



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EL TRANSPORTE PLASMÁTICO DE PROGESTINAS SINTÉTICAS**

**T E S I S**

Que para obtener el Título de

**B I O L O G O**

presenta

**MARCELA LINCE CAMPILLO**

**MEXICO, D. F.**

**1983**



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.

## CONTENIDO

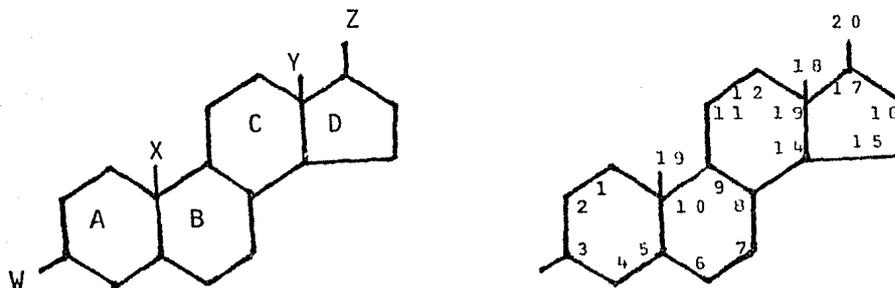
	página
I. Introducción .....	1
II. Objetivos .....	19
III. Material y Métodos .....	21
- Soluciones y Reactivos .....	21
- Hormonas radioactivas y no ra - dioactivas .....	22
- Material Biológico .....	22
- Purificación de la Proteína Uni- dora de Andrógenos (PUA) .....	24
- Purificación de la Proteína Uni- dora de Testosterona y Estradiol (GUTE) .....	25
- Estudios de Unión .....	27
IV. Resultados .....	32
V. Discusión .....	50
VI. Conclusiones .....	53
VII. Bibliografía .....	54

## I. INTRODUCCION

Las hormonas esteroides se encuentran en la naturaleza tanto en las especies animales como en las vegetales. - Estas se unen a muy bajas concentraciones ( $10^{-10}$ - $10^{-8}$  M) sobre sitios específicos de sus células blanco, por lo que deben tener una alta afinidad de unión por dichos sitios para poder ser captados y posteriormente ejercer su función [1]. - La mayoría de los esteroides son sintetizados en tejidos distantes a aquellos de los que son blanco de su acción; por lo que deben ser secretados y transformados antes de ser introducidos a la célula blanco.

Los esteroides son derivados del núcleo del ciclo - pentanoperhidrofenantreno, que contienen tres anillos del ciclohexano condensados con la ordenación propia del fenantreno. Entre los esteroides importantes que se encuentran en la naturaleza se hallan los ácidos biliares, las hormonas sexuales masculinas y femeninas, las hormonas adrenocorticales y otros varios esteroides que poseen intensa actividad biológica [2].

La producción de hormonas sexuales masculinas y femeninas, así como los corticoides tienen como precursor al colesterol. La estructura esencial de todos estos compuestos es de cuatro anillos soldados como sigue:



Los compuestos de este tipo reciben la denominación general de esteroides. En ellos existe siempre oxígeno, hidroxílico o cetónico, en W; un grupo hidroxilo o cetónico en Z y un metilo en Y. Los anillos C y D están saturados y son sumamente estables y en X se encuentra un grupo metilo [3].

### Hormonas Sexuales.

Las gónadas la unidad fetoplacentaria y corteza suprarrenal sintetizan las hormonas esteroides a través de las mismas vías de biosíntesis general. Las variaciones en los índices de secreción dependen de la correspondiente especialización de cada glándula [4 y 5]. Se ha demostrado una serie de reacciones de condensación dependiente de la NADPH que, en última instancia, produce esqualeno a partir de dos fragmentos de carbono de la acetil coenzima A activada. A través de procesos cíclicos y eliminación de tres metilos se forma el colesterol. Esto se produce en el hígado y muchos otros tejidos, además de las glándulas formadoras de esteroides.

La alteración inicial de las moléculas del colesterol comprende la incisión de la cadena lateral para producir delta 5-pregnenolona y ácido isocaproico. Existen evidencias que apoyan la hipótesis de que, en la suprarrenal, el ACTH actúa primariamente para esimular esta reacción.

Al parecer, la pregnenolona es el sustrato común para todos los esteroides hormonales. La conversión de pregnenolona requiere de la delta 5, 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual oxida el grupo hidroxílico en la posición 3, y una isomerasa que cambia el doble enlace en delta 5 a delta 4, originando progesterona. Así, la progesterona puede servir como precursor de los andrógenos y los estrógenos tan-

to en los ovarios como en los testículos.

Las vías para la síntesis de los andrógenos y los estrógenos se hallan expuestas en la figura 1. Las vías más importantes son: 1) pregnenolona a progesterona a 17 alfa-hi-droxiprogesteron a androstendiona; 2) pregnenolona a dehi-droepiandrosterona a androstendiona. Se han sugerido otras vías adicionales.

Los estrógenos proceden de los andrógenos en las glándulas formadoras de esteroides y, probablemente, también de tejidos no endócrinos. La conversión de los andrógenos en estrógenos se efectúa probablemente a través de los intermedios 19-hidroxilados de la delta 4-androstendiona y la aromatización del anillo A para formar estrona y estradiol; la testosterona probablemente se transforma en estrógenos de una forma similar.

Estrógenos.- [6 y 7] Aunque sigue aumentando la lista de estrógenos identificados en los animales, hace tiempo se conocen los estrógenos más importantes, como el 17 beta estradiol, la estrona y el estriol. Todos los estrógenos de origen animal son esteroides. Las fuentes más importantes de estrógenos son el ovario, la corteza suprarrenal, las células de Leydig del testículo y la unidad fetoplacentaria. Aunque la potencia relativa de los estrógenos varía algo de acuerdo con el método biológico que se emplea, se considera que el 17 beta estradiol es el más potente cuando se administra por vía parenteral, le sigue la estrona; y el estriol es relativamente débil.

La estrona, el estriol y el estradiol son los estrógenos urinarios que se han determinado con mayor frecuencia.

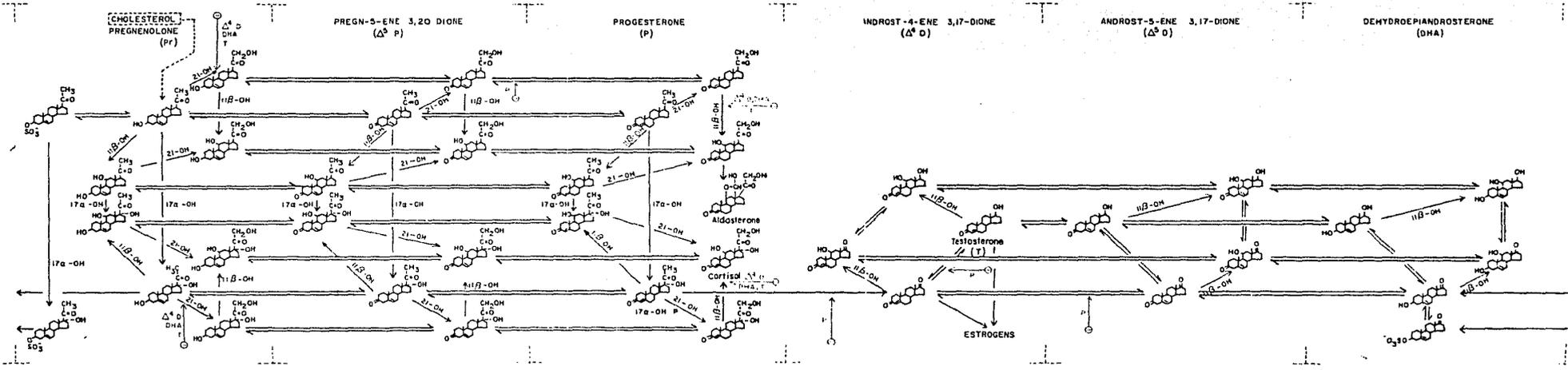
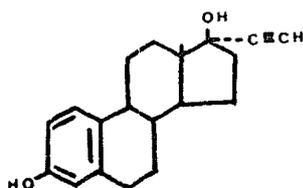


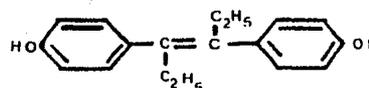
Fig. 1. Biosynthesis of steroid hormones.

Los estrógenos urinarios llegan a alcanzar un óptimo durante el tiempo de la ovulación, y se mantienen a una concentración elevada durante la vida del cuerpo lúteo.

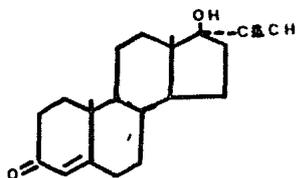
El estrógeno sintético más importante es el dietil-estilbestrol, el cual no es un esteroide, y resulta eficaz por vía oral o parenteral. Al parecer se metaboliza a lo largo de algunas vías, como los estrógenos naturales, y se excreta principalmente en forma de glucorónido. Existen otros estrógenos sintéticos como la 17 alfa-etinilestradiol y el estilbestrol los cuales son usados terapéuticamente debido a su alta potencia al administrarse oralmente.



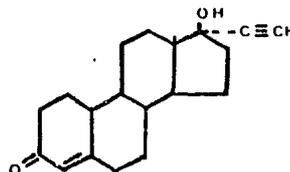
17- $\alpha$ -Etinilestradiol



Estilbestrol



17- $\alpha$ -Etiltestosterona



17- $\alpha$ -Etilinil-19-Nortestosterona

El índice de la producción de la estrona y el estradiol, calculado a partir de los valores de los metabolitos urinarios, es de 0.1 a 0.5 mg en aproximadamente 24 horas [8]. Las escasas determinaciones que se han hecho de los estrógenos plasmáticos indican que los niveles, tanto de la estrona libre como del estradiol, oscilan entre 0.1 a 1.0  $\mu\text{g/l}$  de -

plasma; los valores más elevados de ambos se encuentran en la fase luteínica del ciclo [9 y 10].

Gestágenos.- La progesterona es el mejor conocido y el más importante de los estroides que poseen actividad progestacional. Sin embargo, por lo menos dos sustancias (la  $\delta$  4, 3-cetopregnen-20-beta-ol y  $\delta$  4, 3-cetopregnen-20 alfa-ol) poseen actividad progestacional, y se ha demostrado que se hallan presentes en los folículos de De Graff, en el cuerpo lúteo, en la placenta y en la sangre. La progesterona se sintetiza por varios tejidos; incluyendo el cuerpo lúteo, corteza suprarrenal, placenta y testículos. Si bien la progesterona se secreta en grandes cantidades a la sangre por el tejido luteínico y la placenta, su función principal en la corteza suprarrenal y los testículos es el de servir de precursor a los productos secretados por estas glándulas. Se reduce el pregnandiol, y se excreta principalmente como glucorónido de pregnandiol. La determinación del pregnandiol urinario proporciona una razonable valoración de los niveles de progesterona circulante. Durante la fase luteínica, los niveles del pregnandiol urinario están proporcionalmente elevados respecto al índice de secreción de la progesterona.

La mujer normal presenta valores de progesterona en el plasma que oscilan entre  $0.14 \text{ ug}/100 \text{ cm}^3$  durante la fase folicular del ciclo y  $1.05 \text{ ug}/100 \text{ cm}^3$  durante la fase luteínica [11]. Los índices de producción reportados varían según la técnica empleada para su estudio. Los índices de producción plasmática [12] se han calculado en  $2.9 \text{ mg}/24 \text{ horas}$  durante la fase folicular y  $22.1 \text{ mg}/24 \text{ horas}$  durante la fase luteínica, mientras que los índices de producción calculados a partir del pregnandiol urinario son de  $5 \text{ mg}$  y  $30 \text{ mg}$  por  $24 \text{ horas}$  para las mismas fases del ciclo. El hombre normal pre-

senta un índice de producción plasmático de 0.59 mg/24 horas, comparado con un índice de 3.8 mg/24 horas, calculado a partir del pregnandiól urinario [12].

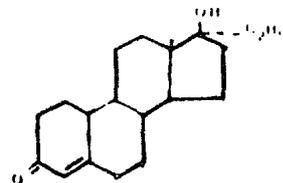
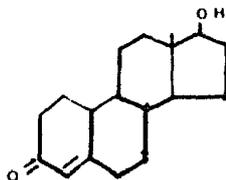
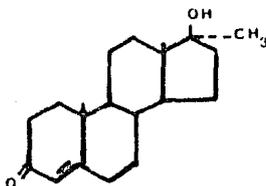
Andrógenos.- Se considera que la testosterona es el principal andrógeno. La mujer normal produce 0.34 mg de testosterona al día, lo cual es, aproximadamente, 5% de la cantidad producida por el hombre normal (7 mg/día) [13]. Los valores de testosterona en el plasma de mujeres normales se mueven dentro de un margen bastante estrecho, con un valor promedio de  $0.034 \pm 0.018$  ug/100 cm<sup>3</sup> de plasma comparado con 0.64 ug/100 cm<sup>3</sup> en los hombres normales [14]. Valores más elevados se encuentran durante la ovulación y la fase lútea del ciclo. La excreción urinaria de testosterona es más elevada en la ovulación y durante la fase lútea.

La mayor parte si bien no toda la testosterona de la mujer normal se forma por reducción de androstendiona. La mayor parte de esta reducción se produce tal vez en los tejidos periféricos. Probablemente, una gran cantidad de la androstendiona de la mujer normal se forma en la corteza suprarrenal. La concentración de androstendiona en el plasma de mujeres se considera más elevada que en la de los hombres (0.14 ug/100 cm<sup>3</sup>, contra 0.06 ug/100 cm<sup>3</sup>). El índice de producción plasmática de la androstendiona oscila entre 3.4 mg/día en la mujer y 1.4 mg/día en el hombre.

La concentración de testosterona urinaria suele ser paralela a la de la testosterona plasmática. Si bien la testosterona y la androstendiona se metabolizan a 17-cetoesteroides, la contribución de estos andrógenos a los 17-cetoesteroides de individuos normales es prácticamente despreciable. La mayoría de los 17-cetoesteroides urinarios proceden de los es

teroides de la corteza suprarrenal.

Dentro de los andrógenos análogos utilizados terapéu-  
ticamente podemos encontrar a la metiltestosterona, la más -  
utilizada por su alta potencia androgénica dentro de la clíni-  
ca, administrándose de manera oral, así como los nor-esteroi-  
des (19-nortestosterona y 17 alfa-etil-19-nortestosterona).



Metiltestosterona

19-Nortestosterona

17- $\alpha$ -etil-19-Nortestosterona

Las hormonas esteroides circulan en una forma conju-  
gada, por ejemplo, en un complejo unido a las proteínas plas-  
máticas. Parece ser que existe una conjugación de proteínas  
específicas con la mayoría de los esteroides, y, además, una  
conjugación menos específica con otras proteínas. La fuerza  
de unión desempeña un papel importante en la regulación de la  
acción y metabolismo de un esteroide.

#### Proteínas Unidoras de Hormonas Sexuales.

Se conocen tres tipos de proteínas naturales que -  
tienen la propiedad específica de unir a los esteroides hormo-  
nales y a otros esteroides con relativa alta afinidad: protef

nas del suero, proteínas receptoras de tejidos blanco, y proteínas transformadoras de hormonas esteroides. Las proteínas unidoras de hormonas sexuales en suero se distinguen de las proteínas receptoras de tejidos blanco, en que las primeras se pueden encontrar tanto extra como intracelularmente, pueden unir a más de dos compuestos con diferente afinidad, y las proteínas receptoras se encuentran también dentro del núcleo y tienen una alta afinidad solamente por uno o dos compuestos [15].

La amplia variedad de esteroides transportados por proteínas que han sido identificadas [16-19], demuestran que se requieren para llevar a los esteroides, dentro y cerca de las células blanco. El hecho de la presencia de diferentes proteínas transportadoras de esteroides en una amplia variedad de especies y para diferentes esteroides naturales nos sugiere la importancia funcional de estas proteínas.

De las proteínas transportadoras de hormonas sexuales en suero se consideran como las más importantes a: 1) Albúmina sérica, la proteína más abundante del suero, la cual se une a todos los esteroides y a muchos otros compuestos con relativa baja afinidad (A); 2) Globulina transportadora de Corticoesteroides (GTC) que también se une a progesterona con alta afinidad, y 3) la Globulina transportadora de Hormonas Sexuales (GUTE), un unidor de alta afinidad a testosterona y estradiol.

Aunque la alta afinidad de GTC y GUTE por sus respectivos esteroides darían la apariencia de que prácticamente toda la hormona esteroide circulante se uniría a su glicoproteína específica, este no es el caso ya que la alta concentración de albúmina en el suero compensa su baja afinidad, por -

lo que cantidades sustanciales de hormona son unidas a albúmina [17].

### Características Fisico-Químicas de las Proteínas Transportadoras.

1) Albúmina: es la proteína del plasma más abundante, con un peso molecular de 69 000 daltons. Su punto isoelectrico, pH 4.7, es también menor que el de la mayoría de las proteínas séricas; ésto y su alta carga negativa neta explican porque la migración electroforética de albúmina es más rápida que la de otras proteínas del plasma a valores de pH neutro o ligeramente alcalino. Al pH sanguíneo, 7.4, la albúmina tiene una carga neta negativa de 18. Estas propiedades ayudan a explicar su gran solubilidad [20 y 21].

La molécula de albúmina tiene una asimetría correspondiente a la de una forma elíptica con un diámetro de 38 Å y una longitud de 150 Å. Su principal función es la regulación osmótica. Del efecto osmótico total de las proteínas del plasma, la albúmina es la responsable del cerca del 75 a 80 por ciento. Aunque constituye ligeramente más de la mitad de las proteínas plasmáticas por su peso, la efectividad de la albúmina es mayor que la de las globulinas porque es de bajo peso molecular.

Muchas sustancias poco solubles en agua, son rápidamente disueltas en presencia de suero o plasma. Las soluciones de albúmina poseen la propiedad de unirse a estas sustancias ayudando a su solubilidad. Este es el caso de las tinturas simples como también para una variedad de sustancias de interés fisiológico, tales como iones de ácidos grasos, bilirrubinas, hormonas esteroides, y otros compuestos. La albúmina

na entonces desempeña un papel importante en el transporte - desde un tejido a otro de productos metabólicos poco solubles.

2) Globulina transportadora de Corticoesteroides: Desde el descubrimiento de la globulina transportadora de tiroxina por Gordon en 1952 [22], una clase completa de glicoproteínas relacionadas con el transporte de hormonas del plasma se ha identificado, para glucocorticoides, en vertebrados superiores se ha demostrado la presencia de una globulina transportadora de corticoesteroides (GTC), que varía en estructura y propiedad de especie a especie. En el humano GTC se une a cortisol y progesterona con alta afinidad, y a la testosterona con baja afinidad [19 y 23].

GTC es una alfa-glicoproteína con un peso molecular de alrededor de 52 000 daltons y una fuerte afinidad por el cortisol. Su avidéz por el cortisol es mayor a bajas temperaturas, siendo casi nula a los 50 °C. La habilidad de GTC para unir cortisol y otros esteroides no sólo depende de la temperatura sino también del pH.

Aunque generalmente se da por hecho que GTC [24 y 25], se sintetice en el hígado, solamente se tienen evidencias indirectas de ello. Algunas de estas evidencias son las de haberse reportado niveles de GTC descendentes en hepatectomía subtotal en la rata, y también se ha encontrado niveles bajos en pacientes con enfermedades hepáticas.

Parece que la integridad del complejo delta 4, 3-cetona del anillo "A" es esencial para la completa unión a GTC [19]. Los compuestos con el mayor grado de competencia con el cortisol por el sitio de unión de GTC son la cortisona, corticosterona, deoxicorticosterona, 11-deoxicortisol y pro -

gesterona. Los compuestos tetrahidros y la mayoría de los esteroides sintéticos (con excepción de prednisona y prednisolona) parecen poseer poca reactividad cruzada.

Se ha observado que la administración de estrógenos tienen efecto sobre la estimulación en la síntesis de GTC, ya que pacientes que han recibido dosis comparativas de estilbestrol para carcinoma de pecho o próstata, presentaron una elevación sustancial en los niveles de cortisol total en plasma. Este incremento de cortisol se debió a un aumento sólo en la fracción unida a la proteína transportadora, ya que ésta se guía aumentando mientras se prolongaba la terapia [19 y 26].

3) Globulina transportadora de Hormonas Sexuales: Se han encontrado proteínas transportadoras de andrógenos en una amplia variedad de especies [27]. Diferentes nombres han sido asignados a esta proteína: globulina unidora de testosterona y estradiol (GUTE), globulina transportadora de hormonas sexuales y el proteína transportadora de esteroides.

GUTE tiene un peso molecular de 94 000 daltons [16]. Otros investigadores han reportado una estructura dimérica - para GUTE con un tamaño mínimo por subunidad de 36 000 y - 67 000 daltons, determinados en condiciones desnaturalizantes. Aunque no existe un acuerdo uniforme con respecto al tamaño - de las subunidades y su composición, existe concenso en que - GUTE es una glicoproteína con un sólo sitio de unión por molécula nativa [16, 18 y 27].

Se cree que GUTE es sintetizado en el hígado en la mayoría de las especies, aunque sólo se tiene evidencia indirecta de ello. Los factores que controlan los niveles de esta proteína en sangre han sido estudiados, los estrógenos, el

exceso de hormona tiroidea y enfermedades del hígado aumentan la concentración de GUTE, y el aumento de andrógenos y la deficiencia de hormona tiroidea la disminuyen [28-31].

La afinidad de GUTE por corticoides o pregnanos es baja, y su afinidad por androstanes y estranes depende de su estructura. Una hipótesis de unión de estructura sostiene - que GUTE se une fuertemente a la cara beta del esteroide con fuertes atracciones a las posiciones C<sub>3</sub> y C<sub>17</sub> beta.

Se ha demostrado hace unos años en varios estudios [16 y 32] de laboratorio que en el citosol testicular y epididimal contienen una proteína de unión estable al calor, proteína unidora de andrógenos (PUA), con alta afinidad por andrógenos y estrógenos, pero no por antiandrógenos. Aunque la proteína unidora de andrógenos ha sido estudiada más extensamente en la rata, ésta o una proteína similar también ha sido identificada en el epidídimo o en los testículos de otras especies.

La proteína unidora de andrógenos tiene un peso molecular de 94 000 daltons con dos subunidades de 45 000 y - 47 000 daltons. En la mayoría de los casos la proteína unidora de andrógenos, no se une bien a corticoesteroides y pregnanos, pero puede unirse bien a androstanes y estranes dependiendo del componente.

En la tabla 1 se relacionan a las hormonas sexuales con sus proteínas acarreadoras:

	Testosterona	Estradiol	Cortisol	Progesterona
Albúmina	X	X	X	X
GTC	-	-	X	X
GUTE	X	X	-	-
PUA	X	X	-	-

Tabla 1. Relación de las proteínas transportadoras y sus respectivos esteroides.

### Papel Fisiológico de las Proteínas Transportadoras Séricas.

En un principio se consideró que las proteínas transportadoras cumplían solamente con la función de ayudar a la solubilidad de los estroides en el suero, sugiriéndose un papel amortiguador para la estabilización de la concentración del esteroide libre, pero las proteínas transportadoras ejercen también otras varias funciones que son de importancia para el balance hormonal del organismo.

Estas proteínas transportan las hormonas esteroides en un complejo biológicamente inactivo [15 y 17], por lo que cantidades relativamente grandes circulan continuamente sin producir efectos de hiperfunción, sin embargo, este complejo es de rápida disociación para que el esteroide pueda encontrarse libre para actuar sobre el sitio blanco. También protegen al esteroide de ataques químicos y enzimáticos, e inhiben la toma de éstos por el hígado, consecuentemente su metabolización y excreción.

Una función de las proteínas transportadoras que -

ha sido reconocida últimamente es la facilitación del paso de la hormona desde su sitio de biosíntesis a la corriente sanguínea. El resultado global, es la conservación de las hormonas esteroideas.

Para poder entender cómo las proteínas transportadoras pueden influenciar la acción de los esteroideas hormonales sobre los tejidos blanco debemos considerar primeramente el mecanismo de acción de los esteroideas a nivel celular.

Para la descripción del mecanismo de acción de las hormonas sexuales se tomará como ejemplo el modelo diseñado por Anderson en 1974 [18] y que puede ser aplicado a las diferentes hormonas [figura 2].

Los esteroideas circulan en su mayoría unidos a proteínas transportadoras en el suero, pero solamente los esteroideas libres entran a la célula. Las células blanco responderán específicamente sólo a concentraciones fisiológicas del esteroide. Estas células se diferencian de las demás en que son capaces de sintetizar proteínas receptoras o proteínas capaces de captar específicamente a los esteroideas. Los esteroideas se difunden dentro de las células donde son unidos a proteínas plasmáticas. Este complejo es posteriormente trasladado al núcleo, en el interior del núcleo el complejo esteroide-proteína se une a la cromatina en los sitios aceptores específicos, con la ayuda de la polimerasa del ácido ribonucleico (ARN) se transcriben las secciones específicas del ácido desoxirribonucleico (ADN). Este ARN transmitirá su mensaje a los ribosomas y consecuentemente se tendrá un incremento en la síntesis proteínica.

En términos generales las hormonas esteroideas se -

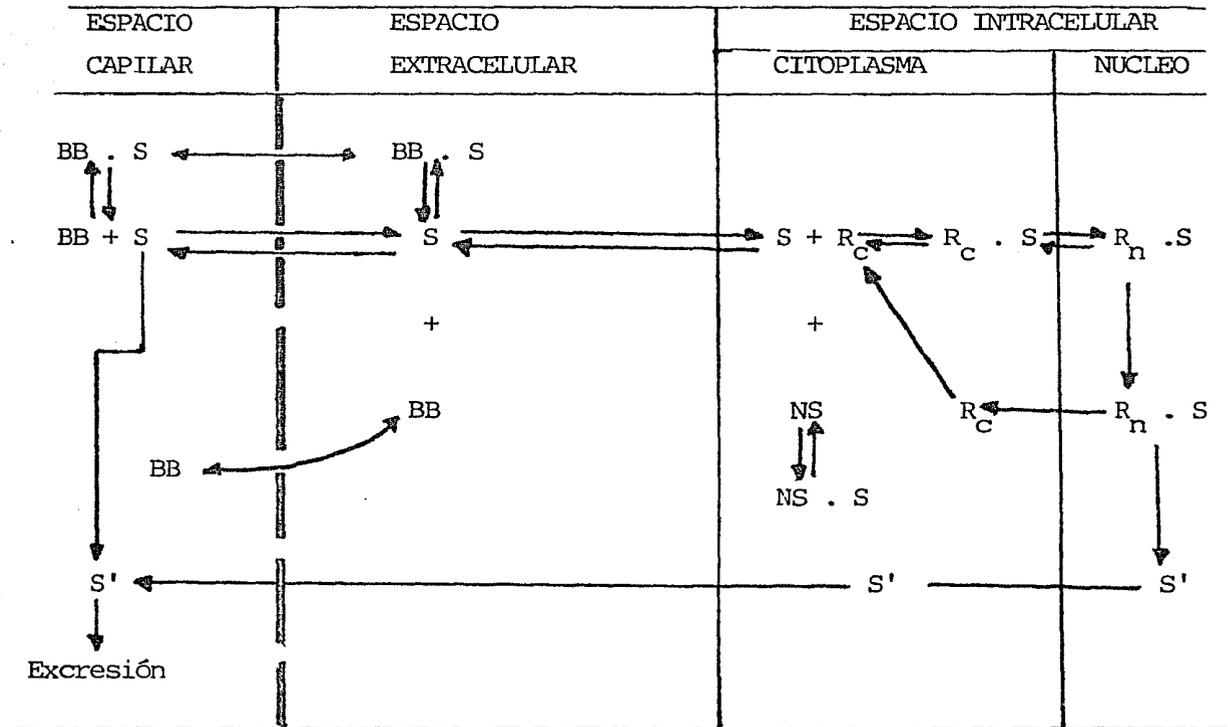


Figura 2. Esquema general de las interacciones del complejo esteroide protefna en varios compartimentos del organismo. BB, unidores en sangre;  $R_C$ , receptores citoplasmáticos;  $R_n$ , receptores nucleares; NS, unidores no específicos; S, esteroide.

encuentran unidas a proteínas plasmáticas, sin embargo, existe una fracción no unida conocida como la fracción libre, la que se piensa es la fracción fisiológicamente activa, por lo que el conocimiento de los niveles circulantes de esteroide libre sirve como parámetros importantes en el conocimiento de las velocidades de depuración de éstos, así como sus efectos metabólicos y el posible papel que puedan jugar bajo condiciones patológicas [33-35]. Por tal motivo la presencia de factores que alteren la relación unido-libre de un esteroide en particular, resultará en disminución o bien en la potencialización de su actividad, esto parece suceder en mujeres que se

Nombre genérico	Nombre común	Nombre químico
DERIVADOS DE LA $\Delta^5$ (10) estrenolona		
Noretinodrel		17 $\alpha$ -etinil-17 $\beta$ -hidroxi-5(10)-estren-3-ona.
DERIVADOS DE LA $\Delta^4$ -estrenolona		
Noretindrona	17-etnilnortestosterona	17 $\alpha$ -etinil-17 $\beta$ -hidroxi-4-estren-3-ona.
Acetato de Noretindrona	Acetato de 17-etnilnortestosterona	Acetato de 17 $\alpha$ -etinil-17 $\beta$ -hidroxi-4-estren-3-ona.
Linestrenol	3-desoxinoretindrona.	17 $\alpha$ -etnil-4-estren 17-ol.
Diacetato de etinodiol		Diacetato de 17 $\alpha$ -etinil-4-estren-3 $\beta$ 17-diol.
Dimetisterona	Dimetil-etiniltestosterona	17 $\beta$ -hidroxi-6 $\alpha$ ,21-dimetil-17 $\alpha$ -pregnen-4-en-20-in-3-ona

Tabla 2. Nombre genérico, común y químico de las progestinas.

Continuación de la Tabla 2.

DERIVADOS DE LA 17-HIDROXIPROGESTERONA		
Acetato de Medroxi progesterona	6-metilacetoxiproges- terona	Acetato de 17 $\alpha$ -hi- droxi-6 $\alpha$ -metil-4- pregnen-3,20-dio- na.
Acetato de Meges - trol	6-metil-6-deshidro- acetoxiprogesteronona	Acetato de 17 $\alpha$ -hi- droxi-6-metil-4,6 pregnandieno-3,20 diona.
Acetato de clorma- dinona	6-cloro-6-deshidro- acetoxiprogesteronona	Acetato de 17 $\alpha$ -hi- droxi-6 cloro-4,6 pregnandieno-3,20 diona.

Tabla 2. Nombre genérico, común y químico de las progestinas

se encuentran bajo tratamiento anticonceptivo [36], ya que se ha demostrado por evidencias indirectas la aparente unión de progestinas sintéticas a proteínas transportadoras de hormonas sexuales. Por lo tanto en estos casos se presentará una alteración de la realción unido-libre de esteroide endógeno libre y el unido a su proteína. En la tabla 2 se muestran algunas de las progestinas sintéticas más utilizadas en la anti concepción.

## II. OBJETIVOS

Los efectos fisiológicos de un esteroide como se ha mencionado anteriormente son ejercidos por la fracción del esteroide que no se encuentra unida a proteínas. Por tal motivo un número de investigadores se encuentran interesados, actualmente, en el mecanismo de transporte de progestinas sintéticas.

Dos de las más utilizadas progestinas sintéticas en el humano son: Acetato de Medroxiprogesterona (Acetato de  $17\alpha$ -hidroxi- $6\alpha$ -metil-4-pregnen-3, 20-diona) y la Noretisterona ( $17\alpha$ -etinil-testosterona), las cuales son usadas frecuentemente como esteroides anticonceptivos. Aún cuando han sido desarrollados métodos para la estimación de estos esteroides en sangre, la unión de Noretisterona en plasma humano ha sido poco estudiada [37 y 38].

Por lo anterior se planteo como objetivo estudiar el mecanismo de transporte de estas dos progestinas en plasma, así como su interacción con las proteínas transportadoras de hormonas sexuales y las características atribuibles a dicha unión. Realizándose este estudio tanto en el humano como en otras especies de mamíferos.

Los objetivos concretos del estudio fueron:

- a) Purificación Tanto de GUTE como de PUA para estudiar la interacción de las progestinas con proteínas parcialmente puras de suero y epidídimos, transportadoras de hormonas sexuales.
- b) La valoración de las constantes: de disociación, asociación, así como las tasas de velocidades de asociación y disociación del esteroide a proteínas transportadoras.
- c) Valorar la especificidad de unión de un esteroide de una

determinada fracción de proteínas del plasma.

- d) La valoración del tipo de interacción del esteroide sintético a nivel del sitio de unión de proteínas del plasma.

### III. MATERIAL Y METODOS

#### Soluciones y Reactivos:

Trizma Base de Sigma Chemical Company.

Glicerol de J. T. Baker, S. A.

N,N-dimetil formamida de Fisher Scientific Company.

Cloruro de Potasio (KCl) de J. T. Baker, S. A.

Hidróxido de Sodio (NaOH) de J. T. Baker, S. A.

Epiclorohidrina de Fisher Scientific Company.

Hidróxido de Amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) de Fisher Scientific Company.

Carbón activado de Sigma Chemical Company.

Dextrán T-70 de Sigma Chemical Company.

Omnifluor de New England Nuclear.

Tolueno de J. T. Baker, S. A.

Dioxano de Fisher Scientific Company.

Metanol de J. T. Baker, S.A.

Sulfato de Amonio de Fisher Scientific Company.

Sefarosa 4B-200 de Sigma Chemical Company.

Silicona de Sigma Chemical Company.

Carbodiimida de Sigma Chemical Company.

Solució Amortiguadora de Tris HCl: 0.02 M, pH 7.4, 10 % glicerol; (solu -  
ción TG).

Solución amortiguadora de Tris HCl: 0.02 M, pH 7.4, 10 % N,N-dimetil for-  
mamida y 1 M de KCl; (solución TDK).

Solución de Hidróxido de Sodio 10 N

Solución de Hidróxido de Amonio 1 M.

Mezcla de Carbón-Dextrán: 250 mg de Carbón activado + 25 mg de Dextrán -

T-70 por 100 ml de solución TG (solución DCC).

Solución de Centelleo líquido: Omnifluor 4 gr por litro de Tolueno.

#### Hormonas Radioactivas.

$^3\text{H}$ .DHT = Dihidrotestosterona = 1, 2- $^3\text{H}$ (N)-5 $\alpha$ - androstan-17 $\beta$ -ol-3-ona. 40 Ci/mmola.

$^3\text{H}$ .F = Hidrocortisona = 1, 2- $^3\text{H}$ (N)-Cortisol. 93 Ci/mmola.

$^3\text{H}$ .NET = Noretisterona = 6, 7- $^3\text{H}$ (N)-19 nor-17 $\alpha$ -etinil-testosterona. 55 Ci/mmola.

Estas hormonas fueron compradas a New England Nuclear.

#### Hormonas no Radioactivas.

DHT = 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona = 17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona.

F = Cortisol = 11 $\beta$ -17, 21-trihidroxi-4-pregnan-3, 20-diona.

NET = Noretisterona = 19 nor-17 $\alpha$ -etinil-testosterona.

MPA = Acetato de Medroxiprogesterona = 6 $\alpha$ -metil-17 $\alpha$ -acetoxi-4-pregnan-3, 20-diona.

Las hormonas no marcadas fueron pedidas a Steroids of Steraloids. Tanto las hormonas marcadas como las no marcadas se disolvieron en alcohol etílico.

#### Obtención de Material Biológico:

Fuente de muestras de sangre:

- a) Mujeres Normales.
- b) Conejos Nueva Zelanda, machos castrados.

- c) Ratas Wistar hembras ovariectomizadas.
- d) Ratas Wistar machos castrados.
- e) Ovinos hembras fértiles.

Sueros.- De un grupo donador del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", se tomaron 20 ml de sangre a cada una de 10 mujeres sanas en la etapa folicular temprana, seguidas durante su ciclo menstrual en la Clínica de Planificación Familiar del mismo Instituto.

Los conejos Nueva Zelanda eran machos, cuyo peso oscilaba entre 2.5 y 3.0 kg.; fueron castrados para eliminar la producción de hormonas esteroides, dos semanas antes de llevarse a cabo la toma de sangre. La castración (orquidectomía) se llevó a cabo de la siguiente manera: el animal se coloca con el dorso hacia abajo. Se realiza una incisión mediana de aproximadamente 1 cm en la piel del escroto, el tejido conectivo subcutáneo se localiza inmediatamente y se observa que cada testículo se encuentra en sacos musculares separados. Se hace una incisión en cada saco muscular e inmediatamente sale el testículo acompañado del epidídimo. Se coloca una ligadura alrededor del vaso deferente y la vena espermática, el polo anterior del testículo junto con las glándulas es removido y la ligadura es cerrada. La incisión de la piel es saturada por uno o dos puntos con hilo de seda. Para la operación de castración los conejos fueron anestesiados con Anestesal (Smith-Kline); un ml. por cada 2.5 Kg. de peso, por vía intravenosa.

El peso de las ratas Wistar osciló entre los 200 a 250 gr., se utilizaron hembras ovariectomizadas (ooforectomizadas), también dos semanas antes de la toma de sangre. La operación se lleva a cabo de la siguiente forma: el animal se coloca con el pecho hacia abajo. Se realiza una incisión longitudinal en la piel, en la parte dorsal media al nivel de los polos bajos del riñón. La piel es retractada lateralmente hacia

los lados y el ovario se expone a través de la pared del músculo delgado justo abajo de la masa muscular dorsal. Cada incisión se realiza del tamaño mínimo para la extracción del ovario. Después la hemostasis es asegurada ligando la parte terminal del cuerno del útero con hilo de seda, el ovario, junto con el tejido graso que lo rodea, el oviducto y una pequeña porción del útero son extraídos. La herida es cerrada con hilo de seda. Se utiliza éter para la anestesia ligera durante la operación [39].

Las tomas de sangre a ovinos fueron hechas a hembras de un año y medio de edad con fertilidad comprobada. Por rata se obtuvieron 5 ml de sangre, por conejo 10 ml, y 40 ml por ovino. Las muestras de sangre fueron obtenidas con jeringas desechables sin heparizar, después de obtener las muestras, éstas fueron centrifugadas durante 20 minutos a 2 000 r.p.m. (en centrífuga Beckman JB-6); posteriormente el suero fue separado y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de un mililitro, por un tiempo no mayor de dos a 12 semanas.

#### Purificación de la Proteína Unidora de Andrógenos (PUA).

a) Obtención de los Epidídimos. Se disecaron epidídimos de ratas de la cepa Wistar, de la misma manera que ya fue descrita la castración. A partir de ellos se obtuvo una preparación parcialmente pura de la proteína unidora de andrógenos.

Los epidídimos se obtuvieron y manejaron a  $4^{\circ}\text{C}$  en presencia de la solución TG. Estos se limpiaron de todo tejido graso, ya limpios se pesaron para posteriormente ser homogeneizados con la solución TG en una proporción final de 1:9. Este homogenado fue centrifugado a 20 000 r.p.m. durante dos horas (en centrífuga Beckman J2-21).

b) Precipitación con Sulfato de Amonio. [40] El sobrenadante se trató con sulfato de amonio al 60 por ciento de saturación. Se agitó durante una hora manteniendo el pH de 7.0 con la adición de NaOH

10 N. El precipitado fue centrifugado durante una hora a 20 000 r.p.m.; todo este procedimiento se realizó a 4 °C.

c) Diálisis. El precipitado se resuspendió con TG al volumen inicial y se dializó contra TG, vigilando no aumentar en exceso el volumen en la bolsa de diálisis sobre todo en las etapas iniciales. Se llevaron a cabo dos cambios cada 18 horas.

Posteriormente este dializado fue analizado en un sistema de saturación como será descrito. Después fue fraccionado en alícuotas de un mililitro y congeladas a 4 °C de dos a 12 semanas.

#### Purificación de la Proteína Transportadora de Testosterona y Estradiol (GUTE).

a) Origen del Suero. Se tomaron 500 ml de mujeres sanas en su etapa folicular temprana, por persona se tomaron 20 ml de sangre. Este suero fue tratado con carbón activado (1 mg/ml de suero), con la finalidad de extraer los estroides endógenos, el carbón es un adsorbente suficientemente fuerte para remover o quitar hormona de soluciones en las que se encuentren presentes, se trató durante una hora a 4 °C con agitación constante. Después del período de incubación el suero fue centrifugado a 2 500 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue filtrado a través de una gasa para remover todas aquellas partículas finas de carbón que pudieran haber quedado.

b) Precipitación con Sulfato de Amonio. El suero se precipitó con Sulfato de Amonio y se dializó bajo las mismas condiciones que han sido descritas anteriormente para la proteína unidora de andrógenos. La suspensión obtenida de proteínas del suero en solución TG fue congelada a - 20 °C mientras se preparaba la resina para la cromatografía por afinidad.

c) Cromatografía por afinidad. Esta tiene por objetivo puri-

ficar a proteínas unidoras de afinidad biológica por un esteroide en particular. La técnica involucra la construcción de un soporte inerte al que se une covalentemente un derivado de esteroide que mantiene su habilidad para interactuar con el sitio de unión de las proteínas receptoras. Cuando una solución contiene proteínas receptoras con su ligando se pasa a través de dicha columna, las proteínas receptoras se pegan al esteroide unido a la columna. Otras macromoléculas de la solución, con poca o ninguna afinidad por el esteroide, pasan a través de ésta y no se retienen [1].

Los pasos seguidos en la cromatografía de afinidad de GUTE fueron los siguientes:

#### 1. Preparación de la Resina:

La resina (Sefarosa 4B-200) para la cromatografía de afinidad se preparó de la siguiente forma:

La Sefarosa se trató con epíclorohidrina a una concentración final de 0.3 M. La reacción se llevó a cabo a 25 °C durante cuatro horas. Posteriormente la resina se incubó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 M a temperatura ambiente durante 18 horas. Lo anterior se realizó con la finalidad de sintetizar el espaciador de la resina (2-hidroxi-amino-propil-éter).

Una vez tomado el espaciador de la resina se utilizó como ligando a la dihidrotestosterona substituida en la posición 17 por el ácido hexanoico [3-oxo-17 $\alpha$ -hidroxi, 5 $\alpha$ - androstan, 17 $\alpha$ -(6-ácido hexanoico)]. La unión del ligando a la sefarosa activada con el procedimiento ya descrito se realizó con 70 % de dioxano en presencia de carbodiimida soluble en agua. El producto final de la reacción fue lavado exhaustivamente con metanol al 80 % y se analizó su capacidad de unión a GUTE utilizando el procedimiento que a continuación será descrito.

#### 2. Determinación de la capacidad de unión de la Resina.

La capacidad de unión de la resina se valoró adicionando cantidades de GUTE a tubos de ensayo previamente siliconizados conteniendo - cantidades variables de la resina. La mezcla fue incubada durante dos - horas con agitación intermitente de cada dos minutos a 4 °C y posteriormente centrifugada a 2 000 r.p.m. durante 15 minutos.

La cantidad de GUTE en el sobrenadante fue analizada utilizando un sistema de saturación como será descrito posteriormente. La capacidad de la resina fue expresada como pico molas unidas a GUTE por mililitro de resina.

### 3. Cromatografía de la muestra.

Una vez conocida la capacidad de unión de la resina, fue empacada una cantidad suficiente (50 ml) para unir el 100 % de GUTE presente en la fracción precipitada con sulfato de amonio. La columna fue equilibrada con la solución TDK. Después de la aplicación de la muestra (460 ml) en la columna, fue lavada con 10 volúmenes (volumen de la columna) de solución TDK. La obtención de GUTE se realizó por elución utilizando tres volúmenes de TDK conteniendo 20 ug/ml de dihidrotestosterona, después de la incubación las fracciones posteriores fueron colectadas, mezcladas y concentradas utilizando una unidad de ultrafiltración (Amicón 7015).

### Estudios de Unión.

a) Sistemas de Saturación. La existencia de una concentración determinada de proteínas unidoras de hormonas esteroides nos da un número finito de sitios de unión para los esteroides. Por lo tanto la formación del complejo proteína-esteroide es un fenómeno saturable. Tomando en cuenta lo anterior los sistemas de saturación se realizan exponiendo una determinada cantidad de proteínas receptoras o transportadoras a una fuente de hormonas esteroides, por ejemplo el citosol, la fracción

nuclear de un tejido blanco o suero incubadas con varias concentraciones de esteroide tritiado, permitiendo la asociación del esteroide con la proteína unidora hasta alcanzar el equilibrio. Subsecuentemente la cantidad de esteroide tritiado unido es determinado.

El componente saturable se define por la diferencia aritmética entre el total de la radioactividad unida y la no específica. La unión no saturable o no específica es medida como la unión del esteroide tritiado unido en presencia de un exceso de un ligando competitivo no marcado. Bajo estas condiciones, el esteroide no marcado ocupa esencialmente todos los sitios de unión de alta afinidad pero esto no altera la unión del esteroide tritiado con baja afinidad, a sitios no específicos o no saturables. Este método asume una alta capacidad del sistema receptor con sitios de baja afinidad a los cuales existe unión no específica.

Este análisis permite estimar el número de sitios de unión específica, sustrayendo las no específicas del total de la unión. Los valores calculados para la unión no específica se usan para estimar el número total de sitios de unión y la constante de disociación ( $K_d$ ) del complejo esteroide-proteína, una característica de afinidad de la proteína por el esteroide. Son usadas principalmente dos métodos para el análisis de estos datos; el método de Scatchard y el de gráficas de doble recíproca (Lineweaver-Burk) [1].

Los ensayos se realizaron de la siguiente forma: se incubaron en tubos de vidrio (10 x 75mm) hormona radioactiva cuya concentración era de 1 nM, con la adición de cantidades crecientes de hormona no radioactiva a una concentración final de 1 a 40 nM. Se evaporó el alcohol en que se encontraban tanto la hormona radioactiva como la no radioactiva de los tubos, posteriormente fue agregada una cantidad constante de las muestras de suero. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de incubación de 200  $\mu$ l de la solución amortiguadora TG durante una hora.

Al finalizar el período de incubación se añadieron 800 ul de la mezcla DCC, para separar la fracción unida de la fracción libre, siendo esta exposición menor de cuatro minutos, ya que el 50 % de la hormona se libera en este tiempo de acuerdo a pruebas hechas con anterioridad, por lo que debe ser seguida inmediatamente por una centrifugación de las muestras a 2 000 r.p.m. durante 15 minutos. Esto para separar el sobrenadante (fracción unida) de la pastilla formada por el carbón (fracción libre).

1. Determinación del contenido de radioactividad. Para la determinación del contenido de radioactividad, el sobrenadante de cada fracción se decantó directamente a viales de conteo conteniendo 5 ml de la solución de centelleo líquido; posteriormente las muestras fueron colocadas en un contador Packard Tricarb de centelleo líquido.

2. Especificidad de Unión. La especificidad de la unión entre la proteína y su hormona radioactiva, se valoró con incubaciones al paralelo que contenían un exceso de mil veces más de hormona no radiactiva, en donde la radioactividad presente en la fracción unida, representó la unión no específica. El resultado de sustraer la unión total la no específica, representó la unión del esteroide radioactivo en forma específica a su proteína.

Los resultados obtenidos fueron graficados de acuerdo a la metodología descrita por Scatchard [41]. La concentración de la proteína se obtuvo considerando el peso molecular de cada proteína y tomando en cuenta un sólo sitio activo por mola de esteroide unido.

b) Sistemas de desplazamiento. Las muestras de suero fueron incubadas en tubos de vidrio con hormona radioactiva cuya concentración era de 1 nM con la adición de cantidades crecientes de hormona no radioactiva ( $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M). Paralelamente se realizaron incubaciones con la hormona radioactiva y la adición de cantidades equimoleculares a la de la hormona no radioactiva de las progestinas sintéticas. La incuba -

ción tuvo un volumen final de 200 ul con la solución TG, se incubó durante dos horas a 4 °C. Al término de la incubación se agregaron 800 ul de la mezcla de DCC, seguida de una inmediata centrifugación de 2 000 r.p.m. durante 15 minutos.

Se realizaron incubaciones paralelas para la determinación de la unión no específica. Se determinó el contenido de radioactividad y los resultados fueron graficados como porcentaje de unión de la hormona radioactiva contra la concentración del esteroide inhibidor añadido.

c) Determinación del mecanismo de Unión del Inhibido. Las muestras de suero se incubaron con hormona radioactiva cuya concentración era de 1 nM, con la adición de cantidades crecientes de hormona no radioactiva, a una concentración final del esteroide de 1 a 40 nM, paralelamente se realizaron incubaciones similares con la adición de cantidades constantes de la progestina sintética en una concentración de 0.2 nM.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 200 ul con solución TG durante dos horas a 4 °C. Al finalizar el período de incubación se agregaron 800 ul de la mezcla de DCC, seguida de una centrifugación inmediata de 2 000 r.p.m. durante 15 minutos.

Se determinó el contenido de radioactividad, así como la unión no específica; los resultados fueron graficados en una forma de doble recíproca.

d) Características de la Unión del Inhibidor. Se realizaron sistemas de saturación en los que se incubaron cantidades crecientes de las muestras de suero con hormona radioactiva cuya concentración era de 1 nM. Cada uno de estos sistemas fueron incubados con cantidades crecientes de la progestina sintética cuyas concentraciones fueron desde 0.2 a 1.0 nM. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 200 ul con solución TG durante dos horas a 4 °C. Al término de la incubación -

se agregaron 800 ul de la mezcla de DCC seguida de una inmediata centrifugación a 2 000 r.p.m. durante 15 minutos. Posteriormente se determinaron los contenidos de radioactividad, como la unión no específica para cada punto de la curva.

Los resultados obtenidos se graficaron en una forma de doble - recíproca. Las pendientes de cada una de las curvas también fueron graficadas contra cada concentración presente del inhibidor en la curva correspondiente [42].

e) Velocidades de Asociación y Disociación. Para la determinación de la velocidad de asociación se incubaron las muestras de suero con hormona radioactiva cuya concentración era de 1 nM, los tiempos de incubación fueron desde 0 hasta 2 horas a 4 °C.

Al término de cada incubación se agregaron 800 ul de la mezcla de DCC seguida de una centrifugación a 2 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C. Se determinó el contenido de radioactividad así como la unión no específica. Los resultados fueron graficados como porcentaje de unión de la hormona radioactiva contra el tiempo de incubación.

En la determinación de la velocidad de disociación las muestras fueron incubadas con la hormona radioactiva durante una hora a 4 °C. Al finalizar la incubación, a cada muestra se le adicionó un exceso de mil veces más de hormona no radioactiva, incubándose a diferentes tiempos, desde 0 a una hora. Después de estas últimas incubaciones se les fue agregando 800 ul de la mezcla de DCC seguida de una inmediata centrifugación a 2 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C.

Se determinó el contenido de radioactividad unida, y los resultados fueron graficados como porcentaje de unión de la hormona radioactiva unida contra el tiempo de incubación con el exceso de hormona no marcada.

#### IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron los siguientes:

El efecto de Acetato de Medroxiprogesterona y de No retisterona sobre la unión de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona radioactiva ( $^3\text{H.DHT}$ ) a suero humano, de ovino y de conejo se muestra

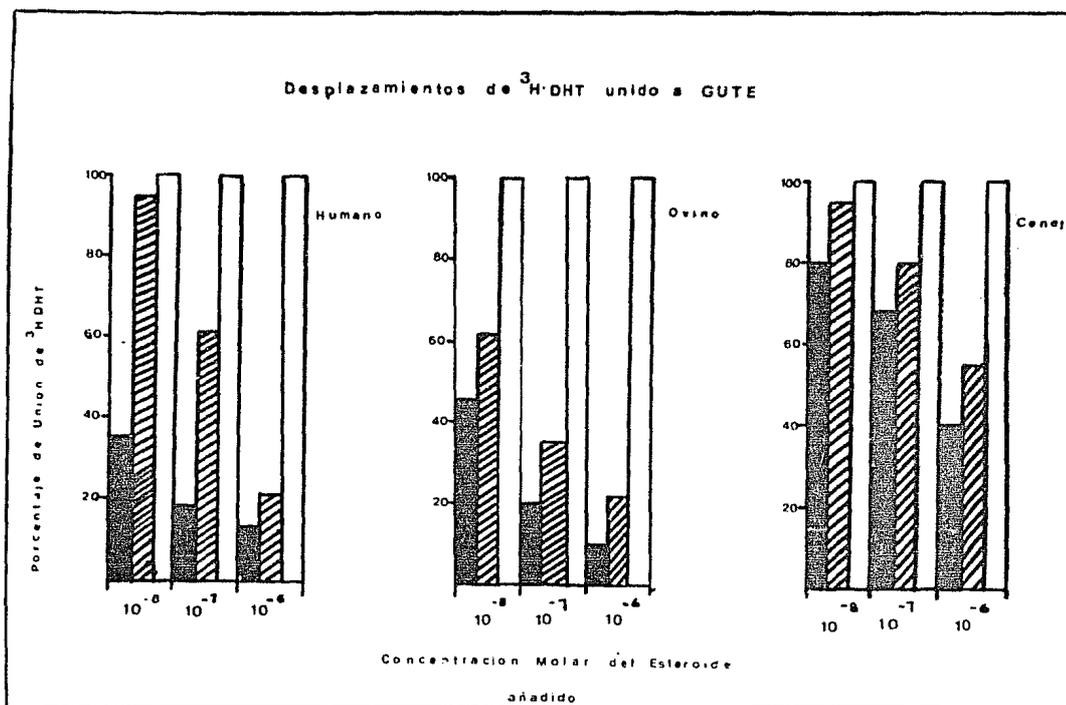


Figura 3. Efecto de DHT (■), NET (▨), y MPA (□) sobre la unión de  $^3\text{H.DHT}$  a GUTE.

en la figura 3.

Como se puede observar, los resultados obtenidos demuestran que Acetato de Medroxiprogesterona (MPA) no tuvo ningún efecto sobre la unión de  $^3\text{H.DHT}$  a GUTE sérica, sin embargo, NET desplazó la radioactividad unida a GUTE del suero

en las especies estudiadas. Siendo este desplazamiento de - cerca de un 80 % para el humano y el ovino.

Este mismo ensayo se realizó con las proteínas pu- rificadas, tanto con GUTE como con PUA (figura 4.), los re - sultados que se obtuvieron fueron similares a los anteriores observándose un mayor efecto de NET sobre la unión de 5 $\alpha$ -di- hidrotosterona radioactiva unida a GUTE que a PUA, siendo

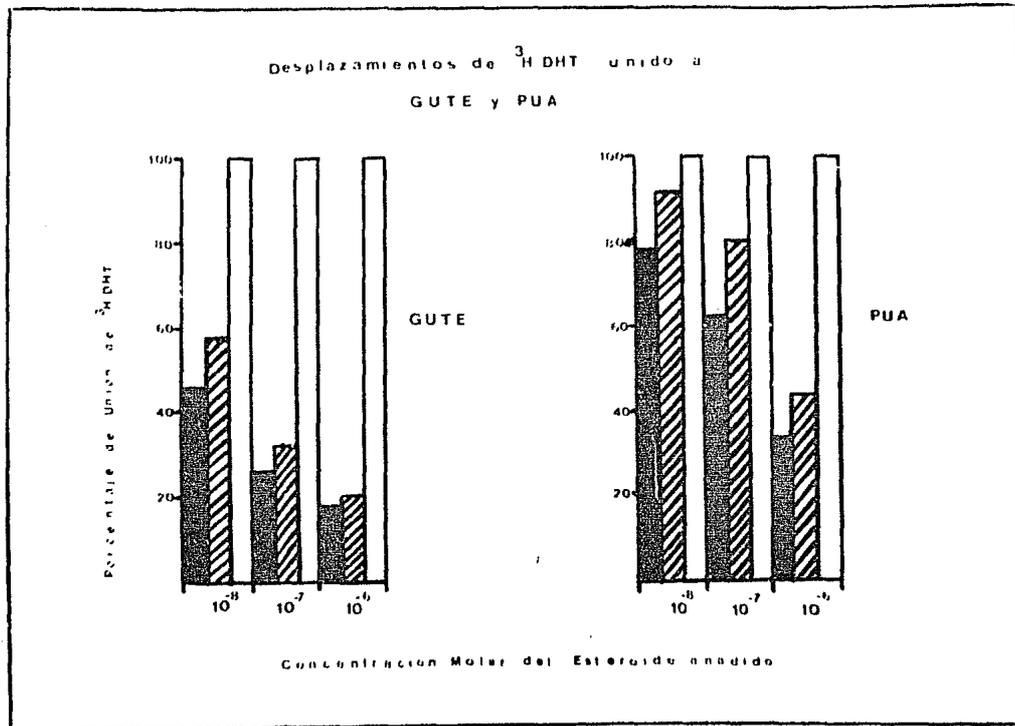


Figura 4. Efecto de DHT (■), NET (▨), y MPA (□) sobre la unión de <sup>3</sup>H.DHT a GUTE y PUA.

nuevamente de un 80 % el efecto para GUTE y de un 58 % para PUA.

El efecto de ambas progestinas fue valorado tam - bién sobre la unión de cortisol radioactivo (<sup>3</sup>H.F) a la glo-

bulina transportadora de corticoesteroides de suero, tanto en el humano, ovino, conejo, como en la rata, como se puede observar en la figura 5. Como en el caso anterior fueron similares al caso de GUTE, nuevamente MPA no tuvo ningún efecto, mientras que las concentraciones crecientes de NET desplaza-

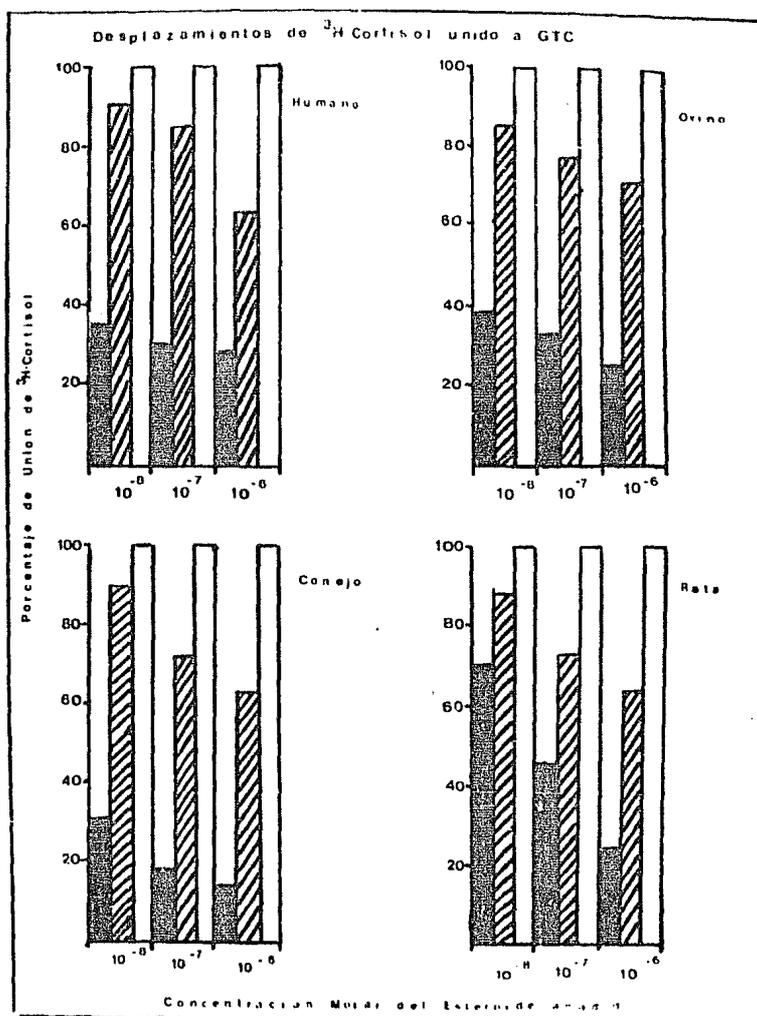


Figura 5. Efecto de Cortisol (■), NET (▨), y MPA (□) sobre la unión de <sup>3</sup>H.Cortisol a GTC.

ron la radioactividad unida de cortisol a GTC, hasta en un - 40 % en el humano.

En el caso de los estudios del mecanismo inhibitorio de NET sobre la unión de DHT a GUTE como puede observarse en la figura 6 en su gráfica superior, la adición de  $1 \times 10^{-7}$  M de NET, produjo un efecto inhibitorio importante sobre la

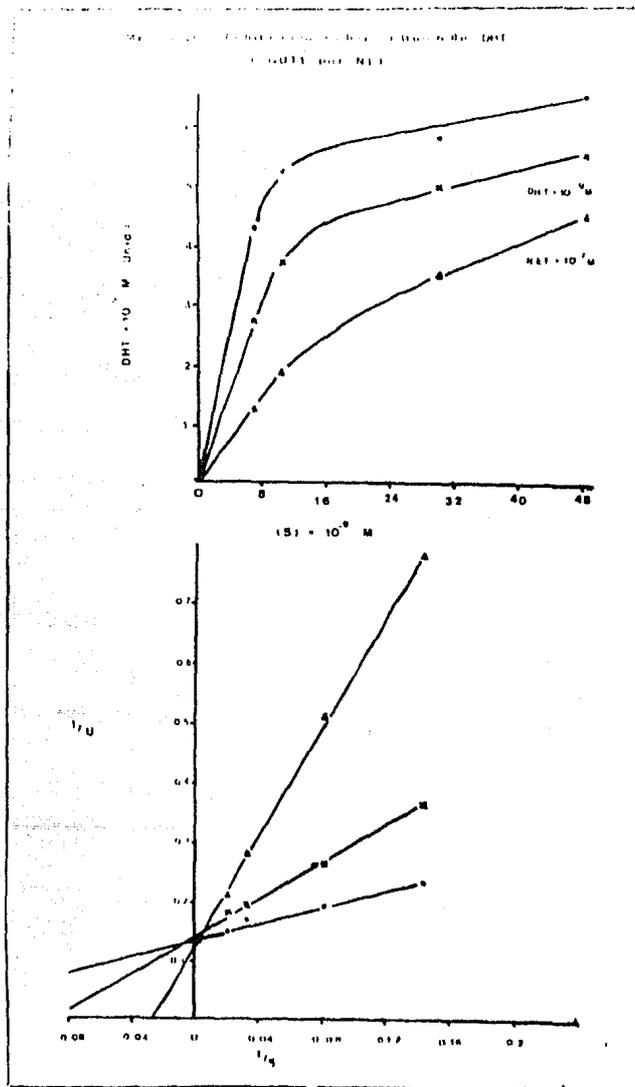


Figura 6. Efecto de NET ( $\blacktriangle - \blacktriangle$ ) y DHT ( $x - x$ ) sobre la unión de  $^3\text{H-DHT}$  a GUTE humana.

unión de DHT a GUTE, cuando estos resultados fueron analizados en una gráfica de doble recíproca (gráfica inferior), de

mostraron claramente que el mecanismo de inhibición de NET como de DHT no radioactiva sobre la unión de DHT radioactiva es competitiva.

Se obtuvieron resultados similares (figura 7) a los anteriores para el caso del ovino, NET nuevamente produjo un efecto inhibitorio significativo sobre la unión de DHT ra - dioactiva a GUTE de ovino, al ser analizados los resultados - para este caso en forma de doble recíproca se observó que NET también presenta un mecanismo inhibitorio de tipo competitivo

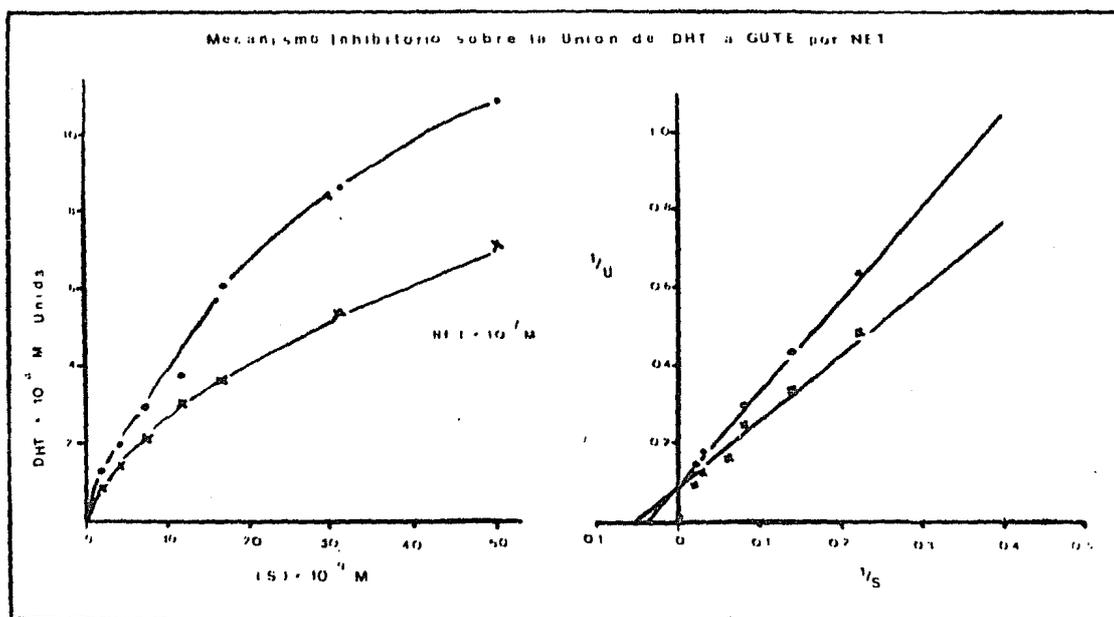


Figura 7. Efecto de NET (x - x) sobre la unión de <sup>3</sup>H.DHT a - GUTE de ovino.

sobre la unión de DHT radioactiva a suero de ovino.

En la figura 8 se puede ver los resultados obteni - dos para el caso de GTC, se decidió utilizar el suero de rata como origen de esta glicoproteína, ya que en esta especie se

encuentra ausente GUTE que pudiera interferir con los resultados. En esta figura se puede observar los dos tipos de gráficas utilizadas en el análisis de este tipo de resultados, los cuales muestran, la naturaleza competitiva del mecanismo inhibitorio de NET sobre la unión de cortisol radioactivo a GTC, al igual que para GUTE.

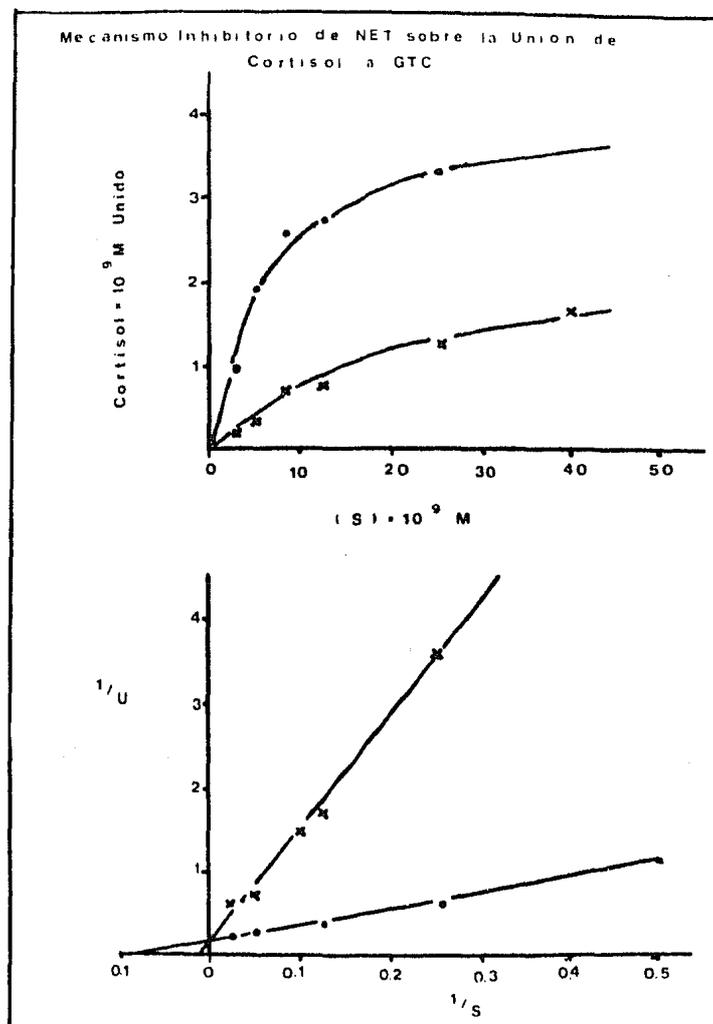


Figura 8. Efecto de NET (x - x) sobre la unión de <sup>3</sup>H.Cortisol a GTC de rata.

Al graficar las pendientes de las curvas de doble -

recíproca contra las concentraciones del esteroide inhibidor, nos da a conocer el mecanismo de unión del inhibidor de la proteína sérica. En la figura 9 se muestra el estudio hecho en suero humano con DHT radioactiva, utilizando DHT sin marcar como inhibidor, la gráfica de la izquierda se muestran las curvas de doble recíproca donde se observa el mecanismo de unión de DHT radioactiva.

Al graficar las pendientes de estas curvas contra las concentraciones crecientes de DHT no radioactiva, se observa claramente la proyección de una línea recta, lo que nos

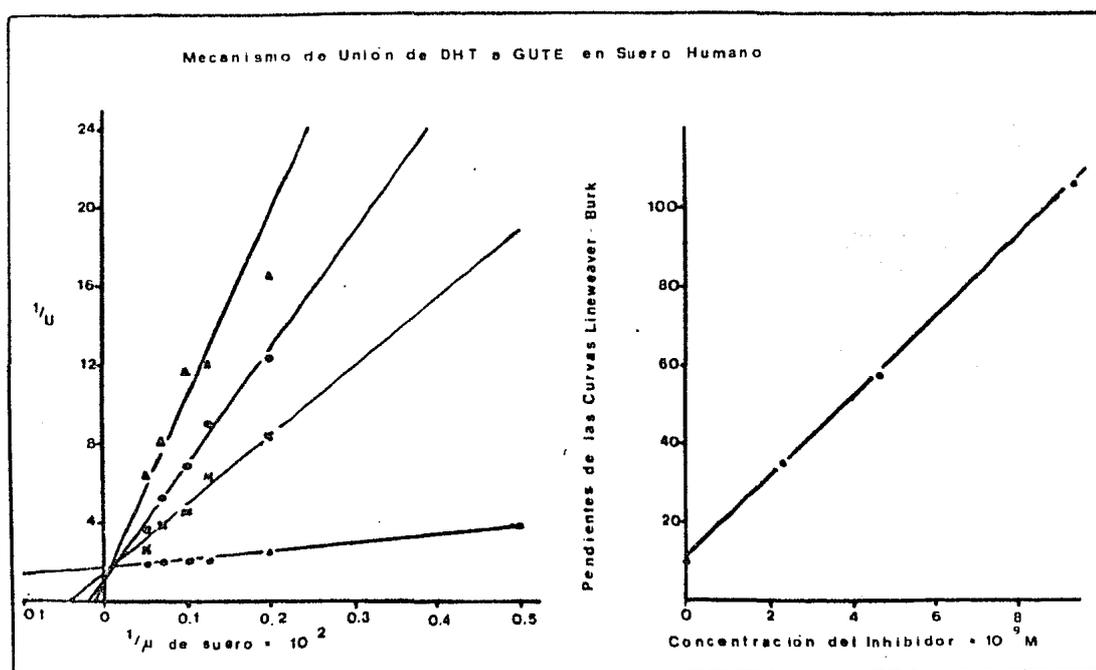


Figura 9. Acción de DHT sobre el sitio activo de GUTE.

sugiere una unión directa al sitio de unión de GUTE, lo que era de esperarse para este caso ya que tanto el esteroide radioactivo como el no radioactivo, es el mismo por el que GUTE tiene una alta afinidad. Cuando se utilizó a NET como esteroide inhibidor; los resultados fueron similares (figura 10)

que con DHT, resultando una unión de NET al sitio de unión de GUTE en el humano.

De manera comparativa se realizaron los mismos estudios en el ovino, al observar los resultados graficados en las figuras 11 y 12 se obtienen resultados similares a los de humano en GUTE de ovino, NET se unió nuevamente en esta especie al sitio de unión de GUTE.

Con estos resultados el paso a seguir fue la de caracterizar la unión de NET radioactiva al suero humano y de

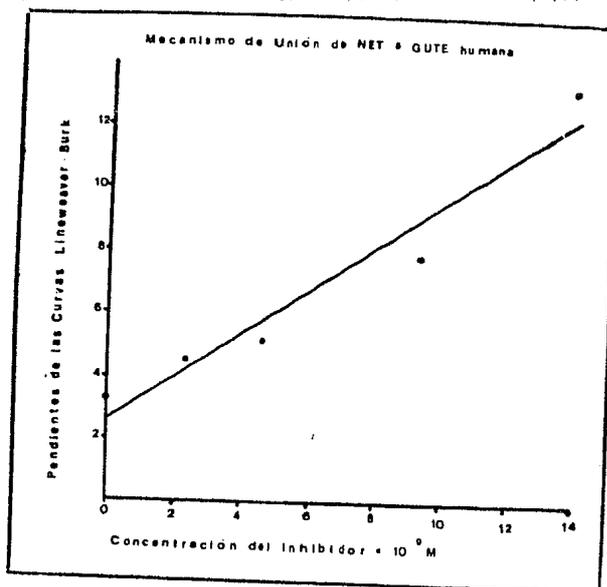


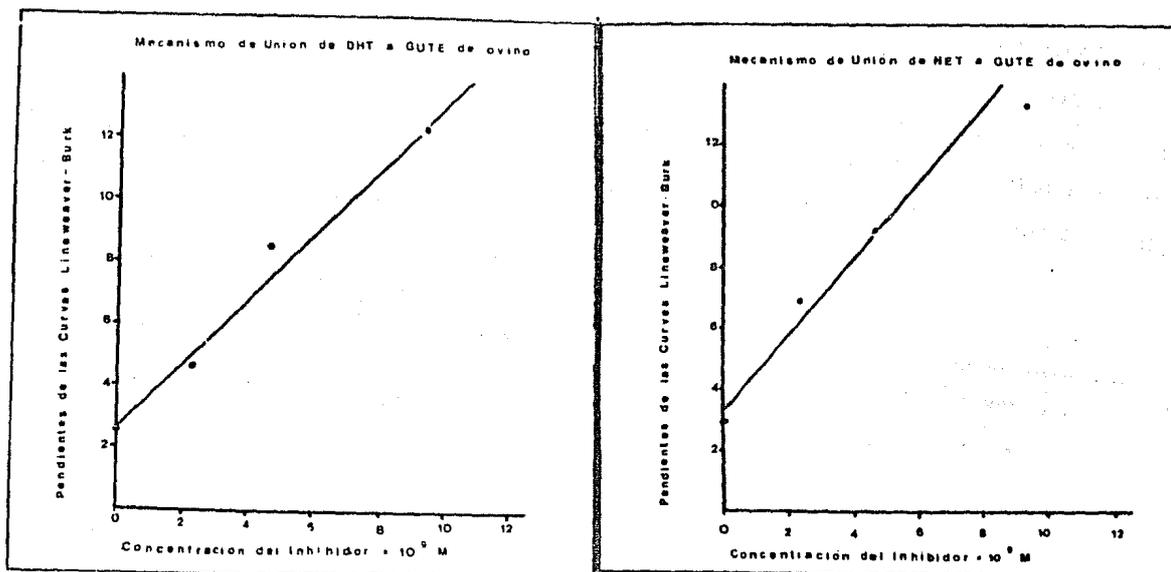
Figura 10. Acción de NET sobre el sitio activo de GUTE.

otras especies animales.

Al comparar los efectos del pH sobre la unión de DHT radioactiva al igual que de NET radioactiva al suero humano (figura 13), los resultados fueron parecidos, a pesar de que la unión específica de DHT radioactiva es mayor que la de NET radioactiva al suero, en cuanto al pH presentan ambos es-

teroides radioactivos una máxima unión a pH neutros que a ácidos u alcalinos.

La figura 14 muestra la unión específica de NET ra -  
 dioactiva a diferentes cantidades de suero a mujeres normales.  
 La unión total del esteroide utilizando cantidades máximas de  
 suero en nuestro ensayo fue del 30 por ciento obteniéndose -  
 porcentajes de unión más elevados con suero de otras especies,  
 como la del ovino (borrego).



Figuras 11 y 12. Acción de DHT (izquierda) y NET (derecha) -  
 sobre el sitio activo de GUTE.

La especificidad de unión de NET al suero se valoró  
 con la adición al sistema de incubación de concentraciones cre -  
 cientes de la progesterona no radioactiva, (figura 15).

En esta figura se muestran los resultados obtenidos,  
 a la derecha de la figura puede observarse que la adición de  
 cantidades crecientes de Noretisterona no radioactiva produce

una curva dosis respuesta generada por un fenómeno competi-

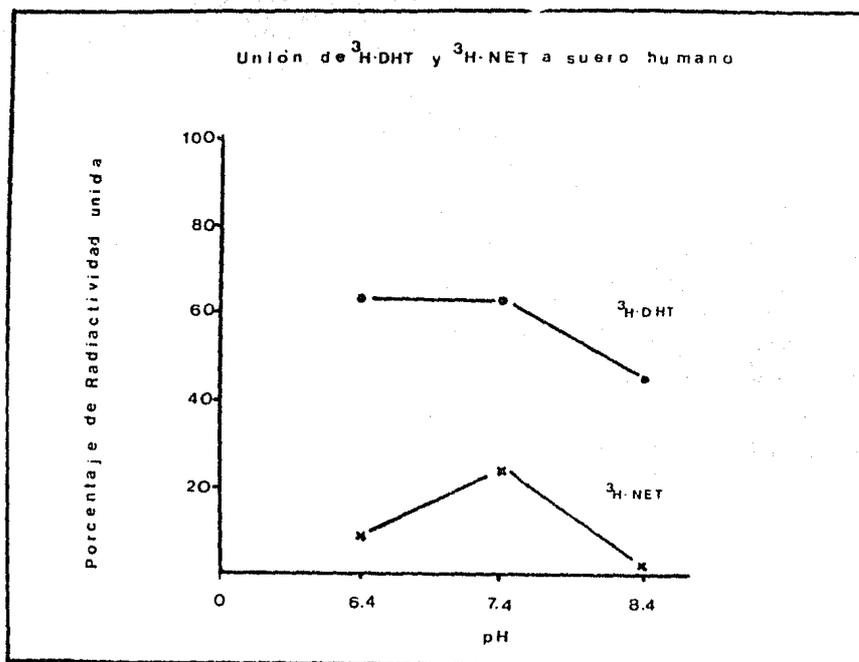


Figura 13. Efecto del pH sobre la unión de DHT y NET a GUTE de suero humano.

vo entre el esteroide radioactivo y el no marcado. Las constantes de afinidad de NET al suero del humano se encuentran representadas a la izquierda de la figura. La constante de disociación del suero por NET fue de  $1.36 \times 10^{-8}$  M indicando que la afinidad del suero por esta progestina en el humano, es menor que la observada para los esteroides naturales.

La unión de NET radioactiva fue también valorada en una preparación parcialmente purificada de GUTE de suero humano, y comparando estos resultados con la unión obtenida en el suero normal (figura 16).

Cuando concentraciones equimoleculares de GUTE parcialmente purificada, y en suero, fueron incubadas con concen

traciones a saturación de NET radioactiva, se obtuvieron los

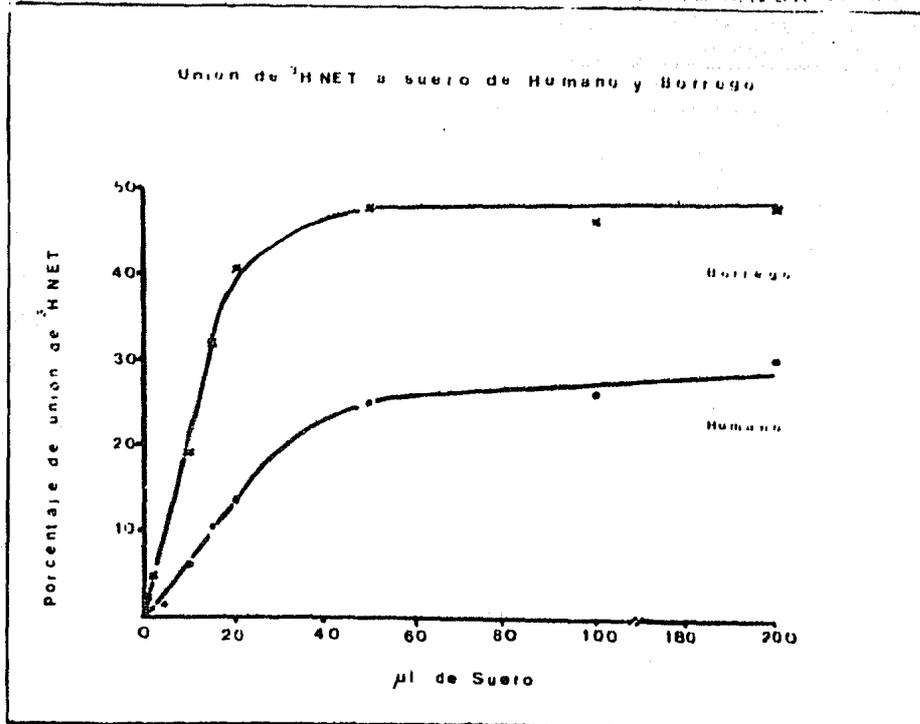


Figura 14. Unión específica de Noretisterona radioactiva a suero de ovino y humano.

siguientes resultados: como puede observarse, solamente el 40 por ciento de la radioactividad unida al suero de mujeres normales parece corresponder a GUTE, estando el 60 por ciento restante unido a otro tipo de proteínas como albúmina y GTC.

El efecto de cortisol, NET y DHT sobre la unión de Noretisterona radioactiva al suero humano fue observada también. En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos en los cuales se puede observar claramente un mayor desplazamiento de la Noretisterona radioactiva unida al suero humano en presencia de DHT no radioactiva confirmando así su mayor unión a GUTE que a GTC o albúmina.

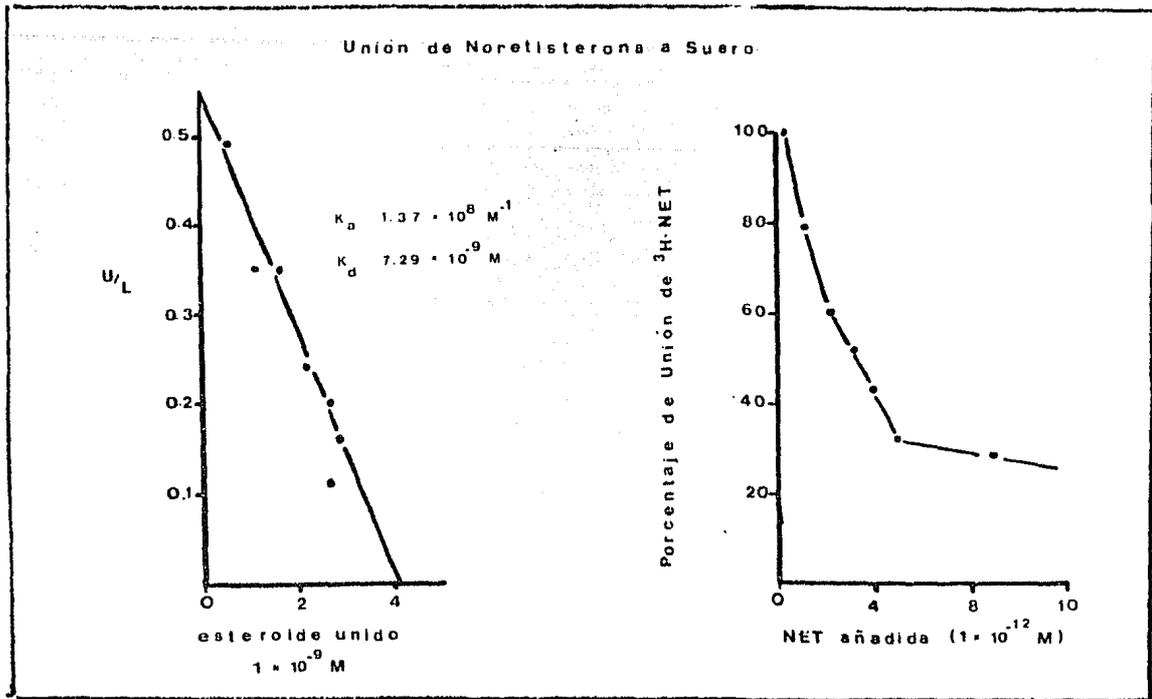


Figura 15. Especificidad de Unión de  $^3\text{H}$ .NET a suero humano.

Las características de unión de NET radioactiva se estudiaron tanto el ovino como en el humano. En la figura 18 se muestran las velocidades de asociación y disociación de Noretisterona y Dihidrottestosterona en suero de humano, y en la figura 19 las observadas en el suero de ovino.

En la parte superior de ambas figuras se ilustra la unión a  $4^\circ\text{C}$  de NET y DHT radioactivas a diferentes tiempos de incubación. Los resultados demuestran que NET y DHT tienen una velocidad de asociación similar, obteniéndose valores de  $4.86$  y  $4.67 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ m}^{-1}$  para DHT y NET respectivamente en el humano, y de  $3.95$  y  $5.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ m}^{-1}$  para DHT y NET respectivamente en el ovino. Resultados similares se obtuvieron cuando se estudió la velocidad de disociación (gráficas inferiores de ambas figuras) de los dos estroides, obteniéndose

se valores para DHT de 1.0 en el humano y de 0.25 en el ovino y para NET de 0.33 en el humano y de 0.142 m<sup>-1</sup> para el ovino.

Por último la afinidad de Noretisterona al suero -

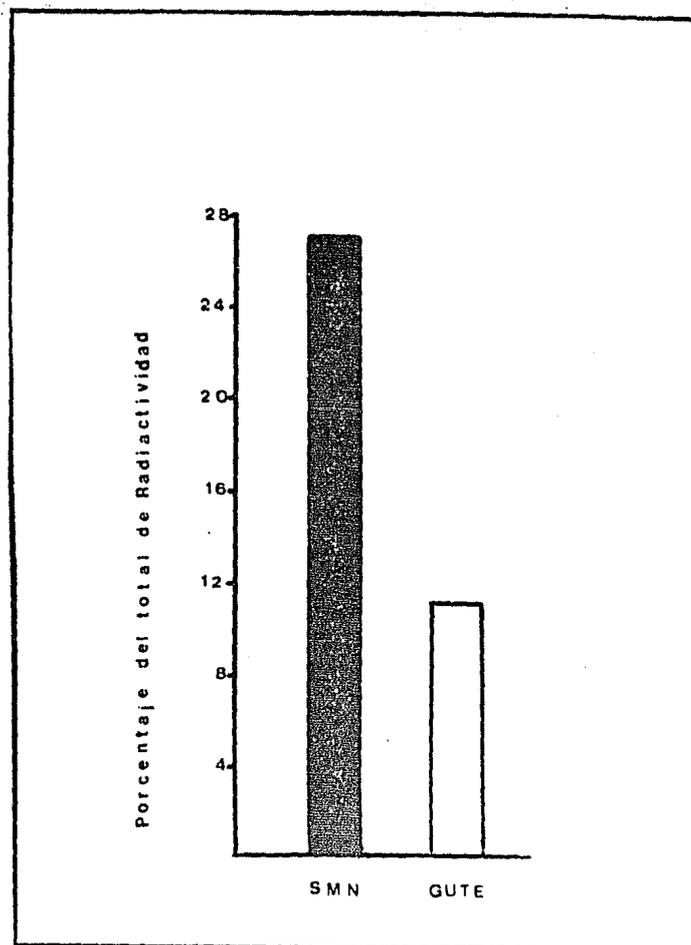


Figura 16. Unión de <sup>3</sup>H.NET al suero de Mujer Normal y a GUTE.

tanto del humano como del ovino, fue comparada a la de los andrógenos naturales, utilizando DHT radioactiva como ligando.

En las figuras 20 y 21 se muestran los resultados obtenidos derivados de gráficas de Scatchard generadas con DHT y NET tanto en el humano como en el ovino.

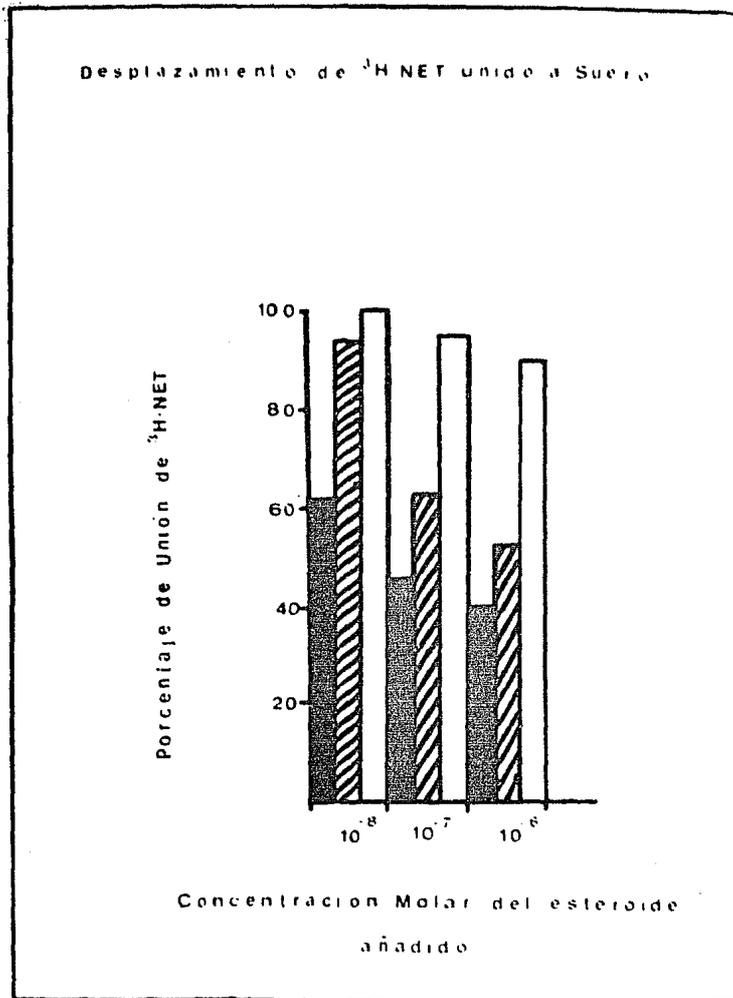


Figura 17. Efecto de DHT (■), NET (▨), y Cortisol (□) sobre la unión de  $^3\text{H}$ .NET a suero humano.

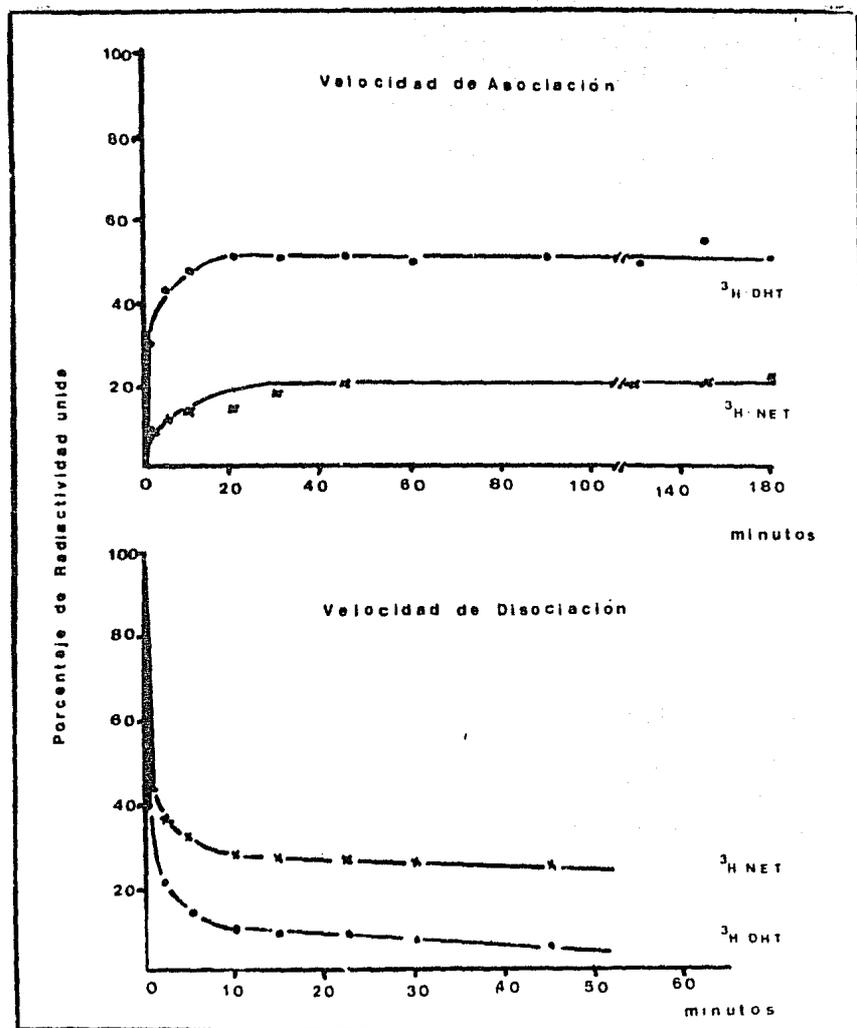


Figura 18. Unión a 4 °C de NET y DHT radioactivas a diferentes tiempos a suero humano.

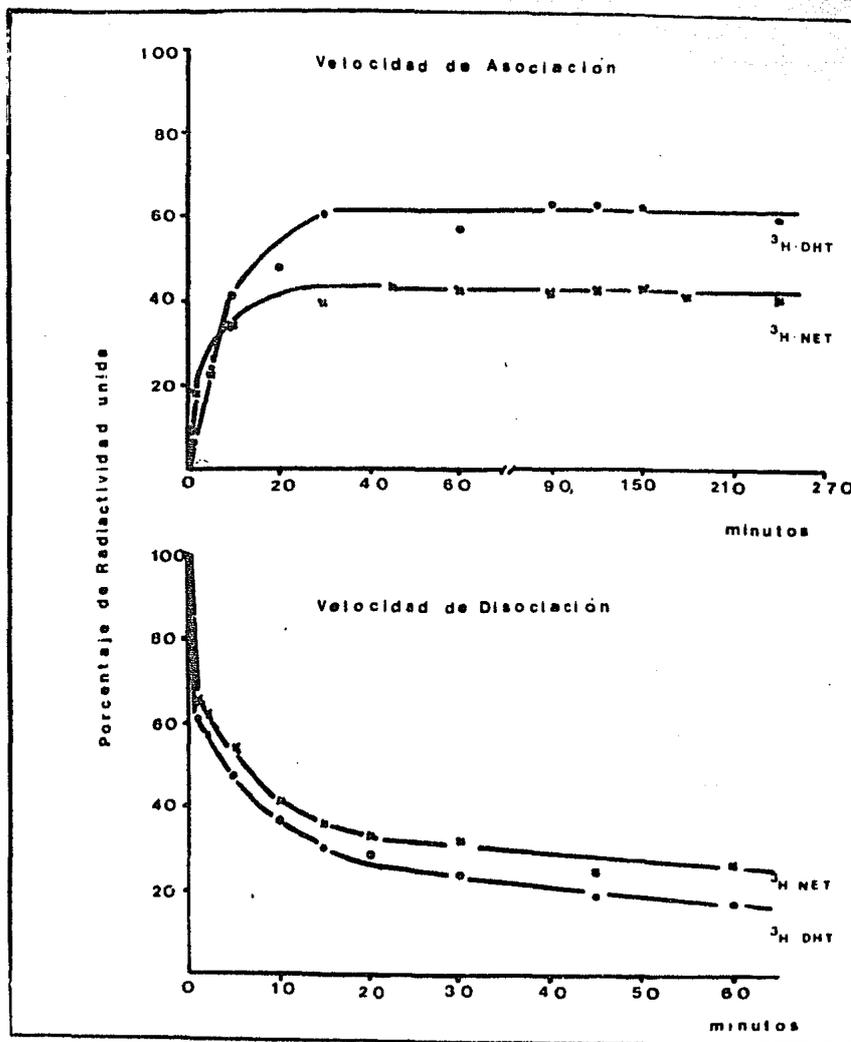


Figura 19. Unión a 4 °C de NET y DHT radioactivas a diferentes tiempos a suero de ovino.

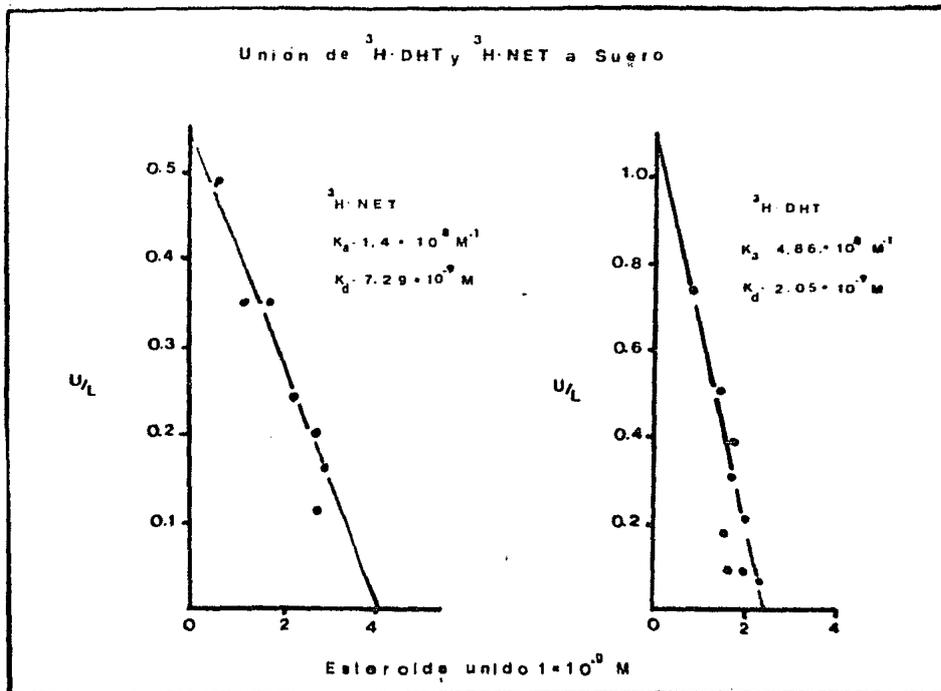


Figura 20. Constantes fisico-químicas de  $^3\text{H}\cdot\text{DHT}$  y  $^3\text{H}\cdot\text{NET}$  unidos a GUTE de suero humano.

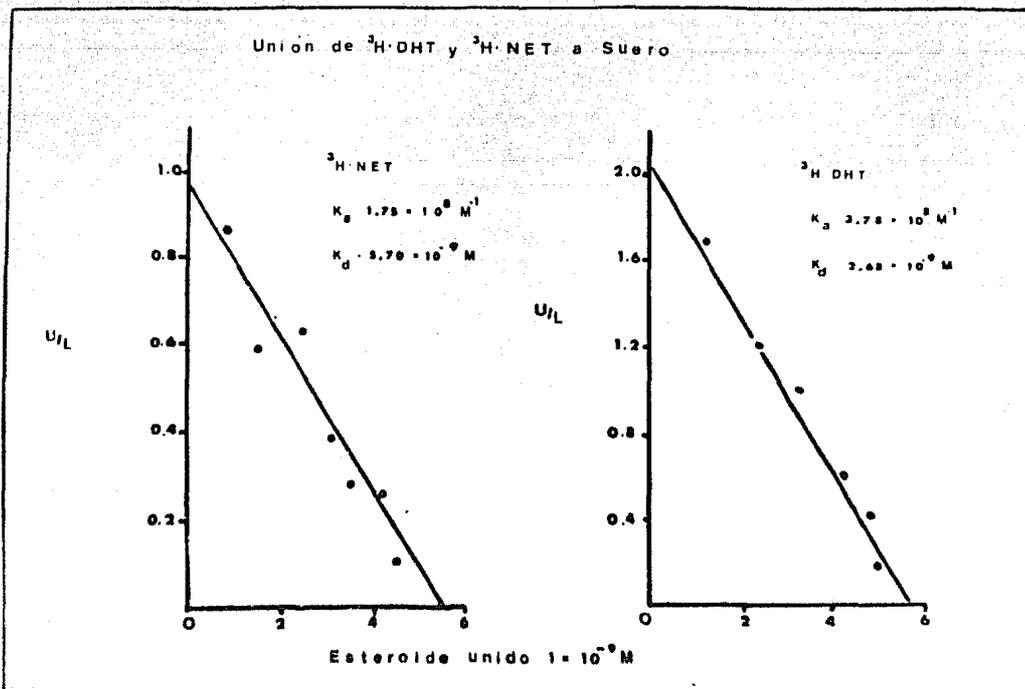


Figura 21. Constantes fisico-químicas de  $^3\text{H}$ -DHT y  $^3\text{H}$ -NET unidos a suero de ovino.

## V. DISCUSION

La interacción de las progestinas sintéticas, Acetato de Medroxiprogesterona (MPA) y Noretisterona (NET) con las globulinas transportadoras de suero principales fue valorada en el humano, el ovino, conejo y rata, así como a GUTE purificada de suero humano y PUA de epidídimos de ratas.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la unión in vitro de Noretisterona con las globulina transportadora de testosterona y estradiol (GUTE), así como con la globulina transportadora de corticoesteroides (GTC). Para el Acetato de Medroxiprogesterona no fue obtenida unión a ninguna de las dos globulinas, en la actualidad otros investigadores como Pugeat [36-38], han demostrado que su máxima unión es a albúmina.

Estos hallazgos dieron la evidencia de la interacción directa de Noretisterona con el sitio de unión de GUTE y GTC, respectivamente. Por lo que se decidió estudiar el mecanismo de inhibición o desplazamiento sobre la unión de DHT y Cortisol a sus respectivas proteínas transportadoras en presencia de Noretisterona.

En el presente trabajo se han demostrado los resultados en los cuales se observa claramente un mecanismo inhibitorio competitivo de noretisterona sobre la unión de  $5\alpha$ -dihidrotestosterona y Cortisol a sus respectivas proteínas unidoras, además de demostrarse que esta competencia guarda una relación directamente proporcional entre la concentración de noretisterona y el grado de inhibición producido.

Las condiciones de pH para obtener la máxima unión

de 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona y noretisterona a globulinas séricas fue igual, demostrándose que cambios ocurridos en la estructura tridimensional de las proteínas al variar el pH afectan de la misma manera la unión de las hormonas sexuales endógenas como la de ésta progestina sintética.

Por otra parte los resultados de este estudio confirman observaciones previas que demostraron que GUTE es capaz de transportar noretisterona en un 40 por ciento y que el 60 por ciento restante corresponde a un transporte por GTC y albúmina, siendo entonces GUTE el principal transportador de noretisterona en la corriente sanguínea.

Se observó y confirmó la similitud en las velocidades de disociación y asociación entre 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona y noretisterona unidas a suero y a otras especies, sin embargo, sus características fisico-químicas nos representan una afinidad de las globulinas transportadoras por esta progestina, como en otras especies en las que fue estudiada su unión, al igual que por las hormonas sexuales endógenas.

La diferencia en porcentaje de unión de noretisterona a suero humano y el de otras especies como el caso del ovino, se considera se debe a una velocidad de metabolización mayor de noretisterona que de los esteroides endógenos, además de la existencia de una diferencia de concentración de GUTE en el humano (3.6 ug/ml) con respecto al ovino (5.6 ug/ml), ya que las constantes fisico-químicas de la unión derivadas de los estudios presentados demostraron una afinidad similar del suero de ovino, a la obtenida por el suero de humano.

Estos resultados confirman la posibilidad de que

noretisterona, por virtud de su afinidad de unión a GUTE, - pueda jugar un papel sustantivo en la modificación del transporte de las hormonas sexuales endógenas. Consecuentemente, en la mujer normal la presencia de niveles circulantes de noretisterona; con la administración de cantidades farmacológi cas, en anticonceptivos orales o inyectables en cuya composi ción se encuentra presente noretisterona, pueden dar niveles suficientes de esta progestina para desplazar cantidades sig nificativas de dihidrotestosterona, testosterona y estradiol de GUTE y cortisol de GTC.

En este contexto la noretisterona es un compuesto que tiene una actividad como anticonceptivo muy importante - y desde hace varios años, pero puede ejercer efectos fisioló gicos significativos a través de la modificación del trasporte de las hormonas sexuales endógenas.

## VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que se ha llegado a través del presente estudio son las siguientes:

- 1.- El transporte de progestinas sintéticas en la sangre se realiza por medio de la unión de éstas a proteínas plasmáticas.
- 2.- Se demostró que Noretisterona es transportada unida tanto a la fracción de globulinas, principalmente a GUTE, así como en menor proporción a GTC.
- 3.- Que la unión de Noretisterona se lleva a cabo directamente al sitio de unión de GUTE; existiendo una competencia entre las hormonas sexuales endógenas y de Noretisterona por éste.
- 4.- Estos datos también sugieren que la interacción de fármacos con globulinas transportadoras pudieran afectar in vivo la relación unido-libre de los esteroides endógenos.
- 5.- De esta manera se explicaría, tanto sus mecanismos de acción como los efectos tóxicos secundarios atribuibles a la administración de los mismos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Schrader, W. T. and O'Malley, B. W. Laboratory manual for action and molecular endocrinology. The department of - Cell Biology. Baylor College of Medicine. Texas Medical Center. Houston, Texas, 4<sup>a</sup> ed. 1980.
2. Lehniger, A. L. Bioquímica. Ediciones Omega, S. A. 7<sup>a</sup> ed. Barcelona, 1977.
3. Thorpe, W. V., Bray, H. G., y James, S. P. Bioquímica. Compañía Editorial Continental, S. A., México, 1976.
4. Williams, R. H. Textbook of Endocrinology. 5<sup>a</sup> ed. W. B. Saunders Company, 1974.
5. Cobo, E., López-Escobar, G., y Pérez Palacios, G. Reproducción. Corporación Centro Regional de Población. Bogotá, Colombia, 1979.
6. Aldercreutz, H. Studies on oestrogen excretion in human bile. Acta Endocrinol. 42 suppl. 72, 1962.
7. Richardson, G. S. Ovarian Physiology. New Eng. J. Med. 274:1008, 10064, 1121, 1183; 1966.
8. Barlow, J. J., and Logan, C. M. Estrogen secretion biosynthesis and metabolism: their relationship to the menstrual cycle. Steroids, 7:309, 1966.
9. Roy, E. J., Horkness, R. A., and Kerr, M. G. The concentration of oestrogens in the peripheral blood of women - during the normal menstrual cycle and the first trimester

- of pregnancy. J. Endocrinol. 31:177, 1965.
10. Svendsen, R. and Sorensen, B. The plasma concentration of unconjugated oestrone and 17 beta oestradiol during the normal menstrual cycle. Acta Endocrinol. 47:245, - 1964.
  11. van der Molen, H. J., and Groen, D. Determination of progesterone in human peripheral blood using gas-liquid chromatography with electron capture detection. J. Clin. Endocrinol. 25:1625, 1965.
  12. Little, B., Tait, S. H. S., and Erlenmeyer, F. The metabolic clearance rate of progesterone in males and ovariectomized females. J. Clin. Invest. 45:901, 1961.
  13. Harton, R., and Tait, J. F. Androstendione production and interconversion rates measured in peripheral blood and studies on the possible site of its conversion to testosterone. J. Clin. Invest. 45:301, 1966.
  14. Lobotsky, J., Weys, H. I., Segre, E. J., and Lloyd, C. W. Plasma testosterone in the normal woman. J. Clin. Endocrinol. 24:1261, 1964.
  15. Westphal, U., et al. Mechanism of Steroid Binding to Serum Proteins. J. of Toxicology and Environmental Health. 4:229, 1978.
  16. Lobl, T. J. Androgen Transport Proteins. Physical Properties, Hormonal Regulation, and Possible Mechanism of TeBG and ABP action. Archives of Andrology. 7:133, 1981.

17. Westphal, U. Mechanism of Steroid Binding to Transport - Proteins. Pharmacological Modulation of Steroid Action, edited by E. Genazzani, et al., Raven Press, New York, - 1980.
18. Anderson, D. C. Sex-Hormone-Binding Globulin. Clin Endocrinol., 3:69, 1974.
19. Brien, T. G. Human Corticosteroid Binding-Globulin. - Clin. Endocrinol., 14:193, 1981.
20. White, A., et al. Principles of Biochemistry. Mc Graw-Hill Book Company. New York. 1970.
21. Rothschild, M. A., and Waldmann, T. Plasma Protein Metabolism. Academic Press. New York. 1970.
22. Gordon, A. H., Gross, J., O'Connor, D. & Pitt-Rivers, R. Nature of circulating thyroid hormone-plasma protein complex. Nature, 169:19, 1952.
23. Rosenthal, H. E., et al. Transcortin: A Corticosteroid Binding Protein of Plasma. X. Cortisol and Progesterone Interplay and Unbound Levels of These Steroids in Pregnancy. J. Clin. Endocrinol., 29:352, 1969.
24. Rosner, W., et al. The effect of Corticosteroid Binding Globulin on the in vitro. Incorporation of Thymidine in to Human Lymphocytes. J. Clin. Endocrinol. Metab., 54: 201, 1982.
25. Ballard, P. L., et al. Ontogeny and Regulation of Corti

- costeroid Binding Globulin capacity in Plasma of Fetal - and Newborn Lambs. *Endocrinology*, 110:359, 1982.
26. Lindenbaum, M., and Chatterton, R. T., Jr. Interaction - of Steroids with Dexamethasone Binding receptor and Corticosteroid Binding Globulin in the Mammary Gland of the Mouse in relation to Lactation. *Endocrinology*, 109:363, 1981.
  27. Bardin, C. W., et al. Extracellular Androgen Binding - Proteins. *Ann. Rev. Physiol.*, 43:189, 1981.
  28. Vermeulen, A., and Andó, S. Metabolic Clearance Rate In terconversion of Androgens and the Influence of the Free Androgen Fraction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48:320,- 1979.
  29. Wieland, R. G., et al. Elevated Testosterone Binding Glo bulin in Klinefelter's Syndrome. *J. Clin. Endocrinol. - Metab.*, 51:1199, 1980.
  30. Vermeulen, A., et al. Prolactinomas, Testosterone Bin- ding Globulin, and Androgen Metabolism. *J. Clin. Endo - crinol. Metab.*, 54:409, 1982.
  31. Stumpf, P. G., et al. Changes in Physiologically Free - Circulating Estradiol and Testosterone during Exposure to Levonorgestrel. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52:138, 1981.
  32. Pelliniemi, et al. Immunocytochemical Localization of - Androgen Binding Protein in the male rat reproductive - Tract. *Endocrinology*, 108:925, 1981.

33. Moll, G. W., et al. Estradiol-Testosterone Binding Interactions and Free Plasma Estradiol under Physiological - Conditions. J. Clin. Endocrinol. Metab., 52:868, 1981.
34. Horst, H. J., et al. The Determination in Human Males - of Specific Testosterone and 5  $\alpha$ -dihydrotestosterone Binding to Sex Hormone Binding Globulin by Differential Dissociation Technique. Steroids, 23:833, 1974.
35. Vigersky, R. A., et al. Relative Binding of Testosterone and Estradiol to Testosterone-Estradiol-Binding Globulin. J. Clin. Endocrinol. Metab., 49:899, 1979.
36. Odland, V., Victor, A., and Johansson, E. D. B. Plasma Protein Binding of Norethisterone. Contraception, 25: - 457, 1982.
37. Pugeat, M., et al. Transport of Steroid Hormones. Interaction of 70 Drugs with Testosterone-Binding-Globulin and Corticosteroid-Binding Globulin in Human Plasma. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53:69, 1981.
38. Dunn, J. F., et al. Transport of Steroid Hormones: Binding of 21 Endogenous Steroids to Both Testosterone Binding Globulin and Corticosteroid Binding Globulin in Human Plasma. J. Clin. Endocrinol. Metab., 53:58, 1981.
39. Farris, E. J., and Griffith, J. Q., Jr. The rat in Laboratory Investigation. J. B. Lippincott, Co. 2<sup>d</sup> ed.
40. Heyns, W., and de Moor, P. Kinetics of Dissociation of - 17 $\beta$ -hydroxysteroids from the Steroid Binding  $\beta$  Globulin of Human Plasma. J. Clin. Endocrinol. 32:147, 1971.

41. Braumberg, H., and Hammond, K. D. Practical and Theoretical Aspects in the Analysis of Steroid Receptors. J. of Steroid Biochemistry, 13:1133, 1980.
42. Roberts, D. V. Cambridge Chemistry Texts Enzyme Kinetics. Cambridge University Press. 1977.