



12 00377
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTOS MULTIHORMONALES DE LAS PROGESTINAS
SINTÉTICAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

BIOL. ROCÍO ÁNGELES GARCÍA BECERRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO LARREA GALLO

MÉXICO, D.F.

ABRIL, 2002



COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de marzo de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) García Becerra Rocío Angeles, con número de cuenta 87296206, y número de expediente 3991095, con la tesis titulada: "Efectos multihormonales de las progestinas sintéticas.", bajo la dirección de la Dr. Fernando Larrea Gallo.

Presidente:	Dr. Enrique Pedemera Astegiano
Secretario:	Dr. Fernando Larrea Gallo
Vocal:	Dr. Federico Martínez Montes
Suplente:	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Suplente:	Dra. Marcela Aguilar Morales

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de marzo de 2002

Dra. Tila María Pérez Ortiz
Coordinadora del Programa

c.c.p Expediente del interesado

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría del Dr. Fernando Larrea Gallo, con el apoyo financiero del programa Contraceptive Research and Development (CONRAD) MF6-99-46 y la beca número 130058 para estudios de maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

JURADO :

Presidente:	Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Secretario:	Dr. Fernando Larrea Gallo
Vocal:	Dr. Federico Martínez Montes
Suplente:	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Suplente:	Dra. Marcela Aguilar Morales

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando Larrea Gallo:

Por su invaluable apoyo y asesoría para la realización de esta tesis.

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Al **Dr. Austin Cooney** y la **B.A. Kathy Jackson** del Departamento de Biología Celular del Baylor College of Medicine en Houston, Tx.

A la **Q.F.B. Ana Elena Lemus Bravo**, por su colaboración en este proyecto.

DEDICATORIA

A mi esposo:

Por su amor y por compartir una vida juntos.

A mis padres:

Por la confianza y la seguridad que me ha dado para salir adelante.

A mis hermanas:

Por su cariño y comprensión y porque siempre han estado a mi lado

A mis amigas y amigos por su apoyo y amistad.

ÍNDICE	3
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
El receptor de progesterona humano	9
Las isoformas A y B del receptor de progesterona y su papel en la farmacología	11
Progestinas sintéticas	14
El receptor de estrógenos	15
Los subtipos α y β del ER y sus ligandos selectivos	16
ANTECEDENTES	20
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVO GENERAL	26
Objetivos particulares	26
HIPÓTESIS	27
MATERIAL Y MÉTODOS	28
Reactivos	28
Plásmidos	28
Preparación de bacterias competentes	29
Transformación de bacterias competentes	29

Purificación y verificación de los plasmidos	30
Maxi preparación	30
Cultivo celular	31
Transfecciones y actividad de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT)	31
Estudios de unión al receptor	33
RESULTADOS	34
Efectos de la reducción del anillo A de la NET y el GSD en la activación de la CAT a través del PR	34
Transactivación selectiva de los subtipos del ER	38
Estudios de antagonismo para los compuestos derivados de la 19-nor testosterona	41
Estudios de unión al receptor de estrógenos	41
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	49
APÉNDICE	50
REFERENCIAS	55

ABREVIATURAS

AF	función de activación
CAT	enzima cloranfenicol acetil transferasa
DBD	dominio de unión al DNA
EC _{50%}	dosis efectiva al 50%
E ₂	estradiol
ER	receptor de estrógenos
ER α	receptor de estrógenos α
ER β	receptor de estrógenos β
ERE	elementos de respuesta a estradiol
GSD	gestodeno
HBD	dominio de unión a la hormona
HSP	proteínas de choque térmico
NET	noretisterona
NR	receptor nuclear
P ₄	progesterona
PR	receptor de progesterona
PR _A	receptor de progesterona A
PR _B	receptor de progesterona B
PRE	elementos de respuesta a progesterona

Estudios en este laboratorio han demostrado que la reducción enzimática del anillo A de los derivados sintéticos de la 19-nortestosterona se acompaña de la pérdida de la actividad progestacional y de la adquisición de propiedades estrogénicas. Con la finalidad de conocer si los cambios en la estructura química y biológica de estos esteroides modifican su actividad transcripcional, se estudió la habilidad de noretisterona (NET) y gestodeno (GSD), así como de sus metabolitos 5α -dihidro (5α NET/ 5α GSD) y $3\beta,5\alpha$ tetrahidro reducidos sobre la inducción de genes progesterona y estrógeno dependientes. El objetivo fue evaluar la actividad esteroideal de NET, GSD y sus correspondientes metabolitos reducidos en el anillo A a nivel transcripcional, a través del uso de sistemas de cotransfección con genes reporteros y vectores de expresión para cada receptor en particular. Para este propósito se utilizó un sistema de transcripción que consistió en la transfección transitoria de células HeLa con genes reporteros y vectores de expresión para los receptores de estrógenos (ER) α (ER α) y β (ER β) y de progesterona (PR) A (PRA) y B (PRB), respectivamente. El plásmido reportero contiene los elementos de respuesta a estradiol (ERE) o los elementos de respuesta a progesterona (PRE) con un promotor mínimo y las secuencias que codifican la expresión de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT). Los vectores de expresión para el ER α y el ER β , así como para el PRA y PRB fueron cotransfectados en células HeLa con el correspondiente plásmido reportero. La actividad transcripcional de cada compuesto se determinó, para cada uno de los receptores utilizados, a través de la incubación de concentraciones crecientes de los compuestos testigos con las células transfectada. La activación de la CAT se evaluó por la acetilación del cloranfenicol marcado radiactivamente con tritio. Los resultados demostraron que la estimulación de células HeLa cotransfectadas con el PR (A y B) y con el vector reportero que contiene los PRE con dosis crecientes de progesterona incrementan de manera dosis dependiente la actividad de la enzima CAT. La curva dosis-respuesta para los compuestos de la 19-nor testosterona, la NET, y el GSD, demostraron que estas progestinas sintéticas

exhiben actividad progestacional y que la reducción de la molécula en el anillo A de los compuestos reduce la activación de la transcripción. Por otra parte, la capacidad de estos compuestos de activar la CAT a través de un mecanismo de acción estrogénico dependió del grado de reducción del anillo A. Los compuestos tetrahidros reducidos $3\beta,5\alpha$ -NET y $3\beta,5\alpha$ -GSD mostraron la mayor capacidad para inducir la actividad de CAT pero únicamente a través del RE α . La ausencia de actividad a través del ER β se descartó por estudios de antagonismo utilizando concentraciones crecientes del competidor. Estos resultados permiten apoyar evidencias previas sobre la relación estructura función de la progestinas sintéticas y ofrece una explicación para las diferencias en la actividad biológica de estos compuestos. Por otra parte se describe por primera vez la identificación de compuestos agonistas específicos para el subtipo α del ER. Estos resultados permitirán el diseño de compuestos agonistas/antagonistas específicos de potencial uso terapéutico en el humano.

ABSTRACT

It has previously been demonstrated that 19-nor contraceptive progestins undergo in vivo and in vitro enzyme-mediated A-ring double bond hydrogenation. Bioconversion of 19-nor progestins to their corresponding tetrahydro derivatives results in the loss of progestational activity and acquisition of estrogenic activities and binding to the ER. Herein, we report subtype-selective differences in ligand binding and transcriptional potency of nonphenolic synthetic 19 nor derivatives between ER α and ER β . In this study, we have examined both ER- and PR-mediated transcriptional activity of a number of A-ring chemically reduced derivatives of norethisterone and gestodene. Double bond hydrogenation decreased the transcriptional potency of norethisterone and gestodene through both PR isoforms with a 100- to 1000- fold difference, respectively. In terms of the effects of norethisterone and gestodene and their corresponding 5 α -dihydro (5 α -norethisterone and 5 α -gestodene), or 3 α ,5 α -tetrahydro or 3 β ,5 α -tetrahydro derivatives (3 α ,5 α - norethisterone/3 α ,5 α - gestodene and 3 β ,5 α - norethisterone/3 β ,5 α - gestodene, respectively) on estrogen-mediated transcriptional regulation, the 3 β ,5 α -tetrahydro derivatives of both norethisterone and gestodene showed the highest induction when HeLa cells were transiently transfected with an expression vector for ER α . This activity could be inhibited with tamoxifen. These compounds did not activate gene transcription via ER β , and none of them showed antagonistic activities through either ER subtype. In summary, two ER α selective agonists have been identified. These compounds, with ER α vs. ER β selective agonist activity, may be useful in evaluating the distinct role of these receptors as well as in providing useful insights into ER action.

El receptor de progesterona humano

La progesterona (P_4) es una hormona esteroide importante en la regulación de los procesos implicados en el desarrollo y mantenimiento del sistema reproductivo (Clarke y Sutherland, 1990). El uso adecuado de antiprogestinas tales como el RU486 en el tratamiento de enfermedades como meningiomas del cerebro, endometriosis y fibrosis uterina ha implicado a la P_4 como la hormona reguladora de un amplio intervalo de procesos biológicos adicionales (Carroll et al., 1993), por lo cual es de esperar que exista un interés importante en definir el mecanismo molecular de la acción del receptor de progesterona (PR), así como el desarrollo de nuevos fármacos, con actividad tanto progestacional como antiprogestacional.

El PR es un factor de transcripción dependiente del ligando, el cual pertenece a la familia de receptores nucleares de factores de transcripción que incluyen receptores para hormona esteroideas, hormona tiroidea, vitamina D, y retinoides. Incluidos en esta familia se encuentran los receptores huérfanos, denominados así porque los ligandos aún no han sido identificados (Mangelsdorf y Evans, 1995). Todos los receptores esteroideos comparten una estructura básica similar compuesta de: 1) un dominio de unión al DNA altamente conservado (DBD), 2) un dominio de unión a la hormona (HBD) que es conservado entre los receptores esteroideos relacionados, tales como el PR, el receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor mineralocorticoides (MR), 3) una región de bisagra "hinge" localizada entre el DBD y el HBD, y 4) un dominio amino terminal (N-terminal), que es la región más variable entre los miembros de la familia (Gronemeyer, 1991; Kastner et al., 1995; Beato et al., 1995; Gronemeyer y Laudet, 1995) (Figura 1)

El mecanismo general de acción del PR es similar al de otros miembros de la familia de receptores esteroideos (Figura 2) (McDonnell, 1995). En ausencia del ligando, el receptor

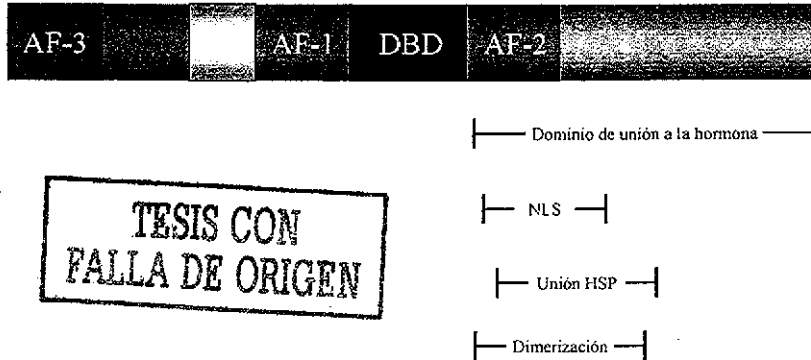


Figura 1. Receptor de progesterona. La estructura básica del receptor de progesterona es similar a la de otros receptores nucleares. El receptor de progesterona está compuesto de un dominio de unión al DNA altamente conservado (DBD), un dominio de unión a la hormona (HBD) conservado entre los receptores esteroideos relacionados, una región de bisagra "hinge" localizada entre el DBD y el HBD y un dominio N-terminal, que es la región más variable entre los miembros de la familia. Dentro del HBD hay regiones responsables para la dimerización del receptor, interacción con las proteínas de choque térmico (HSPs), localización nuclear, y activación dependiente del ligando (función de activación -2, AF-2) y dos funciones de activación adicional (AF-1 y AF-3) localizadas dentro del amino terminal (Giangrande y McDonnell 1999).

es transcripcionalmente inactivo y se encuentra en el núcleo de células blanco, unido a un complejo de proteínas de choque térmico (HSPs: HSP-90, HSP-70 y P59) (Beato et al., 1987; Pratt, 1990; Picard et al., 1990; Bagchi et al., 1991; Smith y Toft, 1993). Tras la unión al ligando, el receptor sufre un cambio en su conformación, que resulta en la disociación de un receptor monomérico del complejo de proteínas de choque térmico (Allan et al., 1992 a, b; McDonnell et al., 1995). Los receptores unidos al ligando después dimerizan e interactúan con los elementos de respuesta a progesterona (PREs) dentro de la región reguladora de genes blanco (Beato et al., 1987). Posterior a la unión con el DNA, el complejo esteroide receptor puede impactar positivamente o negativamente la transcripción del gen blanco, dependiendo del contexto celular o del promotor. Los análisis genéticos,

bioquímicos y farmacológicos de este último paso en la vía de transducción de señal del PR han revelado al menos dos mecanismos por los cuales se influye en los mecanismos de la transcripción a nivel del gen blanco. Específicamente, se ha determinado que el receptor, una vez activado por el ligando, puede interactuar de forma directa o indirectamente con componentes de la maquinaria de transcripción general (GTM) a través de proteínas co-activadoras o de proteínas adaptadoras (Klein-Hitpass et al., 1990; Ing et al., 1992; Halachmi et al., 1994; Oñate et al., 1995; Cavaillès et al., 1995; LeDourin et al., 1995; Hanstein et al., 1996; Voegel et al., 1996; Kamei et al., 1996) Estas diferentes vías de activación transcripcional no son mutuamente exclusivas y son diferencialmente utilizadas por el PR en distintas células, dando así, una explicación para las actividades célula-selectiva que son manifestadas por diferentes ligandos. Más importante aún es que puede ser posible desarrollar fármacos que funcionen como progestinas o antiprogestinas de manera tejido-selectiva. Además, de lo complejo de la vía de transducción de señal del PR, está el hecho de que existen dos isoformas, de este receptor, PR-A y PR-B (Lessey et al., 1983)

Las isoformas A y B del receptor de progesterona y su papel en la farmacología

El PR humano existe en dos isoformas: el hPR_B (114 kDa) y el hPR_A (94 kDa) (Lessey et al., 1983) (Figura 3). El hPR_A es una forma truncada del hPR_B, por no presentar los primeros 164 amino ácidos del N-terminal. Ambas isoformas han sido identificadas en varias especies, con excepción del conejo, donde sólo se ha detectado el hPR_B (Loosfelt et al., 1986). En los humanos, las dos isoformas son transcritos de dos promotores estrógeno-inducibles distintos por iniciación alternativa de la transcripción dentro de un gen del PR de copia simple (Kastner et al., 1990; Gronemeyer, 1991). Bajo algunas circunstancias el hPR_A y el hPR_B están presentes en células blanco en cantidades equimolares; sin embargo, se han observado diferencias en el nivel de expresión relativo de estas dos isoformas en algunos sistemas (Lessey et al., 1983). Específicamente en el útero la proporción hPR_A:hPR_B fluctúa de 50:1 a 2:1 durante el ciclo menstrual, debido principalmente al incremento en el nivel de expresión del hPR_B (Wiehle et al., 1995). En otros casos se han

informado bajas proporciones del hPR_B, sobre todo en tumores primarios de mama así como en cánceres endometriales (Graham et al., 1995, 1996; Kumar et al., 1998).

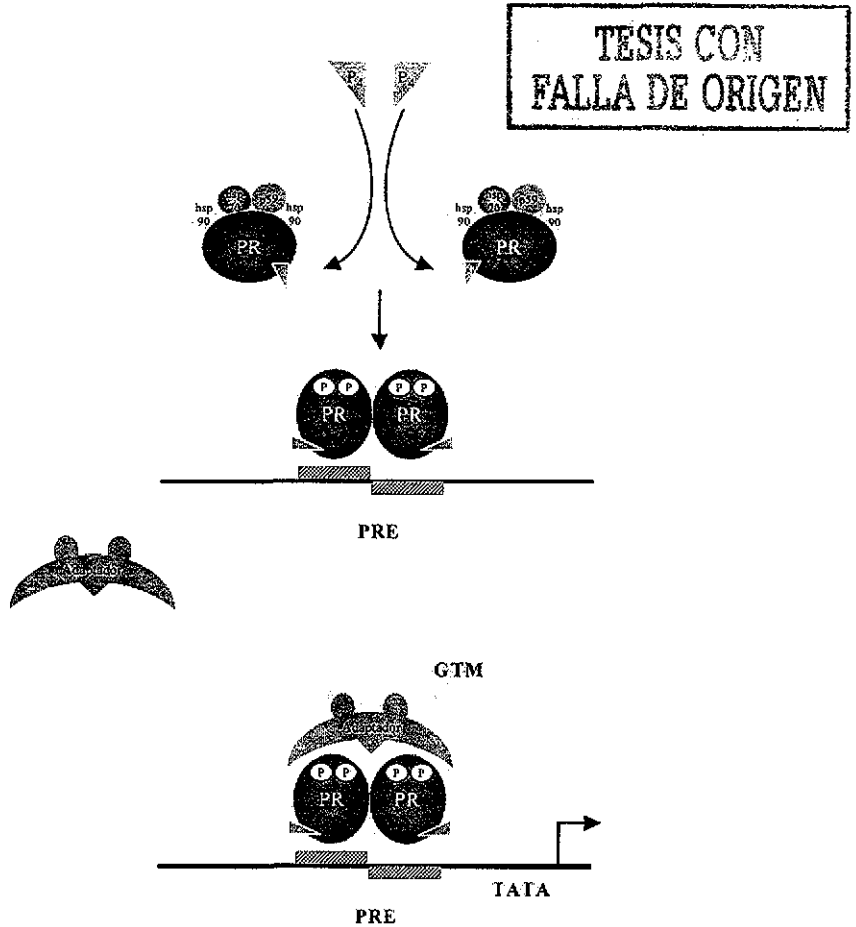


Figura 2. Mecanismo de acción del receptor de progesterona. Después de la unión del ligando, el PR sufre un cambio conformacional distinto, que es caracterizado por la fosforilación del receptor, desplazando las proteínas de choque térmico y la dimerización del receptor. Una vez en el núcleo, el receptor dimerizado interactúa con su respectivo elemento en el DNA, donde el estado de fosforilación del receptor está además aumentado. El dímero del receptor unido al DNA recluta las proteínas adaptadoras que unen al aparato general de transcripción (GTM). La interacción con el GTM resulta en mediar la modulación de la actividad de la RNA polimerasa (Giangrande y McDonnell 1999)

Como consecuencia de la presencia de dos formas del PR, es posible la existencia de tres estados distintos de hPR: monómeros A:A, heterodímeros A:B, y monómeros B:B (DeMarzo et al., 1991,1992). Dado que las isoformas A y B del hPR no son funcionalmente equivalentes, es probable que las tres formas diméricas del receptor activado no son funcionalmente idénticas. De esta manera, las diferencias en la expresión podrían influenciar la respuesta celular por progestinas y antiprogestinas.

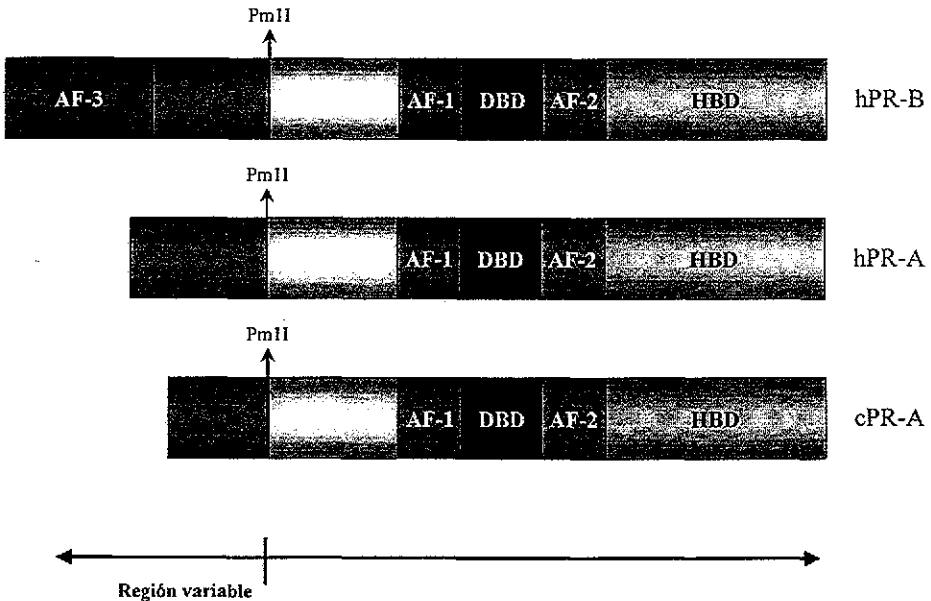


Figura 3. Secuencias similares entre las isoformas del PR. Las regiones de menos homología están localizadas hacia la región 5' del único sitio de restricción Pml I presente en ambos receptores (55% de similitud, 30% de identidad) Las regiones de alta homología se encuentran hacia la región 3' del sitio de restricción Pml I (90% de similitud, >72% de identidad). HPR-B, receptor de progesterona humano-B; hPR-A, receptor de progesterona humano-A; cPR-A, receptor de progesterona de pollo-A; HBD, dominio de unión a la hormona; AF-2, función de activación -2; DBD, dominio de unión al DNA; AF-1, función de activación -1; AF-3, función de activación -3 (Giangrande y McDonnell 1999).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Los trabajos iniciales realizados sobre las propiedades bioquímicas de las isoformas del PR humano indicaron que los dos receptores tienen afinidades similares de unión al ligando y al DNA (Christensen et al., 1991). Los estudios realizados utilizando sistemas de transcripción de respuesta a progesterona en varias células de mamíferos, reveló que el hPR_A y el hPR_B tienen diferente especificidad por el promotor (Vegeto et al., 1993). Además, las actividades transcripcionales de estas isoformas mostraron ser distintas, dependiendo del contexto celular o del promotor (Tung et al., 1993; Vegeto et al., 1993; Wen et al., 1994; Chalbous y Galtier, 1994; McDonnell et al., 1994). En algunos contextos examinados, el hPR_B funciona como un activador de genes reporteros conteniendo los clásicos PREs; sin embargo, el hPR_A fue inactivo transcripcionalmente (Tung et al., 1993; Vegeto et al., 1993). Los análisis realizados demostraron que, en ese contexto celular, donde el hPR_A no activa la transcripción, este receptor podría funcionar como un fuerte represor transdominante, dependiente del ligando, de la actividad del hPR_B (Vegeto et al., 1993).

Una de las características interesantes de la familia de receptores esteroidales es que, aunque cada uno es responsable para una vía reguladora y responde a hormonas estructuralmente distintas, existen varios puntos de convergencia e intercomunicación entre las vías de señalización. Específicamente, el hPR_A, además de modular la actividad transcripcional del hPR_B, también funciona como un factor represor transdominante de la actividad transcripcional de otros receptores esteroides humanos tales como el GR, el receptor de andrógenos (AR), el MR, y el ER. Esta observación no se ha identificado en otros miembros de la familia de receptores nucleares (Tung et al., 1993; McDonnell y Goldman, 1994; McDonnell et al., 1994; Wen et al., 1994; Kraus et al., 1995).

Progestinas sintéticas

Las progestinas sintéticas son esteroides que simulan los efectos de la P₄. Específicamente, las progestinas se definen como agentes que inducen cambios secretorios en el endometrio proliferativo y se pueden clasificar como naturales y sintéticos.

Las progestinas sintéticas pueden clasificarse de acuerdo con la molécula esteroide básica, las que derivan de la molécula del pregnano como la 17-hidroxiprogesterona y aquellas que se derivan del estrano y androstano como la 19-nortestosterona (McGynty y Djeressi 1958), dentro de este último grupo se encuentran la NET y el GSD. Las cuales son ampliamente utilizadas en la regulación de la fertilidad y en la terapia clínica, debido a sus propiedades biológicas (Hilliard et al., 1966). En 1938 se demostró que la manipulación de la molécula de testosterona modifica de forma radical su actividad; de androgénica a progestogénica. Sin embargo, en 1951 Djerassi y cols. sintetizaron el compuesto más importante de esta serie, la NET, y originaron el desarrollo de toda la generación de agentes progestacionales. En la década de los 70's, con el objetivo de disponer de anticonceptivos hormonales orales con una mayor selectividad progestacional, se desarrolló una serie de compuestos entre los que destacan el gestodeno (GSD), que junto con el desogestrel, el acetato de nomegestrol y el norgestimato constituyen la tercera generación de progestinas sintéticas (Wilde y Balfour, 1995). Las combinaciones de progestinas y estrógenos inhiben la secreción de gonadotropinas, lo cual previene la ovulación; alteran el moco cervical, las características del endometrio y la movilidad y secreción de las trompas disminuyendo la posibilidad de concepción e implantación.

El receptor de estrógenos

Los estrógenos juegan un papel crítico en el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de diversos tejidos. Ejercen sus efectos fisiológicos vía el receptor de estrógenos (ER), que funciona como un regulador transcripcional ligando activado. El ER pertenece a la familia de receptores nucleares (NRs) eucarionte de factores de transcripción (Tsai y O'Malley 1994). Ambos subtipos del ER (ER α y ER β) exhiben la organización característica de los dominios de los NRs que incluyen un dominio variable de transactivación N-terminal (AF1), un módulo de unión al DNA altamente conservado con dos dedos de zinc y un dominio de unión al ligando (HBD) C-terminal. El LBD es multifuncional y además tiene un sitio de reconocimiento al ligando conteniendo las regiones para la dimerización del receptor y transactivación dependiente del ligando (AF2). En la ausencia de la hormona, el

ER está unido a un complejo inactivo, reprimido por moléculas chaperonas. La unión de la hormona al HBD de los ERs incluye un cambio conformacional en el receptor que lo libera del complejo de proteínas de choque térmico, facilitando la homodimerización y subsecuentemente unión a secuencias de DNA específico localizado en las regiones reguladoras de los genes responsivos

Los subtipos α y β del ER y sus ligandos selectivos

Por largo tiempo se creyó que los efectos de los estrógenos eran mediados por un único ER, el cual fue clonado hace más de diez años (Green et al., 1986, Greene et al., 1986). Sin embargo, recientemente un segundo ER, denominado ER β , fue identificado y clonado a partir de la próstata de la rata (Kuiper et al., 1996). Este hallazgo fue seguido por la clonación de diferentes formas del ER β del testículo humano y del ovario del ratón (Mosselman et al., 1996, Enmark et al., 1997, Tremblay et al., 1997, Ogawa et al., 1998a). La presencia de dos ERs (el primero descrito originalmente se conoce como ER α) indicó que el mecanismo de acción biológica de los estrógenos y drogas sintéticas y naturales relacionadas era más complejo de lo que se había pensado. Más complejo aún fue: 1) La identificación de isoformas del ER β , uno con un N-terminal prolongado (Ogawa et al., 1998a) y otro con una inserción de 18 aminoácidos en el HBD (Chu and Fuller 1997, Petersen et al., 1998) y 2) la demostración de que el ER α y el ER β pueden formar heterodímeros (Ogawa et al., 1998 a y b)

El ER β es codificado por un gen diferente del que codifica al ER α , (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Katzenellenbogen y Korach 1997). Estos difieren principalmente en el dominio N-terminal A/B, teniendo sólo 18% aminoácidos de identidad. También son sustancialmente diferentes en el HBD mostrando sólo 56% de aminoácidos de identidad (Figura 4). Las grandes diferencias en los dominios AF-1 sugieren que la activación transcripcional de diferentes genes responsivos a estrógenos por los ERs α y β deben mostrar patrones diferentes, de tal forma que se aprecia que la activación del gen está influenciada por factores promotor y célula específicos (Katzenellenbogen et al., 1996;

Izukerman et al., 1994; Berry et al., 1990; Montano et al., 1995) y por interacción sinérgica entre los dominios de activación del receptor N-terminal y C-terminal (Kraus et al., 1995).

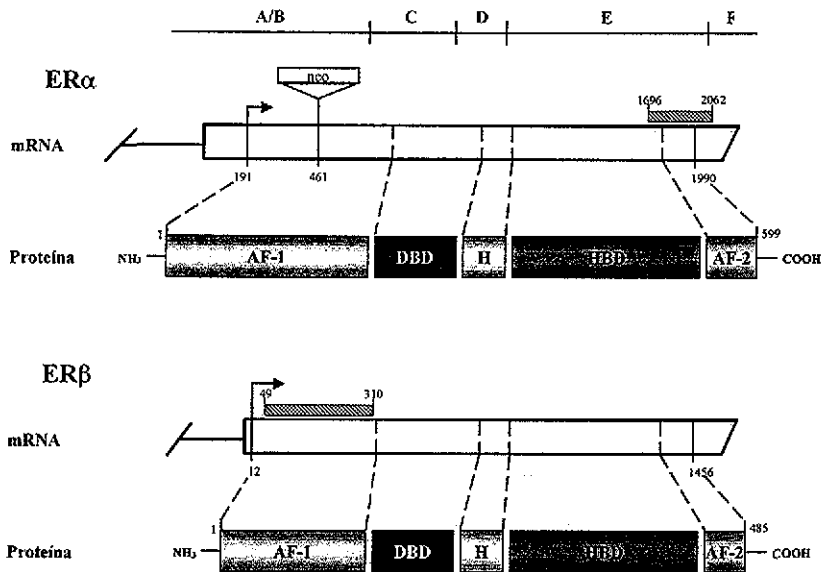


Figura 4. Esquema de los mRNAs y las proteínas que codifican para el $ER\alpha$ y el $ER\beta$. Se muestran las secuencias que codifican para los mRNAs de cada uno de los receptores de estrógenos así como las localizaciones aproximadas de aquellas secuencias que codifican los dominios modulares específicos de las proteínas del receptor. Se muestran los dominios estructurales de estos receptores (A/B,C,D,E y F), así como los dominios de unión a la hormona, unión al DNA y funciones de transactivación (AF-1, AF-2) (Couse et al., 1997).

Los estudios de los subtipos del $ER\alpha$ y $ER\beta$, así como de los plásmidos quiméricos preparados con ambos receptores para examinar las bioactividades de estos y su respuesta a ligandos estrogénicos y antiestrogénicos (McInerney et al., 1998), mostraron que la actividad transcripcional del $ER\beta$ es dependiente del contexto célula/promotor y de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

naturaleza del ligando. De manera interesante es el hecho de que, antiestrógenos tales como el tamoxifeno y 2-fenilbenzofuran, que muestran actividad con el ER α , no exhiben actividad agonista a través del ER β . El remplazo del dominio A/B del ER β (Figura 4) con el dominio A/B del ER α resultó en un receptor quimérico que mostró mejor respuesta transcripcional para los estrógenos e, interesante esta quimera ER α/β fue capaz de activar la transcripción bajo el tratamiento con estos antiestrógenos. Se observó efecto antiestrogénico con la quimera ER β/α conteniendo el dominio N-terminal A/B del ER β unido a los dominios C a F del ER α , pero fue restablecido en la quimera ER α/β conteniendo el dominio A/B del ER α , así que el efecto antiestrogénico se observó ser depender del dominio A/B (región que contiene la función de activación 1) del ER α . Estos resultados indicaron que las diferencias en las regiones N-terminal del ER α y el ER β contribuyen a las diferencias en la actividad transcripcional célula y promotor específico de estos receptores, y su habilidad para responder a diferentes ligandos, dando así lugar a un mecanismo para la regulación diferencial de la transcripción por estos dos ERs (McInerney et al., 1998).

Ya que el ER α y el ER β tiene secuencias primarias significativamente diferentes en sus HBD, es razonable que estos subtipos del ER unan a algunos ligandos con diferente afinidad y que estos ligandos tengan también diferentes caracteres de agonismo o antagonismo mediado por los dos receptores. Debido a que ambos receptores tienen coincidencias pero también diferencias en su distribución tisular (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Kuiper et al., 1997), así como diferencias en la interacción del ligando o actividad con los dos ERs esto podría traducirse en diferencias importantes en sus acciones biológicas a nivel del tejido.

Para identificar compuestos con actividad selectiva por los subtipos del ER, se examinaron algunos ligandos para el ER, de los que se identificaron varios ligandos no esteroideos que muestran diferencias pronunciadas subtipo-selectiva en la unión al ligando y en la potencia transcripcional o eficacia del ER α y el ER β . A este respecto, el compuesto pirazol mostró ser selectivo en activar la transcripción de genes reporteros a través de su interacción con el ER α . Este compuesto fue 120 veces más potente en estimular el ER α comparado con el

ER β . Por otra parte, otro compuesto no esteroidal denominado tetrahidrocriseno (THC), mostró ser agonista para el ER α y antagonista selectivo para ER β (Sun et al., 1999). Posteriores investigaciones han revelado que el carácter antagonista en los ligandos THC para el ER β depende de una vía progresiva en el tamaño y disposición geométrica de grupos sustituyentes (Meyers et al., 1999). Además, los antagonistas que son selectivamente efectivos en el ER β pueden tener estructuras que son muy diferentes de los antiestrógenos típicos (tamoxifeno, raloxifen, ICI 182780) que son antagonistas para ambos ER α y ER β . Otros compuestos que han sido identificados son incluso potencialmente más selectivos por el ER α que el pirazol, mientras otros son agonistas selectivos para el ER β .

Estudios preliminares han sugerido que las progestinas sintéticas ampliamente usadas para la regulación de la fertilidad, además de ser reconocida por el receptor de progesterona (PR), son también reconocidas por otros receptores esteroideos. Además, se ha informado que una variedad de efectos hormonales han sido observados posteriores a su administración en varias especies de mamíferos (Edgren et al , 1967)

Existen previas observaciones en que la noretisterona (NET), una progestina sintética, derivada de la 19-nortestosterona, suprime significativamente los niveles de la hormona luteinizante (LH) en suero de mujeres posmenopáusicas (Pérez-Palacios, Fernández-Aparicio et al., 1981, Pérez-Palacios et al., 1981) y de ratas hembras castradas (Larrea et al., 1983, Larrea et al., 1984). Al respecto, estos estudios demostraron que la liberación a través de un anillo vaginal, de progesterona en mujeres posmenopáusicas no afectó las concentraciones circulantes de gonadotropinas o modificó la respuesta de la LH hipofisaria a la administración de la neurohormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Sin embargo, la administración de la NET, demostró su potente actividad inhibitoria a nivel de las gonadotropinas circulantes en el suero, reduciendo también la concentración de la LH hipofisaria. Estos resultados indican, que la NET tiene un mecanismo de acción en el sistema neuroendocrino diferente al de la progesterona natural. El efecto inhibitorio de las gonadotropinas por NET, en este sistema, podría ser explicado por su potencia estrogénica de acuerdo con el concepto de que los estrógenos ejercen una gran variedad de efectos en el sistema nervioso central, incluyendo la regulación de las gonadotropinas. La NET también suprimió significativamente las concentraciones de LH en suero de pacientes castrados afectados con el síndrome de feminización testicular (resistencia a andrógenos); estos pacientes carecen del receptores de andrógenos y al ser castrados son deficientes en receptores para progesterona

Estudios posteriores en ratas hembras castradas, demostraron que la administración de NET induce la localización nuclear del receptor de estrógenos (ER) en el útero e hipófisis anterior, de manera dosis y tiempo dependiente. La máxima localización nuclear del ER en ratas castradas ocurrió entre 2-4 hrs. después de la inyección de NET, lo cual correlaciona con la supresión máxima de los niveles de la LH circulante. El tamoxifeno (un competidor por los sitios de unión del estrógeno con potencia antiestrogénica) anuló completamente en estos animales la potencia antigonadotrópica de la NET (Larrea et al., 1984, Larrea et al., 1987). Estos datos sugieren que las acciones inhibitorias de la NET sobre las concentraciones circulantes de las gonadotropinas fueron mediadas a través de un mecanismo de acción estrogénico.

En experimentos de unión *in vitro* se demostró que la NET no interactúa con el ER por lo cual se pensó que esta progestina fuera biotransformada a otros metabolitos con afinidad al ER. Subsecuentemente se mostró que la NET no sufre aromatización bajo condiciones *in vivo* o *in vitro*. Sin embargo, debido a que un número de derivados reducidos en el anillo A de NET han sido identificados en mujeres usando esta progestina como un agente anticonceptivo (Braselton et al., 1979), se sugirió que algunas formas derivadas de la NET, formadas dentro de tejidos blancos, pudieran ser responsables de los efectos estrogénicos observados (Figura 5).

Los análisis de desplazamiento del receptor utilizando la NET y sus derivados reducidos con el PR, el ER y el AR demostraron que la potencia competitiva de la NET y sus derivados para los sitios de unión del receptor citosólico difieren no sólo para cada receptor sino también para cada compuesto en particular. La NET fue el competidor más eficiente para el PR seguido por el 5 α -dihidro NET (5 α -NET). La reducción enzimática en el anillo A de la molécula de 5 α -NET a sus compuestos tetrahidroreducidos (3 α o 3 β), resultó en la pérdida completa de su afinidad por el PR. En contraste, 5 α -NET compite más eficientemente por el AR que la NET. El metabolito 3 β ,5 α - tetrahidro NET (3 β ,5 α -NET) fue el que mostró más alta afinidad por el ER seguido por su alcohol epimérico 3 α ,5 α . Sin embargo, NET y 5 α -NET no mostraron afinidad por el ER (Chávez et al., 1985) (Tabla 1).

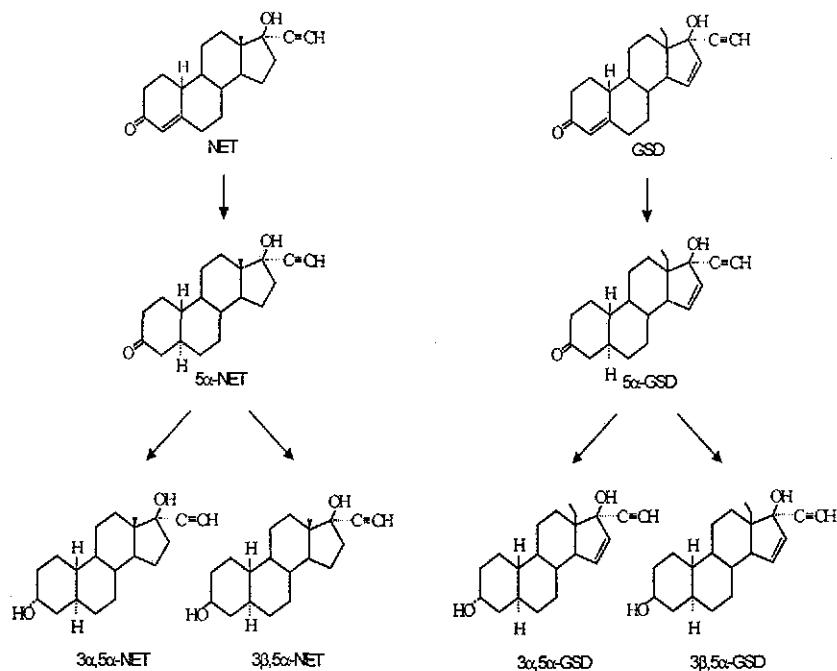


Figura 5. Estructura molecular de la NET, el GSD y sus metabolitos reducidos en el anillo A. Todos los compuestos son derivados de la 19-nor testosterona, los derivados 5- α dihidro y el 3 α ,5 α - y el 3 β ,5 α -tetrahidro de NET y GSD, respectivamente, fueron químicamente preparados por la doble hidrogenación del anillo A como se describe en la sección de material y métodos (Larrea et al., 2001)

Con la finalidad de evaluar si la interacción de los metabolitos de NET con el ER podrían iniciar la respuesta celular dependiente de estrógenos, se realizaron una serie de experimentos para determinar los efectos de los compuestos 3 β ,5 α -NET y 3 α ,5 α -NET en la inducción del PR dependiente de estrógenos y el crecimiento uterino en ratas adultas ovariectomizadas. Los estudios demostraron que el PR fue inducido de manera dosis dependiente por el 3 β ,5 α -NET en la hipófisis anterior de ratas hembras castradas. Además, la administración del 3 β ,5 α -NET resultó en un incremento significativo en el peso uterino a expensas del crecimiento del miometrio y endometrio de modo similar al observado en el

Tabla 1. Afinidades de uniones relativas de NET y sus derivados para diferentes receptores esteroideos. PR receptor de progesterona, AR receptor de andrógenos, ER receptor de estradiol, nd no determinado (Chávez et al., 1985).

	PR	AR	ER
NET	11.2	8.1	< 0.1
5 α -NET	4.8	14.8	< 0.1
3 α ,5 α -NET	< 0.1	< 0.1	< 0.1
3 β ,5 α -NET	< 0.1	< 0.1	6.3
ORG-2058	100	nd	nd
E ₂	nd	nd	100
R-1881	nd	100	nd

grupo tratado con estradiol. El derivado 3 α ,5 α -NET presentó baja potencia para inducir el crecimiento uterino, comparado con el 3 β ,5 α -NET, paralelo con su baja potencia para inducir el PR (Vilchis, et al., 1986). Las propiedades estrogénicas de los esteroides sintéticos 19-nor reducidos están de acuerdo con los estudios utilizando los esteroides de la serie C-19 en donde Thieulant et al., 1983 demostraron la translocación nuclear del ER citosólico en la hipófisis anterior de ratas macho por el compuesto 3 β ,5 α -androstane diol, así como la inducción del PR seguido de la administración de este metabolito reducido en el anillo A de testosterona.

Otros estudios demostraron que el tratamiento previo con tamoxifeno resultó en la disminución significativa de la potencia antigonadotrópica del 3 β ,5 α -NET pero no del 5 α -NET, cuyo efecto fue solamente inhibido por la administración de acetato de ciproterona. Estos resultados indican que las modificaciones estructurales de la molécula de la NET

modula sus interacciones con los receptores de esteroides. En efecto, la reducción del anillo A de la NET, y probablemente otros derivados de la 19-nortetosterona, afectan su unión y actividades biológicas *in vivo* mediado a través del PR e incrementan su potencia estrogénica y su afinidad por el ER. La administración de estos compuestos a ratas hembras castradas demostró que el 3 β ,5 α -NET y el 5 α -NET presentan mayor capacidad para inhibir la liberación de gonadotropinas en comparación con la NET (Larrea et al., 1987).

JUSTIFICACIÓN

La posibilidad de tener un ligando selectivo preferencial para el ER α , ayudará en la identificación de esterooides sintéticos o naturales con diferentes afinidades relativas para ambos subtipos del ER. Además, futuras investigaciones con estos ligandos agonistas solo para el ER α y no para el ER β , junto con estudios en animales knock out del ER α y/o ER β , serían muy útiles para definir los distintos papeles de estos dos receptores tienen en los efectos biológicos de los estrógenos en tejidos como glándula mamaria, el sistema vascular, el hueso, el cerebro, entre otras, tanto en hembras como en machos.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad estrógenica de NET y GSD y sus metabolitos reducidos en el anillo A a nivel transcripcional, mediada por los receptores α y β de estrógenos

Objetivos particulares

1. Determinar los efectos hormonales de diferentes progestinas sintéticas derivadas de la 19-nortestosterona, a través del ensayo de la actividad CAT, en células HeLa transfectadas con el PR_A o el PR_B.
2. Evaluar la actividad estrogénica de NET, GSD y sus correspondientes metabolitos dihidro y tetrahidro reducidos en células cotransfectadas con vectores de expresión para el ER α o el ER β y genes que contienen los elementos de respuesta para estradiol.
3. Evaluar el efecto antiestrogénico de los metabolitos reducidos de la 19-nortestosterona, a través del ensayo de la actividad CAT, en células transfectadas con el ER α o ER β .
4. Determinar la afinidad de unión a los ER α y β por NET, GSD y sus metabolitos reducidos en el anillo A.

HIPÓTESIS

Los efectos estrogénicos *in vivo* e *in vitro* de las progestinas derivadas de la 19-nor testosterona son debidos a la reducción del anillo A de su molécula originando metabolitos que interactúan selectivamente con receptores estrogénicos.

Reactivos

El estradiol no radiactivo: 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol fué de Sigma Chemical Co. (St Louis, Mo. [2,4,6,7-³H]Estradiol ([³H]E₂; actividad específica 72 Ci/mmol) y el ³[H]cloranfenicol (actividad específica 38.9 Ci/mmol) se compró de DuPont NEN Research products (Boston, MA). La radiactividad se determinó en un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman LS6500 (Beckman Instruments, CA). El medio de cultivo celular se compró de Life Technologies (Grand Island, NY). El suero bovino fetal (FBS) de Hyclone Laboratories, Inc. (Logan, UT). Todos los solventes y reactivos utilizados fueron de grado analítico. La NET (17 α -etnil-17 β -hidroxi-4-estren-3-ona) y el GSD (13 β -etil-17 α -etnil-17 β -hidroxi-4,15-gonadien-3-ona) fueron donados por Schering Mexicana, S.A. (Mexico City) y Schering AG (Berlin, Germany) respectivamente. La síntesis de los correspondientes 5 α -dihidro (5 α -NET y 5 α -GSD), y los tetrahidro derivados 3 α ,5 α - (3 α ,5 α -NET y 3 α ,5 α -GSD) y 3 β ,5 α - (3 β ,5 α -NET y 3 β ,5 α -GSD), incluyendo la descripción de sus correspondientes constantes físicas o químicas fueron descritas previamente (Vilchis et al., 1986, Lemus et al., 2000).

Plásmidos

El plásmido pLEN-hPR_A fue construido al insertar el DNA complementario (cDNA) de longitud completa del PR_A en el sitio de restricción BamHI del vector de expresión de mamífero pLEN (Friedman et al., 1989). El pLEN-hPR_B fue generado por insertar el cDNA de longitud completa del PR_B en el sitio Bam HI del vector pLEN. Los vectores de expresión para el ER α y el ER β humano (pCMV₅-hER α y pCMV₅-hER β) conteniendo la secuencia completa que codifica para el ER α y el ER β fueron donados por los doctores

B.S. Katzenellenbogen, Universidad de Illinois (Urbana, Illinois) y J-A. Gustafsson, Karolinska Institute, Huddinge, Suecia, respectivamente. El plásmido reportero de respuesta a estrógenos (ERE-Elb-CAT) contiene un fragmento del promotor del gen de la vitelogenina A2 (posición -331 a -87 en la posición 5' de la caja Eld TATA adenovirus fusionada al gen de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) (Smith et al., 1993). El plásmido PRE-Elb-CAT se utilizó como el gen reportero tanto para el PR_A y el PR_B (Tsai et al., 1989).

Preparación de bacterias competentes

Se inoculó una colonia única de bacterias de E. Coli de la cepa DH5 α en 10 ml de medio LB. Se dejaron crecer toda la noche a 37°C con agitación moderada, 200 revoluciones por minuto (rpm). Al día siguiente se inoculó 1 ml del cultivo en 100 ml de LB con suficiente aireación. Se incubaron a 37°C en agitación y cuando se encontraron a una densidad óptica (D.O)_{590nm} de 0.375 se tomó una alícuota del cultivo de 50 ml en un tubo estéril frío y se dejó en hielo de 5 a 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron las células a 3000 rpm por 7 minutos a 4°C, el precipitado se resuspendió suavemente en 10 ml de CaCl₂ frío. Las bacterias se centrifugaron 5 minutos a 2500 rpm a 4°C. El precipitado se resuspendió en 10 ml de CaCl₂ frío y se dejó en hielo durante una hora. Se alicuotó las bacterias y se congelaron inmediatamente a -70°C.

Transformación de bacterias competentes

Se adicionó 10 ng del DNA de interés a 100 μ l de bacterias competente, se mezcló suavemente y dejó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente las bacterias se incubaron a 42°C por 45 segundos e inmediatamente se pasaron a hielo por 5 minutos. Se adicionó 1 ml de medio LB y se agitó 1 hora a 37°C. Se sembraron 20 μ l del cultivo en cajas de LB-agar conteniendo antibiótico (50 μ l/ml de ampicilina) para seleccionar las bacterias transformadas e incubó 16 hrs. a 37°C. Se picó una colonia simple del plato que contiene el

DNA de interés y creció en 5 ml de medio LB con antibiótico a 37°C por 8 hrs. con agitación vigorosa (300 rpm). Se adicionó glicerol al 15%, se alicuotó las bacterias y se congelaron a -70°C.

Purificación y verificación de los plasmidos

La purificación y verificación de los DNAs se realizó usando QIAprep® Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Se inoculó 5µl de bacterias transformadas en 5 ml medio LB (50 µl/ml de ampicilina), se crecieron a 37°C durante 17 hrs. Se centrifugó a 13000 rpm y el precipitado bacterial se resuspendió en 250 µl de solución P1, se adicionó 250 µl de la solución P2, se invirtió el tubo de 4 a 6 veces. Se adicionó 350 µl de la solución N3 se mezcló por inversión del tubo de 4 a 6 veces. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se adicionó a la columna de QIAprep y se centrifugó 1 minuto. Se lavó la columna adicionando 500 µl de solución PB y se centrifugó 1 minuto. Se lavó la columna con 750 µl de la solución PE y centrifugó 1 minuto. Se recuperó el DNA por centrifugar nuevamente la columna. El DNA se resuspendió en agua y se determinó su concentración por espectrofotometría de luz UV. Se analizó la pureza e integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% en una solución de corrida TBE 1 X

Maxi preparación

La purificación y extracción de los DNAs se realizó usando QIAfilter® Plasmid Maxi (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Se inocularon 250 µl de bacterias conteniendo el DNA de interés en 250 ml de medio LB (50 µl/ml de ampicilina). Se crecieron a 37°C durante 16 hrs. con agitación vigorosa (300 rpm). Se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C y el precipitado se resuspendió en 10 ml de la solución P1. Se adicionó 10 ml de la solución P2, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionó 10 ml de la solución P3 y se mezcló. El lisado se

adicionó a la columna QIAfilter cartridge e incubó a temperatura ambiente 10 minutos. Se insertó el embolo en la columna QIAfilter cartridge y el lisado se pasó a la columna QIAGEN tip Maxi previamente equilibrado con 10 ml de la solución QBT. Se permitió que el lisado pasará por la columna por gravedad. Se lavó dos veces la QIAGEN tip con 30 ml de la solución QC y se eluyó el DNA con 15 ml de la solución QF. El DNA se precipitó con 10.5 ml de isopropanol, se centrifugó a 11000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El precipitado se lavó con 5 ml de etanol al 70 % y se centrifugó a 11000 rpm 10 minutos. El DNA se resuspendió en agua y se determinó su concentración por espectrofotometría de luz UV. Se analizó la pureza e integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% en una solución de corrida TBE 1 X.

Cultivo celular

Las células HeLa (línea epitelial de carcinoma de cerviz humano) fueron mantenidas en cultivo a 37°C en una atmósfera de humedad y 5% de CO₂ en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con rojo de fenol alto en glucosa (Gibco BRL, life technologies) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS); 100 µ/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Las células fueron pasadas tres veces por semana usando tripsina-EDTA (0.25%).

Transfecciones y actividad de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT)

Las células Hela fueron sembradas un día antes de la transfección, a una densidad de 2.75 X 10⁵ células por pozo, en medio Dulbecco's Modified Eagle's sin rojo de fenol alto en glucosa (DMEM-HG), el cual fue complementado con 5% FBS libre de hormonas esteroides y 100 µ/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin e incubado en 5% de CO₂ a 37°C. Al día siguiente, las células HeLa se observaron en un microscopio para verificar la confluencia celular (30% al 50%) Las transfecciones se realizaron por triplicado usando SuperFectTM (QIAGEN Inc., Valencia, CA) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Se adicionó el DNA (1µg del plásmido reportero y 0.025-0.5 µg

del vector de expresión del receptor esteroide correspondiente) a medio libre de suero (0.1 ml), se mezcló y adicionó 10 μ l del reactivo SuperFect™ y se agitó durante 10 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y 0.6 ml de DMEM-HG fué adicionado a cada muestra. El medio conteniendo el complejo de transfección se adicionó a las células en monocapa, las cuales fueron previamente lavadas con PBS. Las placas se incubaron por 3 h a 37°C en 5% de CO₂. Después de la incubación, las placas conteniendo el complejo de transfección se lavaron con PBS y 3 ml de DMEM-HG se adicionó a cada pozo. Veinticuatro horas después, el medio se reemplazó con medio conteniendo los compuestos de interés en varias concentraciones (10^{-12} M a 10^{-6} M). Se utilizó Dimetil sulfoxido (DMSO) o etanol (ETOH) como vehículo. Al día siguiente del estímulo se prepararon los extractos celulares. Brevemente, el medio se aspiró de cada pozo y los platos se lavaron con 2 ml de PBS, se aspiró el medio y se adicionó 1 ml de TEN frío a cada pozo, se removieron las células de las cajas y el contenido de cada pozo se transfirió a un tubo de 1.5 ml. Los tubos se centrifugaron a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C. Se descarto el sobrenadante y adicionó 80 μ l de Tris-HCl 0.25 Mm, pH 8.0, las muestras se mantuvieron en hielo durante el proceso. Se realizaron tres ciclos de congelación (utilizando nitrógeno líquido) y descongelación (37°C). Posteriormente se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford utilizando el reactivo de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad). La actividad de la CAT se evaluó utilizando 5 μ g de proteína, 25 μ g de butiril coenzima A (Sigma Chemical Co. MO), y [³H] cloranfenicol (0.01 μ ci/ μ l) (Du Pont), se mezcló e incubó a 37°C por una hora. La reacción se terminó por adicionar 200 μ l de 2:1 TMPD/Xylenes; se mezcló durante 2 minutos y centrifugó a 13200 rpm 3 minutos. Se transfirió 120 μ l de la fase de arriba a un vial de centelleo. Se adicionó 2 ml de solución de centelleo (Scintisafe Econo 1, Fisher scientific). La radiactividad se determinó en un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman LS6500 (Beckman Instruments, CA) (Cooney et al., 1992, Cooney et al., 1993, Seed and Sheen 1988). Los experimentos se realizaron tres veces y cada uno por triplicado. La significancias estadísticas para este estudio se obtuvieron a través de la prueba de T de students donde la P fué menor a 0.05 comparada con el vehículo.

Estudios de unión al receptor

La afinidad relativa de unión al receptor se determinó de acuerdo al método descrito por Smith y Kreutner (Smith and Kreutner 1998). La transferencia de DNA mediado por adenovirus (Smith and Kreutner 1998, Allgood et al., 1997) fue utilizada para transfectar las células COS-1 con 3 μg del vector de expresión del receptor de estrógenos (pCMV₅-hER α o pCMV₅-hER β). Veinticuatro horas después, las células se cosecharon y el extracto total se preparó en TESH. El extracto celular se incubó con 1 pmol de [³H]E₂ y concentraciones crecientes de E₂ no marcado (0.005 a 5000 pmol) o los compuestos sintéticos, por tres horas a 4°C. El esteroide libre se separó del esteroide unido al receptor por absorción en un gel de hidroxiapatita Bio-Gel HTP (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA). La cantidad de [³H]E₂ unido al ER se cuantificó por conteo de la radiactividad.

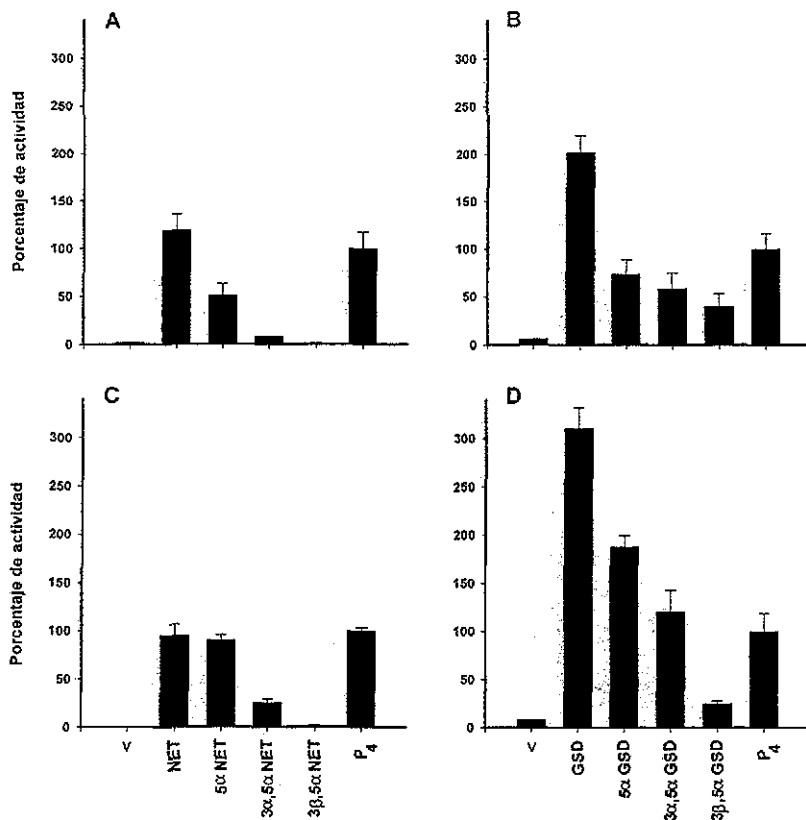
Para la composición de las soluciones consultar apéndice.

Efectos de la reducción del anillo A de la NET y el GSD en la activación de la CAT a través del PR

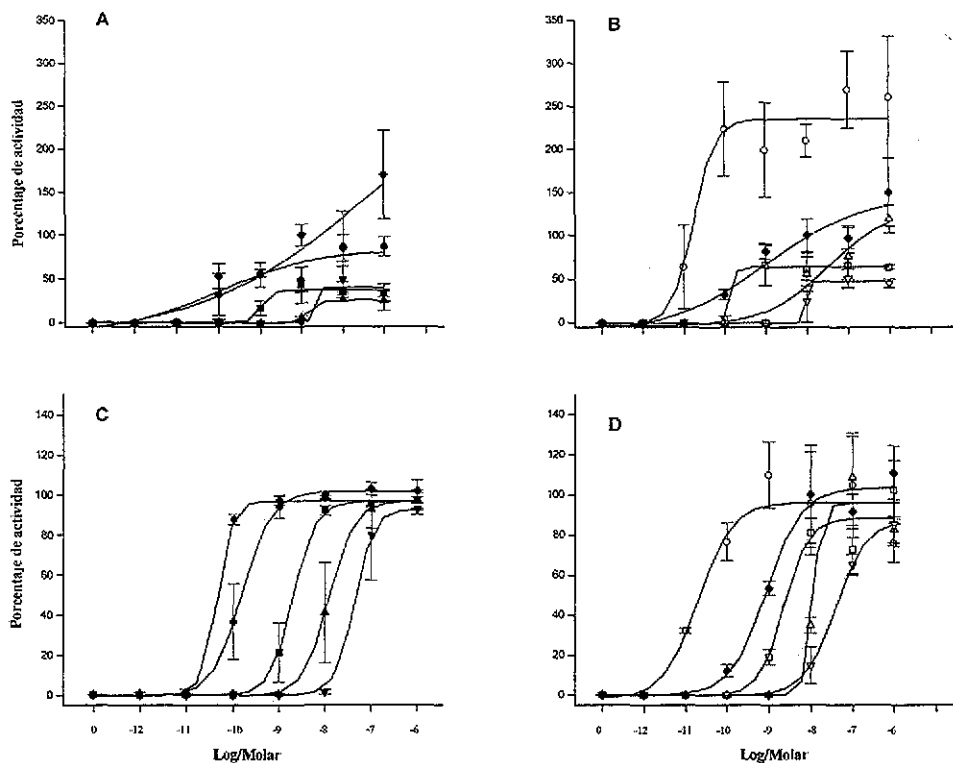
En la gráfica 1 se muestran los efectos de NET y GSD y sus correspondientes derivados reducidos en el anillo A sobre la actividad transcripcional mediada por el PR en células HeLa transfectadas con los vectores de expresión para el PR_A o el PR_B, respectivamente. Las células fueron cotransfectadas con el plásmido de expresión para el PR_A (A y B) o PR_B (C y D) junto con el gen reportero de respuesta a progesterona y tratadas a una concentración de 10^{-8} M de cada esteroide, incluyendo P₄. Como se muestra en la gráfica 1, tanto NET como GSD se comportan como agonistas para el PR. La actividad transcripcional de GSD es mayor a través del PR_A y el PR_B cuando se compara con NET o P₄.

Como se esperaba por informes previos de afinidad de unión relativa para el PR (Chávez et al., 1985), la reducción de la molécula resultó en la pérdida significativa de la potencia transcripcional de NET y GSD (Gráfica 1A,C, y 1B,D respectivamente). Los compuestos 5 α -NET y 5 α -GSD activaron la transcripción de la enzima CAT con menor potencia que sus compuestos originales, más aún, los derivados tetrahidro 3 α ,5 α - y el 3 β ,5 α - de NET y GSD ocasionan menor transactivación de los PRs comparada con los otros compuestos.

Los datos obtenidos de los experimentos curva dosis-respuesta (1×10^{-12} a 1×10^{-6}), gráfica 2, demostraron que el compuesto 3 α ,5 α - y el 3 β ,5 α -tetrahidro derivados de NET tienen aproximadamente de 500 a 1000 veces menor potencia transcripcional, como se juzga por sus respectivos valores de EC₅₀ obtenidos (tabla 2), cuando se comparó con los obtenidos de sus correspondientes compuestos no reducidos. Datos similares fueron obtenidos para los metabolitos reducidos de GSD (tabla 3).



Gráfica 1. Activación del PR_A (A y B) y PR_B (C y D) por NET, GSD y sus metabolitos reducidos. Las células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con el correspondiente vector de expresión del PR y el vector reportero PRE-E1b-CAT. Las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de 10^{-8} M de progesterona (P_4), NET, GSD o sus correspondientes dihidro y tetrahidro derivados. Después de 24 hrs. las células fueron cosechadas y se evaluó la actividad CAT como se describe en la sección de material y métodos. Los valores son la media \pm la desviación estándar (SD) de un experimento representativo realizado por triplicado. Los datos son normalizados con la actividad de P_4 que es establecido como el 100 %



Gráfica 2. Activación dosis dependiente del PR_A (A y B) y el PR_B (C y D) por NET (●), GSD (○) y sus metabolitos dihidro 5αNET (■), 5αGSD (□), y tetrahidro 3α,5αNET(▲), 3β,5αNET(▼), 3α,5αGSD(Δ), 3β,5αGSD(▽) reducidos. Las células HeLa fueron cotransfectadas transitoriamente con los vectores de expresión para el PR_A o el PR_B y el gen reportero PRE-elb-CAT y estimuladas con dosis crecientes (10⁻¹² - 10⁻⁶) de cada compuesto, utilizando P₄ (◆) como control. Los valores son la media de un experimento representativo realizado por triplicado ± SD.

Tabla 2. Dosis efectiva ($EC_{50\%}$) de NET y sus metabolitos para la activación de la transcripción a través del PR_A y PR_B .

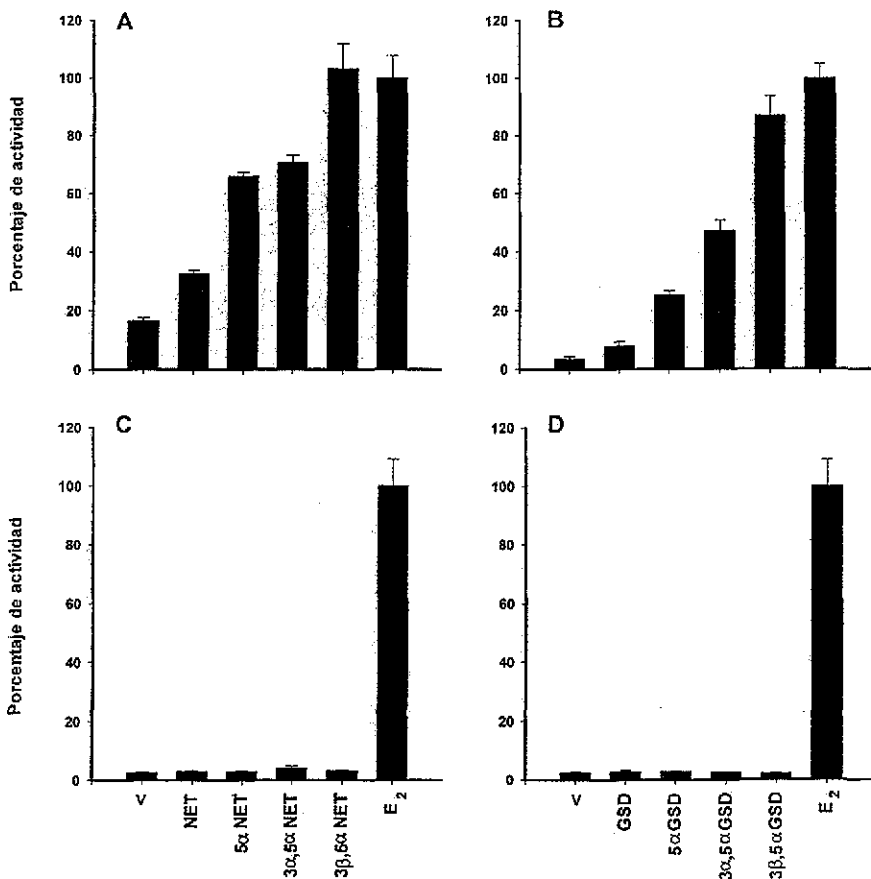
	PR_A	PR_B
P_4	$2.90 \times 10^{-8} \text{ M}$	$8.76 \times 10^{-10} \text{ M}$
NET	$9.10 \times 10^{-11} \text{ M}$	$8.16 \times 10^{-11} \text{ M}$
5α -NET	$1.26 \times 10^{-9} \text{ M}$	$1.80 \times 10^{-8} \text{ M}$
$3\alpha,5\alpha$ -NET	$4.62 \times 10^{-8} \text{ M}$	$2.56 \times 10^{-8} \text{ M}$
$3\beta,5\alpha$ -NET	$6.75 \times 10^{-8} \text{ M}$	$7.91 \times 10^{-8} \text{ M}$

Tabla 3. Dosis efectiva ($EC_{50\%}$) de GSD y sus metabolitos para la activación de la transcripción a través del PR_A y PR_B .

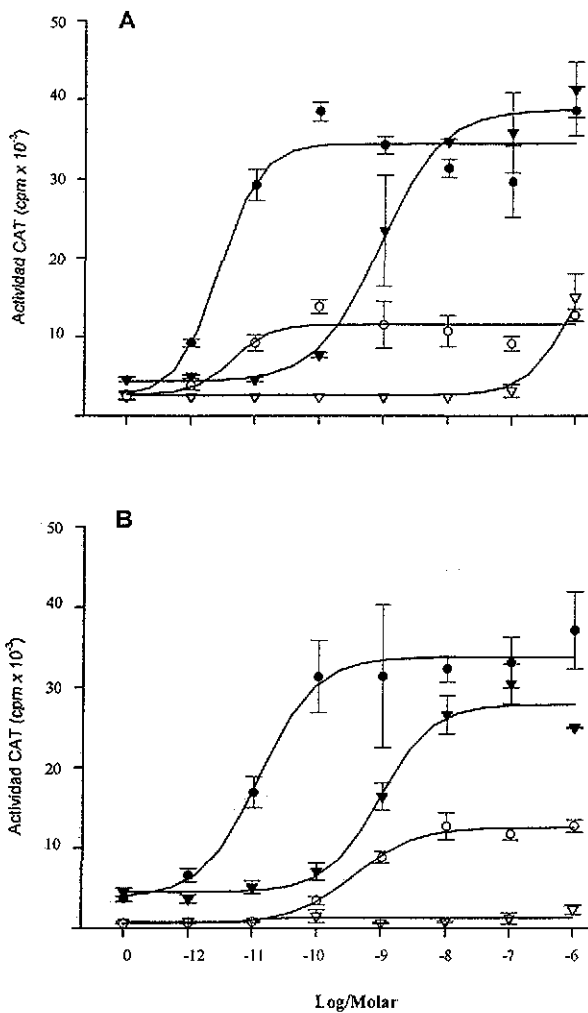
	PR_A	PR_B
P_4	$2.90 \times 10^{-8} \text{ M}$	$8.76 \times 10^{-10} \text{ M}$
GSD	$1.36 \times 10^{-11} \text{ M}$	$1.83 \times 10^{-11} \text{ M}$
5α -GSD	$3.75 \times 10^{-10} \text{ M}$	$2.29 \times 10^{-9} \text{ M}$
$5\alpha3\alpha$ -GSD	$1.06 \times 10^{-8} \text{ M}$	$1.28 \times 10^{-8} \text{ M}$
$5\alpha3\alpha$ -GSD	$1.01 \times 10^{-8} \text{ M}$	$3.90 \times 10^{-8} \text{ M}$

Transactivación selectiva de los subtipos del ER

Dado los efectos *in vivo* e *in vitro* de los derivados reducidos en el anillo A no fenólico de NET y GSD (Larrea et al., 1987, Lemus et al., 2000, Larrea et al., 1984), se examinaron las actividades, por separado, de los metabolitos sintéticos reducidos en el anillo A a través del ER α y el ER β . En estos estudios, los efectos de GSD, NET y sus correspondientes dihidro y tetrahidro derivados en la transcripción del gen reportero mediado por el receptor fueron comparados con E₂. Como se muestra en la gráfica 3, de los ocho esteroides sintéticos probados, tanto el 3 β ,5 α -NET como el 3 β ,5 α -GSD mostraron alta inducción de la transcripción del gen reportero cuando las células HeLa fueron transfectadas transitoriamente con el ER α , (Gráfica 3A y 3B) Los compuestos 5 α -dihidro y 3 α ,5 α -tetrahidro derivados de NET y GSD, presentaron potencias significativamente menores que los compuestos 3 β ,5 α -NET y 3 β ,5 α -GSD. Así que la reducción del anillo A de las moléculas de NET y GSD resultó en un incremento de la actividad transcripcional mediada por el ER α . La incubación con 10⁻⁸ M de estos compuestos no mostró estimulación de la transcripción de la enzima CAT en células HeLa transfectadas con el ER β (Gráfica 3C y 3D). De manera interesante los dos compuestos 3 β ,5 α -NET y 3 β ,5 α -GSD a una concentración de 10⁻⁸ M que presentaron una potencia transcripcional similar a la del E₂ en células transfectadas con el ER α (Figura A y B), no exhibieron actividad transcripcional estadísticamente significativa comparada con una dosis similar a través del ER β . Así que interesados en el efecto agonista selectivo de los compuestos tetrahidro reducido de NET y GSD, (Gráfica 4) se evaluó su comportamiento, con dosis crecientes (10⁻⁶M - 10⁻¹²M), sobre la transcripción del gen reportero a través del ER α o el ER β . Como se muestra en la gráfica 4A, 3 β ,5 α -NET resultó en la transactivación selectiva del ER con una EC₅₀ de 8.4 X 10⁻¹⁰ M \pm 0.27 X10⁻¹⁰ M. Estos valores fueron 100 veces menores, en orden de magnitud, que los obtenidos con E₂ (EC₅₀ de 3.32 X 10⁻¹² M \pm 0.48 X10⁻¹² M). Como también puede observarse en la gráfica 4A, el 3 β ,5 α -NET, a una dosis de 10⁻¹² M a 10⁻⁷ M, no fue capaz de estimular la transcripción del gen reportero mediado por ER β . Sólo a concentraciones altas de estos compuestos (10⁻⁶ M) el ER β fue capaz de estimular la actividad CAT (EC₅₀ de 7.2 X 10⁻⁷ M \pm 0.1 X10⁻⁷ M). Resultados similares se obtuvieron en la activación



Gráfica 3. Efectos de NET, GSD y sus derivados dihidro y tetrahydro en el ER α (A y B) y el ER β (C y D) mediante la actividad reportera del ERE-E1b-CAT. Las células fueron cultivadas en ausencia (V) o presencia de 10^{-3} M de los correspondientes esteroides sintéticos y naturales. Los valores son la media de la \pm SD de un experimento representativo realizado por triplicado. Los datos son normalizados con la actividad de E $_2$ que es establecido como el 100 %



Gráfica 4. Activación dosis dependiente del ERα (símbolos cerrados) pero no del ERβ (símbolos abiertos) por el 3β,5α-NET (A) y el 3β,5α-GSD (B). Las células HeLa fueron cotransfectadas transitoriamente con los vectores de expresión para el ERα o ERβ y el gen reportero ERE-E1b-CAT y estimuladas en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de E₂ (10⁻¹²-10⁻⁶ M) (círculos) o los derivados 3β,5α de NET y GSD (triángulos). Los valores son la media de ± SD de un experimento representativo realizado por triplicado.

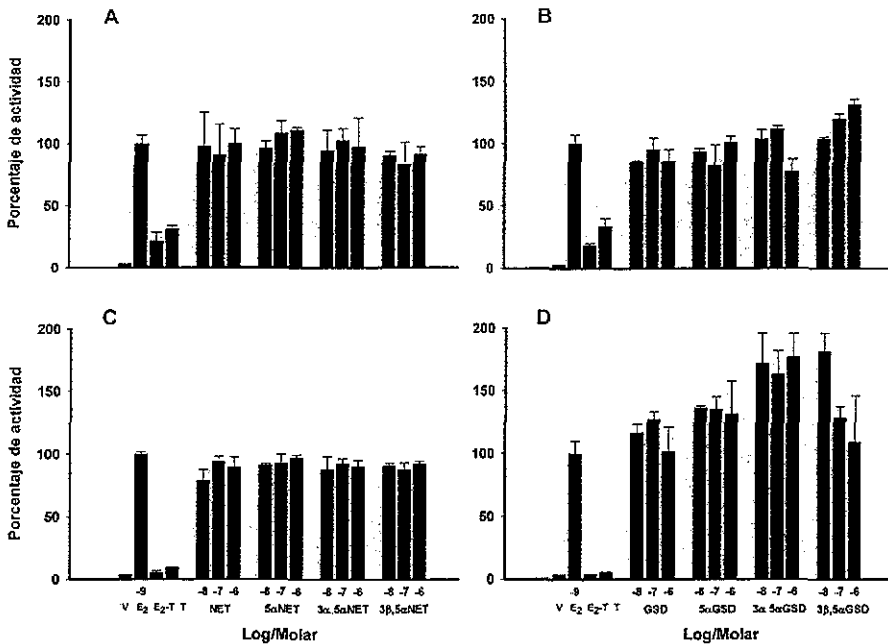
Transcripcional a través del ER α y ER β con dosis crecientes de 3 β ,5 α -GSD (Gráfica 4B). Sin embargo, el compuesto tetrahidro reducido de GSD no activo la transcripción a través del ER β a una dosis alta de 1 X 10⁻⁶ M

Estudios de antagonismo para los compuestos derivados de la 19-nor testosterona

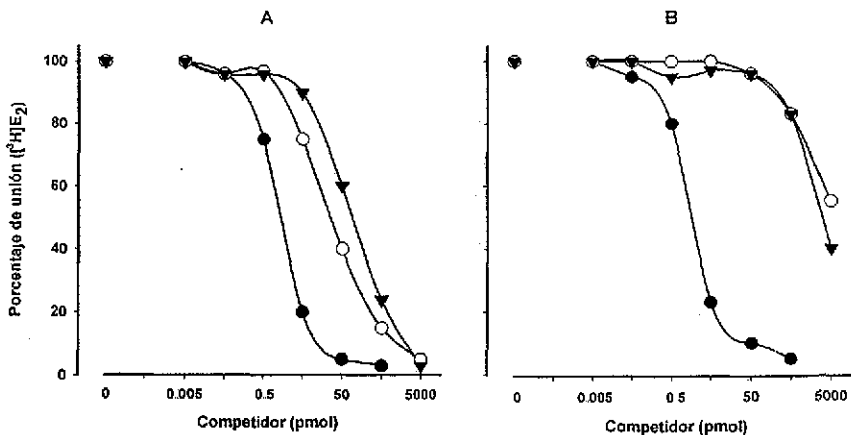
Estudios previos (Sun et al., 1999, Gaido et al., 1999), demostraron que algunos ligandos selectivos para el ER α mostraron ser potentes antagonistas para el ER β , así que con el fin de investigar si estos compuestos actúan como antagonistas particularmente a través del ER β , las células HeLa se cotransfectaron con los vectores de expresión para el ER α o el ER β junto con el gen reportero. Para esto se utilizó E₂ (1 X 10⁻⁹ M) en presencia o ausencia de concentraciones crecientes (10⁻⁸ M a 10⁻⁶ M) de NET o GSD y sus correspondientes derivados reducidos en el anillo A, o el antiestrógeno 4-hidroxitamoxifeno (T) (10⁻⁷ M). Como se muestra en la figura 5, con la excepción de 4-hidroxitamoxifeno ninguno de los derivados de NET (panel C) o GSD (panel D), a varias concentraciones (10⁻⁸ M a 10⁻⁶ M), inhibieron significativamente la activación del gen reportero inducido por el ER β . Resultados similares se obtuvieron con el ER α (panel A y panel B).

Estudios de unión al receptor de estrógenos

Las afinidades de unión relativa (ARB) de los tetrahidro derivados 3 β ,5 α - de NET y GSD, respectivamente, se determinaron en extractos de células COS-1 transfectadas con el vector de expresión para el ER α o el ER β . Como se observa en la figura 6, ambos compuestos mostraron la habilidad de desplazar el [³H]E₂ unido al ER α (panel A) con una ARB de 1.18 y 5.23 para el 3 β ,5 α -NET y 3 β ,5 α -GSD, respectivamente. En contraste, estos compuestos se comportaron como competidores débiles para los sitios de unión del ER β (panel B), como se juzga por sus correspondientes ARB (0.00418 y 0.039 para 3 β ,5 α -NET y 3 β ,5 α -GSD, respectivamente).



Gráfica 5. Los compuestos GSD, NET y sus dihidro y terahidro derivados no antagonizan la transactivación del ER α o el ER β . Las células HeLa fueron cotransfectadas transitoriamente con el vector de expresión para el ER α (A y B) o el ER β (C y D) y el gen reportero ERE-Elb-CAT. Las células transfectadas se incubaron con 1nM de E₂ en presencia o ausencia de 10⁻⁷ M de 4-hidroxitamoxifeno (T) o varias concentraciones (10⁻⁸ a 10⁻⁶ M) de NET o GSD y sus correspondientes sintéticos derivados reducidos. Las incubaciones control se llevaron a cabo en presencia sólo del vehículo (DMSO y etanol, o etanol más T). Los valores son la media de \pm SD de un experimento representativo realizado por triplicado. Los datos son normalizados con la actividad de E₂ que es establecido como el 100 %.



Gráfica 6. Afinidad de unión relativa de E2 (●), 3β,5α-NET (▼) y 3β,5α-GSD (O) para el ERα (panel A) y ERβ (panel B). Los extractos de células COS-1 fueron transfectadas con los vectores de expresión para el ERα o el ERβ, las células fueron incubadas en presencia de 1 pmol de $[^3H]E_2$ y concentraciones crecientes (0.005 a 5000 pmol) de cada uno de los competidores no marcados. Los valores son la media de un experimento representativo realizado por duplicado.

El ER es un miembro de la familia de receptores nucleares y funciona como un factor de transcripción dependiente de la hormona (Evans, 1988). La transactivación por el ER es mediada por dos funciones de activación (AF): AF-1 localizado en el dominio N-terminal y AF2 localizado en el dominio de unión al ligando (Tora et al., 1989). Recientemente un nuevo subtipo del ER fue identificado y es preferentemente expresado en próstata y ovario de rata y humano (Kuiper et al., 1996). Este receptor fue denominado el ER β para distinguirse del clásico ER (ER α). Aunque la importancia biológica de la existencia de dos subtipos del ER aún no es clara, la homología relativa (60%) entre sus respectivos dominios de unión al ligando (Kuiper et al., 1998) aumenta la posibilidad de la existencia de ligandos naturales o sintéticos con características de unión específica para ambos subtipos del ER. Así, la expresión diferencial de compuestos con actividad estrógena dependerá de los subtipos del ER y proveerá de una explicación para las acciones pleiotrópicas de los estrógenos en los tejidos blanco (Kuiper et al., 1997, Couse et al., 1997).

Nuestro grupo ha demostrado que los derivados sintéticos de la 19-nor testosterona son biotransformados en otros metabolitos que exhiben diferentes propiedades a las de la hormona original en los tejidos blanco (Stillwell et al., 1972, Braselton et al., 1979, Larrea et al., 1987, Lemus et al., 1992). La reducción en el anillo A de los derivados de la 19-nor testosterona como la noretisterona (NET) y el gestodeno (GSD) a sus correspondientes 5 α -dihidro y 3 β ,5 α -tetrahidro derivados disminuye significativamente su actividad progestacional. Mientras el metabolito dihidro-reducido se une principalmente al PR, el metabolito tetrahidro-reducido pierde su actividad progestacional y muestra actividad de unión significativa por el ER y sus efectos estrogénicos *in vivo* (Larrea et al., 1987, Lemus et al., 1992, Pérez-Palacios et al., 1992, Vilchis et al., 1986, Lemus et al., 2000). Estas observaciones apoyan la idea de que un esteroide puede inducir efectos selectivos agonista o antagonistas de su metabolismo en órganos y tejidos blancos, así como de la

disponibilidad de los receptores esteroides y de la presencia de promotores responsivos a esteroides y cofactores

Los resultados del presente estudio apoyan observaciones previas, demostrando que la doble reducción enzimática de los derivados de la 19-nor testosterona, para la formación de metabolitos reducidos en el anillo A, determinan sus actividades biológicas por medio de la interacción diferencial con otros receptores esteroides diferentes al de P₄ (Larrea et al., 1987, Lemus et al., 1992, Pérez-Palacios et al., 1992, Lemus et al., 2000, Larrea et al., 1984). En efecto, las propiedades estrogénicas intrínsecas de NET y GSD, dos derivados de la 19-nor testosterona, son probablemente debidas a su biotransformación a derivados 3β,5α-tetrahidro reducidos (Larrea et al., 1987). Además, este estudio demuestra claramente la activación específica de la transcripción a través del ERα por dos compuestos derivados de la NET y el GSD 3β,5α-NET y 3β,5α-GSD, respectivamente. Estos resultados son de importancia para la caracterización de sus efectos biológicos de los estrógenos mediados de subclases a través del ER.

Los resultados obtenidos de la afinidad relativa de estos compuestos por el ERα fueron muy similares a los informados previamente utilizando citosol de útero de rata (Chávez et al., 1985). Estas observaciones, junto con otros estudios de los efectos de la NET y 3β,5α-NET sobre la liberación de la LH hipofisiaria, incluyendo sus efectos estrogénicos en el endometrio de ratas hembras castradas (Larrea et al., 1987, Larrea et al., 1984), confirman la activación de la transcripción y la unión selectiva del 3β,5α-NET al ERα y están de acuerdo con la distribución relativa del ARNm de este receptor en diferentes tejidos de la rata y el ratón (Kuiper et al., 1997, Couse et al., 1997, Shughrue et al., 1996, Shughrue et al., 1997). El ARNm del ERα se expresa principalmente en la hipófisis, útero, testículo, epididimo y riñón, así que la respuesta estrogénica del 3β,5α-NET podría esperarse en estos tejidos. Aunque estos hallazgos sugieren que el 3β,5α-tetrahidro derivado de la NET tiene acciones tejido-selectivas, la evaluación detallada de los efectos biológicos de estos agonistas selectivos del ERα en los modelos knockout del ERα o el ERβ son de interés relevante

La factibilidad de contar con un ligando selectivo preferencial para el ER α , como es el caso del presente estudio, ayudará en el progreso de la identificación de esteroides sintéticos o naturales con diferentes afinidades relativas para ambos subtipos del ER. A este respecto, se conoce que sólo aquellos esteroides C-19 con un grupo hidroxilo en el C-3 y C-17 tienen afinidad significativa por ambos subtipos del ER (Kuiper et al., 1997). Además, como se muestra aquí, la orientación espacial relativa del anillo A con respecto al anillo B, como en el caso de la hidroxilación y la 5 α -reducción en el C-3 de la NET y el GSD podría ser considerado también como una característica estructural importante para el reconocimiento del ligando por el ER α . Si otras modificaciones en la estructura del ligando, además de las que ocurren en el anillo A, tal como sustituciones en el C-17 en posición alfa o la ausencia del metilo angular en C-19 (Jordan et al., 1985) en la molécula de la NET y el GSD son importantes para la unión selectiva al ER α , serán motivo de futuras investigaciones.

Estas observaciones son consistentes con estudios previos sobre la relación estructura-actividad (Tong et al., 1997), en estos estudios la adición de sustituyentes en la posición 17 α - del anillo esteroideal, aumenta la afinidad para el ER α , lo que está de acuerdo con los hallazgos experimentales de este estudio. Además, los cambios moleculares secundarios a la pérdida del metilo angular en C-19 que incrementan la movilidad y densidad electrónica del anillo A, permiten el alineamiento del grupo 3 β -hidroxi y los átomos de hidrógeno del anillo A creando un ambiente similar al estradiol. Existen otros ejemplos de compuestos con diferencias en la actividad transcripcional a través de ambos subtipos del ER. Recientemente, dos nuevos ligandos para el ER α y el ER β han sido descritos (Sun et al., 1999). El primero es un compuesto pirazol no esteroideal, con potencia agonista de 120 veces mayor para el ER α y el segundo un derivado cis-dietil con actividad agonista para el ER α y antagonista para el ER β . De manera similar, Kuiper et al. (1997), informaron las afinidades de unión relativas para el ER α y el ER β de un número de derivados estrogénicos, incluyendo ciertos fitoestrógenos no esteroideales, tales como la genisteína. Además estos autores presentaron evidencias de que los andrógenos naturales reducidos en el anillo A son más selectivos para el ER β , lo cual podría indicar la importancia de las sustituciones en C-17 y/o la ausencia del grupo metilo en C-19 en su acoplamiento con el ER α . A este respecto los resultados de este estudio permiten discriminar de manera más

apropiada la afinidad relativa de unión y la capacidad de activar la transcripción a través del ER α y del ER β facilitando estudios que conduzcan a establecer el papel funcional de ambos receptores.

Por otra parte, la mayoría de los cánceres de mama humano, por lo menos inicialmente, son estrógeno dependientes y sufren regresión cuando son privados del soporte hormonal. Algunos pacientes cuyos tumores de mama carecen del ER, raramente responden a la ablación endocrina o al tratamiento con antiestrógenos. Por el contrario otros pacientes con cáncer conteniendo el ER el tratamiento es benéfico (Jordan 1994, Osborne et al., 1996). La determinación inmunohistoquímica del ER en biopsias de tumor se ha vuelto un procedimiento clínico rutinario para evaluar la terapia. Sin embargo, existe una proporción de pacientes con tumores positivo al ER que no responden a la terapia endocrina o bien son resistentes al efecto antiestrogénico del tamoxifeno. Actualmente los procedimientos disponibles para la identificación del ER se basan en anticuerpos específicos para el ER α por lo cual no detectan proteínas del ER β . El RNA mensajero del ER β ha sido detectado en biopsias de cáncer de mama humano y en líneas celulares de cáncer de mama humano por RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa reversa transcriptasa) y análisis de protección de la RNasa (Dotzlaw et al., 1996, Enmark et al., 1997). La expresión del ER β en células de tejidos normales aún no ha sido bien identificada y el posible papel del ER β en tejido de mama normal o en el desarrollo de cáncer de mama y/o terapia no es aún conocido, por lo que la disponibilidad de compuestos con selectividad preferencial para los subtipos del ER, como en el caso del presente estudio, serán de gran utilidad en ciertas condiciones en donde la administración del esteroide se encuentra contraindicada. La identificación de compuestos selectivos por los subtipos del ER será de valiosa ayuda para el desarrollo de nuevas acercamientos terapéuticos basados en las acciones hormonales y provee una herramienta importante para examinar las funciones moleculares y celulares específicas dependientes del ER α y el ER β .

En el presente estudio, se evaluó la actividad estrógenica de NET, GSD y sus metabolitos utilizando genes reporteros dependientes de la actividad estrógenica. Los resultados demostraron que a concentraciones bajas los derivados 3 β ,5 α -tetrahidro de NET y GSD (3 β ,5 α -NET y 3 β ,5 α -GSD, respectivamente) activan selectivamente al ER α y poseen

actividad agonista débil a concentraciones altas por el ER β . En resumen, los datos presentados demuestran la identificación de dos tetrahidro derivados de la NET y el GSD que unen y activan selectivamente la transcripción vía el ER α . Estos compuestos, además de sus aplicaciones terapéuticas y científicas, ayudarán a la identificación de ligandos sintéticos y naturales específicos para los subtipos del ER.

CONCLUSIONES

- Los metabolitos dihidro y tetrahidro reducidos de la NET y el GSD pierden actividad progestacional, pero adquieren actividad estrogénica cuando fueron evaluado en células HeLa transfectadas transitoriamente con vectores de expresión para los receptores de progesterona y estradiol.
- La actividad estrogénica de los derivados tetrahidros reducidos de la NET y el GSD a nivel transcripcional es debida a su efectos agonista y selectivo sobre receptores alfa estrogénicos.
- El efecto selectivo de los compuestos $3\beta,5\alpha$ -NET y $3\beta,5\alpha$ -GSD sobre el receptor de estradiol alfa se debe a la unión selectiva por este receptor.

Medio de cultivo líquido LB (Luria Bertani) (1000 ml.)

10g de triptona; 5 g de extracto de levadura; 10 de NaCl; pH 7.5. Esterilizar por autoclave.

Almacenar a 2-8°C.

Medio de cultivo LB sólido (agar) (1000 ml.)

10g de triptona; 5 g de extracto de levadura; 10 de NaCl; 5 g de agar pH 7.5. Esterilizar por autoclave.

Almacenar a 2-8°C.

Solución P1

50 mM Tris.Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNasa A

Almacenar a 2-8° C.

Solución P2

200 mM NaOH; 1% SDS

Almacenar a temperatura ambiente.

Solución P3

3.0 M acetato de potasio, pH 5.5

Almacenar a temperatura ambiente.

Solución QBT

750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol; 0.15% Triton X-100

Almacenar a temperatura ambiente.

Solución QC

1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol

Almacenar a temperatura ambiente.

Solución QF

1.25 M NaCl; 50 mM Tris Cl, pH 8.5; 15% isopropanol

Almacenar a temperatura ambiente.

Solución EB

10 mM Tris Cl, pH 8.5

Gel de agarosa al 1% en TBE

0.33 g de agarosa; 33 ml de TBE 1X; 0.5 µg/ml de bromuro de etidio.

Amortiguador de carga para DNA 6X

0.25% Azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 15% ficoll (tipo 400).

Almacenar a 4°C.

Solución amortiguadora TBE 5X (1 lt)

54 g Tris base; 27.5 g ácido bórico; 20 ml EDTA 0.5 (pH 8.0). Esterilizar por autoclave.

Almacenar a temperatura ambiente.

Medio para cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) con rojo de fenol alto en glucosa (Gibco BRL, life technologies) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS); 100 µ/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

Almacenar a 4°C.

Medio para cultivo celular utilizado en la transfección DMEM sin rojo de fenol alto en glucosa (Gibco BRL, life technologies) suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS); 1% L-glutamina; 100 µ/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

Almacenar a 4°C.

1M de CaCl_2 (1 lt)

147 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Solución CaCl_2

60 mM CaCl_2 ; 15% glicerol; 10 mM PIPES pH 7.0.

Solución PIPES (500ml)

1.5 g PIPES.

Protocolo suero bovino fetal (FBS) tratado con carbón/dextran

1. Solución amortiguadora (1lt): 10 mM hepes; 0.15 M NaCl; 1.5 mM MgCl_2 ; pH 7.4; adicionar 2.5% de carbón activado; 0.025% de dextran T-70. Incubar toda la noche a 4°C con agitación.
2. Centrifugar a 2000 rpm por 10 min.
3. Decantar el sobrenadante y remplazar con 1 lt de FBS.
4. Mezclar fuertemente el carbón con el suero e incubar a 4°C con agitación.
5. Centrifugar a 7000 rpm a 4°C durante 1 hora.
6. Filtrar el suero inmediatamente en filtros de 0.22 μm .
7. Almacenar a -20°C.

Preparación de ^3H -Cloranfenicol

1. 50 μl de ^3H -Cloranfenicol; 450 μl de 0.25 M Tris; 500 μl de xileno.
2. Mezclar 2 minutos y centrifugar a 13200 rpm durante 2 minutos.
3. Descartar la fase de arriba y adicionar 500 μl de xileno.
4. Mezclar 2 minutos y centrifugar a 13200 rpm durante 2 minutos.
5. Descartar la fase de arriba y transferir a un plato para permitir la evaporación de los residuos del xileno.
6. Tomar 20 μl y adicionar 4 ml de solución de centelleo. Determinar la radiactividad en un espectrofotómetro de centelleo líquido Beckman LS6500.

Solución TESH

10mM Tris, pH 7.7; conteniendo 1mM EDTA; 0.1% de monotioglicerol y 0.4 M de NaCl.

Solución TEN

40 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA pH 8.0; 150 mM NaCl.

Esterilizar en filtros de 0.22 μm y almacenar a 4°C.

Solución Tris-HCl 1M, pH 8.0

78.82 g Tris-HCl

Esterilizar en filtros de 0.22 μm y almacenar a temperatura ambiente

REFERENCIAS

- Allan G.F., Leng X., Tsai S.Y., Weigel N.L., Edward D.P., Tsai M.J., O'Malley B.W., 1992a. Hormone and anti hormone induce distinct conformational changes wich are central to steroid receptor activation. *J Biol. Chem.* 267:19513-19520.
- Allan G.F., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W., 1992b. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 15,89:11750-11754.
- Allgood V.E., Zhang Y., O'Malley B.W., Weigel N.L., 1997. Analysis of chicken progesterone receptor function and phosphorylation using an adenovirus-mediated procedure for high efficiency DNA transfer. *Biochemistry* 36:224-232.
- Bagchi M.K., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley, B.W., 1991. Progesterone enhances target gene transcription by receptor free of heat shock proteins hsp90, hsp56, and hsp70. *Mol. Cell. Biol.* 11:4998-5004.
- Beato M., Arnemann J., Chalepakis G., Slater E., Willmann T., 1987. Gene regulation by steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* 27:9-14.
- Beato M., Herrlich P., Schutz G., 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of plot *Cell* 83:851-857.
- Berry M., Metzger D., Chambon P., 1990. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen *EMBO J.* 9:2811-2818
- Braselton W.E., Lin T.J., Ellegood J.O., Mills T.M., Mahesh V.B., 1979. Accumulation of norethisterone and individual metabolites in human plasma during short and long-term administration of contraceptive dosage. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 133:154-160.

- Brown T.R., Bullock L.P., Bardin C W, 1979. In vitro and in vivo binding of progestins to the androgen receptor of mouse kidney: correlation with biological activities. *Endocrinology* 105:1281-1287
- Bullock L.P. Bardin C.W. Sherman M.R., 1978. Androgenic and synandrogenic action of progestins: role of steric and allosteric interactions with androgen receptors. *Endocrinology* 103:1768-1782.
- Clarke J.H., Sutherland R.L., 1990. Progestin regulation of cellular proliferation. *Endocr. Rev* 11:266-301.
- Carroll R.S., Glowacka D., Dashner K., Black P.M., 1993. Progesterone receptor expression in meningiomas. *Cancer Res* 53:1312-1316.
- Cavailières V., Dauvois S., L'Horset F., Lopez G., Hoare S., Kushner P.J., Parker M.G., 1995. Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* 14:3741-3751.
- Cooney A.J., Tsai S.Y., O'Malley B.W., Tsai M-J., 1992. COUP-TF dimers bind to different GGTC A response elements allowing it to repress hormonal induction of VDR,TR and RAR. *Mol Cell Biol.* 12:4153-4163.
- Cooney A.J., Leng X., Tsai S.Y., O'Malley B.W., Tsai M-J., 1993. Multiple mechanisms of COUP-TF-dependent repression of VDR,TR and RAR transactivation. *J Biol. Chem* 268:4152-4160.
- Course J.F., Korach K.S., 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev* 20:358-417.
- Couse J.F., Lindzey J., Grandien K., Gustafsson J-A., Korach K.S., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613-4621.

- Chalchous D., Galtier F., 1994. Differential effect of form A and B of human progesterone receptor on estradiol- dependent transcription *J Biol Chem* 269:23007-23012
- Chávez B.A., Vilchis F., Pérez A.E., García G.A., Grillasca I., Pérez-Palacios G., 1985. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 22(1):121-126.
- Christensen K., Estes P.A., Oñate S.A., Beck C.A., DeMarzo A., Altman M., Liberman B.A., St. John J., Nordeen S.K., Edwards D.E., 1991. Characterization and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. *Mol. Endocrinol.* 5:1755-1770.
- Chu S., Fuller P.J., 1997. Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor β gene. *Mol. Cell Endocrinol.* 132: 185-199.
- DeMarzo A.M., Beck C.A., Oñate S.A., Edwards D.P., 1991. Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-KDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:72- 76.
- DeMarzo A.M., Oñate S.A., Nordeen S.K., Edwards D.P., 1992. Effects of the steroid antagonist RU486 on dimerization of the human progesterone receptors. *Biochemistry* 31:10491-10501.
- Dotzlaw H., Leygue E., Watson P.H., Murphy L.C., 1996. Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J Clin. Endocrinol Metab.* 82:2371-2374.
- Eddy E.M., Washburn I.F., Bunch D.O., Goulding E.H., Gladen B.C., Lubahn D.B., Korach K.S., 1996 Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137:4796-4805
- Edgren R.A., Jones R.C., Peterson D.L., 1967 A biological classification of progestational agents *Fert. Steril* 18:238-256

- Enmark E., Peltö-Huikko M., Grandien K., 1997. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localisation and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:4258-4265.
- Evans R.M., 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.
- Friedman J.S., Cofer C.L., Anderson C.L., Kushner J.A., Gray P.P., Chapman G.E., Stuart M.C., Lazarus L., Shine J., Kushner P.J., 1989. High expression in mammalian cells without amplification. *Bio/Technology* 7:359-362.
- Gaido K.W., Leonard L.S., Maess S.C., 1999. Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane with estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 140:5746-5753.
- Giangrande P.H., McDonnell D.P., 1999. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: Two functionally different Transcription factors encoded by single gene, in *Recent Progress in Hormone Research*, Ed. Michael Conn Vol. 54. 291-314. The endocrine society Bethesda, Maryland. USA.
- Graham J.D., Yeats C., Balleine R.L., Harvey S.S., Milliken J.S., Bilous A.M., Clarke C.L., 1995. Characterization of progesterone receptor A and B expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 55:5063-5068.
- Graham J.D., Yeats C., Balleine R.L., Harvey S.S., Milliken J.S., Bilous A.M., Clarke C.L., 1996. Progesterone receptor A and B protein expression in human breast cancer. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* 56:93-98
- Green S., Walter P., Kumar V., 1986 Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320:134-139.
- Greene G.L., Gilna P., Waterfield M., Baker A., Hort Y., Shine J., 1986 Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231:1150-1154.

- Gronemeyer H, 1991. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu. Rev. Genet.* 25:89-123.
- Gronemeyer H, Laudet V, 1995. Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2:1173-1380.
- Halachmi S., Marden E., Martin G., Mackay H., Abbondanza C., Brown M., 1994. Estrogen receptor- associated proteins: possible mediators of hormone- induced transcription. *Science* 264:1455-1458.
- Hanstein B., Eckner R., Drenzo J., Halachmi S., Liu H., Searcy B., Kurokawa R., Brown M., 1996. p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11540-11545.
- Hilliard J., Croxatto H.B., Hayward J.N., Sawyer C.H., 1966. Norethindrone blockade of LH release to intrapituitary infusion of hypothalamic extract. *Endocrinology* 79:411-419.
- Iafrati M.D., Karas R.H., Aronovitz M., Kim S., Sullivan T.R.J., Lubahn D.B., O'Donnell T.F.J., Korach K., Mendelsohn M.E., 1997, Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor α -deficient mice. *Nature Med.* 3:545-548.
- Ing N.H., Beekman J.M., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W., 1992. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J. Biol. Chem.* 267:17617-17623.
- Jordan V.C., 1994. Molecular mechanisms of antiestrogen action in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat* 31:41-52
- Jordan V.C., Mittal S., Gosden B., Koch R., Lieberman M.E., 1985. Structure-activity relationships of estrogens. *Environmental Health Perspectives* 61 :97 -110.
- Kamei Y., Xu L., Heinzel T., Torchia J., Kurokawa R., Glass B., Lin S.C., Heyman R.A., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G., 1996. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85:403-414.

- Kastner P., Krust A., Turcotte B., Stropp U., Tora L., Gronemeyer H., Chambon P., 1990
Two distinct estrogen- regulated promoters generate transcripts encoding the two
functionally different human progesterone receptor forms A and B . *EMBO J.*
9:1603-1614.
- Kastner P., Mark M., Chambon P., 1995. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic
studies telling us about their role in real life? *Cell* 83:859-869.
- Katzenellenbogen B.S., Korach K.S., 1997 Editorial: a new actor in the estrogen receptor
drama- enter ER β . *Endocrinology* 138:861-862.
- Katzenellenbogen J.A., O'Malley B.W., Katzenellenbogen B.S., 1996. Tripartite steroid
hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector site as basis for
the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol. Endocrinol.* 10:119-
131.
- Klein-Hitpass L., Tsai S.Y., Weigel N.L., Allan G.F., Riley D., Rodriguez R., Schrader
W.T., Tsai M.J., O'Malley B.W., 1990. The progesterone receptor stimulates cell-
free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. *Cell*
60:247-257.
- Kraus W.L., McInerney E.M., Katzenellenbogen B.S., 1995. Ligand-dependent:
transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions
of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc. Natl Acad Sci USA* 92:12314-12318.
- Kraus W.L., Weis K.E., Katzenellenbogen B.S., 1995. Inhibitory cross-talk between
steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the
repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist- occupied
progesterone receptors. *Mol. Cell Biol.* 15:1847-1857.
- Krege J.H., Hodgin J.B., Couse J.F., Enmark E., Warner M., Mahler J.F., Sar M., Korach
K.S., Gustafsson J., Smithies O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of
mice lacking estrogen receptor β *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15677-15682

- Kuiper G.J.M., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J-Å., 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 93:5925-5930.
- Kuiper G.J.M., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S., Gustafsson J-Å., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138:863-870.
- Kuiper G.J.M., Shughrue P.J., Merchenthaler I., Gustafsson J-A., 1998. The estrogen receptor β subtype: A novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 19:253-286.
- Kumar N.S., Richer J., Owen G., Litman E., Horwitz K.B., Leslie K.K., 1998. Selective down-regulation of progesterone receptor isoform B in poorly differentiated human endometrial cancer cells: implications for unopposed estrogen action. *Cancer Res.* 58:1860-1865.
- Larrea F., Escobar N., Garza-Flores J., Moctezuma O., Martínez-Campos A. Pérez-Palacios G., 1983. Nuclear translocation of estradiol receptors by the in vitro administration of norethisterone: An alternative mechanism of gonadotropin inhibition. *J Steroid Biochem* 19:1747-1752.
- Larrea F., García-Becerra R., Lemus A.E., García G.A., Pérez-Palacios G., Jackson K.J., Coleman K.M., Dace R., Smith C.L., Cooney A.J., 2001. A-Ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER α . *Endocrinology* 142(9):3791-3799.
- Larrea F., Moctezuma O., Pérez-Palacios G., 1984. Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. *J Steroid Biochem.* 20:841-847.
- Larrea F., Vilchis F., Chávez B., Pérez A.E., Garza-Flores J., Pérez-Palacios G., 1987. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J Steroid Biochem* 27(4-6):657-663.

- Le Dourin B., Zechel C., Garnier J.M., Lutz Y., Tora L., Pierrat B., Heery D., Gronemeyer H., Chambon P., Losson R., 1995. The N-terminal part of TIF 1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18. *EMBO J* 14:2020-2033.
- Lemmen J.G., Broekhof J.L., Kuiper G.G., Gustafsson J.A., Van der Saag P.T., Van der Burg B., 1999. Expression of estrogen receptor alpha and beta during mouse embryogenesis *Mech. Dev* 81:163-167.
- Lemus A.E., Vilchis F., Damsky R., Chávez B.A., García G.A., Grillasca I., Pérez-Palacios G., 1992. Mechanism of action of levonorgestrel: *in vitro* metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.* 41:881-890.
- Lemus A.E., Zaga V., Santillán R., García G., Grillasca I., Damián-Matsumura P., Jackson K., Cooney A.J., Larrea F., Pérez-Palacios G., 2000. The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites. *J. Endocrinology* 165:693-702.
- Lessey B.A., Alexander P.S., Horwitz K.B., 1983. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity *Endocrinology* 112:1267-1274.
- Loosfelt H., Atger M., Misrahi M., Guichon-Mantel A., Meriel C., Logeat F., Benarous R., Milgrom E., 1986. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone-receptor complementary DNA *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:9045-9049
- Lubahn D.B., Moyer J.S., Golding T.S., Couse J.F., Korach K.S., Smithies O., 1993. Alteration of reproductive function but no prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11162-11166.
- Mangelsdorf D.J., Evans R.M., 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841-850.

- McDonnell D.P., Goldman M.E., 1994. RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 269:11945-11949.
- McDonnell D.P., Shahbaz M.M., Vegeto E., Goldman M.E., 1994. The human progesterone receptor A- form functions as a transcriptional modulator of mineralocorticoid receptor transcriptional activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 48:425-432.
- McGynty D.A., Djeressi C., 1958., Some chemical and biological properties of 19-nor-17 ethynyltestosterone. *Ann NY Acad Sci.* 71:500-515.
- McInerney E.M., Weis K.E., Sun J., Mosselman S., Katzenellenbogen B.S., 1998. Transcription activation by the human estrogen receptor subtype β (ER β) studied with ER β and ER α receptor chimeras. *Endocrinology* 139:4513-4522.
- Meyer M.J., Sun J., Carlson K.E., Katzenellenbogen B.S., Katzenellenbogen J.A., 1999. Estrogen receptor subtype-selective ligands: asymmetric synthesis and biological evaluation of cis- and trans- 5,11 dialkyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysenes. *J. Med. Chem.* 42:2456-2468.
- Montano M.M., Müller V., Trobaugh A., Katzenellenbogen B.S., 1995. The carboxyl-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol.* 9:814-825.
- Mosselman S., Polman J., Dijkema R., 1996. ER β : identification and characterization of novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392: 49-53
- Ogawa S., Inoue S., Watanabe t., 1998a. The complete primary structure of human estrogen receptor β (hER β) and its heterodimerization with ER α *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun.* 243:122-126.

- Ogawa S , Inoue S , Orimo A., Hosoi T., Ouchi Y., Muramatsu M., 1998b. Cross inhibition of both estrogen receptor α and β pathways by each dominant negative mutant. *FEBS Lett* 423:129-132.
- Oñate S.A., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B W., 1995. Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-1357.
- Osborne C.K., Elledge R.M., Fuqua S.A., 1996. Estrogen receptors in breast cancer therapy. *Science and Medicine* 32-41.
- Peach K, Webb P., Kuiper G., Nilsson S., Gustafsson J.-Å., Kushner P.J., Scanlan T S., 1997. Differential ligand activation of estrogen receptor ER α and ER β at AP1 site. *Science* 277:1508-1510
- Pérez-Palacios G, Cerbón M.A., Pasapera A.M., Castro J.I, Enriquez J., Vilchis F., García G.A., Morali G., Lemus A.E., 1992. Mechanism of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J Steroid Biochem. Mol Biol* 41:479-485.
- Pérez-Palacios G., Chávez B., Escobar N., Vilchis F., Larrea F., Lince M., Pérez A.E., 1981. Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. *J Steroid Biochem.* 15:125-130
- Pérez-Palacios G, Fernández-Aparicio M.A., Medina M., Zacarias-Villareal J., Ulloa-Aguirre A., 1981. On the mechanism of action of progestins. *Acta Endocr.* 97:320-328.
- Petersen D.N., Tkalcevic G.T., Koza- Taylor P.H, Turi T.G., Brown T.A, 1998. Identification of estrogen receptor β 2, a functional variant of estrogen receptor β expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* 139:1082-1092
- Pike C.W., Brzozowski A.M., Hubbard R.E., 2000. A structural biologist's view of the oestrogen receptor. *J Steroid Biochem. and Mol Biol* 74:261-268

- Pratt W.B., 1990. Interaction of hsp90 with steroid receptors: organizing some diverse observations and presenting the newest concepts. *Mol Cell. Endocrinol* 74:C69-C76.
- Seed B., Sheen J.Y., 1988. A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* 67:271-277.
- Shughrue P.J., Komm B., Merchenthaler I., 1996. The distribution of estrogen receptor- β mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids* 61:678-681.
- Shughrue P.J., Lane M.V., Merchenthaler I., 1997. Comparative distribution of estrogen receptor- α and β mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp Neurol* 388:507-525.
- Smith C.L., Conneely O.M., O'Malley B.W., 1993. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 90:6120-6124.
- Smith C.L., Kreutner W., 1998. *In vitro* glucocorticoid receptor binding and transcriptional activation by topically active glucocorticoids. *Drug Res* 48:956-960.
- Smith D.F., Toft D.O., 1993. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7:4-11.
- Stillwell W.G., Homing E.C., Homing M.G., Stillwell R.N., Zlatkis A., 1972. Characterization of metabolites of steroid contraceptives by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Steroid Biochem* 3:699-706.
- Sun J., Meyer M.J., Fink B.E., Rajendran R., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S., 1999. Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor- α or estrogen receptor- β . *Endocrinology* 140:800-804.
- Thieulant M.L., Benie T., Michaud S., Klein H., Vessieres A., 1983. Binding and effects of 5 α -androstane-3 β ,17 β -diol in the male rat pituitary. *J. Steroid Biochem* 19:241-246.

- Tong W., Perkins E., Xing L., Welsh W.J., Sheehan D.M., 1997. QSAR models for binding of estrogenic compounds to estrogen receptor α and β subtypes. *Endocrinology* 138:4022-4025.
- Tora L., White J., Brou C., Tasset D., Webster N., Scheer E., Chambon P., 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477-487.
- Tremblay G.B., Tremblay A., Coperland N.G., 1997. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Mol. Endocrinol.* 11:352-365.
- Tsai M.J., O'Malley B.W., 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* 63:451-486.
- Tsai S.Y., Tsai M.-J., O'Malley B.W., 1989. Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to transcriptional synergism at target enhancer elements. *Cell* 57:443-448.
- Tung L., Mohamad M.K., Hoeffler J.P., Takimoto G.S., Horwitz K.B., 1993. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol. Endocrinol.* 7:1256-1265.
- Tzukerman M.T., Esty A., Santiso-Mere D., Danielian P., Parker M.G., Stein R.B., Pike J.W., McDonnell D.P., 1994. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. Endocrinol.* 8:21-30.
- Vegeto E., Shahbaz M.M., Wen D.X., Goldman M.E., O'Malley B.W., McDonnell D.P., 1993. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol. Endocrinol.* 7:1244-1255.

- Vilchis F., Chávez B., Pérez A.E., García G.A., Angeles A., Pérez-Palacios G., 1986. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors *J. Steroid Biochem* 24:525-531.
- Voegel J.J., Heine M.J.S., Zechel C., Chambon P., Gronemeyer H., 1996. TIF2, a 160 KDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J* 15:3667-3675.
- Wen D.X., Xu Y.F., Mais D.E., Goldman M.E., McDonnell D.P., 1994. The A and B isoforms of the human progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells *Molec. Cell Biol.* 14:8356-8364.
- Wiehle R.D., Richardson M., Besch N., Besch P., Kirshon B., Reiter A., Hutchens I.W., 1995. Marker proteins in the particulate fraction of third-trimester amniotic fluid. *Exper Lung Res.* 21:17-39.
- Wilde M.I., Balfour J.A., 1995. Gestodene. A review of its pharmacology, efficacy and tolerability in combined contraceptive preparations. *Drug.* 50: 364-395.
- Yang N.N., Venugopalan M., Hardikar S., Glasebrook A., 1996. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17 β -estradiol and raloxifene. *Science* 273:1222-1225.