



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

Facultad de Medicina

**“Estudio de los Efectos de las Progestinas Sintéticas  
Noretisterona y Levonorgestrel sobre la Proliferación y la  
Diferenciación Funcional de las Células Osteoblásticas de  
la Calvaria de la Rata Recién Nacida”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**M en C. JUANA ENRÍQUEZ JIMÉNEZ**

**DIRECTOR DE TESIS: M.C.y P GREGORIO PÉREZ PALACIOS**

MÉXICO D.F.,

DICIEMBRE 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento económico 125818N otorgado para la realización del presente proyecto de investigación y la Beca/CONACYT con No. Referencia 55287 otorgada para realizar mis estudios en el Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM. A la Universidad Nacional Autónoma de México, Secretaría de Desarrollo Institucional, Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas (Megaproyecto SDS.PISD-05-3). A PAPIIT, DGAPA por el apoyo económico de los proyectos IN200205 y IN202102-3, UNAM, Ciudad de México, México.

A los miembros del Comité Tutoral conformado por los Doctores: Gregorio Pérez Palacios, Fernando Larrea Gallo y Felipe Vadillo Ortega por sus consejos y recomendaciones oportunas que sirvieron para el enriquecimiento, mejoramiento y fortalecimiento del trabajo de investigación y de mi propia formación profesional.

A la Coordinación del Posgrado en Ciencias Biológicas por todo el apoyo y facilidades que me brindaron para la obtención del grado.

## Agradecimientos

A mi tutor y tan respetado maestro el Dr. Gregorio Pérez Palacios, por su gran apoyo y solidaridad y ser parte valiosa en mi formación profesional. Por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo y por la seriedad y responsabilidad que asumió en mi preparación profesional, durante mis estudios de posgrado.

A mi querida maestra Ana Elena Lemus Bravo, que con gran tolerancia y paciencia comparte sus conocimientos conmigo, por sus sabios consejos que oportunamente siempre son bien recibidos y su apoyo incondicional para la culminación de este trabajo de investigación.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo, jefe del Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por todas las facilidades y el apoyo recibidos para la realización de este trabajo de investigación.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM por el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización del presente estudio y de manera especial al Dr. Jesús Chimal Monroy por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo y ser una parte valiosa en el desarrollo y culminación de este estudio de investigación.

A la Unidad de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología, especialmente al Dr. Higinio Arzate, por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo y ser una parte valiosa en el desarrollo y culminación de este estudio de investigación.

## *Dedicatoria*

*A Dios por haberme permitido en compañía de mi familia, alcanzar mi meta y ver culminados mis estudios.*

*A mi esposo y fiel compañero, quién siempre me ha apoyado a lo largo de mis estudios y ha estado presente en mis alegrías, tristezas y desánimos. ¡Gracias por tu tolerancia y paciencia!*

*A mi hijo, quién con su amor cristalino y puro, emanado de un corazón gigante, renueva y restablece mi energía para seguir siempre adelante.*

## CONTENIDO

<b>Índice</b>	<b>página</b>
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Antecedentes	9
Hipótesis de Trabajo	15
Objetivos	15
Justificación	16
Materiales	16
Medios de Cultivo y Reactivos	16
Material Biológico	17
Métodos	17
Progestinas Sintéticas y Síntesis de sus Derivados 5 $\alpha$ -Reducidos	17
Síntesis de Derivados 5 $\alpha$ -Reducidos de NET y LNG	18
Síntesis de los Derivados Tetrahidro Reducidos de NET	18
Síntesis de los Derivados Tetrahidro Reducidos de LNG	19
Aislamiento de Osteoblastos	20
Determinación del Fenotipo Celular	21
Determinación de la Proliferación de los Osteoblastos	21
Cuantificación del Contenido de DNA	22
Diferenciación de los Osteoblastos	23
Determinación de la Actividad de Fosfatasa Alcalina	23
Determinación del Contenido de Osteocalcina	24
Mineralización	26
Cuantificación del Contenido de Calcio	27
Análisis Estadístico	27
Resultados	28
Síntesis Química de los Derivados Reducidos en el Anillo A de NET y LNG	28
Fenotipo de los Osteoblastos Aislados de los Parietales de la Rata	29

Estudios de Proliferación Celular	29
Efectos sobre el Contenido de DNA	29
Estudios de Diferenciación	34
Efectos sobre la Actividad de Fosfatasa Alcalina	34
Efectos sobre el Contenido de Osteocalcina en Osteoblastos	36
Estudios de Mineralización	39
Efectos sobre el Contenido de Calcio	39
Efectos sobre la Deposición Mineral en Osteoblastos	41
Discusión	43
Referencias	48
Anexo	62

## Resumen

El papel fisiológico de los estrógenos sobre la función osteoblástica ha sido ampliamente documentado, sin embargo, la función de progesterona y progestinas sintéticas es aún controversial. Mientras que, diferentes estudios indican que progesterona no tiene efectos significativos sobre las células óseas, una serie de estudios clínicos han mostrado que las progestinas sintéticas particularmente, de la serie 19-nor restauran la pérdida de masa ósea en mujeres postmenopáusicas. Los mecanismos a través de los cuales, las progestinas sintéticas 19-nor inducen efectos biológicos del tipo estrogénico, sobre las células óseas no está completamente elucidado ni comprendido. Para determinar si las acciones de las progestinas 19-nor son mediadas por sus metabolitos no fenólicos, se estudió el efecto de norestisterona (NET), levonorgestrel (LNG) y sus dos derivados tetrahidro reducidos sobre la proliferación celular y diferenciación en osteoblastos aislados de calvarias de ratas recién nacidas. La proliferación de los osteoblastos se evaluó mediante la determinación del contenido de DNA celular y la diferenciación a través de la determinación del contenido de calcio y osteocalcina asociado a las células, la actividad de fosfatasa alcalina y la deposición mineral. Los resultados demuestran que la progesterona no indujo ningún cambio sobre los osteoblastos, mientras que NET y LNG ejercieron diferentes acciones. Los derivados  $3\beta,5\alpha$ - y  $3\alpha,5\alpha$ - tetrahidro reducidos de NET y LNG estimularon la proliferación y la diferenciación de los osteoblastos con mayor potencia que la que ejercieron las progestinas sin modificaciones, mimetizando los efectos del estradiol, La diferenciación y la deposición mineral inducida por NET y LNG fueron suprimidas por finasteride, un inhibidor de las  $5\alpha$ -reductasas mientras que, el potente efecto sobre la proliferación inducido por los derivados reducidos de las progestinas fue suprimido por ICI 182,780, un antiestrógeno esteroidal. Los resultados demuestran que los derivados

reducidos en el anillo A de NET y LNG exhiben efectos del tipo estrogénico sobre los osteoblastos de la rata, aportando una explicación plausible del mecanismo de acción de las progestinas sintéticas 19-nor en la restauración de la masa ósea en la mujer postmenopáusica y contribuyen a la generación de propuestas de investigación alternas para el diseño de formulaciones de reemplazo hormonal.

## Abstract

The key role of estrogens on osteoblastic cells function has been well documented; however the role of progesterone (P) and synthetic progestins has remained controversial. While several reports indicate that P has not relevant effects on bone cells, a number of clinical studies have shown that 19-norprogestins induce restoration of the postmenopausal bone mass loss. The mechanisms by which 19-norprogestins induce estrogen-like effects on bone cells are not fully understood. To assess whether the actions of 19-norprogestins in bone cells are mediated by their non-phenolic metabolites, we studied the effects of norethisterone (NET), levonorgestrel (LNG), and two of their A-ring reduced derivatives upon cell proliferation and differentiation in neonatal rat osteoblasts. The proliferation was assessed by determining cell DNA content and the differentiation by calcium and osteocalcin cell associated content, alkaline phosphatase activity, mineral deposition. Results indicated that P completely failed to induce effects on osteoblastic cells, while NET and LNG exerted a number of actions. The most striking finding was that the  $3\beta,5\alpha$ - and  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydro derivatives of NET and LNG induced osteoblast proliferation and differentiation with higher potency than those exerted by their parent compounds, mimicking the effects of estradiol. Interestingly, osteoblast differentiation and mineral deposition induced by NET and LNG were abolished by finasteride, a  $5\alpha$ -steroid reductases inhibitor, while the potent effect on osteoblast proliferation induced by progestin derivatives was abolished by ICI 182,780, a steroidal antiestrogen. Results demonstrate that A-ring reduced derivatives of NET and LNG exhibit intrinsic estrogen-like potency on rat osteoblasts, offering a plausible explication for the mechanism of action of 19-norprogestins in bone restoration in postmenopausal women and providing new insights for hormone replacement therapy research.

## **Introducción**

El avance científico y tecnológico alcanzado en los últimos treinta años en el área médica, aunado a la efectividad de los programas nacionales de salud pública de las instituciones de salud y seguridad social, han propiciado una importante transición demográfica y epidemiológica, resultante del incremento en la esperanza de vida al nacimiento, y que refleja un proceso de envejecimiento en la población de México. En 1930, los mexicanos vivían en promedio 33.9 años y en la actualidad viven en promedio 74.9 años (1). En la última década (2) la esperanza de vida de las mujeres mexicanas ha alcanzado en promedio los 77.9 años y considerando que la edad en la que se establece la menopausia (entre los 47.3 y 49 años de edad) no se ha modificado, se deduce que las mexicanas vivirán una tercera parte de sus vidas en la condición posmenopáusicas (3). La peri- y pos-menopausia son etapas fisiológicas de la mujer, caracterizadas por el cese de la función endócrina y gametogénica del ovario y en consecuencia del cese de la función reproductiva (4).

Durante la etapa posmenopáusicas, las mujeres enfrentan cambios fisiológicos como consecuencia de la deficiente producción de hormonas esteroides sexuales (estrógenos y progesterona), deficiencia que a largo plazo y bajo ciertas circunstancias, puede favorecer o condicionar algunas enfermedades metabólicas y crónico-degenerativas como enfermedad cardiovascular, osteoporosis, diabetes mellitus y síndrome metabólico.

La osteoporosis es una enfermedad esquelética asintomática que se caracteriza por la disminución del contenido mineral y deterioro del tejido óseo, que condiciona fragilidad

del hueso e incrementa la susceptibilidad al riesgo de fractura, principalmente de cadera, columna vertebral y huesos largos en las mujeres de la tercera edad. Se ha estimado que en México, la osteoporosis tiene una prevalencia de 16 % y que una de cada tres mujeres mayores de 45 años de edad sufrirán esta enfermedad (5). En México existen 7 millones 360 mil mujeres en etapa de peri- y pos-menopausia y en el año 2010, esta cifra incrementará a 12 millones (6).

La osteoporosis es un problema de salud pública de gran relevancia por el número de personas afectadas y el costo económico de su tratamiento. La incidencia de esta enfermedad incrementa dramáticamente con la edad, afectando particularmente a las mujeres en el período peri- y pos-menopáusico. En nuestro país se registran anualmente entre 11 mil y 30 mil fracturas de fémur o cadera secundarias a osteoporosis que representan para el sector salud un gasto anual cercano a 830 millones de pesos (7). Adicionalmente, el 57 % de las mujeres mexicanas mayores de 50 años de edad cursan con osteopenia, el 16 % (1.3 millones de mujeres) ya padecen osteoporosis y sólo una pequeña proporción del 27 % tienen una masa ósea normal. Otro sector de la población en riesgo de osteoporosis son las mujeres mayores de 60 años de edad, en las que la incidencia aumenta al 86% (8, 9).

La baja producción ovárica de estrógenos, particularmente del  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), asociada a la condición posmenopáusica, es la causa primaria de la pérdida acelerada de la masa ósea y el deterioro de la microarquitectura del hueso trabecular que ocurre en la mujer (4, 10). La remodelación del hueso es el proceso que permite mantener constante la masa ósea a través del equilibrio entre la degradación o resorción del hueso viejo, por la acción proteolítica de los osteoclastos y la formación de hueso nuevo, mediada por

los osteoblastos, que son las células responsables de la síntesis de las proteínas óseas (colágena tipo I, fosfatasa alcalina, osteocalcina, osteopontina decorina, osteonectina) y la formación de hidroxapatita, un mineral compuesto de calcio y fósforo. En la posmenopausia, el déficit de estrógenos ocasiona el desacoplamiento entre la formación y la resorción ósea, en el que la actividad de resorción excede a la actividad de formación, lo que resulta en la pérdida neta de masa ósea (11, 12). El tratamiento hormonal disminuye la resorción del hueso y restaura el balance entre las actividades óseas; su efectividad antirresortiva ha sido ampliamente confirmada por evaluaciones clínicas del uso de estrógenos naturales o sintéticos para controlar la osteoporosis. Estos hallazgos permiten establecer que los estrógenos, constituyen una estrategia farmacológica efectiva para prevenir y controlar la pérdida de masa ósea en la mujer postmenopáusicas (13-22).

El E<sub>2</sub> inhibe la resorción ósea, a través de la regulación de diferentes factores que actúan como efectores finales de la diferenciación y activación de los osteoclastos. Algunos estudios demuestran que el E<sub>2</sub> inhibe la síntesis de citocinas pro- inflamatorias como las interleucinas IL1, IL6 y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés), las cuales estimulan la resorción, principalmente por incrementar el número de pre-osteoclastos en la médula ósea. El E<sub>2</sub> también estimula la síntesis del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés), una citocina inductora de la apoptosis de los osteoclastos (23-26) e inhibe la síntesis del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés) así como el factor de diferenciación de osteoclastos (ODF, por sus siglas en inglés) conocido también como RANKL, dos citocinas inductoras de la diferenciación y la activación de los osteoclastos. Adicionalmente, el E<sub>2</sub> estimula la síntesis de osteoprotegerina, otra

citocina, perteneciente a la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, que actúa como un receptor señuelo de RANKL, neutralizando su efecto de activación osteoclástica (27, 28).

El E<sub>2</sub> además de disminuir la resorción ósea, también estimula la formación de hueso nuevo. Algunos estudios realizados en roedores ovariectomizados demuestran que la administración de altas dosis de E<sub>2</sub> revierte los efectos óseos producidos por la castración y aumenta la masa ósea (29-31). De igual manera, en estudios clínicos realizados en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis el uso de altas dosis E<sub>2</sub> (25-75 mg) aumenta la masa ósea y la actividad de los osteoblastos (21-22).

Diversos estudios experimentales *in vitro*, realizados en células con fenotipo osteoblástico (32- 34), así como en osteoblastos humanos y de roedores (35-37), muestran que el E<sub>2</sub> incrementa la actividad celular al estimular la proliferación, la síntesis de proteínas y enzimas de la matriz ósea e inducir la mineralización (32-37).

La descripción de características fenotípicas óseas comunes como ausencia del cierre de epífisis de los huesos largos, osteopenia y osteoporosis (38, 39) en hombres con el síndrome de resistencia a la acción de estrógenos demuestra que la biosíntesis del E<sub>2</sub> y su interacción con los receptores intracelulares de estrógenos (RE), en las células del hueso son requisitos indispensables en la mujer y en el varón. Estos hallazgos en individuos con mutaciones en el gen ESR 1, que transcribe los RE o en el gen CYP 19, que codifica, para la aromatasa (P450 arom) enzima que biotransforma los andrógenos en estrógenos, fortalecen el concepto de que el E<sub>2</sub> tiene una función esencial en el desarrollo y crecimiento del hueso, así como en el mantenimiento de la masa ósea durante la etapa adulta.

La función de la progesterona (P) en el metabolismo mineral y mantenimiento de la masa ósea no es muy clara y la evidencia de los efectos de P sobre el hueso es controversial, aún cuando los osteoblastos expresan los subtipos A y B de los receptores para progesterona (RP), que son estrógeno-dependientes (40, 41). Canalis y Raisz (42) han demostrado que la P en dosis relativamente altas, inhibe la proliferación de osteoblastos mantenidos en cultivo y la síntesis de colágena en hueso parietal (calvaria) de la rata fetal. Otros estudios demuestran que la P estimula la proliferación y diferenciación en osteoblastos humanos así como la formación ósea en la rata (37, 43, 44). Por el contrario, algunos estudios en ratas ovariectomizadas revelan que la P no previene la pérdida de masa ósea (31, 45, 46). En este contexto, los estudios clínicos en mujeres posmenopáusicas han mostrado que la P sola o en combinación con E<sub>2</sub> carece de efecto sobre la pérdida del contenido mineral óseo (17, 47).

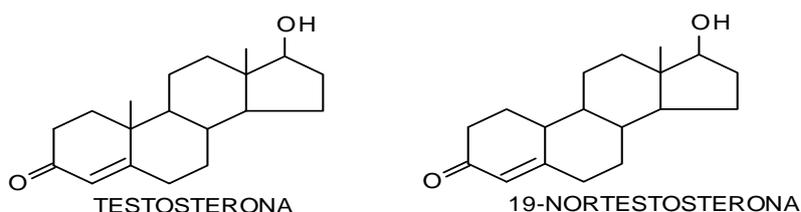
Esta información en su conjunto ha servido como base para establecer que el E<sub>2</sub> es adecuado para controlar la osteoporosis en la mujer posmenopáusica. Sin embargo, a pesar de décadas de uso de estrógenos en la terapia hormonal de reemplazo en la posmenopausia, su papel en la génesis de algunas enfermedades crónicas degenerativas aún permanece incierto. Diferentes estudios clínicos han demostrado la asociación del uso de estrógenos con el incremento del riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, trombosis pulmonar, cáncer mamario, cáncer cérvico-uterino y cáncer de colon (48-50). Estas observaciones han propiciado la búsqueda de otras estrategias farmacológicas de menor riesgo a la salud de la mujer en la etapa posmenopáusica. Una de las estrategias alternas es el uso de progestinas sintéticas las cuales, por sus características farmacológicas pueden tener efectos benéficos sobre el tejido óseo. Es por lo tanto de

interés la búsqueda de agentes hormonales sintéticos capaces de contribuir a la remodelación ósea, sin incrementar otros factores de riesgo a la salud de la mujer posmenopáusica.

## Antecedentes

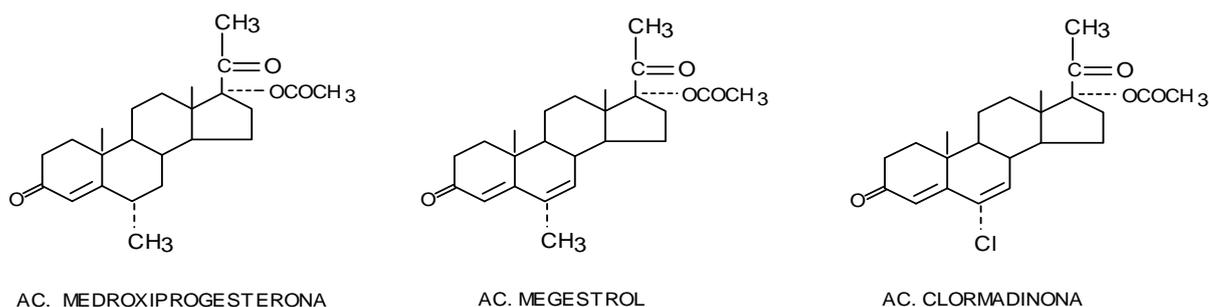
Las progestinas sintéticas son esteroides producidos por síntesis química, con actividad progestacional de mayor potencia que la progesterona natural, que por su capacidad de prevenir la ovulación a través de la inhibición de la síntesis y secreción de las hormonas gonadotrópicas: hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH), han sido ampliamente utilizadas en formulaciones anticonceptivas.

Las progestinas sintéticas, además de su actividad progestacional poseen otros efectos biológicos del tipo hormonal incluyendo: actividad estrogénica, androgénica y glucocorticoide e incluso efectos anti-hormonales. De acuerdo a su estructura química, las progestinas sintéticas se clasifican en dos grandes grupos: las progestinas de la serie pregnano, que derivan de la 17-hidroxiprogesterona y las de la serie 19-nor que derivan de la 19-nortestosterona, un esteroide con actividad progestacional y estructuralmente relacionado con la testosterona (Figura 1).



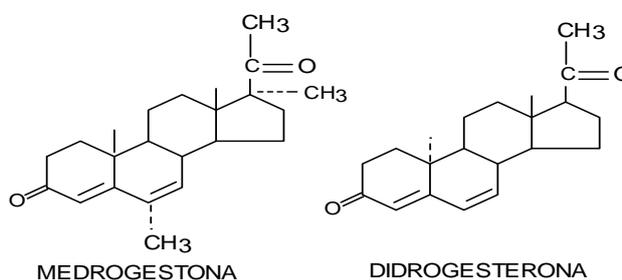
**Fig. 1.** 19-Nortestosterona, esteroide con actividad progestacional, estructuralmente relacionado con testosterona, no activo como andrógeno por vía oral.

Las progestinas sintéticas derivadas de la  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona, más usadas en terapia anticonceptiva incluyen el acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol y acetato de clormadinona (Fig. 2).



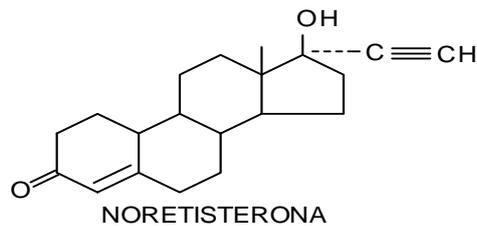
**Fig. 2.** Progestinas sintéticas derivadas de la 17-hidroxiprogesterona usadas en formulaciones anticonceptivas.

El acetato de medroxiprogesterona fue la primera progestina de acción prolongada de aplicación parenteral y con su síntesis se inició el desarrollo de los métodos inyectables para la regulación de la fertilidad (51, 52). El acetato de clormadinona sirvió de base para el desarrollo de la “minipíldora” (53) una estrategia innovadora que permitió la administración de pequeñas dosis de las progestinas (54, 55). Otras progestinas de la serie pregnano incluyen a la medrogestona y didrogesterona (Fig. 3), estructuralmente relacionadas con la progesterona natural, consideradas como progestinas puras, ya que poseen exclusivamente actividad progestacional y no exhiben efectos hormonales adicionales.



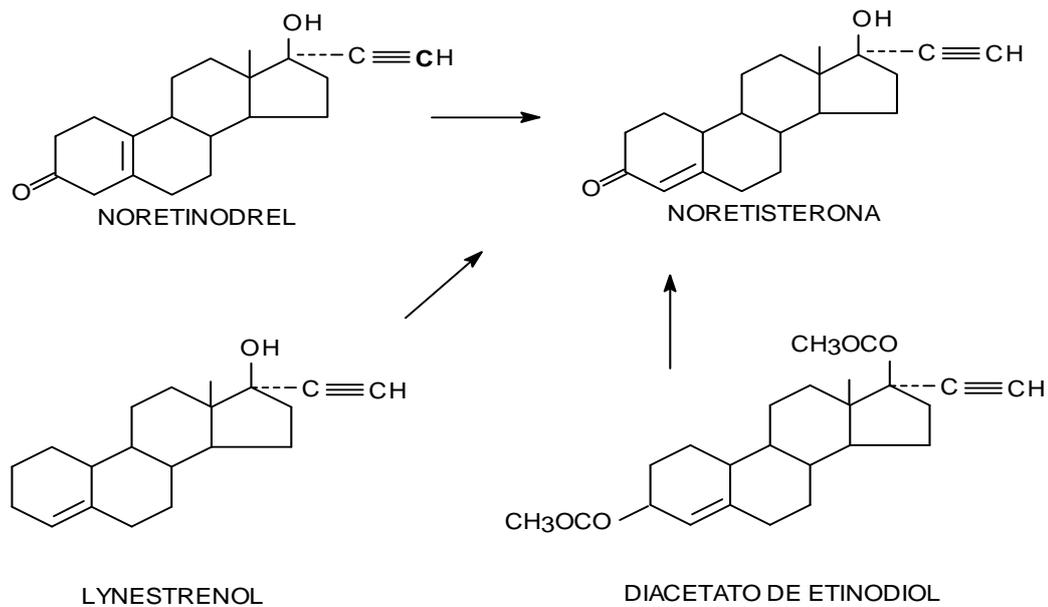
**Fig. 3.** Progestinas sintéticas estructuralmente relacionadas con la progesterona natural.

En el grupo de progestinas sintéticas derivadas de la 19-nortestosterona, se incluye a la noretisterona (NET), una progestina 19-nor que posee un grupo etinilo en el C17 en posición  $\alpha$ , una modificación que le confiere protección a la molécula contra la degradación enzimática al ser administrada por vía oral y le aumenta la vida media (Figura 4).



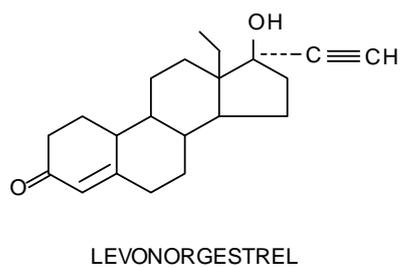
**Fig. 4.** Estructura química de la noretisterona, primera progestina sintética de la serie 19-nor, activa por vía oral con mayor potencia que progesterona.

La NET fue la primera progestina activa por vía oral sintetizada en México por Carl Djerassi, Luis E. Miramontes y George Rosenkranz en los laboratorios Syntex en 1951 (56, 57). Otras progestinas de esta serie incluyen al noretinodrel, linestrenol y diacetato de etinodiol (Figura 5), que han sido consideradas pro-drogas debido a que deben ser biotransformadas a NET después de su administración para ejercer sus efectos.



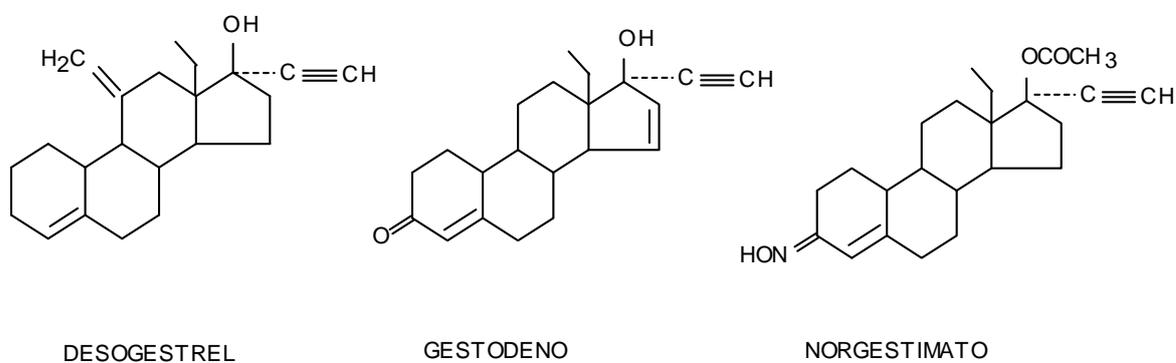
**Fig. 5.** Progestinas sintéticas de la primera generación derivadas de la 19-nortestosterona.

El D(1)-norgestrel o levonorgestrel (LNG) es otra progestina 19-nor (Figura 6), obtenida por síntesis total (58) que posee una mayor potencia progestacional que NET y forma parte de la segunda generación de progestinas derivadas de la 19-nortestosterona.



**Fig. 6.** Estructura química de levonorgestrel, progestina sintética 19-nor de segunda generación obtenida por síntesis total.

En años recientes se ha sintetizado un nuevo grupo de esteroides 19-nor, estructuralmente relacionados con levonorgestrel que comprende al gestodeno, el



norgestimato y el desogestrel, cuyo metabolito activo es el 3-ceto-desogestrel (Figura 7), que constituyen la tercera generación de progestinas sintéticas.

**Fig. 7.** Progestinas sintéticas 19-nor estructuralmente relacionadas con levonorgestrel.

La amplia gama de progestinas sintéticas ha sido de vital importancia en medicina reproductiva y el éxito de los resultados de su uso en la terapia anticonceptiva confirma el concepto de que las progestinas sintéticas son excelentes agentes progestacionales. Además de sus efectos anticonceptivos, las progestinas sintéticas también exhiben efectos biológicos benéficos al nivel del tejido óseo. El uso de progestinas sintéticas para el control de la pérdida de masa ósea y síntomas del climaterio en la mujer posmenopáusica ha tenido resultados benéficos sin embargo, no todas las progestinas sintéticas tienen la capacidad de conservar la masa ósea, esta función dependerá de su estructura química. La evidencia de estudios clínicos ha relacionado la asociación del uso de acetato de medroxiprogesterona (AMP), progestina de depósito derivada de la 17-hidroxiprogesterona, con la pérdida de masa ósea en la mujer en edad reproductiva (20, 59-61). Otro estudio demostró que la terapia de reemplazo con AMP induce disminución de la masa ósea en la mujer postmenopáusica, contrario a lo que ocurre con

el reemplazo de estrógenos (16). Por el contrario, las progestinas sintéticas pertenecientes a la serie 19-nor ejercen efectos benéficos sobre el recambio óseo. Una serie de estudios clínicos han demostrado que la administración de NET no sólo previene la pérdida mineral ósea al reducir la resorción, sino también incrementa la densidad ósea estimulando la formación del hueso en la mujer posmenopáusia (62-69). Adicionalmente, la administración subdérmica de bajas dosis de LNG, también induce aumento de la densidad mineral en la mujer pre-menopáusia (70, 71). Más aún, estudios clínicos y experimentales demuestran que la nandrolona, una 19-norprogestina, ampliamente usada como agente anabólico, incrementa la masa ósea y disminuye el recambio óseo (72-75).

Estas observaciones clínicas demuestran que para la prevención de la osteoporosis en la mujer posmenopáusia las progestinas sintéticas, estructuralmente relacionadas con la 19-nortestosterona, tienen mayor valor terapéutico que las progestinas que derivan de la 17-hidroxiprogesterona. Sin embargo, aún no se ha dilucidado el mecanismo de acción a través del cual las progestinas 19-nor ejercen sus efectos sobre el tejido óseo, particularmente debido a que estos esteroides sintéticos, *per se*, no tienen afinidad por los receptores intracelulares para estrógenos (76-78), ni son enzimáticamente biotransformados a estrógenos por la acción de las aromatasas (79, 80).

En una serie de estudios, nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que las progestinas 19-nor son extensamente metabolizadas a nivel de los órganos blanco (hipotálamo, hipófisis y próstata ventral) a diferentes metabolitos reducidos en el anillo A (77, 78, 81) con capacidad para ejercer diferentes acciones del tipo hormonal, mediadas por receptores intracelulares para esteroides. En particular, los metabolitos

$3\alpha,5\alpha$ - y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro reducidos de las progestinas sintéticas 19-nor inducen respuestas biológicas de tipo estrogénico (82, 83), reconocen selectivamente los sitios de unión de los receptores  $\alpha$  para estrógenos (84, 85) y transactivan genes estrógeno-dependientes en sistemas celulares de expresión (86,87). Estos hallazgos motivaron nuestro interés para estudiar los efectos de las progestinas sintéticas y sus derivados reducidos en el anillo A sobre células óseas.

## **Hipótesis de Trabajo**

Noretisterona y levonorgestrel, dos progestinas 19-nor, estimulan la proliferación, la diferenciación y la mineralización de células osteoblásticas a través de sus productos de conversión metabólica reducidos en el anillo A.

## **Objetivos**

### *Objetivo General*

Determinar los efectos biológicos del tipo hormonal de NET, LNG y sus correspondientes derivados tetrahidro reducidos:  $3\alpha,5\alpha$ - ( $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\alpha,5\alpha$ -LNG) y  $3\beta,5\alpha$ - ( $3\beta,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -LNG) sobre la proliferación, diferenciación y mineralización en osteoblastos aislados de parietales (calvaria) de la rata de 1-2 días de nacida.

### *Objetivos Particulares*

Determinar los efectos de NET, LNG y sus derivados  $3\alpha,5\alpha$ -NET,  $3\alpha,5\alpha$ -LNG,  $3\beta,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -LNG sobre:

- 1) Proliferación osteoblástica evidenciada por el contenido de DNA celular.
- 2) Diferenciación de los osteoblastos, a través de dos biomarcadores celulares: actividad de la fosfatasa alcalina (FA) y contenido de osteocalcina (OC).
- 3) Mineralización evidenciada por la formación de nódulos calcificados y el contenido celular de calcio.

## **Justificación**

La efectividad de las progestinas sintéticas NET o LNG, usadas como estrategia alterna de reemplazo hormonal, para prevenir la pérdida de la masa ósea en mujeres

posmenopáusicas es confirmada por los resultados obtenidos en diferentes estudios clínicos. Sin embargo, el mecanismo a través del cual las progestinas sintéticas NET y LNG ejercen sus efectos a nivel de las células óseas no es aún comprendido. Particularmente, debido a que NET y LNG no interactúan con los receptores para estrógenos ni son capaces de ser aromatizados para formar estradiol. El presente proyecto de investigación biomédica básica que utiliza un modelo celular experimental está orientado a elucidar el mecanismo de acción a través del cual NET y LNG estimula la formación de masa ósea. La investigación vincula los métodos tradicionales de bioquímica hormonal con las técnicas contemporáneas de biología celular. El objetivo puntual fue determinar el mecanismo de acción de dos progestinas sintéticas a nivel de células osteoblásticas, identificando los sitios factibles de intervención, que permitan el diseño y desarrollo de estrategias alternas para la prevención efectiva y sin riesgos de la osteoporosis en la mujer durante la peri- y pos-menopausia.

## **Materiales**

### *1) Medios de Cultivo y Reactivos*

El suero fetal de bovino (SFB) se adquirió en Hyclone Laboratories, Inc. (Logan, UT) y el medio esencial modificado por Dulbecco (DMEM) sin rojo de fenol en Life Technologies (Grand Island, NY). La colagenasa tipo II, E<sub>2</sub>, P y DNA de timo de salmón, se adquirieron en Sigma Chemical, Co. (St. Louis, MO). El anticuerpo monoclonal contra la osteocalcina de bovino desarrollado en ratón y el anticuerpo contra la inmunoglobulina G (IgG) de ratón desarrollado en conejo y acoplado a peroxidasa se adquirieron en Zymed Laboratories, Inc. (St. Francisco, CA). El inhibidor de 5 $\alpha$ -esteroide-reductasas, Finasteride, fue adquirido en UKT Laboratories, Inc. (St. Paul, MN). Los reactivos y disolventes utilizados en todos los estudios, fueron de grado analítico.

### *2) Material Biológico*

Se emplearon ratas hembras de la cepa Wistar de 1-2 días de edad, proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todos los procedimientos utilizados para el manejo de los animales fueron aprobados por el Comité de Investigación en Animales del mismo Instituto y de acuerdo a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los animales se limpiaron cuidadosamente con alcohol etílico al 70%, se decapitaron con tijeras estériles y se extrajeron inmediatamente los parietales.

## **Métodos**

### *Progestinas Sintéticas y Síntesis de sus Derivados 5 $\alpha$ -Reducidos*

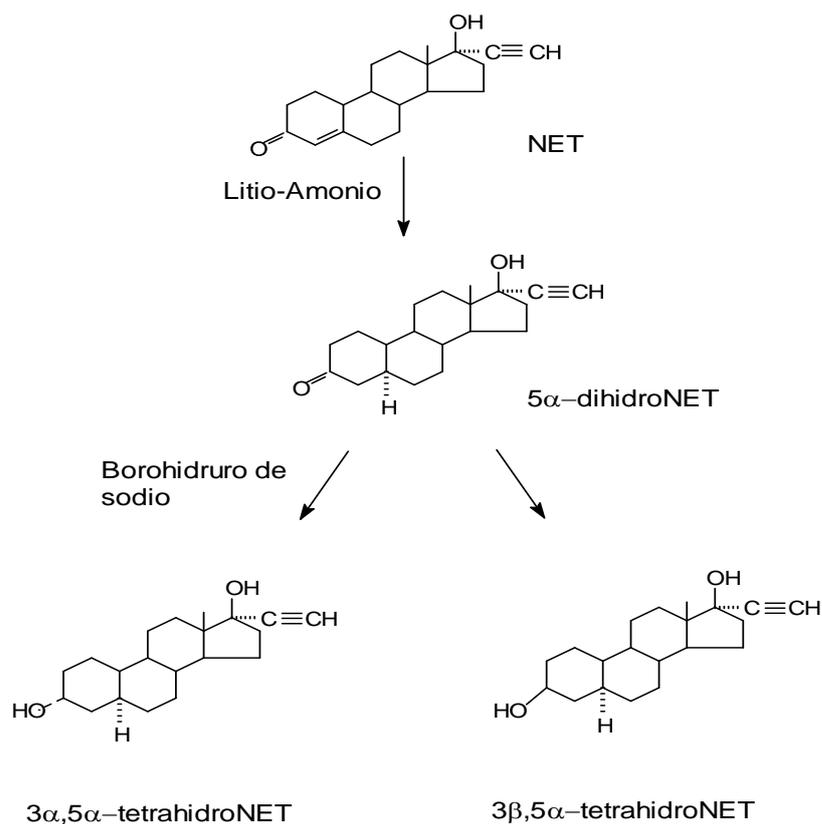
Las progestinas sintéticas NET y LNG fueron generosamente proporcionadas por Schering Mexicana, S.A. de C.V. (Ciudad de México) y Schering AG (Berlin). Los derivados  $3\alpha,5\alpha$ - y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro reducidos de NET y LNG ( $3\alpha,5\alpha$ -NET,  $3\alpha,5\alpha$ -LNG,  $3\beta,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -LNG,) se sintetizaron químicamente, a partir de NET y LNG. La pureza química de las progestinas sintéticas y sus derivados se estableció en base a sus constantes físicas y espectroscópicas, punto de fusión, comportamiento en cromatografía de líquida de alta presión, espectro de infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

#### *Síntesis de Derivados $5\alpha$ -Reducidos de NET y LNG*

Los derivados  $5\alpha$ -dihidro de las dos progestinas se sintetizaron a partir de la reducción de NET y LNG con litio en amoníaco líquido, de acuerdo al método descrito por Bowers y cols. (88). Los productos reducidos resultantes se cristalizaron en una mezcla de acetato de etilo-hexano y se purificaron en cromatografía de Flash.

#### *Síntesis de los Derivados Tetrahidro Reducidos de NET*

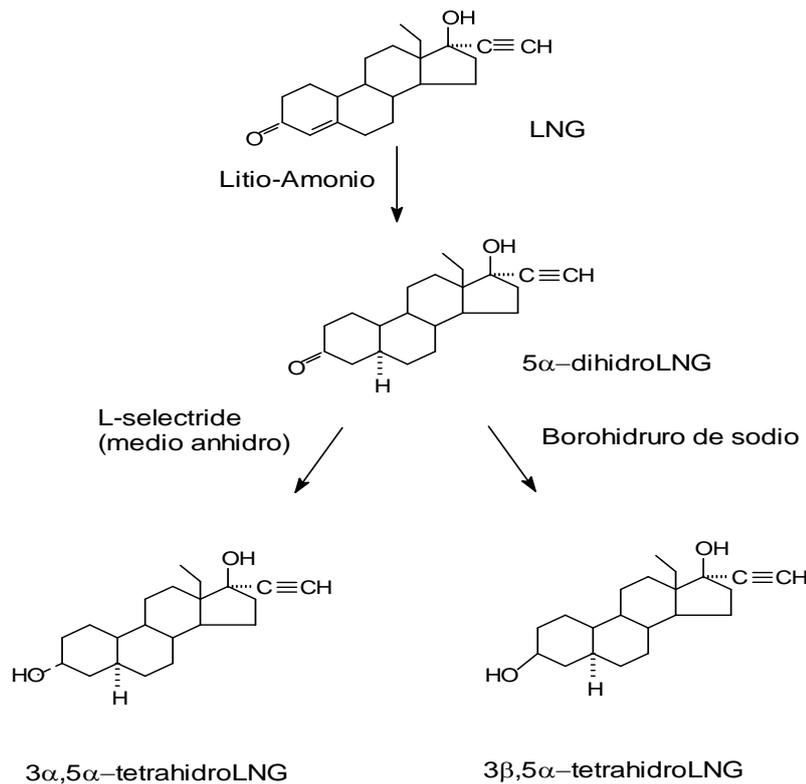
Los derivados  $3\alpha,5\alpha$ - y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro reducidos de NET se obtuvieron a partir de la reducción de  $5\alpha$ -dihidroNET con borohidruro de sodio (Figura 8). Los alcoholes isoméricos se separaron por cromatografía de Flash, usando el sistema acetato de etilo : hexano (3 : 7). La pureza química de los derivados tetrahidro reducidos de NET se determinó por sus constantes físicas y espectroscópicas.



**Fig. 8.** Esquema representativo de la síntesis química de 3α,5α-tetrahidro-NET y 3β,5α-tetrahidro-NET. El rendimiento de la producción fue de 85% para el derivado 3β,5α- reducido y de 15% para su isómero 3α.

#### *Síntesis de los Derivados Tetrahidro Reducidos de LNG*

El derivado 3α,5α-tetrahidro reducido de LNG se obtuvo de la reducción de 5α-dihidroLNG con L-selectride bajo condiciones anhidras (Figura 9). La mezcla resultante de ambos alcoholes se extrajo con acetato de etilo. La síntesis del derivado 3β,5α-tetrahidro de LNG se obtuvo por reducción de 5α-dihidroLNG con borohidruro de sodio. Los epímeros formados se separaron por cromatografía de Flash, usando un sistema de disolventes constituido por acetato de etilo : hexano (3 : 7). El derivado 3β,5α-tetrahidro fue el principal producto de la reacción. Su pureza química se estableció mediante sus constantes físicas y espectroscópicas.



**Fig. 9.** Esquema representativo de la síntesis química de 3α,5α-tetrahidroLNG y 3β,5α-tetrahidroLNG. A partir de 5α-dihidroLNG se forma el derivado 3β,5α-tetrahidroLNG, con un rendimiento de 85%. El rendimiento de la síntesis de 3α, 5α-tetrahidro LNG fue de 92%.

### *Aislamiento de Osteoblastos*

Los osteoblastos se aislaron de los parietales de las ratas utilizando el método descrito por Robey (89). Los parietales se extrajeron cuidadosamente de cada uno de los cráneos y se eliminaron sangre y tejidos suaves. Los parietales limpios se cortaron en fragmentos de 1 mm<sup>2</sup> y se incubaron con 2 ml de una solución de colagenasa tipo II al 0.3 %, durante 10 min a 37° C, en un incubador bajo una atmósfera húmeda de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Al término del período de incubación, la solución de colagenasa se descartó y los fragmentos de tejido óseo se incubaron adicionalmente con solución de colagenasa, durante 30 min a 37° C, con agitaciones suaves a intervalos de 5 min. Las células suspendidas en la solución de colagenasa se transfirieron a un tubo cónico estéril al que se le adicionaron 2 ml DMEM suplementado con SFB al 10 %, para inactivar la

enzima. Este procedimiento se repitió dos veces más. La suspensión celular de la 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> digestiones enzimáticas se reunieron en un tubo cónico y se concentraron en el fondo del tubo, mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 min, a temperatura ambiente.

El botón celular se resuspendió en un volumen adecuado de DMEM, suplementado con 10 % de SBF, 100  $\mu$ M de aminoácidos no esenciales y una solución que contenía 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina y 250 ng/ml de anfotericina-B (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). El número total de células se determinó por observación en microscopio y el uso de una cámara de Neubauer.

#### *Determinación del Fenotipo Celular*

Los osteoblastos se sembraron ( $6 \times 10^6$  células) en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en un incubador bajo una atmósfera húmeda de 5 % CO<sub>2</sub> en aire. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se cosecharon utilizando una solución que contenía tripsina al 0.25 % y 1 mM de EDTA. El fenotipo de las células aisladas se estableció por la presencia de osteocalcina (OC) determinada por medio de un método inmunofluorescente (90) y la determinación de actividad de fosfatasa alcalina (FA) mediante el uso de la técnica citoquímica descrita por Kaplow (91).

#### *Determinación de la Proliferación de los Osteoblastos*

Se sembraron  $2 \times 10^4$  osteoblastos/ pozo en placas de cultivo de 96 pozos en DMEM que contenía SBF al 10 %, pre-tratado con una suspensión de carbón-dextrán (SBFC) y se mantuvieron en cultivo durante 6 horas hasta su adherencia a la placa. El medio de cultivo se retiró y se reemplazó por DMEM suplementado con 0.5 % de SBFC,

aminoácidos no esenciales, solución de antibióticos y antimicótico y 50 µg/ml de ácido ascórbico. Los cultivos de osteoblastos se incubaron durante 6 h adicionales. Al término de este período de tiempo se retiró el medio, reemplazándose por medio nuevo que contenía los diferentes esteroides sintéticos y naturales incorporados al medio, disueltos en propilenglicol, este momento fue considerado como el día 0. El efecto de concentraciones crecientes (1, 10, 50, 100 y 500 nM) de NET, LNG, 3α,5α-NET, 3β,5α-NET, 3α,5α-LNG y 3β,5α-LNG, sobre la proliferación de los osteoblastos, se estudió mediante incubaciones durante 4 días, el medio se reemplazó cada 24 h, por medio nuevo que contenía cada una de las concentraciones de los esteroides. Como controles experimentales se emplearon concentraciones idénticas de E<sub>2</sub> y P, así como el propilenglicol (vehículo). La proliferación celular se determinó por la cuantificación diaria (día 0 al día 4) del contenido de DNA, tanto en los cultivos tratados con los esteroides como en los cultivos control. Se realizaron estudios adicionales en los cuales se incubaron durante 24 h, 15 X 10<sup>3</sup> células/ pozo en placas de cultivo de 48 pozos con una sola concentración de 500 nM de E<sub>2</sub>, 3α,5α-NET, 3β,5α-NET y 3β,5α-LNG, en presencia o ausencia de 250 µM del antiestrógeno esteroide ICI-182,780 (Zeneca-Pharma, Ciudad de México).

#### *Cuantificación del Contenido de DNA*

El contenido de DNA se determinó por el método fluorométrico, descrito por Labarca y Paigen (92). Se preparó la curva estándar de DNA de timo de salmón de 0.1 µg a 20 µg. Los cultivos de osteoblastos se lavaron con PBS y se sonicaron durante 5 s en 200 µl de una solución salina que contenía 0.05 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 2 M de NaCl, a pH 7.4. De cada concentración del DNA de la curva estándar así como de los lisados celulares, se tomaron 100 µl y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente con 5 ml del

reactivo de Hoechst 33258 (Bisbenzimidazoles) disuelto en solución salina, en una proporción de 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Al término del período de incubación, la intensidad de la fluorescencia se determinó en un fluorómetro Hoefer modelo DyNA Quant 200 (Pharmacia Biotech Inc. St. Francisco, CA) a 360 / 460 nm. La concentración de DNA se expresó en microgramos ( $\mu\text{g}$ ).

#### *Diferenciación de los Osteoblastos*

Para evaluar los efectos de las progestinas sintéticas y sus derivados reducidos en el anillo A sobre la diferenciación de los osteoblastos cultivados, se determinaron dos biomarcadores celulares de formación ósea: la actividad de fosfatasa alcalina y el contenido de osteocalcina (93-95) en presencia o ausencia de esteroides.

#### *Determinación de la Actividad de Fosfatasa Alcalina*

Los osteoblastos se sembraron a la densidad de  $20 \times 10^4$  células/pozo en placas de cultivo de 24 pozos en DMEM con 5 % de SFB, aminoácidos no esenciales, solución de antibióticos y antimicótico y se incubaron durante 18 h. Al término de la incubación, el medio de cultivo se retiró y se reemplazó por medio nuevo que contenía 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ácido ascórbico y concentraciones crecientes (1-500 nM) de NET, LNG y sus derivados tetrahydro reducidos incorporados al medio con propilenglicol (día 0). Como controles experimentales se usaron concentraciones idénticas de  $\text{E}_2$  y P y propilenglicol. Cada tercer día durante 15 días, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo, conteniendo idénticas concentraciones de los esteroides y propilenglicol. Experimentos adicionales se realizaron con osteoblastos incubados con NET y LNG en presencia o ausencia de 75  $\mu\text{M}$  de finasteride. Al término del período de exposición a los esteroides, el medio se retiró y las células se cosecharon con la ayuda de un gendarme,

se transfirieron a tubos cónicos de 500 µl y se lisaron durante 2 min con 200 µl de una solución que contenía 0.1 M de Tris-HCl y 0.1% de Tween 20, a pH 7.5. Los lisados celulares se sometieron a 3 ciclos alternos de 5 min de congelación - descongelación (-70° C / 25° C) cada uno, para liberar al medio la fosfatasa alcalina de los osteoblastos y proceder a la determinación de su actividad.

La actividad de fosfatasa alcalina (FA) se determinó por el uso del método descrito por Lowry y cols. (96). Se tomaron 20 µl de los lisados y se transfirieron a pozos de una placa de 96 pozos y se incubaron a 37° C, durante 30 min en una solución alcalina de 0.1 M de Tris HCl y 0.1 M de NaCl, pH de 9.8 que contenía 1 M de dietanolamina, 0.25 mM de MgCl<sub>2</sub> y 10 mM de *p*-nitrofenilfosfato. Al finalizar el período de incubación, se adicionaron 50 µl de 3 M de NaOH para detener la reacción y la intensidad del color generado por el nitrofenilo liberado se determinó en un espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se expresaron en unidades (U) de actividad de FA/ mg de proteína / min. La determinación del contenido de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford (97).

#### *Determinación del Contenido de Osteocalcina*

Se sembraron 4 X 10<sup>4</sup> osteoblastos/ pozo en placas de cultivo de 96 pozos. Al alcanzar la confluencia, el medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo que contenía 50 µg/ml de ácido ascórbico y una concentración de 50 nM de cada uno de los siguientes esteroides: NET, LNG, 3α,5α-NET, 3β,5α-NET, 3α,5α-LNG y 3β,5α-LNG, usando E<sub>2</sub>, P y propilenglicol como controles y se incubaron durante 15 días. El medio, conteniendo los diferentes esteroides se reemplazó por medio nuevo idéntico, cada tercer día. Experimentos adicionales se realizaron con osteoblastos incubados con NET

o LNG, en presencia o ausencia de 75  $\mu$ M de finasteride. Al término del período de incubación, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 30 min a 4° C en las placas con 0.5 % de glutaraldehído disuelto en PBS. Inmediatamente después, las células se lavaron con PBS, se secaron con aire y se incubaron a 4° C, durante 24 h en la oscuridad, con 1 % de albúmina sérica de bovino disuelta en una solución amortiguadora de carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.59 g y  $\text{NaHCO}_3$  2.93 g) a pH de 9.6. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS que contenía 0.1 % de Tween 20 y dos veces con PBS.

El contenido de osteocalcina (OC) presente en la matriz extracelular de los osteoblastos se determinó por un método de ELISA adaptado a células, para la cuantificación de proteínas localizadas en la superficie celular similar al descrito por Nibbering y cols. (98). Los cultivos de osteoblastos de la curva estándar, así como aquellos que fueron expuestos a los esteroides se incubaron a 37° C durante 2 h, con un anticuerpo monoclonal contra OC de bovino desarrollado en ratón, diluido 1:500 con PBS que contenía 0.025 % de Tween 20. Las células se lavaron con PBS conteniendo 0.5 % de Tween 20 y se incubaron a 37° C, durante 1 h con anti-IgG de ratón desarrollado en conejo, acoplado a peroxidasa, diluido 1:1000 con PBS conteniendo 0.025 % de Tween 20. Al término de la incubación se removió el exceso de anti-IgG e inmediatamente las células se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 min con 0.4 mg/ml de *o*-fenilendiamino (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), disuelto en 2.43 ml de una solución que contenía 0.1 M de ácido cítrico, 2.57 ml de 0.2 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 5 ml de agua bidestilada y desionizada y 2  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 30 %. Al finalizar la incubación, se adicionaron 30  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a una concentración 2 M, para detener la reacción. La intensidad del color generado por la reacción se midió en un

espectrofotómetro a 490 nm. El contenido de OC se determinó interpolando las lecturas de las absorbancias específicas en la parte lineal de la curva estándar. Los resultados se expresaron como absorbancia específica/  $10^3$  células.

### *Mineralización*

El efecto de las progestinas sintéticas NET y LNG así como de sus derivados reducidos sobre el proceso de mineralización se estableció por el contenido de calcio y la deposición mineral en los osteoblastos mantenidos en cultivo. La deposición mineral se visualizó mediante la tinción con rojo de Alizarina S (Sigma Chemical Co. St Luis, MO) (99) y el contenido de calcio se determinó a través de su espectro de absorción atómica y el uso de un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer, Modelo 3110. Norwalk, CO). Se sembraron  $20 \times 10^4$  osteoblastos/ pozo, en placas de 24 pozos en DMEM conteniendo 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato y se incubaron con una sola dosis (50nM).de NET, LNG y sus derivados  $3\alpha,5\alpha$ - y  $3\beta,5\alpha$ -reducidos en una atmósfera húmeda de 5% de  $\text{CO}_2$  en aire a  $37^\circ \text{C}$ , durante 15 días. Una concentración idéntica de  $\text{E}_2$  y P así como el propilenglicol se utilizaron como controles experimentales. El medio de cultivo se reemplazó por medio nuevo con los esteroides cada tercer día. Experimentos adicionales se realizaron con osteoblastos incubados con 50 nM de NET y LNG en presencia o ausencia de  $75\mu\text{M}$  de finasteride. Al finalizar el período de incubación, las células se sometieron para determinar la deposición mineral y el contenido de calcio asociado a la célula. La deposición mineral se determinó después de que las células se fijaron a la placas con formalina neutra y se incubaron durante, 15 min y a temperatura ambiente, con una solución saturada de rojo de Alizarina S en agua bidestilada, pH 4.1. Las placas se lavaron tres veces en agua corriente, se secaron con flujo de aire y la deposición mineral se observó en un microscopio estereoscópico

Nikon SMZ, Modelo 1500 y se fotografió con una cámara digital Nikon, Modelo E995. El análisis de densidad integrada en muestras representativas se realizó usando un analizador de imágenes Stratagene Modelo Tagle Eye II ( La Jolla, CA, EUA). Los resultados se expresaron en valores numéricos arbitrarios de densidad integrada (píxeles) obtenidos mediante el uso del software Lab Works 4.5 (UVP Bioimagen Systems, Upland, CA, EUA).

#### *Cuantificación del Contenido de Calcio*

El contenido de calcio de los osteoblastos, se determinó después de que las células se lavaron (3 veces) con PBS libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , se descalcificaron toda la noche con 0.5 N de HCl a 4° C y se centrifugaron (4000 g) durante 5 min en una centrífuga Eppendorf Modelo 5415 C (Brinkmann Instruments Co. Westbury, NY). El contenido de calcio de los sobrenadantes, se determinó en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer, Modelo 3110 (Norwalk, CO). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de calcio/ mg de proteína. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (97).

#### **Análisis Estadístico**

Las comparaciones de los grupos experimentales con los controles se analizaron mediante la prueba estadística de ANOVA. Las diferencias estadísticas entre los grupos se establecieron utilizando la prueba estadística *t*-Student de dos colas (SigmaStat Statistical Analysis System, Jandel Corporation, San Rafael, CA) y se consideraron significativas con valores de  $P \leq 0.05$  (100).

## Resultados

### *Síntesis Química de los Derivados Reducidos en el Anillo A de NET y LNG*

La reducción de NET y LNG con litio en amoníaco líquido resultó en la formación de 5 $\alpha$ -dihidro-NET y 5 $\alpha$ -dihidro-LNG. El rendimiento de la formación de los productos dihidro-reducidos fue del 85 % respectivamente. A partir de los derivados 5 $\alpha$ -dihidro reducidos de NET y LNG se sintetizaron los derivados tetrahidro-reducidos. La reducción de 5 $\alpha$ -dihidro-NET con bromohidruro de sodio resultó en la formación de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro de NET y con rendimiento de 85 % para el derivado 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET y de 15 % para el 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET. Las constantes físicas y espectroscópicas de los derivados 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -reducidos de NET resultantes, demuestran que poseen un alto grado de pureza química, y se muestran a continuación:

3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET [p. f.= 117 °C,  $[\alpha]_D$  (CHCl<sub>3</sub>)= -1.56 °], H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 3.98 ppm (m, 1H, CH<sub>3</sub>); 2.6 ppm (s, 1H); 0.88 ppm (s, 3H).

3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET [p. f.= 191°C;  $[\alpha]_D$  (CHCl<sub>3</sub>)= -25°], H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 3.45 ppm (bm, 1H, C3-H); 2.77 ppm (s, 1H); 0.82 ppm (s, 3H).

La reducción de 5 $\alpha$ -dihidroLNG con L-selectride resultó en la formación de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -LNG. El rendimiento fue de 92% para 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -LNG y 8% para su isómero 3 $\beta$ . La reducción de 5 $\alpha$ -dihidroLNG con borohidruro de sodio, resultó en la síntesis del derivado 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -LNG. El rendimiento de producción fue de 85% para el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -LNG y 15% para el derivado 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -LNG. Las constantes físicas y espectroscópicas de los derivados tetrahidro-reducidos de LNG se muestran a continuación:

3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -LNG [p. f.= 130°C];  $[\alpha]_D^{20}$  (CH<sub>3</sub>-OH)= 26°; i.r. max: 3400, 3300, 1060 cm<sup>-1</sup>; H-

NMR ( $\delta$ ) 0.98 ppm (t, CH<sub>3</sub>); 2.58 ppm (s, C $\equiv$ CH); 4.1 ppm (m, 3H).

3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -LNG [p. f.= 104 °C]; [ $\alpha$ ]<sup>20</sup><sub>D</sub> (CH<sub>3</sub>-OH)= 42°; i.r. max: 3400, 3300, 1050 cm<sup>-1</sup>; H-

NMR ( $\delta$ )

0.98 ppm (t, CH<sub>3</sub>); 2.60 ppm (s, C $\equiv$ CH), 3.61 ppm (bm, 3H)

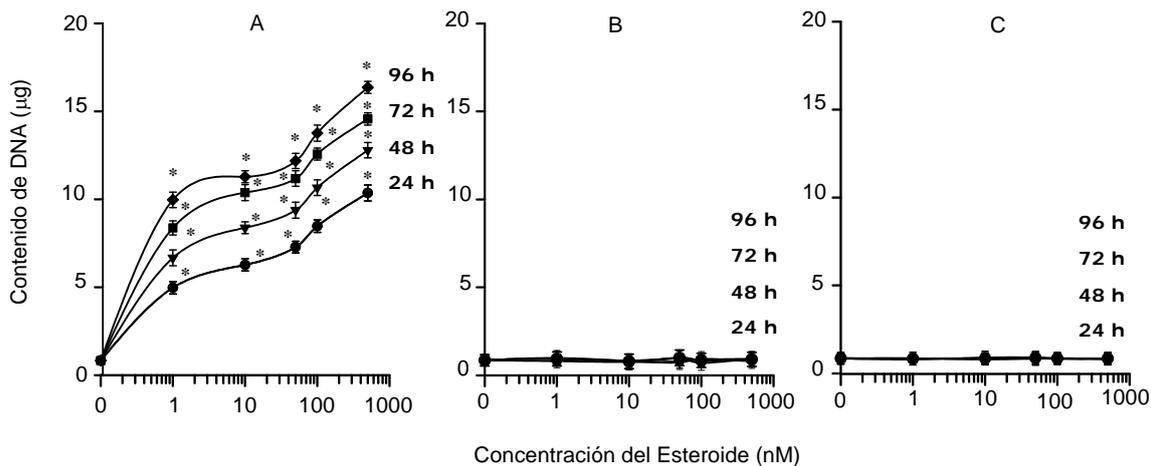
#### *Fenotipo de los Osteoblastos Aislados de los Parietales de la Rata*

Los resultados obtenidos de la actividad de fosfatasa alcalina y la presencia de osteocalcina en las células aisladas entre la segunda y cuarta digestiones enzimáticas demostraron la presencia de ambas proteínas en el 98 % de las células analizadas, indicando que las células poseen características fenotípicas de osteoblastos.

#### *Estudios de Proliferación Celular*

##### *Efectos sobre el Contenido de DNA*

El efecto de las hormonas esteroideas naturales sobre la proliferación de los osteoblastos se muestra en la Figura 10. La adición de concentraciones crecientes (1-500 nM) de E<sub>2</sub> a los cultivos de osteoblastos estimularon un incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ), dosis-dependiente en el contenido de DNA (Figura 10 A), aún con la menor dosis empleada (1nM), cuando se comparó con los cultivos de osteoblastos expuestos al vehículo (Figura 10 C). El efecto del E<sub>2</sub> sobre el contenido de DNA también fue dependiente del tiempo de estimulación. Por el contrario, la adición de concentraciones idénticas de P los cultivos de osteoblastos, no indujo cambios sobre el contenido de DNA (Fig. 10 B), la ausencia de efecto fue evidente aún con la mayor dosis de P empleada (500 nM).

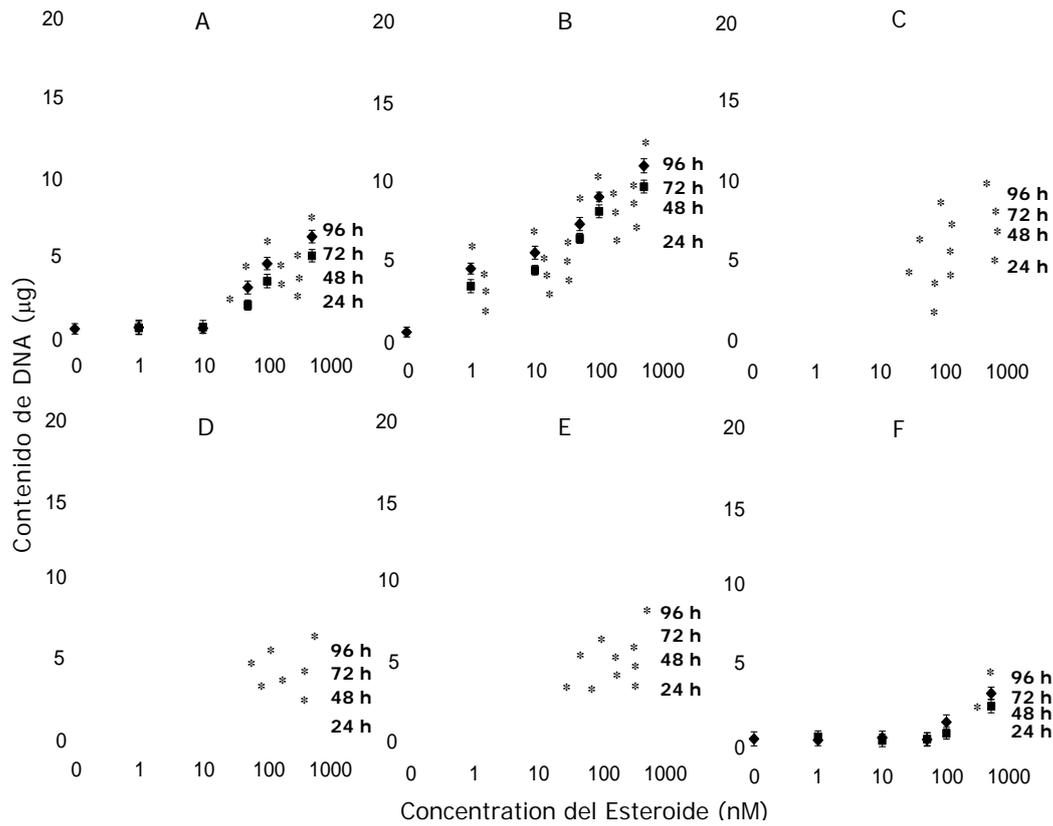


**Fig. 10.** Efecto de concentraciones crecientes de estradiol (A), progesterona (B) y propilenglicol (vehículo) (C) sobre el contenido de DNA de los osteoblastos. El DNA celular se determinó antes y después de 24, 48, 72 y 96 h de exposición a cada uno de los esteroides. El contenido de DNA en ausencia de esteroides (vehículo) fue de  $0.85 \pm 0.32 \mu\text{g}$ , en todos los períodos de incubación. Los valores representan la media  $\pm$  D. E. de tres experimentos por sextuplicado cada uno. \*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con el vehículo

Los efectos de NET, LNG y sus derivados reducidos en el anillo A sobre la proliferación celular se muestran en la Figura 11. La adición de NET a los cultivos de osteoblastos indujo un incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ) sobre el contenido de DNA (Figura 11 A), comparado con los cultivos expuestos a P y al vehículo (Figuras 10 B y C). El efecto de NET sobre los osteoblastos se observó a partir de la dosis de 50 nM y después de largos períodos (72 h y 96 h) de exposición de los cultivos con la progestina. La adición de pequeñas dosis de NET (1 nM y 10 nM) a los cultivos de osteoblastos no indujo cambios significativos en el contenido de DNA durante el tiempo de exposición. La estimulación de los cultivos de osteoblastos con concentraciones crecientes de  $3\beta,5\alpha$ -NET resultó en un incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ), dosis-dependiente sobre el contenido celular de DNA, aún en la menor dosis empleada (1nM), durante todos los períodos de exposición (Figura 11 B), semejante al efecto inducido por el  $E_2$ , aunque con menor extensión. El derivado  $3\alpha,5\alpha$ -NET también incrementó el

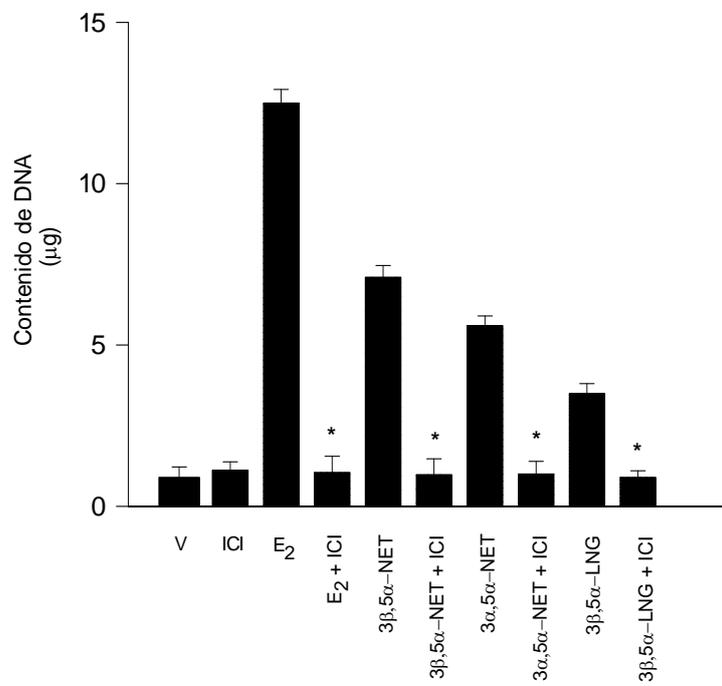
contenido de DNA en los cultivos de osteoblastos (Figura 11 C), aunque el efecto fue de menor potencia que el observado con su isómero 3 $\beta$ . Dosis pequeñas (1 nM y 10 nM) de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET fueron ineficientes sin embargo, 50 nM y dosis mayores (100 nM y 500 nM) incrementaron el contenido celular de DNA durante todos los períodos de exposición.

La progestina sintética LNG también incrementó el contenido de DNA, aunque el efecto fue menor que el inducido por NET. El efecto de LNG sobre la proliferación de los osteoblastos se observó a partir de la dosis de 50 nM y a las 72h y 96 h de estimulación (Figura 11 D). El efecto del derivado 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro de LNG sobre el contenido de DNA de los osteoblastos (Figura 11 E) fue mayor que el observado con LNG, aunque más débil que el efecto inducido por el derivado correspondiente 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro de NET. La adición de dosis elevadas dosis (500 nM) de 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -LNG a los cultivos de osteoblastos incrementó significativamente ( $P \leq 0.0001$ ), el contenido de DNA a partir de las primeras 24 h de estimulación. Por el contrario, el efecto inducido por el derivado 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -LNG sobre el contenido celular de DNA de los cultivos fue débil y tardío, a partir de las 72h y 96h (Figura 11 F).



**Fig. 11.** Efecto de dos progestinas sintéticas y sus derivados reducidos en el anillo A sobre el contenido celular de DNA en osteoblastos. Concentraciones crecientes de norestisterona (A), 3β,5α-NET (B), 3α,5α-NET (C), levonorgestrel (D), 3β,5α-LNG (E) y 3α,5α-LNG (F) se incubaron con osteoblastos durante 4 días. El contenido de DNA se determinó antes y después de 24, 48, 72 y 96 h de exposición a los esteroides. Los valores representan la media ± D. E. de tres experimentos por sextuplicado. \*, *P* < 0.0001 cuando se compararon con las incubaciones control (vehículo).

El efecto de ICI-182,780 sobre el incremento del contenido de DNA, inducido por los derivados 3β,5α-, 3α,5α-tetrahydro de NET y el derivado 3β,5α-reducido de LNG en



los cultivos de osteoblastos se muestra en la Fig. 12. La incubación de una dosis alta (500 nM) de  $3\beta,5\alpha$ -NET,  $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -LNG, en la presencia de 250  $\mu$ M de ICI-182-780 en cultivos de osteoblastos, durante 24 h suprimió significativamente ( $P \leq 0.0001$ ) el incremento sobre el contenido de DNA inducido por los derivados tetrahidro-reducidos.

**Fig. 12.** Efecto del antiestrógeno ICI 182 780 (ICI), sobre el incremento del contenido de DNA inducido en osteoblastos por estradiol ( $E_2$ ) y los derivados tetrahidro reducidos de noretisterona (NET) y levonorgestrel (LNG). Los osteoblastos se incubaron con 500 nM de  $E_2$ ,  $3\beta,5\alpha$ -NET,  $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -LNG en la presencia o ausencia de 250 $\mu$ M de ICI durante 24 h. Los valores representan la media  $\pm$  D. E. de tres experimentos por sextuplicado cada uno. \*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con incubaciones en ausencia del antiestrógeno.

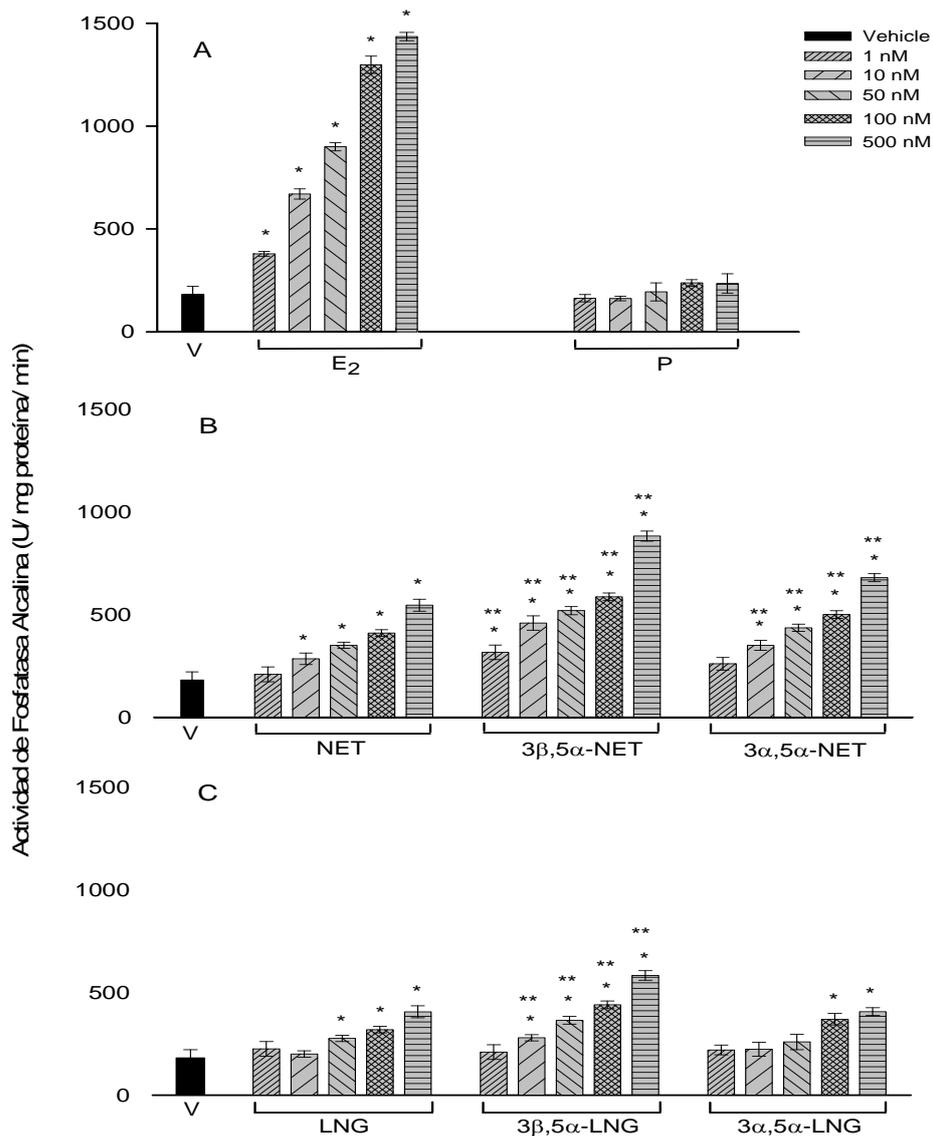
## **Estudios de Diferenciación**

### *Efectos sobre la Actividad de Fosfatasa Alcalina*

El efecto de concentraciones crecientes (1-500 nM) de  $E_2$  y P sobre la actividad de FA de los cultivos de osteoblastos se muestra en la Figura 13. La exposición de los osteoblastos a  $E_2$  resultó en un incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ), dosis-dependiente sobre la actividad de FA comparado con los cultivos expuestos al vehículo (Figura 13 A), mientras que la exposición de los osteoblastos a P, no indujo cambios en la actividad de la enzima, a ninguna de las dosis empleadas (Figura 13 A). Por el contrario, NET y sus derivados tetrahidro-reducidos incrementaron la actividad de FA en los cultivos de osteoblastos (Figura 13 B). La adición de 10 nM y dosis mayores (50 nM, 100 nM y 500 nM) de NET a los cultivos de osteoblastos resultó en un incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ) sobre la actividad de FA, comparado con los cultivos expuestos al vehículo. El derivado  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro-NET también indujo un incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ), dosis-dependiente sobre la actividad de FA de los osteoblastos, aún con la menor dosis empleada (1 nM) (Figura 13 B), de manera similar al efecto observado con dosis idénticas de  $E_2$  (Fig. 13 A), aunque con menor potencia. La adición de  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro-NET a los cultivos de osteoblastos también resultó en

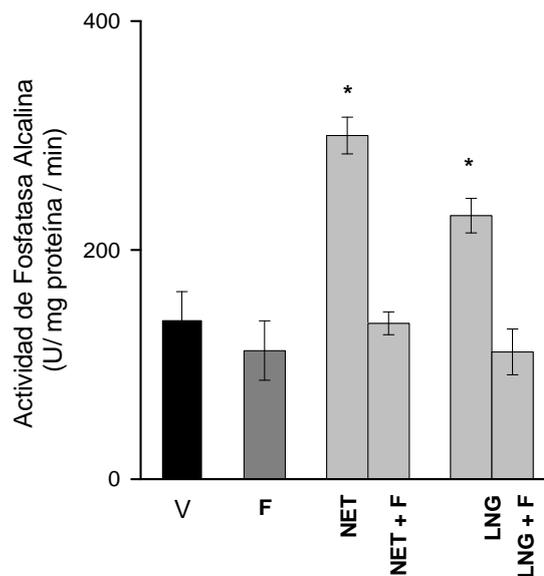
un incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ), dosis-dependiente de la actividad de FA, aunque con menor potencia que lo observado con su isómero  $3\beta$ .

La progestina sintética LNG indujo un efecto débil pero significativo ( $P \leq 0.0001$ ) sobre la actividad de FA de los osteoblastos, que fue evidente a partir de la dosis de 50 nM (Figura 13 C). La adición del derivado  $3\beta,5\alpha$ -LNG resultó en un incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ), dosis-dependiente sobre la actividad celular de FA en osteoblastos, evidente a partir de la dosis de 10 nM. El  $3\beta,5\alpha$ -LNG fue más potente que LNG para inducir la actividad de FA aunque de menor potencia que el inducido por  $E_2$ . El derivado  $3\alpha,5\alpha$ -LNG exhibió un incremento pequeño, pero significativo ( $P \leq 0.0001$ ), sobre la actividad de FA de los cultivos de osteoblastos, únicamente a dosis altas (100 y 500 nM).



**Fig. 13.** Efecto de estradiol y progesterona (A); norestisterona (NET),  $3\beta,5\alpha$ -NET y  $3\alpha,5\alpha$ -NET (B) y levonorgestrel (LNG),  $3\beta,5\alpha$ -LNG y  $3\alpha,5\alpha$ -LNG (C) sobre la actividad de fosfatasa alcalina en osteoblastos en cultivo. La actividad de fosfatasa alcalina se determinó en osteoblastos incubados con concentraciones crecientes (1-500 nM) de cada uno de los esteroides durante 15 días consecutivos. Los valores representan la media  $\pm$  D. E. de tres experimentos por sextuplicado cada uno. \*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con el vehículo (V) y \*\*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con las progestinas sintéticas correspondientes.

El efecto de finasteride, sobre el incremento de la actividad de FA inducida por NET y LNG en los cultivos de osteoblastos, se muestra en la Figura 14. La incubación de osteoblastos con una sola dosis (50 nM) de NET o LNG en presencia de  $75 \mu\text{M}$  de finasteride, durante 15, días suprimió significativamente ( $P \leq 0.0001$ ) el incremento de la actividad de FA inducido por las progestinas sintéticas.



**Fig. 14.** Efecto de finasteride (F), un inhibidor de  $5\alpha$ -esteroide reductasas, sobre el incremento de la actividad de fosfatasa alcalina inducida por progestinas sintéticas 19-nor. Los osteoblastos se incubaron con 50 nM de noretisterona (NET) o levonorgestrel (LNG) en presencia o ausencia de  $75 \mu\text{M}$  de F durante 15 días. Los resultados se expresan como actividad de fosfatasa alcalina (U/ mg proteína/ min). Los valores representan la media  $\pm$  D. E. de tres experimentos por sextuplicado cada uno. \*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con incubaciones en ausencia de F.

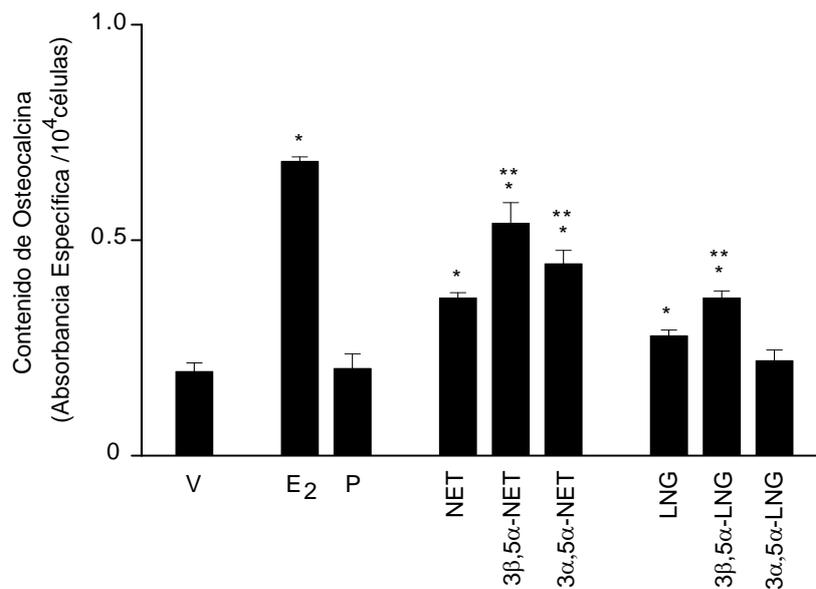
### *Efectos sobre el Contenido de Osteocalcina en Osteoblastos*

El efecto de los esteroides naturales y las progestinas sintéticas 19-nor y sus derivados tetrahidro reducidos sobre el contenido de OC en los cultivos de osteoblastos se muestra en la Figura 15. La incubación de osteoblastos con una dosis única (50 nM) de E<sub>2</sub>, durante 15 días, resultó en el incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ) del contenido de OC, comparado con los cultivos de osteoblastos incubados con vehículo. Por el contrario, la incubación de osteoblastos con 50 nM de P, no modificó el contenido celular de OC.

La adición de 50 nM de NET, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET en los cultivos de osteoblastos (Figura 15) resultó en el incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ) del contenido de OC, cuando se comparó con osteoblastos incubados con el vehículo. El efecto observado fue semejante al inducido por E<sub>2</sub>, aunque de menor potencia (Figura 15). El derivado 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET fue el inductor más potente del incremento del contenido de OC, aunque el efecto fue de menor potencia que el observado con E<sub>2</sub>. El derivado 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET también indujo incremento sobre el contenido celular de OC, aunque de menor potencia que el inducido por su isómero 3 $\beta$ , mientras que el efecto de NET, fue de menor potencia que los inducidos por sus derivados tetrahidro-reducidos.

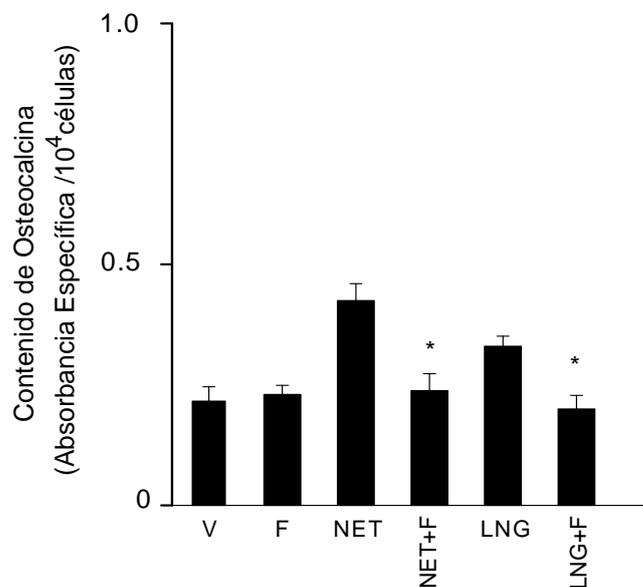
La exposición de cultivos de osteoblastos a una dosis idéntica (50 nM) de LNG y sus derivados reducidos durante 15 días resultaron en diferentes efectos. Como se muestra en la Figura 15, el derivado 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -LNG fue el más efectivo inductor del incremento del contenido de OC, aunque su efecto fue de menor potencia que el inducido por el derivado 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro de NET. El incremento del contenido de OC inducido por

LNG fue pequeño pero significativo ( $P \leq 0.001$ ) comparado con cultivos expuestos al vehículo, mientras que el derivado  $3\alpha,5\alpha$ -LNG fue ineficiente para inducir cambios en el contenido de OC.



**Fig. 15.** Efecto de estradiol y progesterona, las progestinas sintéticas y sus derivados tetrahidro-reducidos sobre el contenido celular de osteocalcina. Los osteoblastos se incubaron con una sola dosis (50 nM) de cada uno de los esteroides, durante 15 días consecutivos. Los resultados se expresaron como absorbancia específica/ 10,000 células. Los valores representan la media  $\pm$  D. E. de tres experimentos por sextuplicado cada uno. \*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con el vehículo; \*\*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con las progestinas sintéticas correspondientes.

El efecto de finasteride sobre el incremento del contenido de OC inducido por ambas progestinas en los cultivos de osteoblastos, se muestra en la Figura 16. Las incubaciones de los cultivos de osteoblastos con 50 nM de NET o LNG en presencia de 75  $\mu$ M de finasteride, durante 15 días suprimió significativamente ( $P \leq 0.0001$ ) el incremento del contenido de OC .inducido por ambas progestinas



**Fig. 16.** Efecto de finasteride (F) sobre el incremento del contenido de osteocalcina inducido en osteoblastos por progestinas sintéticas. Los osteoblastos se incubaron con 50 nM de noretisterona (NET) y levonorgestrel (LNG) en la presencia de 75 $\mu$ M de F durante 15 días. Los resultados se expresan como absorbancia específica/ 10000 células. Los valores representan la media  $\pm$  D. E. de tres experimentos por sextuplicado cada uno. \*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con las incubaciones en la ausencia de F.

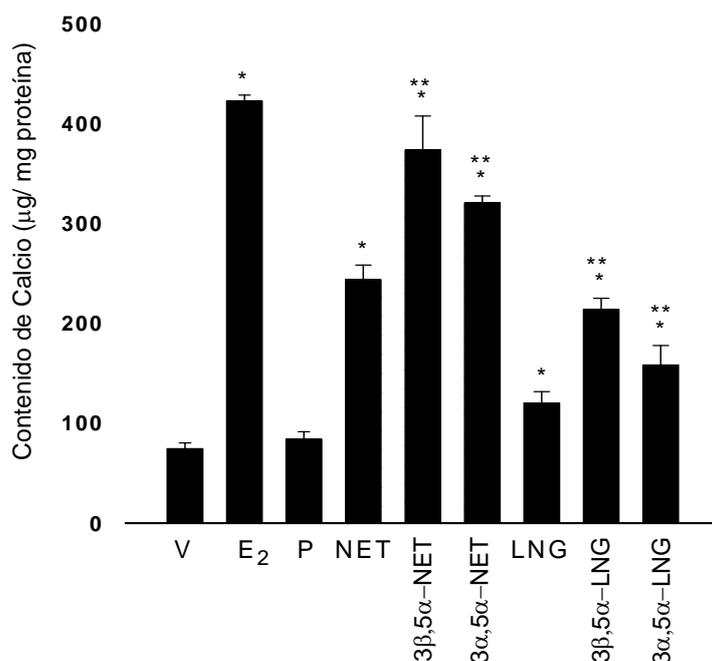
## Estudios de Mineralización

### *Efectos sobre el Contenido de Calcio*

El efecto de hormonas esteroides sexuales, progestinas sintéticas y sus derivados tetrahidro- reducidos sobre el contenido de calcio en cultivos de osteoblastos se muestra en la Figura 17. La estimulación de osteoblastos con 50 nM de E<sub>2</sub>, durante 15 días, resultó en un incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ) sobre el contenido de calcio comparado con cultivos de osteoblastos expuestos al vehículo mientras que, la adición de progesterona a los cultivos de osteoblastos resultó ineficiente. La exposición de cultivos de osteoblastos a 50 nM de NET, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - NET y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET resultó en un

incremento significativo ( $P \leq 0.0001$ ) del contenido de calcio, semejante al efecto inducido con  $E_2$ , aunque de menor potencia (Figura 17). El derivado  $3\beta,5\alpha$ -NET, el mejor inductor del incremento del contenido de calcio, fue menos potente que el de  $E_2$ . El derivado  $3\alpha,5\alpha$ -NET también estimuló incremento sobre el contenido de calcio, aunque el efecto fue de menor potencia que el de su isómero  $3\beta$ . El efecto de NET sobre el contenido de calcio fue significativamente menor ( $P \leq 0.0001$ ) que los inducidos por sus derivados tetrahidro-reducidos.

La exposición de cultivos de osteoblastos con 50 nM de LNG y sus derivados reducidos, durante 15 días, resultó en diferentes efectos. El derivado  $3\beta,5\alpha$ -LNG fue el inductor más efectivo del incremento del contenido de calcio, aunque su efecto fue significativamente ( $P \leq 0.0001$ ) de menor potencia que el inducido por el derivado  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro de NET (Figura 17). El derivado reducido  $3\alpha,5\alpha$ -LNG también estimuló un incremento sobre el contenido de calcio, aunque el efecto fue menor que el inducido por su epímero  $3\beta$ . La estimulación de cultivos de osteoblastos con LNG indujo un incremento pequeño, pero significativo ( $P \leq 0.0001$ ) sobre el contenido de calcio comparado con el vehículo.



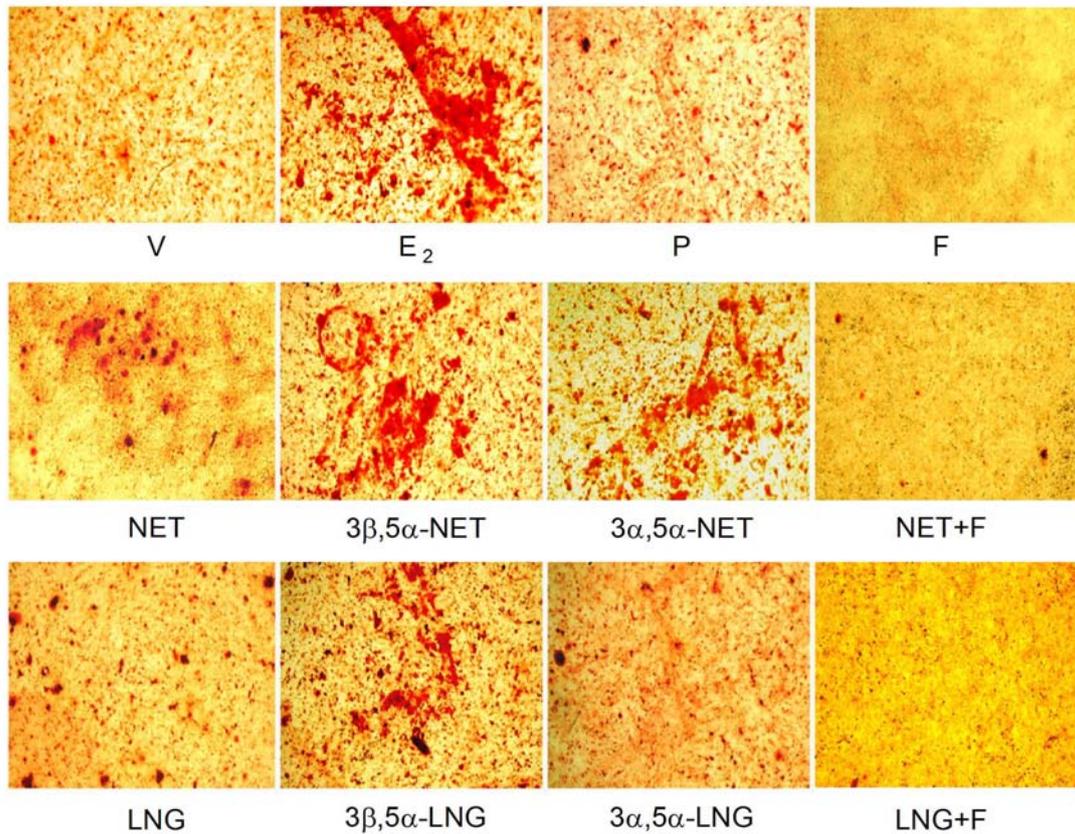
**Fig. 17.** Efecto de estradiol, progesterona, progestinas sintéticas y sus derivados tetrahidro-reducidos sobre el contenido de calcio. Los osteoblastos se incubaron con 50 nM de estradiol (E<sub>2</sub>), progesterona (P), noretisterona (NET), 3β,5α-NET, 3α,5α-NET, levonorgestrel (LNG), 3β,5α-LNG y 3α,5α-LNG durante 15 días, usando vehículo (V) como control. Los resultados se expresan como µg/ mg de proteína y los valores representan la media ± D. E. de tres experimentos por sextuplicado cada uno. \*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con el vehículo, \*\*,  $P < 0.0001$  cuando se compararon con las progestinas sintéticas correspondientes.

#### *Efectos sobre la Deposición Mineral*

La Figura 18 muestra la deposición mineral teñida con el rojo de Alizarina S, en los cultivos de osteoblastos estimulados con E<sub>2</sub>, P y NET, LNG y sus derivados 3α- y 3β-tetrahidro-reducidos. La adición de 50 nM de E<sub>2</sub> a los cultivos de osteoblastos estimuló una extensa y densa deposición mineral (406 X 10<sup>3</sup> pixeles), mientras que la P a la misma dosis fue ineficiente. La densidad de los depósitos minerales en los cultivos expuestos a P (117 X 10<sup>3</sup> pixeles) fue similar a la observada en los cultivos de osteoblastos incubados con el vehículo (110 X 10<sup>3</sup> pixeles). La estimulación de los cultivos de osteoblastos con NET indujo deposición mineral (191 X 10<sup>3</sup> pixeles) de menor densidad que la inducida con E<sub>2</sub>. La deposición mineral inducida por el derivado

$3\beta,5\alpha$ -NET ( $289 \times 10^3$  pixeles) fue mayor que la inducida por NET y similar a la estimulada por  $E_2$  aunque de menor potencia (Figura 18). El derivado  $3\alpha,5\alpha$ -NET ( $175 \times 10^3$  pixeles) también indujo deposición mineral, aunque con menor densidad que la formada con  $E_2$  y el derivado  $3\beta,5\alpha$ -NET.

LNG y sus derivados tetrahidro-reducidos particularmente, el  $3\beta,5\alpha$ -LNG ( $231 \times 10^3$  pixeles) estimularon la deposición de mineral en los cultivos de osteoblastos, de manera similar a NET y sus correspondientes derivados reducidos, aunque de menor densidad. La deposición mineral inducida por LNG fue de densidad similar ( $169 \times 10^3$ ) a la estimulada por el derivado  $3\alpha,5\alpha$ -LNG ( $160 \times 10^3$ ) (Figura 18). La adición de  $75\mu\text{M}$  de finasteride a los cultivos de osteoblastos estimulados con  $50 \text{ nM}$  de NET o LNG, durante 15 días, suprimió la deposición mineral inducida por las progestinas sintéticas (Fig. 18).



**Fig. 18.** Depósitos minerales en osteoblastos inducidos por estradiol ( $E_2$ ), progesterona (P), noretisterona (NET), levonorgestrel (LNG), y sus derivados tetrahidro-reducidos ( $3\beta,5\alpha$ -NET,  $3\alpha,5\alpha$ -NET,  $3\beta,5\alpha$ -LNG y  $3\alpha,5\alpha$ -LNG) teñidos con rojo de Alizarina-S. Los osteoblastos se incubaron con una sola dosis (50nM) de cada uno de los esteroides durante 15 días, usando vehículo (V) como control. Incubaciones en paralelo con NET o LNG se realizaron en presencia de finasteride (F). Las microfotografías estereoscópicas (magnificación: X 120) de una muestra representativa muestra las imágenes de la deposición mineral inducida por los esteroides y el efecto de F en osteoblastos incubados con las progestinas sintéticas. La escala de la barra es de 0 - 200  $\mu$ m.

## Discusión

Los resultados obtenidos a lo largo de este estudio contribuyen con una explicación plausible del modo de acción de las progestinas 19-nor en células osteoblásticas. Con el uso de cultivos primarios de osteoblastos, aislados de los parietales de ratas recién nacidas, se logra demostrar que dos progestinas derivadas de la serie 19-nor: NET y LNG ejercen efectos relevantes sobre la proliferación, diferenciación y mineralización

celular, mediados por sus derivados reducidos en el anillo A, mimetizando los efectos del  $E_2$ . Los resultados también aportan evidencia concluyente de que la P no estimula la actividad celular de osteoblastos. El hallazgo de que P carece de efecto esta de acuerdo con la observación de que el modelo del ratón portador de una mutación en el gen que expresa el receptor de P no tiene alteraciones aparentes en la densidad de su masa ósea, ni en la histomorfometría del hueso, lo que indica que los receptores de P no tienen un papel biológico en los procesos que dirigen y orientan el desarrollo normal del hueso (101). En contraste, la NET y en menor extensión el LNG, en dosis altas a partir de 50 nM y después de 48 h de cultivo, estimulan de una manera dosis-dependiente, la proliferación de osteoblastos. El efecto de las progestinas 19-nor es similar al observado con  $E_2$ , aunque con menor potencia. Esta observación confirma y extiende la demostración experimental de que la NET estimula la proliferación de células de osteosarcoma humano (102).

El hallazgo experimental más sorprendente es que los derivados  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro reducidos de NET y LNG estimulan eficientemente la proliferación de los osteoblastos, con mayor potencia que las progestinas sin modificaciones, de manera similar al efecto observado con  $E_2$ . El derivado  $3\alpha,5\alpha$ -reducido de NET también induce un aumento significativo en la proliferación de osteoblastos en cultivo, aunque de menor potencia que el de su epímero  $3\beta$  mientras que, el derivado  $3\alpha,5\alpha$  de LNG es inefectivo para inducir la proliferación celular. Estos resultados sugieren fuertemente que el incremento de la proliferación de osteoblastos inducido por NET y LNG, son mediados por sus derivados tetrahidro-reducidos y de la interacción posterior con los receptores intracelulares de estrógenos. Este concepto se sustenta con la observación de que el ICI 162 780, un potente antagonista esteroidal de los receptores de estrógenos, suprime la

proliferación osteoblástica inducida por los derivados tetrahidro-reducidos de NET y LNG de una manera idéntica a lo que ocurre con la supresión de la proliferación celular inducida con E<sub>2</sub>.

Las dos progestinas 19-nor y sus derivados reducidos en el anillo A también exhiben efectos relevantes sobre la diferenciación de los osteoblastos, establecida por los cambios sobre la actividad de FA el contenido de OC. Los efectos de los esteroides sintéticos sobre los dos biomarcadores celulares, se observan después de 15 días consecutivos de estimulación con los esteroides, de manera similar a los efectos inducidos con E<sub>2</sub>. Esta observación correlaciona con los hallazgos de Stein y cols. (103) y Qu y cols. (36) quienes demostraron que la expresión del RNAm de FA el RNAm de OC inducida por el E<sub>2</sub> en osteoblastos de roedores no fueron detectados antes del día 12 consecutivo de estimulación. Interesantemente, el efecto del incremento de los dos biomarcadores inducido por los derivados 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -reducidos de NET y LNG fue de mayor potencia que el inducido por las progestinas sintéticas 19-nor sin modificaciones. Los derivados 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -reducidos de NET y LNG también estimularon el incremento de la actividad de FA y el contenido de OC en osteoblastos en cultivo, aunque con menor potencia que los efectos inducidos por sus epímeros 3 $\beta$ . Los efectos de NET y LNG sobre la diferenciación celular en los osteoblastos fueron suprimidos por la adición de F, inhibidor esteroideal específico de las 5 $\alpha$ -esteroide reductasas, (104); este hallazgo sugiere fuertemente que los efectos inducidos por las progestinas sintéticas 19-nor sobre la diferenciación, son mediados por sus productos reducidos en el anillo A, formados por conversión metabólica.

Los resultados de los estudios de mineralización en los osteoblastos en cultivo revelaron que el E<sub>2</sub> fue el esteroide más potente para inducir incremento en el contenido de calcio en los cultivos, tal y como lo demostró Qu y cols (36) en los osteoblastos de ratón, mientras que la P fue completamente ineficiente. En contraste, las progestinas sintéticas y sus derivados tetrahidro-reducidos, exhibieron un efecto evidente sobre la mineralización, similar a lo observado con E<sub>2</sub>.

El hallazgo más relevante fue que los derivados 3β,5α y 3α,5α de NET estimularon incremento en la acumulación de calcio con una potencia comparable a la del E<sub>2</sub>. Los derivados reducidos de LNG también estimularon incremento sobre el contenido de calcio en los cultivos de osteoblastos, aunque con menor potencia. El efecto de E<sub>2</sub>, las progestinas sintéticas y sus derivados tetrahidro-reducidos sobre la mineralización de los osteoblastos fue aún más evidente cuando se usó el rojo de Alizarina S para visualizar los depósitos de calcio en los cultivos. Las imágenes microestereoscópicas de los depósitos minerales en los cultivos de osteoblastos expuestos a los esteroides, correlacionan positivamente con el contenido celular de calcio. Los más potentes inductores de la deposición de calcio fueron E<sub>2</sub> y los derivados 3β,5α-reducidos de NET y LNG. Las progestinas sin modificaciones y sus derivados 3α,5α-reducidos también indujeron la mineralización, aunque en una menor proporción, mientras que la P no exhibió ningún efecto. Interesantemente, el finasteride también suprimió la formación de depósitos de calcio inducidos por NET y LNG en los cultivos de osteoblastos, brindando un apoyo adicional al concepto de que los efectos de las progestinas sintéticas 19-nor sobre la diferenciación de los osteoblastos son mediados a través de sus metabolitos no fenólicos, reducidos en el anillo A.

La presencia de enzimas que reducen el anillo A de los andrógenos y de las progestinas sintéticas ha sido demostrada en las células osteoblásticas. En efecto, la actividad de

5 $\alpha$ -esteroide reductasa se ha documentado por Shimodaira y cols.(105), mientras que Issa y cols. (106) han informado la expresión de los genes de las 5 $\alpha$ -esteroide reductasas tipos 1 y 2 en células osteoblásticas humanas. Vittek y cols. (107) demostraron la presencia de la 3 $\alpha$  pero no de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa en el hueso mandibular de la rata y estudios recientes en nuestro laboratorio, usando dilución isotópica inversa, demuestran la presencia de 3 $\alpha$ - y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas, dos miembros de la superfamilia de las aldo-ceto reductasas, en osteoblastos de la calvaria de la rata neonatal (datos aún no publicados).

En conclusión, los resultados experimentales en su conjunto son consistentes con los informes previos de nuestro grupo de investigación, que demuestran que los diversos efectos estrógeno-agonistas de NET y LNG son mediados por sus derivados no fenólicos, reducidos en el anillo A (82, 83, 78) y están en línea, con el concepto de que la progestinas sintéticas 19-nor son agentes efectivos para estimular la formación de masa ósea, observado en estudios clínicos controlados. Adicionalmente, usando sistemas celulares de expresión génica por co-transfección, nuestro grupo ha demostrado que los metabolitos no fenólicos, reducidos en el anillo A de las progestinas sintéticas 19-nor son capaces de transactivar genes dependientes de estrógenos, mediados a través de los receptores  $\alpha$  de estrógenos, pero no a través del receptor  $\beta$  de estrógenos (84, 85), comportándose los derivados reducidos de las progestinas sintéticas como moduladores altamente selectivos. Estudios adicionales sobre los efectos de los derivados reducidos de las progestinas, sobre el tejido mamario se requieren llevar a cabo, particularmente debido a que se ha reportado sobreexpresión del gen de la 5 $\alpha$ -esteroide reductasa tipo 1 en células de la glándula mamaria normales y neoplásicas y en cáncer mamario (109-110).

En conclusión, los resultados experimentales en su conjunto son consistentes con los informes previos de nuestro grupo de investigación, que demuestran que los diversos efectos estrógeno-agonistas de NET y LNG son mediados por sus derivados no fenólicos, reducidos en el anillo A (82, 83, 78) y están en línea, con el concepto de que la progestinas sintéticas 19-nor son agentes efectivos para estimular la formación de masa ósea, observado en estudios clínicos controlados. Adicionalmente, usando sistemas celulares de expresión génica por co-transfección, nuestro grupo ha demostrado que los metabolitos no fenólicos, reducidos en el anillo A de las progestinas sintéticas 19-nor son capaces de transactivar genes dependientes de estrógenos, mediados a través de los receptores  $\alpha$  de estrógenos, pero no a través del receptor  $\beta$  de estrógenos (84, 85), comportándose los derivados reducidos de las progestinas sintéticas como moduladores altamente selectivos. Estudios adicionales sobre los efectos de los derivados reducidos de las progestinas, sobre el tejido mamario se requieren llevar a cabo, particularmente debido a que se ha reportado sobreexpresión del gen de la  $5\alpha$ -esteroide reductasa tipo 1 en células de la glándula mamaria normales y neoplásicas y en cáncer mamario (109-110).

Los datos presentados en esta tesis, proporcionan información relevante sobre los mecanismos moleculares a nivel celular, involucrados en la inducción de efectos estrogénicos de las progestinas sintéticas 19-nor, las cuales son ampliamente utilizadas en la prevención y tratamiento de las pérdida de masa ósea en la mujer posmenopáusicas y contribuyen a la generación de propuestas de investigación alternas para el diseño de nuevas formulaciones de reemplazo hormonal.

## Referencias

1. Datos Estadísticos del INEGI, 2004.
2. CONAPO, INEGI y COLMEX. Conciliación demográfica 2000-2005. Septiembre, 2006.
3. Malacara JM, Canto de Cetina T, Bassol S, González N, Cacique L, Vera-Ramirez ML y Nava LE 2002 Symptoms at pre- and postmenopause in rural and urban women from three States of México. *Maturitas* 43:11-193.
4. WHO Scientific Group on Research on the Menopause in the 1990s. *WHO Technical Report Series*. Geneva, Switzerland: WHO, 1996.
5. Murrillo-Uribe A, Delezé-Hinojosa M, Aguirre E, Villa A, Calva J, Cons F, Briceño A, González G, Morales J, Pena H, Guerrero G, Orozco J, Morales G y Elizondo J 1999 Osteoporosis en la mujer postmenopáusica mexicana. Magnitud del problema. Estudio multicéntrico. *Ginecología y Obstetricia de México* 67: 227-233
6. Datos Estadísticos del INEGI. Abril, 2005.
7. -Velasco V, Hernández-Navarrete E, Cavanzo-Pozos JL, Mijares-Ojeda RI, Camacho-Rodríguez A 2003 Fracturas en mujeres postmenopáusicas en el IMMS: frecuencia y costos de su atención hospitalaria. *Gaceta Médica de México* 139: 453-458.
8. Datos Estadísticos INEGI, 1995
9. Barreira M A, Delezé HM, Morales TJ 2000 Pérdida de masa ósea durante el climaterio. *Revisión en Endocrinología y Nutrición* 8: 43-47.
10. Albrigh F, Bloomberg E y Smith PH 1940 Postmenopausal osteoporosis. *Transactions of the Association of American Physicians* 55: 305-308.

11. Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, MacDonald EB, Anderson JB y Clarke AC 1976 Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. *Lancet* 1: 1038-1041.
12. Heaney RP, Recker RR y Saville PD 1978 Menopausal changes in bone remodeling. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 92: 964-970.
13. Lindsay R y Tohme JF 1990 Estrogen treatment of patients with established postmenopausal osteoporosis. *Obstetrics and Gynecology* 76: 290-295.
14. Ettinger B, Gerant HK y Cann CE 1995 Long term estrogen replacement therapy prevents bone loss and fractures. *Annals of Internal Medicine* 102: 319-324.
15. Khastgir G, Studd J, Holland N, Alagband-Zadeh J, Fox S y Chow J 2001 Anabolic effect of estrogen replacement on bone in postmenopausal women with osteoporosis: histomorphometric evidence in a longitudinal study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86: 289-295.
16. Gallagher JC, Kable WT y Goldgar D 1991 Effect of progestin therapy on cortical and trabecular bone: Comparison with estrogen. *The American Journal of Medicine* 90: 171-178.
17. Riis BJ, Thomsen K, Strøm V y Christiansen C 1987 The Effect of percutaneous estradiol and natural progesterone on postmenopausal bone loss. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 156: 61-65.
18. Christiansen C y Riis BJ 1990  $17\beta$ -estradiol and continuous norethisterone: a unique treatment for established osteoporosis in elderly women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 71: 836-841.
19. Bjarnason NH, Byrjalsen I, Hassager C, Haarbo J y Christiansen C 2000 Low doses of estradiol in combination with gestodene to prevent early postmenopausal bone loss. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 183: 550-561

20. Scholes D, LaCroix AZ, Ichikawa LE, Barlow WE y Ott SM 2002 Inyectable hormone contraception and bone density: Results from a prospective study. *Epidemiology* 13: 581-587.
21. Vedi S, Purdie DW, Ballard P, Bord S, Cooper AC y Compston JE 1999 Bone remodeling and structure in postmenopausal women treated with long-term, high-dose estrogen therapy. *Osteoporosis International* 10: 52-58.
22. Tobias JH y Compston JE 1999 Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women?. *Bone* 24: 121-124.
23. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Pseri , Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H y Manolagas SC 1992 Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 257: 88-91.
24. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR y Boyce BF 1996 Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nature Medicine* 2: 1132-1136.
25. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL y Riggs L 2003 Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *The Journal of Clinical Investigation* 111: 1221-1230.
26. Michael H, Harkonen PL, Vaananen HK y Hentunen TA 2005 Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *Journal Bone and Mineral Research* 20: 2224-2232.
27. Hofbauer, LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL 2000 The roles the osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* 15: 2-12.
28. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM y Pike JW 2000 Estrogens suppress RANKL-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent

- mechanism involving c-Jun repression. *Proceedings of the National Academic of Sciences U.S.A* 97: 7829-7834.
29. Edwards MW, Bain SD, Bailey MC, Lantry MM y Howard GA 1992 17 $\beta$ -estradiol stimulation of endosteal bone formation in the ovariectomized mouse: an animal model for the evaluation of bone-targeted estrogens. *Bone* 13: 29-34.
30. Chow J, Tobias JH, Colston KW y Chambers TJ 1992 Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by supresión of resorption but also by stimulation of bone formation. *Journal of Clinical Investigation* 89: 74-78.
31. Yamamoto Y, Kurabayashi T, Tojo Y, Yahata T, Honda A, Tomita M & Tanaka K 1998 Effects of progestins on the metabolism of cancellous bone in aged oophorectomized rats. *Bone* 22: 533-537.
32. Masuyama A, Ouchi Y, Sato F, Hosoi T, Nakamura T y Orimo H 1992 Characteristics of steroid hormone receptors in cultured MC3T3-E1 osteoblastic cells and effect of steroid hormones on cell proliferation. *Calcified Tissue International* 51: 376-381.
33. Ikegami A, Inoue S, Hosoi T, Kaneki M, Mizuno Y, Akedo Y, Ouchi Y y Orimo H 1994 Cell cycle-dependent expression of estrogen receptor and effect of estrogen on proliferation of synchronized human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology* 135: 782-789.
34. Majeska RJ, Ryaby JT y Einhorn TA 1994 Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. *Journal of Bone and Joint Surgery* 76-A: 713-721.
35. Ernst M, Schmid CH y Froesch ER 1988 Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. *Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A.* 85: 2307-2310.

36. Qu Q, Perälä-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Väänänen HK y Härkönen, P 1998 Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone* 22: 201-209.
37. Scheven BAA, Damen CA, Hamilton NJ, Verhaar HJJ y Duursma SA 1992 Stimulatory effects of estrogen and progesterone on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells *in vitro*. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 186: 54-60.
38. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB y Korach KS 1994 Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *The New England Journal of Medicine* 331: 1056-1061.
39. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C y Qin K 1995 Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80: 3689-3698.
40. Namara PM y Loughrey HC 1998 Progesterone receptor A and B isoform expression in human osteoblasts. *Calcified Tissue International* 63: 39-46.
41. Rickard DJ, Waters KM, Ruesink TJ, Khosla S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS Riggs BL y Spelsberg TC 2002 Estrogen receptor isoform-specific induction of progesterone receptors in human osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research* 17: 580-592.
42. Canalis E y Raisz LG 1978 Effects of sex steroids on bone collagen synthesis *in vitro*. *Calcified Tissue Research* 25: 105-110.

43. Barbagallo M, Carbognani A, Palummeri E, Chiavarini M, Pedrazzoni M, Bracchi PG y Passeri M 1989 The comparative effect of ovarian hormone administration on bone mineral status in oophorectomized rats. *Bone* 10: 113-116.
44. Tremollieres FA, Strong DD, Baylink DJ y Mohan S 1992 Progesterone and promegestone stimulate human bone cell proliferation and insulin-like growth factor-2 production. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)* 126: 329-337.
45. Kalu DN, Salerno E, Liu CC, Echon R, Ray M, Garza-Zapata M y Hollis BW 1991 A comparative study of the actions of tamoxifen, estrogen and progesterone in the ovariectomized rat. *Bone and Mineral* 15: 109-124.
46. Roux C, Kolta S, Chappard C, Morieux C, Dougados M y De Vernejoul MC 1996 Bone effects of dydrogesterone in ovariectomized rats: A biologic, histomorphometric, and densitometric study. *Bone* 19: 463-468.
47. Ikram Z, Dulipsingh L y Prestwood KM 1999 Lack of effect of short-term micronized progesterone on bone turnover in postmenopausal women. *Journal of Women's Health and Gender-Based Medicine* 8: 973-978.
48. Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators 2002 Ricks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 288: 321-333
49. McTiernan A, Martin CF, Peck JD, Aragaki A, Chlebowski RT, Pisano ED, Wang CY, Brunner RL, Johnson KC, Manson JE, Lewis CE, Kotchen JM y Hulka BS 2005 for the Women's Health Initiative Mammogram Density Study Investigators. *Journal of the National Cancer Institute* 97: 1366-1376

50. Auranen A, Hietanen S, Salmi T y Grénman S 2005 Hormonal treatments and epithelial ovarian cancer risk. *International Journal Gynecological Cancer* 15: 692-700.
51. Coutinho EM 1966 Reversible sterility induced by medroxyprogesterone injections. *Fertility and Sterility* 17: 261-266
52. Garza-Flores J, Cravioto MC y Pérez-Palacios G 1992 Steroid injectable contraception: Current concepts and perspectives. En: *Contraception: Newer pharmacological agents, devices and delivery systems*. R Struk-Ware. CW Bardin (Eds.) MerceL Dekker, Inc, New York, pp 41-70.
53. Martínez-Manaoutou J 1967 Daily progestogen for contraception: A clinical study. *British Medical Journal* 2: 730-735.
54. Fotherby K y Caldwell ADS 1994 New progestogens in oral contraception. *Contraception* 49: 1-132.
55. Wilde MI y Balfour AJ 1995 Gestoden: a review of its pharmacology, efficacy and tolerability in combined contraceptive preparations. *Drugs* 50: 364-395.
56. Djerassi C, Miramontes L y Rosenkranz G 1952 Steroids 19-nor-17-ethynyltestosterone and 19-nor-17-methyltestosterone. Meeting of the *American Chemical Society* Abstract p18J.
57. Djerassi C, Miramontes L, Rosenkranz G y Sondheimer F 1954 Steroids-LIV. Synthesis of 19-Nor-17 $\alpha$ -ethynyltestosterone and 19-Nor-17 $\alpha$ -methyltestosterone. *Journal of the American Chemical Society* 76: 4092-4094.
58. Smith H, Hughes GA, Douglas GH, Hartley D, McLoughlin BJ, Siddall JB, Wend GR, Buzby GC Jr, Herbst DR, Ledig KW, McMenamín JR, Pattison TW, Suida J, Tokolics J, Edgren RA, Jansen AB, Gadsby B, Watson DH y Phillips PC 1963

Totally synthetic-13-alkyl-3-hydroxy and methoxygona-1.3.5(10)-trien-17-ones and related compounds. *Experientia* 19: 394-396.

59. Paiva LC, Pinto-Neto AM y Faundes A 1998 Bone density among long-term users of medroxiprogesterone acetate as a contraceptive. *Contraception* 58: 351-355.
60. Tang OS, Tang G, Yip P, Li B y Fan S 1999 Long-term depot-medroxiprogesterone acetate and bone mineral density. *Contraception* 59:25-29.
61. Ott SM, Scholes D, LaCroix AZ, Ichikawa LE, Yoshida CK y Barlow WE 2001 Effects of contraceptive use on bone biochemical markers in young women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86: 179-185.
62. Lindsay R, Aitken JM, Hart DM y Purdie D 1978 The effect of ovarian sex steroids on bone mineral status in the oophorectomized rat and in the human. *Postgraduate Medical Journal* 54 (Suppl. 2): 50-58.
63. Abdalla HI, Hart DM, Lindsay R, Leggate I y Hooke A 1985 Prevention of bone mineral loss in postmenopausal women by norethisterone. *Obstetrics and Gynecology* 66: 789-792.
64. Christiansen C, Riis BJ, Nilas L, Rodbro P y Deftos L 1985 Uncoupling of bone formation and resorption by combined oestrogen and progestagen therapy in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 2: 800-801.
65. Selby PL, Peacock M, Barkworth SA, Brown WB y Taylor GA 1985 Early effects of ethinyloestradiol and norethisterone treatment in post-menopausal women on bone resorption and calcium regulating hormones. *Clinical Sciences (London)* 69: 265-271.
66. Christiansen C 1990 17Beta-estradiol and continuous norethisterone: a unique treatment for established osteoporosis in elderly women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 71:836-841.

67. Horowitz M, Wishart JM, Need AG, Morris HA y Nordin BEC 1993 Effects of norethisterone on bone related biochemical variables and forearm bone mineral in post-menopausal osteoporosis. *Clinical Endocrinology* (Oxford) 39: 649-655.
68. Scopacasa F, Horowitz M, Need AG, Morris HA y Nordin BEC 1999 The effects of low dose norethisterone on biochemical variables in postmenopausal women. *Osteoporosis International* 9: 494-498.
69. Delmas PD, Confavreux E, Garnero P, Fardellone P, De Vernejoul MC, Cormier C y Arce JC 2000 A combination of low doses of 17 $\beta$ -estradiol and norethisterone acetate prevents bone loss and normalizes bone turnover in postmenopausal women. *Osteoporosis International* 11: 177-187.
70. Naessen T, Olsson S-E y Gudmundson J 1995 Differential effects on bone density of progestogen-only methods for contraception in premenopausal women. *Contraception* 52: 35-39.
71. Di X, Li Y, Zhang C, Jiang J y Gu S 1999 Effects of levonorgestrel-releasing subdermal contraceptive implants on bone density and bone metabolism. *Contraception* 60: 161-166.
72. Hassager C, Riis BJ, Podenphant J y Christiansen C 1989 Nandrolone decanoate treatment of post-menopausal osteoporosis for 2 years and effects of withdrawal. *Maturitas* 11: 305-317.
73. Passeri M, Pedrazzoni M, Pioli G, Butturini L, Ruys AH y Cortenraad MG 1993 Effects of nandrolone decanoate on bone mass in established osteoporosis. *Maturitas* 17: 211-219.
74. Jerome CP, Power RA, Obasanjo IO, Register TC, Guidry M, Carlson CS y Weaver DS 1997 The androgenic anabolic steroid nandrolone decanoate prevents osteopenia

- and inhibits bone turnover in ovariectomized cynomolgus monkeys. *Bone* 20: 355-364.
75. Li X, Takahashi M, Kushida K, Shimizu S, Hoshino H, Suzuki M y Inoue T 2000 The effects of nandrolone decanoate on bone mass and metabolism in ovariectomized rats with osteopenia. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 18: 258-263.
76. Chávez BA, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca I y Pérez-Palacios G 1985 Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry* 22: 121-126.
77. Lemus AE, Zaga V, Santillán R, García GA, Grillasca I, Damián-Matsumura P, Jackson KJ Cooney AJ, Larrea F y Pérez-Palacios G 2000 The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites. *Journal of Endocrinology* 165: 693-702.
78. Santillán R, Pérez-Palacios G, Reyes M, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I y Lemus AE 2001 Assessment of the oestrogenic activity of the contraceptive progestin levonorgestrel and its non-phenolic metabolites. *European Journal of Pharmacology* 427: 167-174.
79. Gual C, Morato T, Hayano M, Gut M y Dorfman RI 1962 Biosynthesis of estrogens. *Endocrinology* 71: 920-925.
80. Breuer H 1970 Metabolism of progestagens. *Lancet* 2: 615-616.
81. Larrea F, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores J y Pérez-Palacios G 1987 The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *Journal of Steroid Biochemistry* 27: 657-663.
82. Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, García GA, Angeles A y Pérez-Palacios G 1986 Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-

- dependent pituitary progestin receptors. *Journal of Steroid Biochemistry* 24: 525-531.
83. Morali G, Lemus AE, Oropeza MV, García GA y Pérez-Palacios G 1990 Induction of male sexual behavior by norethisterone: Role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacology and Biochemical Behaviour* 37: 477-484.
84. Larrea F, García-Becerra R, Lemus AE, García GA, Pérez-Palacios G, Jackson KJ, Coleman KM, Dace R, Smith CL y Cooney AJ 2001 A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER $\alpha$ . *Endocrinology* 142: 3791-3799.
85. García-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Pérez-Palacios G y Larrea F 2002 The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- $\alpha$ . *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 82: 333-341.
86. Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chávez BA, García GA, Grillasca I y Pérez-Palacios G 1992 Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 41: 881-890.
87. Lemus AE, Santillán R, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I y Pérez-Palacios G 2001 In vitro metabolism of gestodene in target organs: formation of A-ring reduced derivatives with oestrogenic activity. *European Journal of Pharmacology* 417: 249-256.
88. Bowers A, Ringold HJ y Denot E 1958 Steroid CI 19-nordihydrotestosterone derivatives. *Journal of the American Chemical Society* 80: 6115-6121.

89. Robey PG 1995 Collagenase-treated trabecular bone fragments: a reproducible source of cells in the osteoblastic lineage. *Calcified Tissue International* 56 (Suppl 1): S11-12.
90. Arzate H, Alvarez-Pérez MA, Aguilar-Mendoza ME y Alvarez-Fregoso O 1998 Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro. *Journal Periodontal Research* 33: 249-258.
91. Kaplow LS 1955 A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood* 10: 1023-1027.
92. Labarca C y Paigen K 1980 A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Analytical Biochemistry* 102: 344-352.
93. Posen S y Grunstein HS 1982 Turnover rate of skeletal alkaline phosphatase in humans. *Clinical Chemistry* 28: 153-154.
94. Canalis E 1983 Effect of hormones and growth factors on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured rat calvariae. *Metabolism* 32: 14-20.
95. Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Chapuy MC y Meunier PJ 1984 Serum bone gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1: 1091-1093.
96. Lowry OH, Roberts NR, Wu M-L, Hixon WS y Crawford EJ 1954 The quantitative histochemistry of brain. II Enzyme measurements. *Journal of Biological Chemistry* 207: 19-37.
97. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

98. Nibbering PH, Van de Gevel JS y Van Furth R 1990 A cell-ELISA for the quantification of adherent murine macrophages and the surface expression of antigens. *Journal of Immunology Methods* 131: 25-32.
99. Stevens A 1990 Pigment and minerals: En Theory and Practice of Histological Techniques, 3a ed. , JD Bancroft y A Stevens (Eds.) pp 245-267. Edinburgh: Churchill Livingstone.
100. Montgomery DC 1991 Design and analysis of experiments. Belmont, Wiley, pp. 537.
101. Bain SD, Lydon JP, Tibbetts T, Strachan MJ, Puerner DA y O'Malley BW 1997 Mice lacking functional progesterone receptors have no apparent alterations in peak bone mass or bone histomorphometry. *Journal of Bone and Mineral Research* 12: S46 (Abstract S432).
102. Lau K-HW, Wang SP, Linkhart TA, Demarest KT y Baylink DJ 1994 Picomolar norethindrone in vitro stimulates the cell proliferation and activity of a human osteosarcoma cell line and increases bone collagen synthesis without an effect on bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* 9: 695-703.
103. Stein GS, Lian JB y Owen TA 1990 Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB Journal* 4: 3111-3123.
104. Stuart JD, Lee FW, Noel DS, Kadwell SH, Overton LK, Hoffman CR, Kost TA, Tippin TK, Yeager RL, Batchelor KW y Bramson HN 2001 Pharmacokinetic parameters and mechanisms of inhibition of rat type 1 and 2 steroid 5 $\alpha$ -reductases: determinants for different in vivo activities of GI198745 and finasteride in the rat. *Biochemical Pharmacology* 62: 933-942.

105. Shimodaira K, Fujikawa H, Okura F, Shimizu Y, Saito H y Yanaihara T 1996 Osteoblast cells (MG-63 and HOS) have aromatase and 5 $\alpha$ -reductase activities. *Biochemistry and Molecular Biology International* 39: 109-116.
106. Issa S, Schnabel D, Feix M, Wolf L, Schaefer H-E, Russell DW y Schweikert H-U 2002 Human osteoblast-like cells express predominantly steroid 5 $\alpha$ -reductase type 1. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 5401-5407.
107. Vittek J, Altman K, Gordon GG y Southern LA 1974 The metabolism of 7 $\alpha$ -<sup>3</sup>H-testosterone by rat mandibular bone. *Endocrinology* 94: 325-329.
108. Suzuki T, Darnel AD, Akahira J-I, Ariga N, Ogawa S, Kaneko C, Takeyama J, Moriya T y Sasano H 2001 5 $\alpha$ -reductases in human breast carcinoma: possible modulator of in situ androgenic actions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86: 2250-2257.
109. Wiebe JP, y Lewis MJ 2003 Activity and expression of progesterone metabolizing 5 $\alpha$ -reductase, 20 $\alpha$ -hydroxy steroid oxido reductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB 231, T-471) and nontumorigenic (MCF-10A human breast cells. *BMC Cancer* 3:1-15.
110. Pérez-Palacios G, Santillán R, García-Becerra R, Borja-Cacho E, Larrea F, Damían-Matsumura P, González L y Lemus AE 2006 Enhanced formation of non-phenolic androgen metabolites with intrinsic oestrogen-like gene transactivation potency in human breast cancer cells: a distinctive metabolic pattern. *Journal of Endocrinology* 190:805-818.

