidase. **J. Biol. Chem.** 173:449-456, 1948.
- 69.- Bardin, C.W., Brown, T.R., Mills, N.C., Gupta, C., Bullock, L.P. The regulation of the  $\beta$ -glucuronidase gene by androgens and progestins. **Biol. Reprod.** 18: 74-83, 1978.
- 70.- Gupta, C., Bullock, L.P. and Bardin C.W. Further studies on the androgenic, antiandrogenic, and sinandrogenic actions of progestins. **Endocrinology** 102:736-744, 1978.
- 71.- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.
- 72.- Pearson, E.S. and Wishart, J. Students collected papers. **The Biometrika Office, University College (London), 1947.**

- 73.- Bannister, P., Sheridan, P. and Losowsky, M.S. Use of a new radioactive ligand  $7\alpha,17\alpha$ -dimethyl[ $17\alpha$ -methyl- $^3\text{H}$ ]19-nortestosterone for the estimation of androgens receptors in rat liver cytosol. **J. steroid Biochem.** 23:121-123, 1985.
- 74.- Traish, A.M., Müller, R.E. and Wotiz, H.H. Binding of  $7\alpha,17\alpha$ -dimethyl-19-nortestosterone (mibolerone) to androgen and progesterone receptors in human and animal tissues. **Endocrinology** 118:1327-1333, 1986.
- 75.- Vilchis, F., Chávez, B. and Pérez-Palacios G. Steroid hormone binding in the Harderian gland of birds: characteristics of the androgen, estrogen and progestins receptors of *Anas platyrhynchos* and *Gallus domesticus*. **Gen. Comp. Endocr.** 82:425-433, 1991.
- 76.- Bullock, L.P. and Bardin, W. Androgen receptors in mouse kidney: A study of male, female and androgen-insensitive [tfm/y]mice. **Endocrinology** 94:746-756, 1974.
- 77.- Samperez, S., Thiculant, M., Mercier, L. and Jouan, P. A Specific testosterone receptor to the cytosol of rat anterior hypophysis. **J. steroid Biochem.** 5:911-915, 1974.
- 78.- Wilson, E.M. and French, F.S. Binding properties of androgen receptors: evidence for identical receptors in rat testis, epididymis and prostate. **J. Biol. Chem.** 251:5620-5629, 1976.
- 79.- Verhoeven, G. and Wilson, J.D. Cytosol androgen binding in submandibular gland and kidney of the normal mouse and the mouse with testicular feminization. **Endocrinology** 99:79-92, 1976.
- 80.- A-Li, H.V., Loor, R.M., Chamberlin, L. and Wang, T.Y. Study of the androgen-binding cytosol proteins from rat prostate purification of androgen receptor. **Arch. Biochem. Biophys.** 185:134-141, 1978.
- 81.- Traish, A.M., Müller, R.E. and Wotiz, H.H. Resolution of non-activated and activated androgen receptors based on differences in their hydrodynamic properties. **J. steroid Biochem.** 22:601-609, 1985.

- 82.- Ryan K.J. Estrogen formation by the human placenta: studies on the mechanism of steroid aromatization by mammalian tissue. **Acta Endocrinol. (Copenh.) 35 suppl. 51:697-698, 1960.**
- 83.- Hayano, M., Longchamp, J.E., Kelly, W., Gual C. and Dorfman, R.I. Studies on the biosynthesis of estrogens by human placental microsomes. **Acta Endocrinol. (Copenh.) 35 suppl. 51:699-700, 1960.**
- 84.- Gual, C., Morato, T., Hayano, M., Gut, M. and Dorfman, R.I. Biosynthesis of estrogens. **Endocrinology 71: 920-925, 1962.**
- 85.- Barbieri, R.L., Petro, Z., Canick, J.A. and Ryan K.J. Aromatization of norethindrone to ethinylestradiol by human placental microsomes. **J. Clin. Endocr. Metab. 57:299-303, 1983.**
- 86.- Krieg, M., Dennis, M. and Voigt, K.D. Comparison between the binding of 19-nortestosterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone and testosterone in rat prostate and bulbocavernosus/levator ani muscle. **J. Endocr. 70:379-387, 1976.**
- 87.- Krieg, M. and Voigt, K.D. In vitro binding and metabolism of androgens in various organs: a comparative study. **J. steroid Biochem. 7:1005-1012, 1976.**
- 88.- Kenneth, M.B., Chan, Smythe, S. and Liao S. Androgen receptor binding and androgenicity of methylated 4-ene-3-ketosteroids having no 17-hydroxy group. **J. steroid Biochem. 11:1193-1196, 1979.**
- 89.- Tullner, W.W. and Hertz, R. High progestational activity of 19-norprogesterone. **Endocrinology 52:359-361, 1953.**
- 90.- Shain, S. and Boescl, R.W. Saturation analysis of the binding of androgens, antiandrogens and estrogens by cytoplasmic high affinity androgen receptor of the rat ventral prostate. **J. steroid Biochem. 6:43-50, 1975.**

- 91.- Zakár, T. and Tóth, M. Steroid-binding properties of the rat seminal vesicle androgen receptor: short-term and long-term competition of various steroids with radioactive dihydrotestosterone. **J. steroid Biochem.** 17:287-293, 1983.
- 92.- Ojasso, T. and Raynaud, J.P. Unique steroid congeners for receptor studies. **Cancer Res.** 38:4186-4198, 1978.
- 93.- Gutiérrez-Sagal, R., Pérez-Palacios, G., Langley, E., Pasapera, A.M., Castro, I. and Cerbón, M.A. Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. **Mol. Reprod. Dev.** 34:244-249, 1993.
- 94.- Castro, I., Cerbón, M.A., Pasapera, A.M., Gutiérrez-Sagal, R., García, G.A., Orozco, C., Camacho-Arroyo I., Anzaldúa, R. and Pérez-Palacios G. Molecular mechanisms of the antihormonal and antiimplantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. **Mol. Reprod. Dev.** 40:157-163, 1995.

## **PUBLICACION DEL TRABAJO DE TESIS**

**Anexo**



## 5 $\alpha$ -Reduction of Norethisterone Enhances Its Binding Affinity for Androgen Receptors but Diminishes Its Androgenic Potency

Ana E. Lemus,<sup>1\*</sup> Juana Enriquez,<sup>2</sup> Gustavo A. García,<sup>3</sup>  
 Ivonne Grillasca<sup>1</sup> and Gregorio Pérez-Palacios<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Reproductive Biology, UAM-Iztapalapa, Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition S. Zubiran, Mexico City, Mexico and <sup>3</sup>Faculty of Chemistry, National University of Mexico, Mexico City, Mexico

Norethisterone (NET), a 19 $\alpha$ -synthetic progestin, undergoes enzyme-mediated 5 $\alpha$ -reduction and exerts potent androgenic effects in target organs. To investigate its mode of androgenic action we examined, in a comparative manner, the *in vitro* metabolism of NET and testosterone (T), as well as the binding affinities to androgen receptors (AR) and the androgenic potency of NET, T, and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives. Bioconversion of [<sup>3</sup>H]-NET and [<sup>3</sup>H]-T was studied in rat prostate homogenates, AR binding affinity was assessed in rat ventral prostates using [<sup>3</sup>H]-mibolerone as the radioligand, and the androgenic potency was evaluated by the increase of  $\beta$ -glucuronidase activity in the mouse kidney, and by the growth of accessory sex organs in castrated male rats. The results demonstrated that 5 $\alpha$ -NET displayed a higher AR binding affinity but a significantly lower androgenic potency than unchanged NET. The bioconversion studies indicated that the metabolism of NET was similar to that of T, although to a lesser extent, thus ruling out the possibility that the synthetic progestin metabolizes rapidly into less active derivatives. To investigate the nature of the paradoxical effect of 5 $\alpha$ -reduction upon the NET molecule, the interaction with AR and the androgenic potency of T, 19 $\alpha$ -nor-testosterone (19 $\alpha$ orT), 17 $\alpha$ -ethynyl testosterone (ET) and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives were examined. The results of AR binding studies revealed that 5 $\alpha$ -reduction of T and ET significantly enhanced their affinities, and that the 5 $\alpha$ -derivative of 19 $\alpha$ orT displayed a similar binding affinity to that exhibited by 19 $\alpha$ orT. In terms of biological activity, the results showed that 5 $\alpha$ -reduction of T and 19 $\alpha$ orT significantly increased their androgenic potency, whereas 5 $\alpha$ -reduction of ET resulted in a significant diminution of its androgenicity in a manner similar to that observed with the 5 $\alpha$ -reduction of NET. When NET and 19 $\alpha$ orT were simultaneously administered with 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone they exhibited a potent synergistic activity, an effect that was cancelled by their 5 $\alpha$ -reduction. Interestingly, ET displayed an antiandrogenic activity, an effect that was also suppressed by its 5 $\alpha$ -reduction. The overall results demonstrated a distinctive, paradoxical effect of 5 $\alpha$ -reduction upon the NET molecule, which was different from that seen in naturally occurring androgens, and which suggests that the presence of the 17 $\alpha$ -ethynyl group plays a key role in this phenomenon. The data provided further evidence that the metabolic stability of androgen receptor progestins modulates the expression of their hormone-like actions. Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd.

*J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, Vol. 60, No. 0, pp. 1-9, 1996

### INTRODUCTION

Norethisterone (NET), a synthetic 19 $\alpha$ -nor, 17 $\alpha$ -ethynyl testosterone derivative, has been widely used as a contraceptive progestin in a number of pharmaceutical formulations [1-4]. In addition to its well-known

\*Correspondence to: A. E. Lemus, Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition S. Zubiran, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, Mexico, D.F., 14000 Mexico. Tel: +52 (5) 573 1140; Fax: +52 (5) 655 9456.  
 Received 17 Jan 1996; accepted 12 Aug 1996.

progestational activity. NET displays potent androgen-like effects following its administration in a number of mammalian species [5-8]. Previous studies from this and other laboratories have demonstrated that NET, in a similar way to naturally occurring androgens, undergoes extensive *in vivo* and *in vitro* enzyme-mediated 5 $\alpha$ -reduction [9-11], and that 5 $\alpha$ -dihydro NET (5 $\alpha$ -NET) exhibits a higher binding affinity for the androgen receptor (AR) compared to its parent compound [12].

To assess whether the androgenic effects of NET are mediated by its 5 $\alpha$ -metabolic conversion product, we examined, in a comparative manner, the effects of NET and 5 $\alpha$ -NET upon  $\beta$ -glucuronidase activity in the mouse kidney, and upon accessory sex organ growth in the castrated male rat. The results demonstrated that 5 $\alpha$ -reduction of the NET molecule induced a significant diminution of its androgenic potency, thus indicating that the androgenic effects of NET are not mediated by its A-ring reduction. In addition, *in vitro* metabolic studies indicated that NET and T exhibit similar metabolic patterns in a target tissue. These striking observations prompted us to investigate whether the absence of the C-19 or the presence of the 17 $\alpha$ -ethyl group in the NET molecule are involved in the paradoxical effect of 5 $\alpha$ -reduction. Accordingly, the AR binding affinity and the androgenic potency of testosterone (T), 19-nortestosterone (19norT), 17 $\alpha$ -ethynyltestosterone (ET) and their corresponding 5 $\alpha$ -derivatives were studied. AR binding affinities were assessed by displacement analysis in rat ventral prostate preparations using [ $^3$ H]-mibolerone as the radioligand. Additional experiments were carried out to determine the effects of 5 $\alpha$ -reduction upon the synergistic/antagonistic activities of NET, 19norT and ET.

Further impetus to conduct this study was provided by the observation that 5 $\alpha$ -reduction of NET results in a dramatic diminution of its androgen-like behavioural potency in long-term castrated male rats [13].

## MATERIALS AND METHODS

### Radioactive material and chemicals

[6,7- $^3$ H]-Nortestosterone ( $^3$ H-NET) specific activity 55 Ci/mmol and [1,2,6,7- $^3$ H]-testosterone ( $^3$ H-T) specific activity 102 Ci/mmol were obtained from New England Nuclear Research Products, Boston, MA, U.S.A.). [17 $\alpha$ -methyl ( $^3$ H)-dimethyl-19-nortestosterone ( $^3$ H-mibolerone) specific activity 85 Ci/mmol and unlabelled mibolerone were purchased from Amersham International plc (Bucks, U.K.). Radiochemical purity of [ $^3$ H]-steroids was established by paper or by thin-layer chromatographic behaviour, and by repeated crystallizations to constant specific activity. Radiopure T, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ , androstanediols, NET, ET, and ET

acetate (ETAc), NADPH, and  $\beta$ -glucuronidase assay reagents were supplied by Sigma Chemical Co (St Louis, MO, U.S.A.). All solvents and reagents used were of analytical grade.

### Synthesis of steroid derivatives

5 $\alpha$ -NET and the 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  tetrahydro NET derivatives (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET) were synthesized from NET as previously described [14]. 5 $\alpha$ -dihydro 19norT (5 $\alpha$ -19norT), 5 $\alpha$ -dihydro ET (5 $\alpha$ -ET) and 5 $\alpha$ -dihydro ET acetate (5 $\alpha$ -ETAc) were synthesized by lithium-ammonia reduction of their corresponding unsaturated compounds, crystallized from ethyl acetate-hexane and purified by flash chromatography [15]. Chemical purity of steroids was assessed by their melting points, high pressure liquid chromatography behaviour, infrared absorption, and  $^1$ H-nuclear magnetic resonance. The physical and spectroscopic constants of the A-ring reduced derivatives of 19norT, ET, and ETAc were as follows:

5 $\alpha$ -19norT	mp 213°C, $^1$ H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ 6.07, 1.1, max 3.90, 3.72 (m), $^1$ H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) (9) 0.76 (s, 3H), 1.5-3.5, OH disappear with D <sub>2</sub> O, 3.6 (s, 1H), ppm
5 $\alpha$ -ET	mp 220°C, $^1$ H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ 2.75, 1.1, max 3.90, 3.76, 3.70 (m), $^1$ H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) (9) 0.82 (s, 3H), 1.5-3.5, OH disappear with D <sub>2</sub> O, C=CH, ppm
5 $\alpha$ -ETAc	mp 218°C, $^1$ H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ 3.13, 1.1, max 3.93, 3.80, 3.74 (m), $^1$ H-NMR (CDCl <sub>3</sub> ) (9) 0.84 (s, 3H), 1.5-3.5, OH disappear with D <sub>2</sub> O, C=CH, C=O, 2.1 (s, 3H), ppm

### Animals and tissues

Adult male Wistar rats (250-300 g) and adult male Balb/c mice (30-35 g) used throughout this study were kept under a 14 h light/10 h dark cycle and maintained on food and water *ad libitum*. Gonadectomies were performed under light ether anaesthesia. Animals were killed by decapitation, the appropriate tissues were immediately removed, blotted and weighed and then submitted to experimental procedures.

### Androgen receptor binding studies

The presence of high affinity androgen binding sites in cytosol preparations of rat ventral prostates was assessed by a linear velocity gradient labelling technique using [ $^3$ H]-mibolerone as the radioligand, as previously described [16].

The equilibrium dissociation constant and the cytosol limited-capacity binding sites, for rat ventral prostate androgen receptor, were studied by a saturation analysis using [ $^3$ H]-mibolerone as the radioligand [12].

To evaluate the interaction of NET and its 5 $\alpha$ -reduced derivative with rat prostate AR, appropriate cytosol preparations obtained from animals castrated

48 h before the experiments, were incubated overnight with 2 nM [ $^3$ H]-mibolerone at 4°C in the presence or absence of increasing concentrations of radiolabeled steroid competitors, including NET, 5 $\alpha$ -NET, mibolerone, T, and DHT. At the end of the incubation period, bound and free fractions were separated by the addition of a dextran-coated charcoal suspension (DCC) and filtered for 10 min at 4°C. Incubations with DCC were terminated by centrifugation at 800  $\times$  g for 10 min, and aliquots were submitted to radioactive counting in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer using Instagel (Packard, Downers Grove, IL, U.S.A.) as the counting solution. Results were expressed as the percentage of [ $^3$ H]-mibolerone specific binding.

The relative binding affinities (RBA) for AR of 19 $\alpha$ orT, ET, and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives were also evaluated by their capability to displace bound [ $^3$ H]-mibolerone from rat ventral prostate androgen binding sites, as described above. The RBA and inhibition constants (K $_i$ ) of each steroid in displacement experiments were calculated according to the procedures described by Reel *et al.* [17] and Cheng and Prusoff [18], respectively.

#### Assessment of androgenic potency of unsaturated and 5 $\alpha$ -reduced steroids

To evaluate the androgenic potency of various natural and synthetic androgenic and 5 $\alpha$ -reduced derivatives, rat bioassays were used: the androgen-induced  $\beta$ -glucuronidase activity in the mouse kidney and the androgen-induced growth of male rat accessory sex organs.

The  $\beta$ -glucuronidase bioassay was performed in adult mice castrated 5 days before the experiments. Animals were divided into eight groups ( $n = 7-9$  each) and submitted to daily steroid treatments for five consecutive days. Steroids were dissolved in propylene glycol (PG) and subcutaneously (s.c.) administered (40  $\mu$ l); to enhance the solubility of ET and 5 $\alpha$ -ET, they were used in bioassays as their corresponding 17 $\beta$ -acetate derivatives. T and DHT were given at a daily dose of 125  $\mu$ g subcutaneously (NET, 5 $\alpha$ -NET, 19 $\alpha$ orT, 5 $\alpha$ -19 $\alpha$ orT, ETAc, and 5 $\alpha$ -ETAc were administered at 400  $\mu$ g per day). Two additional groups of intact ( $n = 5$ ) and castrated ( $n = 5$ ) mice, receiving vehicle alone, served as controls. At the end of the treatment period the animals were killed and their kidneys removed immediately and homogenized in deionized water. Aliquots of kidney homogenates (200  $\mu$ l, 16 mg protein) were submitted to  $\beta$ -glucuronidase activity determination by the colorimetric method of Fishman [19], with minor modifications, using the Sigma assay kit reagents. Results were expressed as  $\beta$ -glucuronidase units (U) per milligram of protein.

The androgenic potency of unsaturated and 5 $\alpha$ -reduced steroids was also evaluated by their capability to induce ventral prostate and seminal vesicle growth

in adult rats castrated eight days prior to the experiments. Animals were divided into eight groups ( $n = 7-9$  each) and submitted to daily steroid treatments for 10 consecutive days. Steroids were dissolved in PG and administered s.c. (100  $\mu$ l). T and DHT were given at the daily dose of 250  $\mu$ g, whereas NET, 5 $\alpha$ -NET, 19 $\alpha$ orT, 5 $\alpha$ -19 $\alpha$ orT, ETAc and 5 $\alpha$ -ETAc were administered at 2 mg per day. Two additional groups of intact ( $n = 9$ ) and castrated ( $n = 12$ ) rats, receiving vehicle alone, served as controls. At the end of the treatment period, animals were killed and their ventral prostates and seminal vesicles were immediately removed, blotted and weighed to the nearest 0.1 mg.

Additional experiments were carried out to determine the effect of 5 $\alpha$ -reduction upon the androgen agonistic, synergistic or antagonistic activities of NET, 19 $\alpha$ orT, and ET using the mouse kidney  $\beta$ -glucuronidase bioassay. Castrated male mice were divided into six groups ( $n = 8$  each), and submitted to daily combined steroid treatments. Steroids were dissolved in PG and administered s.c. (40  $\mu$ l): NET, 5 $\alpha$ -NET, 19 $\alpha$ orT, 5 $\alpha$ -19 $\alpha$ orT, ETAc, and 5 $\alpha$ -ETAc at a daily dose of 400  $\mu$ g each were simultaneously administered with DHT (250  $\mu$ g/day) for five consecutive days. Two additional groups ( $n = 8$  each) of castrated mice receiving either vehicle alone or DHT (250  $\mu$ g/day) for five days served as controls.

#### In vivo metabolic studies

Ventral prostates from adult rats, castrated 48 h before the experiments, were homogenized in Krebs-Ringer phosphate buffer solution, pH 7.4. Tissue preparations (10 mg protein) were incubated in triplicate with a single concentration (2  $\mu$ M) of either [ $^3$ H]-labelled NET, ET, or DHT, in the presence or absence of 0.3 mM NADPH in a final volume incubation of 1 ml. Incubations were carried out in a Dubnoff metabolic incubator at 37.5°C for 2 h, using air as the gas phase. Tissue-less incubations were used as controls. At the end of the incubation period the steroids were extracted (4 $\times$ ) with three volumes of ethyl acetate. The organic extracts were partitioned between petroleum ether and 10% aqueous methanol. Methanolic extracts from the NET incubations were added with 2.5  $\mu$ g each of NET, 5 $\alpha$ -NET, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET, and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET as steroid carriers, whereas 2.5  $\mu$ g each of T, DHT, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -androstenediol (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -diol) and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -androstenediol (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol) were added to 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -androstenediol incubations. Isolation and radiochemical purity of NET and T metabolites were established by an identical method to that of steroid carriers in both paper (petroleum ether: benzene: methanol: water; 5:1:5:1) and thin layer (benzene: absolute ethanol; 95:5) chromatographic systems and successive recrystallization to obtain a constant specific activity. The radioactive content in samples was determined in a Packard Tri-Carb liquid scintil-

lation spectrometer, Model 2060 (Packard, Downers Grove, IL). Counting efficiency of [ $^3\text{H}$ ] was 45% and quenching was corrected in all samples by external standardization. Formation of [ $^3\text{H}$ ]-NET and [ $^3\text{H}$ ]-T metabolites was calculated from the last crystal values and the results were expressed as pmol/mg protein/h.

#### Statistical

Kidney  $\beta$ -glucuronidase activity data and accessory sex organ weights were analysed by the Student's *t*-test. Group differences were considered significant at  $P < 0.05$  (two-tailed test).

## RESULTS

#### Comparison of NET and 5 $\alpha$ -NET for androgen receptors

The results of saturation analysis and linear sucrose gradient experiments, using [ $^3\text{H}$ ]-mibolerone as the radioligand, provided evidence of the presence of a specific 4.5 cytosol-located androgen receptor in the rat ventral prostate, with an equilibrium dissociation constant of 1.71 nM and a saturation binding capacity of 2.3 nmol/mg of protein, confirming and extending our previous report using a different ligand [16].

The effects of increasing concentrations of non-radioactive NET, 5 $\alpha$ -NET, T and DHT upon the [ $^3\text{H}$ ]-mibolerone binding to androgen cytosol receptors from rat ventral prostate are shown in Fig. 1. The order to the affinity for the androgen receptor was: DHT > T > 5 $\alpha$ -NET > NET. The RBA and  $K_d$  values of each steroid are listed in Table 1.

#### Comparison of 19 $\alpha$ orT, ET and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives for androgen receptors

The addition of increasing concentrations of radioligand 19 $\alpha$ orT, ET, and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives induced a varying degree of displacement of [ $^3\text{H}$ ]-mibolerone from rat ventral prostate cytosol AR, as depicted in Fig. 2. The most potent steroid competitors for androgen binding sites were 5 $\alpha$ -19 $\alpha$ orT and 19 $\alpha$ orT. 5 $\alpha$ -ET also displayed a potent competitive effect, although to a lesser extent, whereas ET was effective only at high concentrations. The RBA and  $K_d$  values of each steroid are given in Table 1.

#### Androgenic potency of NET and 5 $\alpha$ -NET

The administration of NET (400  $\mu\text{g}/\text{day}$  for five days) to castrated mice induced an increase of kidney  $\beta$ -glucuronidase activity to significantly higher levels ( $P < 0.0001$ ) than those observed in castrated control animals, whereas the administration of an identical dose of 5 $\alpha$ -NET to castrated mice had no effect upon kidney enzyme activity, as shown in Fig. 3. The administration of T (125  $\mu\text{g}/\text{day}$  for five days) to castrated mice fully restored kidney  $\beta$ -glucuronidase activity to levels observed in intact animals, whereas DHT given at an identical dose exhibited a signifi-

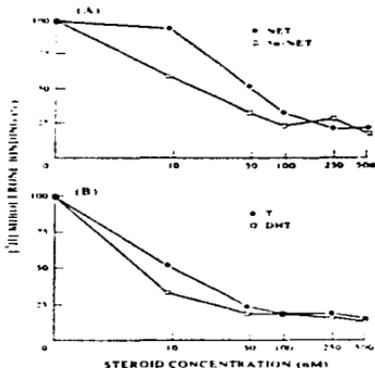


Fig. 1. Displacement effect of radioligand unsaturated and 5-reduced steroids upon the specific binding of [ $^3\text{H}$ ]-mibolerone to cytosol androgen receptors. Aliquots of ventral prostate cytosol (4.5 mg protein/ml) from castrated male rats were incubated overnight with 2 nM [ $^3\text{H}$ ]-mibolerone at 4°C (final incubation volume 200  $\mu\text{l}$ ), in the absence or presence of graded concentrations of non-labelled testosterone (NET), 5 $\alpha$ -dihydro-TEST (5 $\alpha$ -NET) (Panel A), and testosterone (T), and 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) (Panel B). The total binding of [ $^3\text{H}$ ]-mibolerone in the absence of radioligand competitors was set at 100%. Each point represents the mean of three experiments in triplicate. For details see the text.

cantly greater ( $P < 0.001$ ) potency than T to increase kidney enzyme activity in castrated mice, as depicted in Fig. 3.

Similar results were obtained when NET, T, and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives were examined for their

Table 1. Relative binding affinities (RBA) and inhibition constants ( $K_d$ ) of natural and synthetic steroids for androgen receptors

Steroid competitors	RBA* (%)	$K_d$ † (nM)
MIB	100.0	0.1
T	93.6	12.1
DHT	125.0	0.1
NET	14.0	51.1
5 $\alpha$ -NET	41.0	18.1
19 $\alpha$ orT	112.0	7.3
5 $\alpha$ -19 $\alpha$ orT	110.6	7.1
ET	7.0	101.1
5 $\alpha$ -ET	66.6	16.1

\*RBA was determined according to Reel *et al.* [17].

† $K_d$  values were calculated according to Cheng and Prusoff [18].

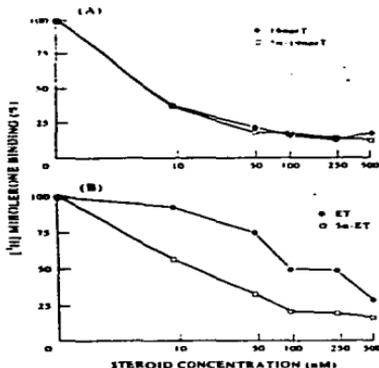


Fig. 2. Comparison of radiolabelled estradiol and 5 $\alpha$ -reduced steroids for rat ventral prostatic androgen binding sites. Cytosolic androgen receptors were labelled as above by overnight incubation (described in Fig. 1). Increasing concentrations of the following radiolabelled specific steroids were added to the incubations: 19-nortestosterone (19nort), 5 $\alpha$ -dihydro-19-nort (5 $\alpha$ -19nort) (Panel A), and 17 $\beta$ -oestradiol (ET), and 5 $\alpha$ -dihydro-17 $\beta$ -oestradiol (5 $\alpha$ -ET) (Panel B). Each point represents the mean of three experiments in triplicate.

capability to induce growth of accessory sex organs in the castrated male rat. Indeed, NET administered at the daily dose of 2 mg for 10 consecutive days induced a significant increase ( $P < 0.0001$ ) in the weights of the ventral prostate and seminal vesicles compared with vehicle-treated castrated animals (Fig. 4). On the contrary, treatment with 5 $\alpha$ -NET, administered at an identical dose, failed to induce ventral prostate and seminal vesicle growth in castrated rats, as shown in Fig. 4. The administration of DHT (250  $\mu\text{g}/\text{day}$  for 10 days) induced a significant increase in the weights of the ventral prostate ( $P < 0.0001$ ) and the seminal vesicles ( $P < 0.0001$ ) compared with vehicle-treated castrated male rats. The androgenic effect of DHT was significantly more potent than T administered at an identical dose, particularly in terms of ventral prostate growth ( $P < 0.001$ ), as depicted in Fig. 4.

The observation that 5 $\alpha$ -reduction of the NET molecule diminished and almost cancelled its androgenic-like potency, as assessed by two different bioassays,

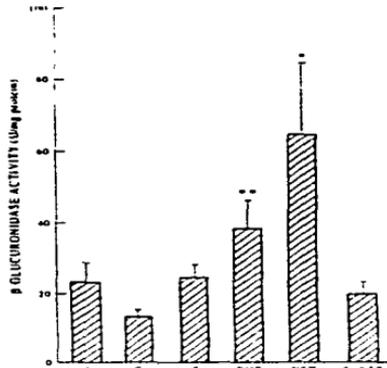


Fig. 3. Effect of nortestosterone (NET), testosterone (T) and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives (5 $\alpha$ -NET and DHT) on mouse kidney  $\beta$ -glucuronidase activity. Adult castrated male Rabbitt mice were treated with nortest (NET) and 5 $\alpha$ -NET; 200  $\mu\text{g}/\text{day}$  T and DHT; 125  $\mu\text{g}/\text{day}$  for five consecutive days. Inset (I) and castrated (C) vehicle-treated mice served as control groups. Each bar shows the mean and standard deviation (SD) for seven to nine animals. \* $P < 0.001$  compared with the C vehicle-treated group; \*\* $P < 0.001$  compared with the T-treated group. For experimental details see the text.

prompted us to examine the nature of this most striking finding.

#### Androgenic potency of 19nort, ET, and their 5 $\alpha$ -derivatives

The administration of 19nort (400  $\mu\text{g}/\text{day}$  for five days) induced an increase of kidney  $\beta$ -glucuronidase activity in castrated mice, reaching significantly higher levels ( $P < 0.0001$ ) than those observed in vehicle-treated control animals (Fig. 5). The 5 $\alpha$ -reduced derivative of 19nort, given at an identical dose, exhibited a significantly greater potency than 19nort ( $P < 0.01$ ), in terms of kidney  $\beta$ -glucuronidase activity increase in castrated mice, as depicted in Fig. 5.

The administration of ETAC (400  $\mu\text{g}/\text{day}$  for five days) induced a significant increase ( $P < 0.0001$ ) of kidney  $\beta$ -glucuronidase activity in castrated male mice, as shown in Fig. 5. The 5 $\alpha$ -reduced derivative of ETAC, given at an identical dose, also induced a rise of kidney  $\beta$ -glucuronidase activity, although with

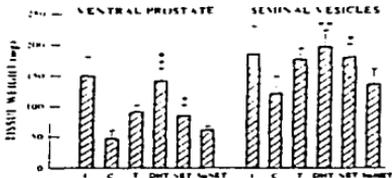


Fig. 4. Effect of moxibuterone (NET), testosterone (T) and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives (5 $\alpha$ -NET and DHT) on accessory sex organ growth in the castrated male rat. Adult castrated animals were treated with steroids (NET and 5 $\alpha$ -NET; 2mg/day; T and DHT; 250  $\mu$ g/day) for 10 consecutive days. Inset (1) and castrated (C) vehicle-treated rats served as control groups. Each bar shows the means (mean  $\pm$  SD) in terms of the weight (mg) of the ventral prostate and the seminal vesicle for seven to nine animals. \* $P < 0.05$  compared with the C vehicle-treated group; \*\* $P < 0.01$  compared with the C vehicle-treated group; \*\*\* $P < 0.001$  compared with the T-treated group.

a significantly lower ( $P < 0.01$ ) potency than ETAc (Fig. 5.)

When the potency of 19 $\alpha$ orT, ETAc, and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives to induce accessory sex organ growth was assessed in castrated male rats, the results were similar but not identical to those obtained using the mouse kidney  $\beta$ -glucuronidase assay. The administration of 19 $\alpha$ orT (2 mg/day for 10 days) to castrated rats induced a significant increase in the weights of the ventral prostate ( $P < 0.0001$ ) and the seminal vesicles ( $P < 0.001$ ). When 5 $\alpha$ -19 $\alpha$ orT was given at an identical dose, it induced an increase of both ventral prostate and seminal vesicle growth, with a significantly greater ( $P < 0.001$ ) potency than 19 $\alpha$ orT, as shown in Fig. 6.

Interestingly, neither ETAc nor its 5 $\alpha$ -reduced derivative, administered at the daily dose of 2 mg for 10 consecutive days to castrated male rats had any significant effect upon accessory sex organs.

#### Synergistic and antagonistic activities of NET, 19 $\alpha$ orT, ETAc and their 5 $\alpha$ -derivatives

The administration of NET plus DHT and 19 $\alpha$ orT plus DHT revealed an androgenic synergistic effect of both synthetic steroids. Indeed, NET and 19 $\alpha$ orT when given with DHT induced a significantly greater increase ( $P < 0.01$  and  $P < 0.0001$ , respectively) of kidney  $\beta$ -glucuronidase activity in castrated male mice compared with animals treated with DHT alone (Fig. 7). On the contrary, when 5 $\alpha$ -NET and 5 $\alpha$ -19 $\alpha$ orT were given simultaneously with DHT a lack of synergistic effect of these reduced derivatives was observed in terms of mouse kidney enzyme activity (Fig. 7).

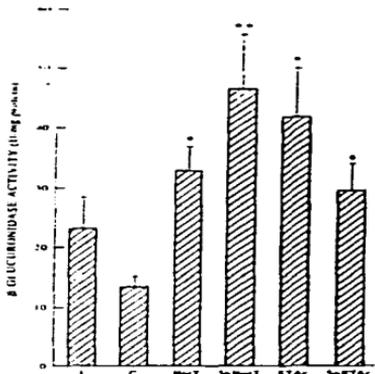


Fig. 5. Effect of synthetic testosterone and 5 $\alpha$ -reduced steroids on mouse kidney  $\beta$ -glucuronidase activity. Adult castrated male Balb/c mice were treated with 1 $\alpha$ -testosterone (Net T), 17 $\alpha$ -oestradiol/androstenedione (ETAc) and the 5 $\alpha$ -reduced derivatives (5 $\alpha$ -19orT and 5 $\alpha$ -ETAc) at the daily dose of 400  $\mu$ g for five consecutive days. Inset (1) and castrated (C) vehicle-treated mice served as control groups. The results are expressed as the kidney enzyme activity (mean  $\pm$  SD) for each group ( $n = 7-9$ ) of animals. \* $P < 0.05$  compared with the C vehicle-treated group; \*\* $P < 0.01$  compared with the C vehicle-treated group; \*\*\* $P < 0.01$  compared with the T-treated group.

The simultaneous administration of ETAc with DHT resulted in a significant diminution ( $P < 0.0001$ ) of the DHT-induced increase of kidney  $\beta$ -glucuronidase activity in castrated mice. Indeed, the levels of kidney enzyme activity in animals treated with ETAc plus DHT resembled those found in vehicle-treated castrated mice. Increasingly, the combined administration of 5 $\alpha$ -ETAc plus DHT to castrated mice induced an increase of kidney  $\beta$ -glucuronidase activity similar to that observed in animals treated with DHT alone (Fig. 7).

#### Metabolism of NET and T in the rat prostate

The results from the *in vivo* incubations of rat ventral prostate homogenates with radiolabelled NET and T demonstrated that both substrates undergo extensive bioconversion to A-ring reduced metabolites. As shown in Table 2, the enzyme-mediated A-ring reduction of both NET and T was NADPH-dependent,

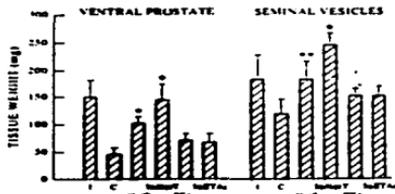
A Paradoxical Effect of 5 $\alpha$ -Reduction

Fig. 6. Androgenic potency of 19-nortestosterone (NorT), 17 $\alpha$ -ethynyltestosterone acetate (ETA) and their 5 $\alpha$ -reduced metabolites (NorT and ETA) obtained by their effects on the weight of accessory sex organs in the castrated male rat. Uncastrated and castrated animals were administered (i.p.) for 30 consecutive days to either each vehicle (C) or vehicle-treated animals served as control groups. The results are given as the weight of the ventral prostate and the seminal vesicles (mean  $\pm$  SD) for each animal group ( $n = 7-9$ ). \* $P < 0.001$  compared with the C vehicle-treated group; \*\* $P < 0.001$  compared with the C vehicle-treated group;  $\Phi\Phi < 0.001$  compared with the NorT-treated group.

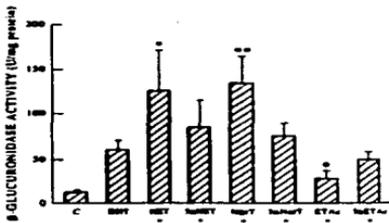


Fig. 7. Androgenic and antiandrogenic activities of nortestosterone (NET), 19-nortestosterone (NorT), 17 $\alpha$ -ethynyltestosterone acetate (ETA) and their 5 $\alpha$ -reduced metabolites in castrated female rats. The effect of uncastrated and castrated animals (400 gBW) administered simultaneously with DNET (150  $\mu$ g/day) for 30 consecutive days was assessed by their capability to modify the tissue histary  $\beta$ -glucuronidase activity. Control animals treated with DNET plus vehicle (DNET) or vehicle alone (C) served as control groups. The results are given as the histary enzyme activity (mean  $\pm$  SD) for each animal group ( $n = 8$ ). \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.0001$ ,  $\Phi\Phi < 0.0001$  compared with the DNET + vehicle-treated group.

Table 2. *In vivo* formation of A-ring reduced metabolites of [14]nortestosterone and testosterone in the rat ventral prostate

[14]-Substrate	[14]-isolated metabolites	pmol mg prostate.h	
		NADPH	No cofactor
Nortestosterone (NET)	5 $\alpha$ -NET	21.28	6.92
	3 $\alpha,5\alpha$ -NET	12.30	2.56
	3 $\beta,5\alpha$ -NET	8.90	1.10
Testosterone (T)	5 $\alpha$ -DHT	82.44	20.81
	3 $\alpha,5\alpha$ -diol	16.12	9.84
	3 $\beta,5\alpha$ -diol	23.27	7.30

For details see Materials and Methods.

as has been previously described [20]. The *in vivo* metabolic fate of NET and T in the prostate was similar, although T was a more efficient substrate for the steroid metabolizing enzymes. The 5 $\alpha$ -dihydro derivatives of NET and T were the major isolated incubation products followed by their corresponding 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -tetrahydro metabolites (Table 2).

## DISCUSSION

The results presented herein provide strong evidence that enzyme-mediated 5 $\alpha$ -reduction of the synthetic progestin norethisterone enhances its relative binding affinity for the intracellular androgen receptor, but diminishes and almost cancels its androgen-like effects. Indeed, experiments carried out in rat ventral prostates using displacement analysis revealed a significant increase in the relative binding affinity of 5 $\alpha$ -NET to the 8.2 S cytosol-located androgen receptor, with a concomitant significant decrease in the  $K_d$  value compared with uncastrated NET (Table 1), confirming and extending previous results from this laboratory [12]. When the androgenic potency of NET and 5 $\alpha$ -NET was assessed by two different bioassays, it became evident that A-ring reduction of the NET molecule results in a complete loss of its potent androgen-like effects as shown in Fig. 3 and Fig. 4. These findings are in a sharp contrast with the well-established concept that formation of the 5 $\alpha$ - (trans A/B ring junction) derivative of naturally occurring testosterone enhances both its RBA to the AR and its androgenic potency.

These striking observations raise the important question as to why 5 $\alpha$ -reduction of NET, a 19-nor, 17 $\alpha$ -ethynyl testosterone derivative, induced a dramatic diminution of its androgenicity in spite of the fact that 5 $\alpha$ -NET exhibits a high RBA for the androgen receptor, and prompted us to delineate the nature of this paradoxical effect.

This unexpected effect of 5 $\alpha$ -reduction on NET could be caused by a more rapid bioconversion of 5 $\alpha$ -NET into less active molecules. To rule out this possibility, a study aimed to compare the *in vivo*

metabolism of radiolabelled NET and T in the rat ventral prostate was conducted. The results disclosed that both NET and T were efficiently bioconverted to several A-ring reduced compounds, including their corresponding 5 $\alpha$ -dihydro and their 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -tetrahydro derivatives. The formation rate of A-ring reduced metabolites of NET and T presented a similar pattern, it was NADPH-dependent and it occurred to an almost identical extent, although T was a more efficient substrate than NET (Table 2). Indeed, the 5 $\alpha$ -reduction of NET seems to be slower than that of T, whereas the further 3 $\alpha$ - or 3 $\beta$ -reduction of 5 $\alpha$ -NET appears to be slightly faster than that of DHT.

To assess whether the lack of the C-19 methyl group or the presence of the 17 $\alpha$ -ethyl moiety of the NET molecule may be involved in the paradoxical effect of 5 $\alpha$ -reduction upon this synthetic progestin, a series of experiments was conducted, which aimed at evaluating the AR affinities and androgenic potency of 19norT, ET and their 5 $\alpha$ -reduced derivatives. The results showed that 5 $\alpha$ -reduction of 19-norT neither increased nor decreased its affinity for the androgen receptor, whereas 5 $\alpha$ -reduction of ET significantly enhanced its relative binding to the androgen receptor (Fig. 2 and Table 1). These combined results provided an explanation for the finding that 5 $\alpha$ -reduction of NET enhanced (two- to three-fold) the specific interaction with androgen binding sites in a manner similar to that observed with T, its parent compound (Fig. 1 and Table 1).

The androgenic potency of 19norT, ETAc and their corresponding 5 $\alpha$ -derivatives was assessed by their effects upon the  $\beta$ -glucuronidase activity in the mouse kidney and the growth of the ventral sex organs. The results showed that 5 $\alpha$ -reduction of 19norT significantly increased the kidney enzyme activity (Fig. 5), in a fashion similar to that observed with T after its 5 $\alpha$ -reduction (Fig. 3 and Fig. 4). A similar increase in the androgenic potency of the 19norT molecule, induced by its 5 $\alpha$ -reduction, was demonstrated in terms of the weights of the ventral prostate and seminal vesicles in castrated male rats (Fig. 6). These results were interpreted as indicating that removal of the C-19 methyl group from the T molecule does not interfere with the 5 $\alpha$ -reduction-induced amplification of its androgenic potency.

On the contrary, 5 $\alpha$ -reduction of ETAc resulted in a significant diminution of its capability to increase  $\beta$ -glucuronidase activity in the mouse kidney bioassay (Fig. 5). As shown in Fig. 6, ETAc was unable to restore the weights of the ventral prostate and seminal vesicles of castrated male rats, indicating that this compound was completely devoid of androgenic potency. Furthermore, 5 $\alpha$ -reduction of ETAc had no effect at all on its biological potency (Fig. 7). The data indicate that the addition of a 17 $\alpha$ -ethyl group to the testosterone molecule precludes the androgen amplifying effect induced by 5 $\alpha$ -reduction, and offers

a plausible explanation for the paradoxical effect of A-ring reduction upon norethisterone.

These results confirm and extend the observations of Morail *et al.* [13] that NET, when administered with estradiol-17 $\beta$  to long-term castrated rats, was able to restore full copulatory behaviour, whereas 5 $\alpha$ -NET failed to induce masculine behaviour when given with estradiol 17 $\beta$ , indicating that 5 $\alpha$ -reduction of NET results in a significant diminution of its behavioural androgenic potency. This paradoxical effect of 5 $\alpha$ -reduction upon the androgen-like potency of NET also seems to occur with its progestational activity. Gutierrez-Sagal *et al.* [21] have demonstrated that A-ring reduction of NET significantly diminishes its progestational activity, as assessed by the endometrial content of the uteroglobin gene expression products in prepubertal rabbits; furthermore, the 5 $\alpha$ -reduced NET derivative exhibits potent anti-progestational activity. Reel *et al.* [17] have also demonstrated the capability of 5 $\alpha$ -NET to inhibit progesterone-induced endometrial proliferation. More recently Castro *et al.* [22] have reported that 5 $\alpha$ -NET displays anti-implantation effects, when given to mated adult female rabbits, with a potency similar to that observed with RU-486, the synthetic steroidal antiprogestin.

Because the synergistic and antisynergistic effects of several synthetic progestins have been well documented [23], we felt it would be of interest to assess the effect of 5 $\alpha$ -reduction upon NET, 19norT, and ETAc, in terms of their androgen synergistic and antagonistic activities.

The simultaneous administration of DHT plus unchanged NET revealed that this synthetic progestin exhibited a synergistic effect in the androgen bioassay, as was expected, whereas the simultaneous administration of DHT plus the 5 $\alpha$ -reduced NET derivative had neither synergistic nor antagonistic additive effects. This observation is consistent with the diminution of the androgenic activity of the NET molecule induced by its 5 $\alpha$ -reduction. The lack of antisynergistic effect of 5 $\alpha$ -NET in the dose-dependent manner may be explained by the observations of Mamonczik *et al.* [23], indicating that the synergistic and antisynergistic effects of synthetic progestins vary in a dose-dependent manner. Similar results were observed following the administration of 19norT plus DHT and 5 $\alpha$ -19norT plus DHT. Indeed, 19norT exhibited a synergistic potency identical to that of NET, whereas 5 $\alpha$ -19norT did not. Interestingly, ETAc displayed an antisynergistic effect when administered simultaneously with DHT, as shown in Fig. 7, whereas 5 $\alpha$ -ETAc exhibited neither antisynergistic nor synergistic effects in the mouse kidney. These data indicate that 5 $\alpha$ -reduction modifies the expression of androgen synergistic and antagonistic activities of NET.

Taking all these results together, it can be concluded that 5 $\alpha$ -reduction of NET does not simplify,

A Paradoxical Effect of 5 $\alpha$ -Reduction

9

but does suppress its androgen-like activity in target organs, in spite of its high RBA to the androgen receptor. This paradoxical effect of 5 $\alpha$ -reduction seems to be caused by the presence of a 17 $\alpha$ -ethynyl group in the NET molecule. Whether similar findings can be obtained in isolated hormone-responsive systems remains to be ascertained, and deserves further experimental work in culture-maintained androgen-dependent and androgen-sensitive cells. The overall data provide additional support for the concept that the metabolism of synthetic progestins at target organs modulates their hormone-like effects.

**Acknowledgements**—This study was supported in part by grants from the Rockefeller Foundation (RF 93029-allocation 54), New York and The Special Programme on Human Reproduction of the World Health Organization, Geneva. The authors are indebted to Ma B Alarcon and Mr J. L. Ramirez for assistance with the preparation of the manuscript.

## REFERENCES

1. Gostolerman U., Szancay P. Z. and Brenner P.: Serum neurosterone concentrations following intramuscular nortestosterone dodecanoate injection: effect upon LH/FSH, estradiol and progesterone. *Contraception* 39 (1979) 283-315.
2. Hertz R., Tubbey W. and Raffel E.: Progesterone activity of orally administered 17 $\alpha$ -ethynyl-19-nortestosterone. *Endocrinology* 94 (1994) 228-230.
3. Beck L. R., Pope V. Z., Phammy C.E. Jr, Connor D. R., Tice T. H., Lewis D. H., Damm R. L., Moore A. B. and Gilley R. M.: Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) neurosterone microcapsules: an injectable biodegradable contraceptive. *Drug. Resour.* 28 (1983) 186-195.
4. Bondar R. B., Gorbun J. B., Orzoff M., Flores C. and Hernandez A.: The use of biodegradable microcapsules as a 6-month contraceptive system. *Fertil. Steril.* 42 (1984) 228-232.
5. Orzoff M. B., Dhegama J. B. and Malovich R. E.: On the fetal masculinizing action of certain oral progestins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39 (1979) 1369-1380.
6. Revel R., Chapoy C. I. and Olsberg R.: Masculinization of female fetuses in the rat by progestational compounds. *Endocrinology* 95 (1989) 168-166.
7. Jacoby E. D.: Results of nifedipine therapy during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 53 (1982) 962-966.
8. Ponce G. D., Ponce W. C. and Ponce L. H.: Incidence of certain neural and systemic tumors on genital development in guinea pigs. *Fertil. Steril.* 19 (1985) 608-615.
9. Saffell W. G., Hanson E. C., Hanson M. G., Saffell R. N. Zedler A.: Characterization of metabolites of steroid contraceptives by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Steroid Biochem.* 9 (1977) 699-705.
10. Braslow W. E. Jr, Lu T. J., Ellegren J. O., Mills T. M. and Mahesh V. B.: Accumulation of nortestosterone and individual metabolites in human plasma during short- and long-term administration of a contraceptive depot. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 133 (1978) 154-160.
11. Lopez F., Vilchis F., Chavez B., Perez A. E., Garcia Flores J., Perez-Palacios G.: The metabolism of 19-nore contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J. Steroid Biochem.* 48 (1987) 637-643.
12. Chavez B. A., Vilchis F., Perez A. E., Garcia G. A., Grinblat I. and Perez-Palacios G.: Stereospecificity of the intracerebral binding of nortestosterone and its A-ring reduced metabolites. *J. Steroid Biochem.* 22 (1985) 121-126.
13. Morali G., Lemos A. E., Orzoff P. M., Garcia G. A. and Perez-Palacios G.: Induction of male sexual behavior by nortestosterone role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37 (1990) 477-484.
14. Vilchis F., Chavez B., Perez A. E., Garcia G. A., Angeles A., Perez-Palacios G.: Evidence that a non-aromatizable metabolite of nortestosterone induces androgen-dependent pituitary progenitor receptors. *J. Steroid Biochem.* 24 (1986) 523-531.
15. Saito W. C., Kahan M. and Mera A.: Rapid chromatographic technique for progesterone preparation with moderate resolution. *J. Organ. Chem.* 45 (1978) 2923-2925.
16. Vilchis F., Hernandez A., Perez A. E. and Perez-Palacios G.: Hormone regulation of the rodent Harderian gland binding properties of the androgen receptor in the male golden hamster. *J. Endocr.* 112 (1987) 3-8.
17. Reif J. R., Humphrey R. R., Shah Y.-H., Wanders B. L., Sabornie R., Creeger P. L. and Edgren R. A.: Competitive progesterone antagonist receptor binding and biologic activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives. *Fertil. Steril.* 31 (1978) 552-561.
18. Cheng Y.-C. and Prusoff W. H.: Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973) 3063-3108.
19. Fahlman W.: H. Springer B. and Bruneto R.: Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human placental  $\beta$ -glucuronidase. *J. Biol. Chem.* 173 (1982) 648-658.
20. Fredriksson D. W. and Wilson J. D.: Partial characterization of the nuclear reduced nortestosterone acetate dinitrile/uracil phosphate (18, 4-3)-nortestosterone 5 $\alpha$ -acetate/uracil of rat prostate. *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 2586-2593.
21. Gutierrez-Sagel R., Perez-Palacios G., Langley E., Panopara A. M., Castro I. and Caruso M. A.: Endometrial expression of progesterone receptor and urogenital genes during early pregnancy in the rabbit. *Anat. Recol. Dev.* 38 (1993) 246-249.
22. Castro I., Caruso M. A., Panopara A. M., Gutierrez-Sagel R., Garcia G. A., Orozco C., Camacho-Arroyo I., Antikarov I., Perez-Palacios G.: Molecular mechanisms of the antihormonal and antiandrogenic effects of nortestosterone and its A-ring reduced metabolites. *Mol. Reprod. Dev.* 66 (1995) 157-163.
23. Monasterio I., Baster D. E., Chang K. W., Bullock L. P. and Barden C. W.: Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: comparison with nonprogestational antiandrogens. *Endocrinology* 95 (1974) 1596-1599.