

55

20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DE LA ACTIVIDAD PROGESTACIONAL Y/O ANTIPROGESTACIONAL DE VARIAS PROGESTINAS SINTETICAS A TRAVES DEL USO DE VECTORES QUIMERICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
ROCIO ANGELES GARCIA BECERRA



DIRECTOR DE TESIS MARIA PASAPERA LIMON



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Análisis de la actividad progestacional y/o antiprogestacional de
varias progestinas sintéticas a través del uso de vectores químé-
ricos.

realizado por Rocío Angeles García Becerra

con número de cuenta 8729620-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis M. en I.B.B. Ana María Pasapera Limón

Propietario M. en I.B.B. Saúl Cano Colín

Propietario M. en I.B.B. Benito Estrada Mena

Suplente Dr. Ignacio Camacho Arroyo

Suplente M. en C. Francisco Javier Camacho Arroyo

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena.

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE
BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNAM Y EL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN, BAJO LA
DIRECCION DE LA M. EN I.B.B. ANA MARIA PASAPERA LIMÓN.**

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS:

Por permitirme llegar a esta etapa de mi vida, por la fuerza y luz que guía mi camino.

A mis padres:

Con todo respeto y admiración.

A mi madre :

Por ser la persona más maravillosa que he conocido, por todo el apoyo, comprensión y amor que recibí de ella y por seguir siendo un impulso en mi vida.

A mi padre:

Por la confianza que has depositado en mí, siendo el motor en la búsqueda de una superación, por tu amor, ejemplo y aún más, por ser mi padre.

Te quiero mucho.

A mis hermanas Raquel, Lupita y Areli:

Por todo los momentos de cariño que han demostrado, por su ternura y por su ayuda incondicional.

A Gustavo Ramos Fuentes:

Con mucho amor, por todos los momentos bellos que hemos compartido, por la preocupación, cariño y respeto que has mostrado en cada cosa que quiero realizar, por tu ayuda en la elaboración de esta tesis, y sobre todo por tu amor.

A mi abuelito:

Por tu cariño y apoyo. Y por ser un super abuelito.

A mis tíos y tías:

Por su interés y entusiasmo que han mostrado en cada una de las metas que me he propuesto seguir. Con especial cariño y agradecimiento a **Isaura y Leticia**, porque entre muchas cosas que he recibido de ustedes, lo más importante que me han dado es su amor.

Con mucho cariño a todos mis **primos**.

A la UNAM:

Por el espacio y oportunidad para mi formación profesional y el logro de mis metas.

A la M. en I.B.B. Ana María Pasapera Limón:

Por su asesoría y orientación para la realización de este trabajo, por su amistad, confianza y afecto brindado, mi más distinguida consideración.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y al Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

A los integrantes del Laboratorio de Endocrinología Molecular.

Al Dr. Alejandro García Carrancá y su equipo de trabajo (Néstor y Miriam) por su apoyo en el desarrollo de trabajos de investigación.

A mis amigos y amigas por su apoyo y amistad.

Agradezco a los sinodales sus observaciones y aportaciones a este trabajo:

M. en I. B. B. Saúl Cano Colín.

M. en I. B .B. Bénito Estrada Mena.

M. en C. Francisco Javier Camacho Arroyo.

INDICE

RESUMEN.	5
ANTECEDENTES.	7
INTRODUCCIÓN.	10
3.1 HORMONAS ESTEROIDES.	11
3.1.1 MECANISMO GENERAL DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES.	13
3.2 ELEMENTOS BÁSICOS QUE REGULAN LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES HORMONO- REGULADOS.	15
3.2.1 ELEMENTOS CIS.	15
3.3 ESPECIFICIDAD EN LA RESPUESTA BIOLÓGICA POR HORMONAS ESTEROIDES: HORMONA, RECEPTOR, GEN Y ESPECIFICIDAD CELULAR.	16
3.4 RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES	17
3.4.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES.	18
3.4.2 INTERACCIÓN DEL RECEPTOR CON HRE.	22
3.4.3 DISCRIMINACIÓN DE LA SECUENCIA DEL DNA POR EL RECEPTOR A HORMONAS ESTEROIDES.	22
3.5 INTERACCIÓN DE LOS RECEPTORES CON OTROS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.	23
3.5.1 ENSAMBLE DEL COMPLEJO DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.	23
3.5.2 INTERACCIÓN POSITIVA DE LOS RECEPTORES CON OTROS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.	24
3.5.3 REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL: Competencia para la Unión, Interacción con API, y Secuestro.	25
3.6 MODULACIÓN DE LAS INTERACCIONES DEL RECEPTOR.	25
3.6.1 UNIÓN DEL LIGANDO AL RECEPTOR: Agonistas vs Antagonistas.	26
3.7 EL RECEPTOR DE LA PROGESTERONA.	27
3.7.1 ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA.	28
3.7.2 UNIÓN DEL RP AL DNA.	29
3.8 PROGESTERONA.	30
3.9.3.9 PROGESTINAS SINTÉTICAS.	33
3.9.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN	33
3.9.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROGESTINAS SINTÉTICAS	33
3.9.3 LA NORETISTERONA.	35
3.10 ANTIPROGESTINAS	38
3.10.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS ANTIPROGESTINAS	38
3.10.2 ANTAGONISTAS DE PROGESTERONA.	38

3.10.3 RU 486.	39
3.11 LA UTEROGLOBINA COMO MARCADOR DE ACCION PROGESTACIONAL.	41
3.12 GENES REPORTEROS.	43
3.12.1 CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA.	45
JUSTIFICACIÓN.	47
OBJETIVOS.	49
5.1 OBJETIVOS GENERALES	50
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	50
HIPÓTESIS.	51
MATERIALES Y MÉTODOS.	53
7.1 CONSTRUCCIONES GÉNICAS	54
7.2 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.	56
7.3 PREPARACIÓN, EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.	60
7.3.1 MINI PREPARACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS .	60
7.3.2 MAXI PREPARACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.	62
7.3.3 VERIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DEL MINI Y MAXI PREP. POR ELECTROFORESIS EN GELES HORIZONTALES DE AGAROSA.	64
7.4 VERIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.	66
7.5 CULTIVO CELULAR.	67
7.6 TRANSFECCIONES.	68
7.6.1 TRATAMIENTOS HORMONALES.	70
7.6.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA (CAT).	71
7.6.3 CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA (CCF).	72
RESULTADOS.	74
8.1 AMPLIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LOS VECTORES REPORTEROS.	75
8.2 REGULACIÓN PROGESTACIONAL DE LA ACTIVIDAD DE CAT DE LOS VECTORES PRE, TATA CAT Y TATA CAT.	77
8.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROGESTACIONAL DE NET, LNG Y SUS METABOLITOS REDUCIDOS EN EL ANILLO A.	81
8.4 EFECTO ANTIPROGESTACIONAL DE RU486.	87
8.5 EFECTO ANTIPROGESTACIONAL DE 5 α -NET.	89

DISCUSIÓN.	91
CONCLUSIONES.	96
APÉNDICE.	98
REFERENCIAS.	110

RESUMEN.

La Noretisterona (NET) y el Levonorgestrel (LNG) son progestinas sintéticas ampliamente utilizadas como agentes anticonceptivos y en terapia hormonal. Ambos compuestos son biotransformados, en los tejidos blanco, en metabolitos reducidos en el anillo A de su molécula, los cuales poseen diferentes propiedades farmacológicas. El objetivo de este estudio fue determinar los mecanismos moleculares a través de los cuales se llevan a cabo los efectos progestacionales y/o antiprogestacionales de NET, LNG y sus metabolitos reducidos. Para este propósito se utilizó un ensayo molecular *in vitro*, altamente eficiente, basado en la detección de la expresión de un gen reportero [la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT)] cuya transcripción es regulada por dos elementos de respuesta a progesterona (PRE₂) insertados en la región promotora 5' de la caja TATA (PRE₂-TATA-CAT). Se utilizó la línea celular CV-1, la cual se derivó de riñón de mono, y no posee receptores de hormonas esteroides sexuales. Estas células se cotransfectaron con un vector de expresión que codificaba para el receptor de progesterona y el vector reportero PRE₂-TATA-CAT. Los datos obtenidos con este modelo demostraron que NET y LNG indujeron la actividad de CAT de una manera similar a la de la potente progestina R5020. Los metabolitos de NET y LNG exhibieron una actividad progestacional débil; por otra parte, cuando el metabolito 5 α -NET se administró simultáneamente con R5020, un claro efecto antiprogestacional similar al de la antiprogestina RU486 se observó. Con estos resultados se mostró claramente que los efectos hormonales que presentaron NET y LNG, así como sus metabolitos previamente observados se llevaron a cabo a nivel de la transcripción, y que el uso de sistemas de transfección *in vitro*, de vectores quiméricos que portan en su secuencia los elementos de regulación progestacional unidos a un vector reportero, son un excelente modelo molecular que permite evaluar el efecto hormonal o antihormonal de diversos compuestos a nivel de la transcripción.

ANTECEDENTES.

La Noretisterona (NET) y el Levonorgestrel (LNG) son progestinas sintéticas derivadas de la 19-Nortestosterona, con actividad progestacional, ampliamente utilizadas en diversos fármacos empleados en la regulación de la fertilidad y terapia hormonal (Van Look 1986, 1987. Shoupe y Mishell, 1989). Ambos esteroides son metabolizados en tejidos blancos, en compuestos dihidroreducidos (5α y 5β) y tetrahidro reducidos (3β , 5α ; 3α , 5α). Se ha demostrado que estos metabolitos resultantes adquieren actividades hormonales (agonistas o antagonistas) diferentes del compuesto original (Cerbón 1991, Pérez-Palacios et al., 1992.). Los metabolitos reducidos en el anillo A de NET (5α NET y 3β , 5α NET) principalmente interactúan con los receptores de progesterona (RP) y receptores de estrógenos, respectivamente (Pérez Palacios et al., 1981, Chavéz et al., 1985, Shoupe y Mishell 1989). Los efectos hormonales que resultan de estas interacciones (principalmente de tipo progestacional y estrogénico) han sido ampliamente estudiados *in vivo* utilizando como modelo el gen de la uteroglobina de conejo. Los resultados de estos estudios indicaron que 5α -NET tuvo efectos agonistas progestacionales débiles, y que el 3β , 5α -NET presentó efectos estrogénicos evaluados mediante la síntesis de uteroglobina y de su RNAm (Cerbón et al., 1990), regulados por progesterona y estradiol, en el útero de conejas preñadas y prepúberes (Isoma et al., 1979, Loosfelt et al., 1981).

Cuando se evaluó el efecto hormonal de 5α NET en conejas prepúberes, se observó típicamente como un antagonista, fue capaz, en dosis mayores de 2.5 mg, de inhibir la síntesis de UG inducida por progesterona. Los resultados de estos estudios, nos permitieron conocer a qué nivel de la expresión génica se llevó a cabo este proceso inhibidor o antiprogestacional., ya que cuando estos metabolitos fueron probados en combinación con progesterona, exhibieron propiedades tanto antiprogestacional potentes como de anti-implantación (Pérez-Palacios et al., 1992, Pasapera et al., 1995, Castro et al., 1995). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en las acciones hormonal y antihormonal de estos esteroides no han sido completamente dilucidados.

En la actualidad, no se conocen todos los mecanismos a través de los cuales, tanto los metabolitos reducidos de NET, como otras progestinas ejercen sus múltiples efectos biológicos, incluyendo aquellos de tipo antagonista. Sin embargo, los datos en la literatura apoyan que estos efectos son mediados por la interacción de estas moléculas con los diferentes receptores, aunque el tipo de respuesta generada a partir de esta interacción tiene que ser explorada, ya que podría traducirse en efectos variados tipo agonista o antagonista.

Debido a que el mecanismo de acción de las hormonas y/o antihormonas puede llevarse a cabo a diferentes niveles, en este estudio nos propusimos valorar los efectos hormonales y/o antihormonales a nivel de la transcripción de NET, LNG y sus metabolitos reducidos, mediante el uso de un ensayo molecular *in vitro* altamente sensible a través del cual los efectos progestacional y antiprogestacional pudieron ser detectados al medirse la actividad de la enzima cloranfenicol acetyl transferasa (CAT) (Goman et al., 1982) de un vector reportero que posee en su secuencia dos elementos de respuesta a progesterona, los cuales regulan la transcripción del gen CAT.

INTRODUCCIÓN

3.1 HORMONAS ESTEROIDES.

Los esteroides tienen en común el poseer como núcleo químico básico, el ciclopentanoperhidrofenantreno. Este hidrocarburo cíclico está constituido por diecisiete átomos de carbono dispuestos en tres anillos de seis átomos de carbono (ciclohexano) y un anillo de cinco átomos de carbono (ciclopentano) denominados A, B, C y D (figura 1). La biosíntesis de novo de todas las hormonas esteroides se inicia a partir de acetyl-CoA y utiliza el colesterol como intermediario obligatorio. En la formación de colesterol se requiere la participación de por lo menos 27 enzimas localizadas en las fracciones microsomal y soluble de la célula. Por lo tanto, puede decirse que la formación de hormonas esteroides a partir del colesterol, un compuesto de 27 átomos de carbono, implica una serie sucesiva de cambios inducidos enzimáticamente, que resultan en su transformación a compuestos de 21 átomos de carbono (progesterona, gluco- y mineralo-corticoides), de 19 átomos de carbono (androstano) y de 18 átomos de carbono (estrano) (figura 1) (Hicks, y Díaz 1988).

Las hormonas esteroides más conocidas son los estrógenos, la progesterona, los andrógenos, los glucocorticoides, los mineralocorticoides y la vitamina D. Se trata de hormonas potentes que regulan el desarrollo y las funciones fisiológicas en las hembras (estrógenos), en el embarazo (progesterona), en el macho (andrógenos), en el metabolismo y las respuestas al estrés (glucocorticoides), en el equilibrio del agua y electrolitos (mineralocorticoides) y en el metabolismo del calcio y el crecimiento esquelético (vitamina D) (Yen et al., 1993). La mayor parte de estas hormonas se biosintetizan en las glándulas de secreción endócrina (ovario, testículo y suprarrenal) y en otros órganos que también tienen actividad esteroideogénica como la placenta, el hígado fetal (Hicks, y Díaz 1988) y en el cerebro, aunque en este último en muy pequeñas cantidades.

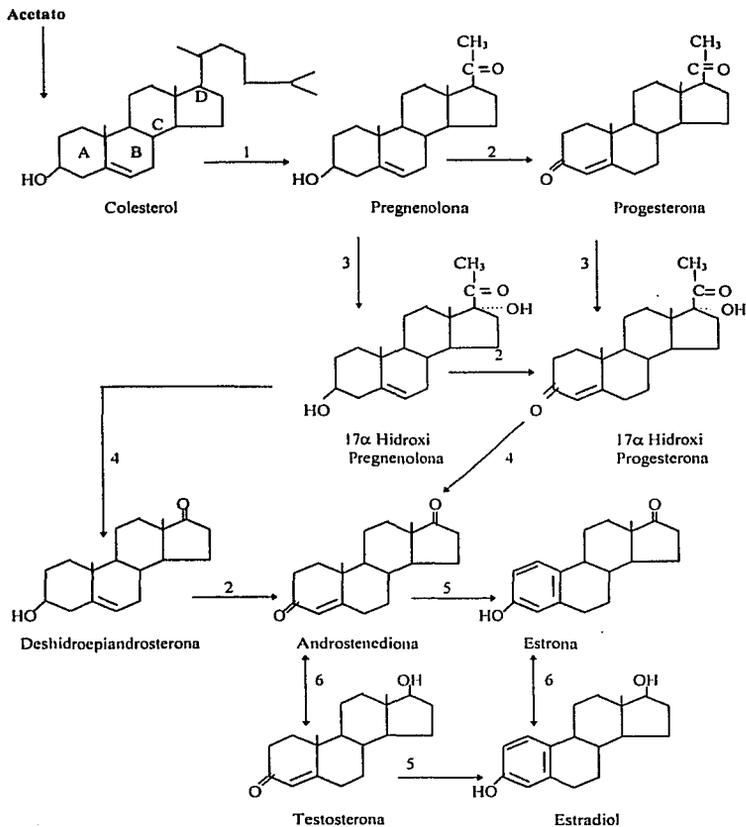


Figura 1. Biosíntesis de los principales esteroides. 1) 20,22 Desmolasa; 2) 3 β -OH deshidrogenasa. 3) 17 α -hidroxilasa, 4) 17,20- esteroide liasa (desmolasa), 5) aromatasa . 6) 17 β -OH-deshidrogenasa.

3.1.1 MECANISMO GENERAL DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES.

Nuestra comprensión actual de la vía bioquímica de la acción de las hormonas esteroideas en las células puede resumirse brevemente de la siguiente forma: las hormonas son secretadas desde sus respectivas glándulas endócrinas hacia el torrente circulatorio, donde circulan unidas (95%) a lipoproteínas plasmáticas de transporte. Los esteroideos libres difunden hacia el interior de las células e interactúan con los receptores específicos localizados, mayoritariamente, en el núcleo. Después de unirse con sus receptores específicos, experimentan un cambio conformacional, lo cual los convierte de inactivos a activos. En este punto, los receptores unen con los elementos de respuesta específicos localizados en la región promotora de los genes y así activar (o suprimir) la transcripción. Si un gen se activa, por ejemplo, la enzima RNA polimerasa II transcribe la información del gen en ácido ribonucleico mensajero (RNAm), una molécula intermediaria que transporta la información hacia el compartimiento citoplasmático de las células. Aquí, la información es traducida con la maquinaria biosintética produciendo el producto proteínico adecuado (Yen et al., 1993) (figura 2).

Los receptores de hormonas esteroideas, como muchos otros factores de transcripción, deben dimerizarse, interactuar con secuencias específicas del ácido desoxirribonucleico (DNA) y luego acoplarse con otros factores de la transcripción para formar complejos multiméricos estables que inducen a la RNA polimerasa, para que inicie la transcripción de los genes hormono-regulados (Landers y Spelsberg 1992, Yen et al., 1993) (fig. 2).

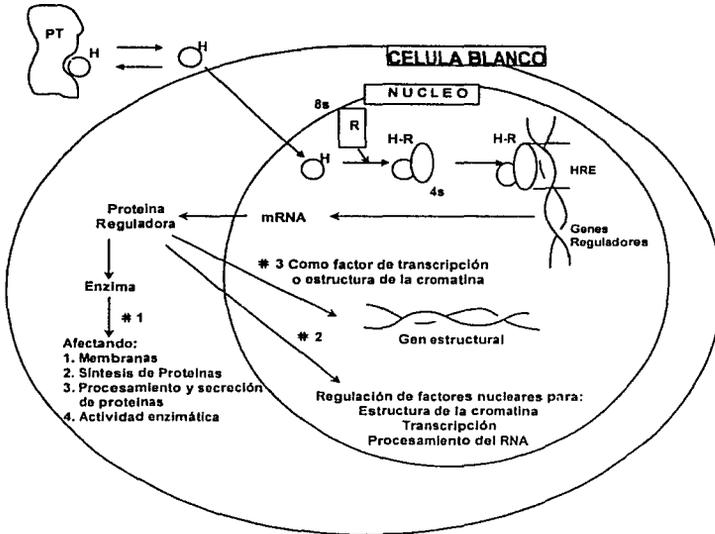


Figura 2. Mecanismo general de acción de las hormonas esteroides. El receptor activado por la hormona esteroide se une a un elemento de respuesta hormonal localizado en el extremo 5' de un gen regulador, controlando así la transcripción del gen regulador. PT= proteína transportadora, R= receptor, H= hormona esteroide, H-R= complejo hormona-receptor activado, HRE= elementos de respuesta a hormonas esteroides.

3.2 ELEMENTOS BÁSICOS QUE REGULAN LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES HORMONO-REGULADOS.

3.2.1 ELEMENTOS CIS.

Los elementos *cis* que regulan la expresión de los genes controlados por los receptores de hormonas esteroides, se dividen en cuatro grupos principales: 1) los promotores, 2) los elementos de respuesta a los esteroides (o potenciadores), 3) los silenciadores y, 4) los potenciadores independientes de las hormonas. (Yen et al., 1993)

1) Promotores. El promotor es indispensable para que el gen se transcriba. El promotor determina la tasa basal de la transcripción y también controla la iniciación de la transcripción. Sólo se requiere un promotor y en general se localiza hasta una distancia de 300 pares de bases (pb) del sitio de inicio de la transcripción de un gen. El promotor generalmente, está compuesto por dos subelementos diferentes: la caja TATA, que es una secuencia de 7 pb rica en (A·T) localizada a -30 bp del sitio de comienzo de la transcripción de un gen, y la secuencia de iniciación ubicado por lo general a -90 bp a partir del primer nucleótido (+1) de la transcripción. Ambos subelementos son activados cuando los complejos proteicos que forman la maquinaria básica de la transcripción se unen de forma específica con estos sitios.

2) Potenciadores que responden a los esteroides. Son secuencias localizadas en la región lejana 5' del gen y no limitadas a un sitio particular, hay una o más copias del potenciador que responde a los esteroides. Los potenciadores son secuencias cortas del DNA que son potentes estimuladores de la transcripción y que pueden localizarse a diferente distancia de sus genes análogos. Los potenciadores que responden a señales de las hormonas esteroides, sirven como sitios fijadores del DNA para los complejos esteroide-receptor activados y se denominan elementos de respuesta a las hormonas esteroides (HRE). Se ha demostrado que los sitios de los HRE contienen copias de un conjunto particularmente importante de desoxirribonucleótidos cuya secuencia contiene sitios de unión para los receptores específicos. La existencia de un HRE cercano al promotor o al sitio de inicio de la transcripción, por lo

general, permite que el gen sea sujeto al control de los complejos activados hormona-receptor. La estimulación hormonal podría aumentar la tasa de transcripción hasta más de cinco veces por encima del nivel basal.

3) Silenciadores. En contraste, los silenciadores son elementos *cis* con acción opuesta a los HRE. Actúan reduciendo o silenciando la transcripción de los genes. Un gen particular puede tener uno o más silenciadores. Si hay un silenciador, el gen adyacente no tiene una tasa basal de transcripción en ausencia de la estimulación por las hormonas esteroides. Sin embargo, la activación del HRE puede superar el efecto del silenciador y poner en marcha la expresión del gen.

4) Potenciadores independientes de las hormonas. Uno o más pueden localizarse dentro de la región reguladora del gen. Estos elementos *cis* tienden a incrementar la función de los HRE por el mayor aumento de la tasa máxima de la expresión de los genes inducibles.

3.3 ESPECIFICIDAD EN LA RESPUESTA BIOLÓGICA POR HORMONAS ESTEROIDES: HORMONA, RECEPTOR, GEN Y ESPECIFICIDAD CELULAR.

Dentro de un tipo celular particular, los ligandos agonistas interactúan con un receptor particular evocando siempre el mismo tipo de respuesta biológica, aunque la intensidad es diferente, dependiendo de la eficiencia de la unión del ligando. Aunque los efectos de una hormona pueden ser influenciados por el estado metabólico de la célula o por el ciclo celular, ellos son caracterizados por esta hormona y son por lo tanto hormono-específicos (Truss y Beato 1993). La respuesta celular a las hormonas es mediada por una interacción del receptor hormonal con los HREs en el DNA que son específicamente reconocidos por las proteínas receptoras. Hay varias clases de HREs, y parte de la selectividad en la respuesta hormonal es impartida por el uso de HREs específicos para un conjunto de receptores (Beato 1989). Sin embargo, hormonas diferentes (glucocorticoides, progestinas, mineralocorticoides y andrógenos) pueden activar los mismos genes al unirse con su receptor específico a la misma

secuencia reguladora (Cato et al., 1986, Cato et al., 1987 y Arriza et al., 1987). Por esta razón, varias hormonas pueden tener el mismo efecto en un tipo celular particular.

Los efectos evocados por una clase de hormona, en una línea celular particular, pueden incluir la inducción de la expresión de ciertos genes y represión de otros, aunque todas estas acciones están mediadas por la misma clase de receptores hormonales. Por lo tanto, la siguiente pregunta con respecto a la selectividad del efecto hormonal es el de las respuestas de genes específicos. Esto podría deberse al orden particular de la secuencia reguladora del DNA con la región del potenciador/promotor del gen regulado. La organización espacial de elementos reguladores puede influir su significado funcional. Por ejemplo, la consecuencia biológica de la unión hormona-receptor (Truss y Beato 1993).

Factores específicos de la célula pueden también influir sobre la hormona unida al receptor. La misma hormona puede producir efectos diferentes en células diferentes. Por ejemplo, un gen particular puede ser inducido o reprimido por el complejo hormona-receptor en cierto tipo celular, mientras no es regulado en otro tipo celular, o puede siempre ser inversamente regulado en un tercer tipo celular. En casos parecidos, la especificidad del receptor y la especificidad celular podría ser en parte explicado por la existencia de conjuntos diferentes de factores específicos de la célula, pero más probablemente refleje la contribución de la estructura de la cromatina para determinar la accesibilidad de secuencias reguladoras del DNA para receptores y otros factores de transcripción (Truss y Beato 1993).

3.4 RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES

Cada una de las hormonas esteroides actúa, primeramente, uniéndose a receptores específicos que discriminan entre las varias moléculas esteroides, cuyas diferencias estructurales son algunas veces mínimas (Truss y Beato 1993). Los receptores de cada clase de hormonas esteroides están codificados por genes de copia simples y una hormona específica produce efectos diferentes en varias células, ya que el mismo producto del gen media varias respuestas

diferentes dependiendo del tipo de célula bajo el que la hormona actúa. Una posible excepción es el receptor de progesterona (RP) que se presenta en dos isoformas, en las que la longitud de la región amino N-terminal difiere. Las dos isoformas pueden presentar especificidad por genes diferentes y, algunas veces por contextos celulares diferentes (Gronemeyer 1991), y por lo tanto, sus respuestas son diferentes.

3.4.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDES.

La bioquímica del receptor esteroide ha sido un campo activo de investigación endocrinológica desde los últimos años de la década de 1960, pero el análisis estructural y funcional de los receptores de las hormonas ha sido en parte solo posible siguiendo las clonaciones moleculares de la secuencias de los genes correspondientes. Las diferentes funciones de los receptores, como unión al ligando, dimerización, translocación nuclear, unión al DNA, y transactivación han sido asignadas a secuencias de aminoácidos particulares o a regiones más complejas de la proteína (Evans 1988).

Todos los miembros de la familia de receptores de hormonas esteroideas (SRs) comparten características estructurales y funcionales similares, en lo que respecta a la regulación de la transcripción de diferentes genes. Todos los receptores en esta familia tienen tres dominios estructurales altamente conservados (Figura 3). Uno de éstos es 66-68 residuos de aminoácidos, el cual está localizado en la parte central de la proteína. Funcionalmente, esta región contiene el dominio de unión al DNA (DBD). Las otras dos secuencias son de 42 y 34 residuos de aminoácidos y están localizadas hacia el extremo Carboxilo terminal (C-terminal) respecto al DBD. Estas dos secuencias están mezcladas con secuencias no conservadas, tienen un menor grado de homología que el DBD y son ricas en residuos de aminoácidos hidrofóbicos.

Los receptores contienen un dominio variable o A/B, localizado en el extremo N-terminal de la proteína. Este dominio varía tanto en tamaño como en secuencia (Figura 3) y está implicado en

la regulación de la transcripción génica tejido y promotor-específico (Berry *et al.*, 1990), así como en la formación de homodímeros y heterodímeros con otros factores de transcripción (Landers y Spelsberg, 1992).

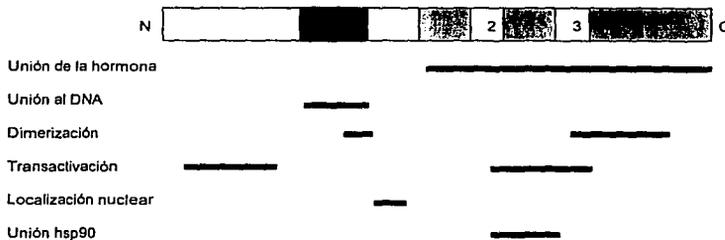


Figura 3. Representación esquemática de un receptor a hormonas esteroides indicando su organización estructural y funcional. La porción central negra es el dominio de unión al DNA (DBD) de 66-68 residuos de aminoácidos que define a esta superfamilia. Las regiones sombreadas en el extremo carboxi terminal es el dominio de unión a la hormona (HBD), la cual incluye los dominios conservados 2 y 3 (Fuller, 1991).

El dominio de unión al DNA (DBD) es la región más altamente conservada entre los miembros de la familia de receptores a hormonas esteroides. Este dominio contiene dos iones de zinc coordinados tetraédricamente con 8 residuos de cisteína. La coordinación del zinc es importante para la integridad estructural y la función de unión al DNA del DBD. Este dominio tiene dos subdominios (CI y CII) que son codificados por dos exones separados. Cada uno de ellos está compuesto de la estructura supersecundaria de asa-hélice y cada uno tiene un ion zinc ligado por dos cisteínas ubicadas en el inicio del asa (dedo de zinc) y por dos cisteínas ubicadas en el extremo N-terminal de la α -hélice. Las dos hélices se encuentran empaçadas una contra la otra en un ángulo casi recto (Harrison, 1991). Los residuos de aminoácidos de estos dos subdominios se pliegan para formar un solo dominio estructural. La estructura de

esta región parece ser el tema estructural asa [hélice-vuelta-hélice (HLH)], el cual es común para varias proteínas que se unen al DNA (incluyendo factores de transcripción), y puede unirse al surco mayor del DNA para inducir cambios en la transcripción de genes regulados por esteroides. Se cree que los residuos de aminoácidos que se encuentran entre las primeras dos cisteínas del segundo dedo de zinc forman una región de dimerización (Trus y Beato, 1993). Todo este dominio conlleva a que elemento del DNA se una al SR y, por lo tanto, que el gen sea regulado por el receptor. Por lo menos tres residuos de aminoácidos del extremo C-terminal del primer dedo de zinc (entre los dos dedos) son críticos para que el receptor reconozca el elemento de respuesta apropiado (Mader *et al.*, 1989).

El dominio de unión al esteroide (HBD) está localizado en el extremo C-terminal de la proteína. Este dominio es importante en la regulación de la actividad transcripcional del receptor. Subregiones específicas del dominio de unión al esteroide son responsables de conferir actividad transcripcional o "funciones activadoras de la transcripción" (TAF), las cuales se han identificado en ciertos receptores y son muy similares a los "dominios ácidos de activación" de ciertos factores de transcripción, no relacionados con los SR. La actividad de esta región es dependiente de la unión de ligandos agonistas (Webster *et al.*, 1988). La localización específica de la región TAF dentro del receptor no ha sido totalmente determinada, ya que ha sido encontrada en diferentes regiones del receptor. Otra región de dimerización menos definida se traslapa con el HBD y parece ser dependiente de la unión de la hormona (Fawell *et al.*, 1990). La formación de homodímeros es una característica general de esta familia.

Originalmente se creía que los SR se localizaban en el citoplasma y que se translocaban al núcleo cuando se unía la hormona (Jensen *et al.*, 1968). Estudios más recientes han demostrado que, a excepción del receptor de glucocorticoides (GR), los SR están asociados al núcleo de la célula, aún en ausencia de la hormona, y que la unión del ligando solamente incrementa la unión del receptor al núcleo (Picard *et al.*, 1990). Todos los SR contienen una secuencia de aminoácidos básicos (lisinas y argininas) en la vecindad del segundo dedo de zinc, entre los dominios de unión al DNA y el de unión al esteroide. Este dominio es llamado

la región de "bisagra" (hinge), cuya secuencia no es altamente conservada. Se ha encontrado que esta región básica es la señal de localización nuclear para varios SR, incluyendo el receptor de mineralocorticoides (MR), andrógenos (AR), GR, PR y ER (Picard y Yamamoto, 1987; Arriza *et al.*, 1987;; Trapman *et al.*, 1988; Guiochon-Mantel *et al.*, 1989, Green y Chambon, 1991). También se han identificado señales de localización nuclear en el dominio de unión a la hormona. Picard y Yamamoto, han demostrado que la secuencia de localización nuclear ubicada en el dominio de unión a la hormona del GR es dependiente de la hormona y puede tener un significado en la localización citosólica de este receptor no unido a glucocorticoides (Picard y Yamamoto, 1987).

Después de la unión al ligando, la forma activa de los receptores se supone es una entidad homodimérica conteniendo dos moléculas de ligando. En contraste a la vitamina D₃, hormona tiroidea y receptores de ácido retinoico, los receptores de hormonas esteroides de organismos superiores no parecen formar heterodímeros funcionales con otros miembros de la familia de los receptores nucleares (Truss y Beato 1993). Algunos receptores actúan en forma homodimérica en solución (Notides *et al.*, 1981. Redeuilh *et al.*, 1987, Wrangle *et al.*, 1989, Rodriguez *et al.*, 1990, De Marzo *et al.*, 1991), pero unidos al DNA estabilizan la formación del homodímero (Eriksson y Wrangle 1990). Una de las regiones de dimerización esta localizada dentro del DBD y más precisamente entre las primeras dos cisteínas y el segundo dedo de zinc (Schwabe y Rhodes 1991). Algunas antihormonas parecen ejercer su efecto negativo por interferir con la dimerización propia del receptor (Emmas *et al.*, 1992). La formación del homodímero parece ser importante en la unión del receptor a su secuencia palindrómica de reconocimiento (Lees 1990).

Los análisis detallados sobre la localización intracelular y circulación del receptor ya han mostrado que la mayoría de los receptores de hormonas esteroides están libremente asociados con el núcleo celular en la ausencia de la hormona, y la unión del ligando sólo permite una unión nuclear muy estrecha (King y Greene 1984, Welshons *et al.*, 1984). Varias secuencias cortas de residuos de aminoácidos se han identificado en muchas regiones del receptor que son

importantes para la localización nuclear (Picard y Yamamoto 1987, Guiochon-Mantel et al., 1989, Ylikomi et al., 1992).

3.4.2 INTERACCIÓN DEL RECEPTOR CON HRE.

Durante los últimos años un número de secuencias de reconocimiento del DNA han sido identificadas (Truss y Beato 1993). Entre ellas, aquellas que exhiben la más alta afinidad por receptores de hormonas, que son palíndromes imperfectos separados por 3 bp (Beato et al., 1989). Sin embargo, en regiones reguladoras en sitios de unión al receptor parece faltar una mitad del palíndromo. La afinidad del receptor por la mitad del palíndromo depende del tipo del receptor y de las secuencias vecinas (Truss y Beato 1993).

3.4.3 DISCRIMINACIÓN DE LA SECUENCIA DEL DNA POR EL RECEPTOR A HORMONAS ESTEROIDES.

Semejante a algunas otras proteínas reguladoras unidas al DNA, los receptores de hormonas esteroideas se unen a la doble hélice del DNA, esencialmente a través de interacciones con el surco mayor donde ellos reconocen pares de bases individuales en sus sitios de unión. Estos sitios tienen una estructura palindrómica imperfecta y puede clasificarse en dos principales subclases. Una comparación de algunos elementos de respuesta natural muestran que el grupo de elementos de respuesta a glucocorticoides/progesterona (GRE/PRE) tiene la secuencia consenso GGTACAnnnTGTYCY, y la interacción es inducida por glucocorticoides, progestinas, mineralocorticoides y andrógenos. Otro grupo es el prototipo de los elementos de repuesta para estrógenos (ERE), tiene la secuencia consenso GGTCANNNTGACC y su respuesta es mediada por estrógenos, hormonas tiroideas, vitamina D₃, y ácido retinoico (Truss y Beato 1993).

Los estudios más recientes (Carson-Jurica et al., 1990) han dividido estos elementos en tres clases que incluyen a los Elementos de Respuesta para Glucocorticoide, Progesterona,

Andrógeno y Mineralocorticoide (GRE/PRE), Estrógenos (ERE), hormonas Tiroideas (T₄RE) y los elementos de respuesta a ácido retinoico (arRE) (Beato M 1989). Los cuales se caracterizan por secuencias de bases específicas, ya sea de tipo palindrómicas o repetidas. (Beato M. 1989).

3.5 INTERACCIÓN DE LOS RECEPTORES CON OTROS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

Como ya se mencionó, la unión del receptor a los HRE es un prerequisite para la regulación del gen, pero esto no es suficiente. Varios estudios han mostrado que otros elementos de regulación dentro del promotor son requeridos para la manifestación del efecto hormonal en la expresión del gen. Esto sucede no sólo para aquellos sistemas en que la inducción hormonal puede ser bloqueada por inhibidores de la síntesis de proteínas, sino también en efectos primarios clásicos de hormonas en la transcripción. En los casos donde la hormona reprime la transcripción de los genes, la regulación puede tomar lugar sin unión de los receptores hormonales a los HREs definidos (Truss y Beato 1993).

3.5.1 ENSAMBLE DEL COMPLEJO DE INICIACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.

Los receptores de hormonas esteroides parecen ser capaces de interactuar con varios componentes de la maquinaria transcripcional. En transfecciones y ensayos de transcripción *in vitro*, se ha demostrado que los receptores de hormonas esteroides pueden activar promotores mínimos. La transactivación del receptor de estrógenos se aumentó en respuesta a la sobre expresión de la proteína de unión a la caja TATA (TBP). Esta interacción, sin embargo, no pudo ser suficiente para la transactivación o debió modularse por TAFs, ya que el receptor no pudo activar la transcripción de los genes de RNAr por RNAPI, que también son catalizados por un complejo conteniendo TBP. Los TAFs (factores implicados en el complejo de inicio de la transcripción) han sido identificados como blancos potenciales de los receptores a hormonas. También una interacción con TFIIB se ha reportado para el receptor de hormona

tiroidea (Banahmad A, et al., 1993, Tone Y., 1994) y para el receptor de la vitamina D₃ (Mac Donald PN, et al., 1995, Blanco JC, et al., 1995). Una interacción similar entre ER o PR y TFIIB se ha reportado (Ing NH, et al., 1992). También recientemente un número de factores intermediarios de la transcripción (TIF) para receptores de hormonas esteroides se han identificados, como SRC-1 que interactúa con PR y aumenta la transactivación por PR, ER, GR, etc. (Jacq, et al., 1994.)

3.5.2 INTERACCIÓN POSITIVA DE LOS RECEPTORES CON OTROS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.

En experimentos de transfección con construcciones artificiales conteniendo sitios de unión correctamente separados por varios factores de transcripción, se ha demostrado que GR es capaz de actuar sinérgicamente con una variedad de factores de transcripción, incluyendo CTF/NFI, SP1, y los factores de unión a la caja CACC (Schule et al., 1988, Strahle et al 1988). Los dominios carboxilo y amino terminal de GR se han implicado en estas interacciones sinérgicas (Muller et al., 1991).

Los análisis mutacionales del promotor MMTV (virus de tumor mamario de ratón) han mostrado que, además de los sitios de unión para receptores hormonales, otros elementos de secuencia proximal son importantes para la inducción hormonal. En particular, el sitio de unión para CTF/NFI inmediatamente hacia el 5' de la región de respuesta a la hormona (HRR) ha sido identificada como esencial para la inducción por glucocorticoides y progesterona (Nowock et al., 1985, Miksicek et al., 1987, Buetti et al., 1989, Toohery et al., 1990, Bruggemeier et al., 1990.). Además, dos temas estructurales octaméricos localizados entre los sitios de unión para CTF/NFI y la caja TATA parecen participar en la transcripción inducida hormonalmente. Como era de esperar, la región de la caja TATA es también esencial (Toohery et al., 1990, Bruggemeier et al., 1991).

Una demostración directa de la participación de CTF/NFI en la transcripción del MMTV y otros promotores se han obtenido en experimentos de transferencia de genes y en ensayos de transcripción *in vitro* (Kalff et al., 1990, Bruggemeier et al., 1991, Allan et al., 1991).

3.5.3 REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL: Competencia para la unión, Interacción con AP1, y Secuestro.

La represión de la transcripción por hormonas esteroides se puede explicar por la competencia entre los receptores de hormonas y otros factores de transcripción, al unirse a sitios esenciales en el promotor (Akerblom et al., 1988), pero algunos otros mecanismos se han propuesto. Ejemplos bien documentados de la represión transcripcional por glucocorticoides se ha descrito para varios promotores que son inducidos a través del sitio AP1 (Mordacq y Linzer 1989). En este caso, aunque el DBD del receptor es necesario para el efecto inhibitor, la represión no requiere la unión a los GRE, sino más bien depende de una interacción proteína-proteína, con los componentes del complejo AP1, Jun y Fos (Jonat et al., 1990, Touray 1991). Además, el efecto inhibitor es recíproco ya que la sobre expresión de Jun o Fos impide la inducción de genes de respuesta a los glucocorticoides (Shule et al., 1990, Lucibello et al., 1990).

3.6 MODULACIÓN DE LAS INTERACCIONES DEL RECEPTOR.

Se ha observado que la interacción de los receptores hormonales con el DNA, y con otros factores de transcripción esta influenciada por una variedad de parámetros, algunos afectan a uno de los receptores hormonales, mientras otros influyen en su blanco genómico. Entre los factores que influyen en la actividad del receptor, algunos son relevantes en todas las células, como la unión al ligando, en donde otros pueden ser célula específico, como el grado de fosforilación. Los factores que influyen en la secuencia genómica blanco de los receptores hormonales son la topología del DNA y la estructura de la cromatina. El conocimiento acerca

de estos mecanismos son limitados, a pesar de que ello es eminentemente importante para la fisiología de la acción de la hormona (Truss y Beato 1993).

3.6.1 UNIÓN DEL LIGANDO AL RECEPTOR: Agonistas vs Antagonistas.

Los experimentos *in vivo* han demostrado que la hormona se necesita para la acción del receptor, pero no es claro si en la ausencia de la hormona el receptor no unido al ligando ejerce alguna función fisiológica significativa. En el caso de las hormonas esteroideas no hay prueba directa de la función del receptor no unido al ligando (Truss y Beato 1993). Los receptores de esteroideas no unidos al ligando forman complejos con otros péptidos unidos, incluyendo a la proteína de choque térmico hsp 90 (Denis et al., 1987, Rexin et al., 1988) y, posiblemente, hsp 70 (Smith et al., 1990, Onate et al., 1991). Una de las funciones sugeridas de la formación de estos complejos podría ser mantener el receptor en una conformación "inactiva" en términos de la activación transcripcional (Cadepond et al., 1991). Además, la interacción de hsp 90 con p59, podría servir para facilitar la transición conformacional del receptor y, al mismo tiempo incrementar su afinidad por el ligando (Ohara et al., 1990, Tai et al., 1992, Callebaut et al., 1992.). En esta perspectiva, una función de la unión del ligando podría ser inducir un cambio conformacional del complejo oligomérico permitiendo la disociación de la hsp 90 y la formación de homodímeros estables de las subunidades unidas al esteroide (Denis et al., 1988, Forman y Samuels 1990). Como las uniones homodiméricas a los HRE son de alta afinidad y es la forma funcional del receptor, la inducción de dimerización podría ser uno de los efectos blanco principal de la unión del ligando (Truss y Beato 1993).

Se sabe que los receptores aislados pueden unirse a los HRE en ausencia del ligando, o cuando forman complejos con un antagonista (Willmann y Beato 1986). Existen también indicios de que un antagonista puede inducir la unión del receptor a los HRE *in vivo* (Guiochon-Mantel et al., 1988, Pham et al., 1991). Interesantemente, la cinética de unión del receptor al DNA parece ser dependiente de la unión al ligando (Shauer et al., 1989). En particular, la velocidad se acelera considerablemente por la unión de un agonista, sugiriendo que los cambios en la

vida media del complejo HRE-receptor pueden tener consecuencias funcionales (Shauer et al., 1989). La movilidad electroforética del complejo ERE-ER es también influenciada por la naturaleza del ligando, indicando que ligandos antagonistas pueden permitir la formación de complejos análogos con HREs (Fawell et al., 1990, Reese y Katzenellenbogen 1991). Estas ideas son apoyadas por la observación que estos complejos pueden competir por la transactivación constitutiva observada con receptores truncados que les falta el dominio de unión al ligando (Guiochon-Mantel et al., 1988). Además, la activación de la transcripción *in vitro* por el PR requiere la unión de un ligando agonista (Elliston et al., 1992), y la sustitución del agonista por un antagonista reduce la actividad de transactivación (Kalff et al., 1990, Bagchi et al., 1990). Estos hallazgos sugieren que la conformación del receptor homodímero de unión a los HRE está influenciada por la naturaleza del ligando y es importante para su transactivación (Truss y Beato 1993).

3.7 EL RECEPTOR DE LA PROGESTERONA.

La progesterona ejerce sus actividades biológicas a través de su unión a una proteína aceptora específica denominada Receptor de Progesterona (RP), el cual pertenece, como antes se mencionó, a una superfamilia de factores transcripcionales trans-activadores. Esta familia incluye a los receptores para hormonas esteroideas, para la vitamina D, hormonas tiroideas, ácido retinoico, ácido graso, así como proteínas sin ligando conocido, también llamadas receptores "huérfanos" (Evans 1988).

El RP, a diferencia de los otros receptores de hormonas esteroideas se ha detectado en análisis electroforéticos como dos isoformas de peso molecular distinto (llamados A de 79-94 kilo daltons (K) y B de 100-120 k), debido a que la longitud de la región amino N-terminal es diferente. Las dos isoformas pueden exhibir especificidad por genes diferentes y algunas veces por contextos celulares diferentes (Gronemeyer 1991).

La transcripción del receptor está bajo el control dual de progestinas y estrógenos, que actúan secuencialmente para regular la concentración celular del RP y, por consiguiente, una probable respuesta celular a progestinas. En el útero y varios tejidos blanco de progesterona, el receptor es incrementado por estrógenos donde los niveles de RNAm del RP se elevan en presencia de estrógenos. Algunas situaciones fisiológicas en que los niveles de progesterona en suero son elevados, por ejemplo, durante la fase lútea del ciclo menstrual humano o durante el tratamiento con progestinas en varias especies, se ha observado que los niveles del RP celular disminuyen de manera importante a lo que se le ha denominado una regulación a la baja del receptor por su ligando. (Christine et al., 1990).

3.7.1 ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA.

En la ausencia de ligandos específicos, por lo general, los receptores de esteroides están inactivos *in vivo*. La adición de la hormona resulta en una transformación rápida del receptor inactivo a un estado activo en donde el receptor se vuelve más pequeño (de 8s a 4s). Este proceso ha sido referido como activación o transformación. Antes de la activación por la hormona, el receptor esteroide forma complejos oligoméricos, los cuales no se unen al DNA. Se propone que este estado inactivo se mantiene por asociación del receptor a otras proteínas. Algunas de las proteínas que se ha propuesto como componentes del complejo oligomérico con el RP es la proteína de choque térmico de 90 K (HSP 90) y p59. Estas proteínas se han encontrado en complejos con los receptores de glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, y andrógeno en forma hetero-oligomérica. Se ha observado que cuando se forma el complejo con HSP90 y/o p59, los receptores de progesterona y de glucocorticoides no son viables para unirse al DNA. El tratamiento del complejo oligomérico del receptor con sales u hormonas *in vitro* resulta en la disociación del complejo para producir un receptor que puede ser activo y unirse al DNA.

En el caso particular del PR, éste interactúa con dos moléculas de HSP90 que son liberadas en presencia de su ligando (progesterona), quedando así el receptor activado el cual se une a

elementos de respuesta a progesterona (PRE) como dímeros (Christine et al., 1990, Carson-Jurica et al., 1990, Landers y Spelsberg 1992). Figura 4.

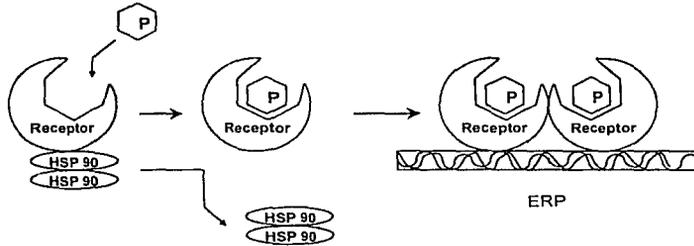


Figura 4. Activación del receptor de progesterona. Al unirse la progesterona al receptor se liberan las dos proteínas de HSP 90 quedando "activo" el receptor para unir a los elementos de respuesta para progesterona.

3.7.2 UNIÓN DEL RP AL DNA.

El paso inmediato después de que la progesterona (P_4) se une al receptor, es el cambio conformacional que sufre este receptor, resultando en la liberación de hsp90 (la cual está unida en una región cercana al dominio de unión al ligando (LBD), provocando cambios en la región LBD. De esta forma, los receptores se convierten en activadores transcripcionales, que a su vez pueden interactuar con otros factores de transcripción, desencadenando así el inicio de la transcripción de un gen que contiene dentro de las secuencias aledañas al promotor, elementos de respuestas a estos receptores (Beato M; 1989).

3.8 PROGESTERONA.

En los mamíferos, la P₄ es la hormona esteroide responsable de la preparación morfofuncional del endometrio para la nidación del huevo fertilizado, el mantenimiento de la gestación y el desarrollo alveolar de la glándula mamaria, esencial para el proceso de la lactancia. La estructura química básica de la P₄ y sus derivados hidroxilados y/o reducidos (progestinas naturales) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono. Los principales órganos de producción de progesterona son el cuerpo lúteo del ovario y la placenta. La corteza suprarrenal y el testículo también biosintetizan progesterona, aunque como intermediario en la formación de otras hormonas esteroideas (Hicks et al., 1988) (Fig. 5).

La molécula de P₄, una vez que ha sido sintetizada, puede servir como sustrato para la síntesis de un grupo de compuestos conocidos como progestinas naturales. Este proceso se realiza a través de cambios estructurales mediados por la acción de sistemas enzimáticos, localizados tanto en los órganos esteroideogénicos, como a nivel de los órganos blanco (sensibles a progesterona). Estas modificaciones enzimáticas de la P₄ modulan su actividad biológica intrínseca y ocurren fundamentalmente en los anillos A y D, así como en la cadena lateral. Las progestinas reducidas en el C-5 particularmente las 5β-progestinas (dihidro derivados) tienen una gran potencia anestésica, mientras que los compuestos reducidos en el C-5 y en el C-3 (tetrahydro derivados) modulan el funcionamiento del aparato neuronal relacionado con la producción y liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (LH-RH) (Hicks et al., 1988).

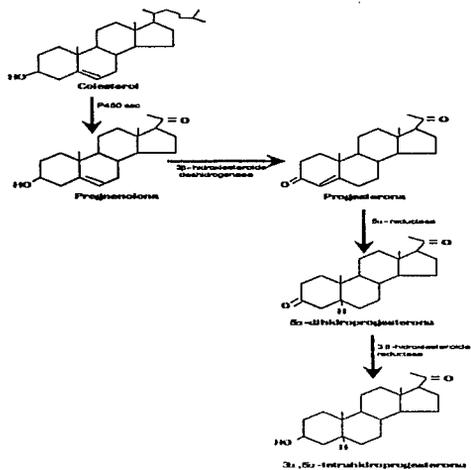


Figura 5. Biosíntesis de la progesterona a partir del colesterol y formación de progestinas naturales reducidas en el anillo A (dihidro y tetrahydro derivados) a partir de progesterona.

En la mujer, durante la fase lútea del ciclo menstrual, después de la ovulación, y durante el embarazo, la P₄, es esencial para la función reproductiva. En el útero, la P₄ causa decidualización del endometrio, implicado en este proceso células epiteliales, glandulares, mesenquimáticas y vasculares. Estos cambios son necesarios para la implantación del embrión (blastocisto), los cuales ocurren durante la segunda semana después de la fertilización. La P₄ también participa en la disminución de la respuesta del músculo liso del útero (miometrio) para evitar las acciones provocadas por agentes excitadores, tales como prostanglandinas y/u oxitocina, lo cual favorece la estabilidad en la cérvix del útero y la formación de una capa mucosa. Todos estos efectos son vitales para la protección del desarrollo del embrión y del feto (Clarke y Sutherland 1990).

Algunas células en el sistema nervioso central, particularmente en el hipotálamo, son también blancos para P_4 . (Camacho-Arroyo et al., 1995), la P_4 actúa en células blanco por vía del receptor de P_4 , la concentración de este receptor se ve incrementada en células blanco por el aumento preovulatorio de estrógenos. Estas células son así preparadas para responder a P_4 después de la ovulación. Cuando P_4 es secretada por el cuerpo lúteo este se encuentra particularmente bajo el control de la hormona luteinizante (LH) durante el ciclo, y su periodo de vida es marcadamente constante (14 días) si no se recupera por una hormona estimulante adicional (gonadotropina). La muerte funcional del cuerpo lúteo (luteólisis) está asociada con un decremento rápido de P_4 y estradiol, de tal forma que el endometrio sufre un proceso de desintegración y se desprende (menstruación). Si un óvulo fertilizado se implanta, la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) producida por células embrionarias, asegura la prolongación del periodo de vida del cuerpo lúteo y continúa la secreción de P_4 . Posteriormente, la placenta toma esta función, y hay un decremento de hCG, mientras la producción de P_4 placentar incrementa hasta el fin del embarazo. El incremento de las concentraciones de P_4 en el plasma son responsables de la falta de ovulación durante el embarazo, operando presumiblemente, vía un sistema de retroalimentación negativo en el eje hipotálamo-hipófisis al incrementar los niveles de LH. Este efecto inhibitorio de P_4 es la base de muchos de los anticonceptivos, que contienen un análogo de P_4 sintético (una progestina). (Wayne y Edwin 1983)

La P_4 está también implicada en el principio del ciclo en el desarrollo de los folículos y en los procesos de ovulación. La foliculogénesis depende, en parte, de P_4 intraovárica que no es secretada hacia la sangre, pero es activa localmente en una manera paracrina o autocrina. Un incremento pequeño de los niveles de P_4 en sangre ocurre antes de la ovulación y refuerza el efecto de retroalimentación positivo del estradiol, disparando los niveles de LH a mitad del ciclo. Este incremento de P_4 puede tener también efecto directo en el folículo (Wayne y Edwin 1983).

Durante el segundo o tercer mes de embarazo, la placenta comienza a secretar estradiol (E_2) y P_4 y de allí en adelante el cuerpo lúteo no es esencial para continuar la gestación. El E_2 y la P_4 continúan siendo secretados en largas cantidades por la placenta. La P_4 inhibe la síntesis de su propio receptor e impide la resíntesis del receptor de E_2 . Por estas razones bioquímicas, entre otras, la caída repentina en la secreción de P_4 en el fin del ciclo es el determinante principal del principio de la menstruación. Si la duración de la fase lútea se prolonga por tratamientos con P_4 , se pueden inducir cambios deciduales en el estroma endometrial, similares a aquellos observados en el embarazo temprano. El incremento en las concentraciones de P_4 que ocurre durante el curso de la gestación son de gran importancia en el mantenimiento del embarazo, particularmente considerando el hecho de que la P_4 suprime la contractilidad uterina. Otro efecto importante, es el hecho de que la P_4 puede contribuir para inducir un estado de "inmunidad a la transplatación", de este modo previene inmunológicamente el rechazo del feto. (Wayne y Edwin 1983)

3.9 PROGESTINAS SINTÉTICAS.

3.9.1 DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Las progestinas sintéticas o análogos de la progesterona, como el nombre lo sugiere, son esteroides que simulan los efectos de la progesterona. Específicamente, las progestinas se definen como agentes que inducen cambios secretores en el endometrio proliferativo. Se pueden clasificar como naturales y sintéticos (Yen et al., 1993).

3.9.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROGESTINAS SINTÉTICAS

Las progestinas sintéticas pueden clasificarse de acuerdo con la molécula esteroide básica de la cual se derivan. Las que se derivan de la molécula de pregnanos como la 17-Hidroxiprogesteronona y aquellas que se derivan del androstano y estrano como la 19-nortestosterona

(McGynty y Djeressi 1958). Dentro de este último grupo se encuentra la Noretisterona o NET, la cual es ampliamente utilizada en diversos fármacos empleados en la regulación de la fertilidad y terapia clínica, debido, a sus propiedades biológicas. Dentro de este grupo también se encuentra el Levonorgestrel o LNG (Hilliard et al., 1966).

Progestinas de estructura relacionada con la testosterona. Ya en 1938 se demostró que la manipulación de la molécula de testosterona modifica de forma radical su actividad; de androgénica a progestogénica. Sin embargo, en 1951 Djerassi y cols. sintetizaron el compuesto más importante de esta serie, la noretisterona, y originaron el desarrollo de toda la generación de agentes progestacionales. En este grupo se encuentra la noretisterona, el noretinodrel, el norgestrel, el levonorgestrel y el diacetato de einodiol. Estas cinco progestinas se utilizan como componentes de los anticonceptivos orales. Sólo el Levonorgestrel presenta actividad biológica y también se emplea en el preparado anticonceptivo implantable Norplant. (Yen et al., 1993).

Progestinas de estructura relacionada con la progesterona. El uso de estos compuestos como anticonceptivos es limitado. Es probable que el compuesto más importante de esta serie sea el acetato de medroxiprogesterona, efectivo por vía oral, el cual es utilizado con diversas indicaciones ginecológicas. En el pasado, algunas de estas progestinas se evaluaron y liberaron al mercado como anticonceptivos; en la actualidad se emplean sobre todo para el tratamiento de trastornos ginecológicos (Yen et al., 1993).

Se ha demostrado que las progestinas sintéticas se biotransforman a nivel de los órganos blanco y que los productos de transformación metabólica pueden interactuar con receptores localizados dentro de las células blanco. El efecto biológico de estas interacciones pueden resultar en actividades agonistas, antagonistas y/o sinérgicas, dependiendo de la naturaleza del receptor al que se unen (Pérez-Palacios, Fernández-Aparicio et al., 1981, Pérez-Palacios, Chavez et al., 1981).

Las progestinas también pueden interactuar con otros receptores de hormonas esteroides (andrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides y en algunos casos estrógenos) y pueden tener una especificidad muy variable. Algunas progestinas han mostrado unirse a otra clase de receptores, como por ejemplo el receptor GABA-A y el receptor de Glicina. (Ed. Progestins 1996).

3.9.3 LA NORETISTERONA.

La NET, 17 α -etilil-17 β -hidroxi-4 estren-3 ona, es una progestina sintética, con actividad progestacional, derivada de la 19-nor-testosterona (Pérez-Palacios, Fernández-Aparicio et al., 1981) se utiliza ampliamente como anticonceptivo debido a su capacidad para inhibir la ovulación (Pérez-Palacios, Chavez et al., 1981), en una acción mediada por la supresión de la liberación cíclica de gonadotropinas en la hipófisis anterior; sin embargo, la NET no posee exclusivamente actividad progestacional, ya que diversos estudios clínicos y experimentales han demostrado que después de su administración se observan efectos adicionales que clásicamente se consideran de tipo androgénico, estrogénico y glucocorticoide e, incluso, puede presentar algunos efectos antihormonales (Cerbón et al., 1990 Cerbón, et al., 1991). En experimentos llevados a cabo en varias especies de mamíferos ha quedado demostrado que la NET presenta esta gama de efectos hormonales (Revez et al., 1960), y se debe a las interacciones de los diferentes productos de bioconversión de NET con los diferentes receptores de hormonas esteroides sexuales (Braselton et al., 1979, Chávez et al., 1985, Larrea et al., 1987, Pérez-Palacios et al., 1992).

Se ha demostrado que las hormonas esteroides se metabolizan y pueden convertirse en esteroides más potentes. Así, los precursores de las hormonas esteroides sexuales son esteroides, tales como la estrona, la cual puede convertirse a estradiol, dihidroepiandrosterona (DHEA), androstendiol, (un derivado de DHEA) y androstendiona, todos potenciales precursores de testosterona. La pregnenolona es el precursor inmediato de progesterona, por medio de la acción de la Δ^5 -3, β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, $\Delta_5 \rightarrow \Delta_4$ isomerasa. Esos

precursores pueden ser liberados al torrente sanguíneo y transportados a células blanco, donde pueden producir productos activos. Este proceso de "activación metabólica" está bien establecido para la formación de testosterona a partir de androstendiona (en el hígado, la piel y la próstata) y para la formación de estradiol a partir de estrona (en el útero, glándula mamaria y tejido adiposo) o a partir de DHEA (en la placenta humana).

La testosterona y el estradiol son 17β -hidroxiesteroides, que se unen con una fuerte afinidad a sus receptores. El androstendiol, es estrogénico, y esto sucede por que se une al RE.

Otros metabolitos de hormonas esteroides son activos, como la 5α -Dihidrotestosterona, el estradiol que también es metabolito de testosterona es activo en células del hipotálamo, células de la granulosa, placenta, adipocitos y hueso.

Los metabolitos de las hormonas esteroides sexuales previamente considerados como productos inactivos, poseen distintas propiedades, tales como los $3\alpha,5\alpha$ tetrahidroderivados de progesterona, los cuales son responsables del efecto sedativo de la progesterona, el cual está relacionado a la modulación alostérica del receptor de GABA.

Los metabolitos de los esteroides son entonces extremadamente importantes para determinar el mecanismo de acción de los esteroides sexuales, y progestinas sintéticas (Beaulieu 1970, Muller et al., 1950).

De esta forma, a través de diversos estudios bioquímicos se ha establecido que la NET también se metaboliza tanto *in vitro* como *in vivo*, a nivel de órganos blanco y que los productos de transformación metabólica son principalmente 5α -reducidos (Cerbón et al., 1991) (fig. 5). Varios estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que los metabolitos 5α -reducidos (5α - DHNET) se unen a los RA y RP y que los metabolitos tetrahidrorreducidos ($3\beta,5\alpha$ THNET) interaccionan con los RE (Chávez et al., 1985).

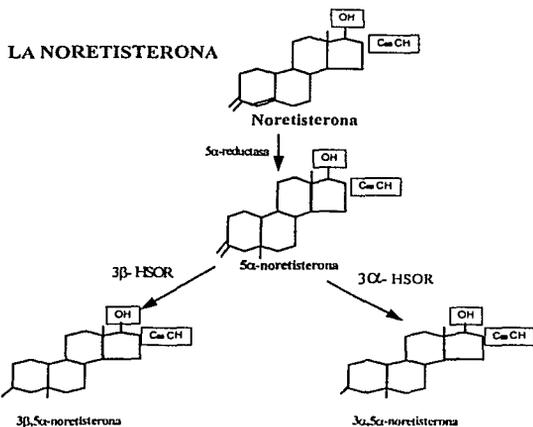


Figura 6. Reducción enzimática de la noretisterona. La reducción enzimática de la NET da como resultado metabolitos reducidos en las posiciones 5 y 3 de la molécula de NET.

Las características de unión de estos metabolitos con los receptores nucleares ya se ha determinado (Chávez et al., 1985). La NET intacta se une con alta afinidad al RP y produce efectos biológicos a nivel de órganos blanco, el 5α-DHNET también se une al RP, aunque con menor afinidad, así como al RA (Larrea et al., 1987). Sin embargo, muchos de los efectos biológicos resultantes de estas interacciones no han sido evaluados, aunque hay datos que sugieren fuertemente que sus efectos son de tipo antihormonal (Cerbón et al., 1990, Castro et al., 1995, Pasapera et al., 1995). El metabolito 3β,5α-THNET (compuesto no fenólico y no aromatizable) se une específicamente al RE dando por resultado un efecto típicamente estrogénico (Vilchis et al., 1986).

En 1979, Reel y col. evaluaron por el método de Mc Phail (1934), el efecto progestacional producido por los derivados de la 19-Nor-Testosterona. Entre estos compuestos evaluaron las propiedades de unión de la 5 α -DHNET al RP y a respuestas biológicas después de su administración. Ellos reportaron que el 5 α -DHNET producía un efecto antagonista a la acción de la P₄; ya que no encontraron ninguna correlación entre la afinidad por RP y la actividad biológica de la progestina.

3.10 ANTIPROGESTINAS

3.10.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS ANTIPROGESTINAS

Las antiprogestinas se dividen en dos grupos:

1. Las progestinas que se unen al DNA,
2. Y las que no se unen al DNA.

3.10.2 ANTAGONISTAS DE PROGESTERONA.

Existen dos mecanismos fundamentales por los cuales actúan los antagonistas: El primero es un efecto clásico antagonista, el cual tiene la habilidad de inhibir las actividades de un agonista. En este sentido, los RP ocupados por un agonista regulan la transcripción uniéndose como dímeros a los elementos de respuesta a progesterona presentes en el gen regulado. Por otra parte, los complejos formados por el RP-antagonista también se unen a los PREs pero no son productivos. De esta forma, la inhibición por este tipo de antagonistas involucra la competencia entre dos ligandos, agonistas contra antagonistas por el sitio de unión en el RP, seguida por la competencia entre las dos clases de RP-ligando para unirse a los PREs. En presencia del agonista, la unión al DNA conlleva a una respuesta transcripcional específica, mientras que con el antagonista la unión al DNA es abortiva. En este último caso, esta

actividad inhibidora está controlada por numerosos factores, los cuales incluyen su afinidad por los receptores, la afinidad de esos complejos por los PREs, el número y ocupación de los PREs en un promotor y otros factores más. Existen otros datos que sugieren otros mecanismos alternativos para que un agonista ejerza su efecto. Los complejos RP-antagonista, presentan actividad estimuladora de la transcripción que no son percibidas, y ésto es a través de sitios de unión en el DNA o proteínas que se unen al DNA y no implican a los PREs (Horwitz 1993).

Estos mecanismos novedosos podrían, en teoría, afectar no solamente a los genes que contienen PREs, sino también a los genes que no son regulados por el RP y sobre los cuales los agonistas no tienen ningún efecto. Dichos mecanismos podrían explicar cómo una antiprogestina puede tener efectos en genes que no son blanco de progesterona.

3.10.3 RU 486.

La antiprogestina RU486 [mifepristona; 17 β -hidroxi-11 β -(4-dimetilaminofenil) 17 α -(1-propinil)-estra-4,9-dien-3-ona], la cual pertenece al grupo de antiprogestinas que se unen al DNA, es un derivado de la 19-nortestosterona. RU486 (Philibert et al., 1985) se reportó primero por poseer actividad antiglucoicóide, y sus propiedades antiprogestacionales y abortivas se demostraron más tarde. Se han utilizado exitosamente como una alternativa médica para provocar el aborto temprano; sin embargo, tiene aplicaciones clínicas adicionales (Garfield et al., 1987, Ulmann et al., 1990). La RU486 se utilizó clínicamente como un agente anticancerígeno en cáncer de mama avanzado, como una droga efectiva en el tratamiento del síndrome de Cushing, y como una herramienta experimental para el estudio de la acción de hormonas esteroides. RU486 inhibe la acción de las hormonas a nivel del receptor en tejidos blancos. Se une con alta afinidad al RP e induce unión del RP a un elemento de respuesta a progesterona localizado en genes hormono-regulados de humano, pero impide la función de la maquinaria de transcripción que se desencadenaría, normalmente, con la progesterona. RU 486 también interactúa con el receptor de glucocorticoides para antagonizar los efectos de éstos

(Meei-Huey et al.,1993). También se ha reportado (Meei-Huey et al.,1993) que RU486 posee algunas propiedades parecidas a las de los estrógenos.

Se ha demostrado que el primer paso en el mecanismo de acción de las antiprogestinas es su interacción con los RP (Philibert et al., 1985). El antagonista RU 486 unido al RP desencadena la activación del receptor de la misma forma como lo hace el agonista, es decir:

- a) Ocurre una disociación de los complejos activos 8S, el cual implica las proteínas de choque térmico *in vivo* e *in vitro* (El-Ashry et. al., 1989).
- b) La oligomerización de los receptores (Guiochon-Mantel et al., 1989, Delabre et al, 1993) y la transferencia al núcleo(El-Ashry et. al., 1989, Guiochon-Mantel et al., 1989, Delabre et al., 1993).
- c) La unión a los sitios específicos PRE *in vivo* (Guiochon-Mantel et al., 1988, Meyer et al, 1990, Delabre et al, 1993) e *in vitro* (Guiochon-Mantel et al, 1988, Al Ashry et al 1989, Bailly et al, 1990, Meyer et al, 1990, Klei Hitpass et al 1991, Allan et al, 1992, Sartorius et al, 1993)

Los estudios de Meyer y cols. (1990) proponen que el RU486 no tiene la capacidad de activar la función transactivadora 2 (TAF2) que se encuentra localizada en la región de unión a la hormona. Los efectos agonistas parciales reportados para el RU486 dependen de la función de transactivación del dominio terminal TAF1. También se ha descrito una función de represión dentro del dominio de unión a la hormona (Picard et al., 1988, Hollerbery y Evans., 1988, Spanjaard et al., 1993). Otros estudios, por el contrario, no han demostrado este efecto antiprogestacional del RU486, efecto que se ha explicado por el cambio en la posición de la glicina 575 por una cisteína, por lo que resulta en una incapacidad del RU486 para unirse (Benhamou et al., 1992). La sustitución de esta cisteína por una glicina (y no por otro aminoácido) produce un receptor que se une al RU486, cuya actividad se encuentra inhibida. En el caso del RP humano, se ha demostrado que los últimos residuos de la región C-terminal, se necesitan para que este RP se una a la progesterona, mientras que los antagonistas (RU486, ORG31806, ORG31376) se unen a un sitio localizado en la región más cercana al N-terminal

del dominio de unión a la hormona (Vegeto et al., 1992). Para estudiar su mecanismo de acción, varios cientos de dichas progestinas se han sintetizado, pero a la fecha, solo una, el mifepristone (RU 486), se ha estudiado ampliamente tanto en animales de laboratorio como en el humano (Garfield y Baulieu 1987). muchos estudios realizados con el RU-486 han sido enfocados para profundizar en el mecanismo de acción a nivel molecular de las progestinas, así como sus efectos a nivel fisiológico.

3.11 LA UTEROGLOBINA COMO MARCADOR DE ACCION PROGESTACIONAL.

La uteroglobina (UTG) es una proteína globular de secreción, de bajo peso molecular que se sintetiza y secreta en el endometrio de la coneja, cuyo eventos están regulados por la P₄ (Bullock y Willen 1974, Daniel 1976). Los primeros hallazgos de la UTG se hicieron en la coneja gestante, donde la UTG representa más del 40 % de las proteínas totales del fluido uterino durante el embarazo temprano. Su peso molecular es de 14 kDa, y es secretada, principalmente, durante los primeros días de la gestación, alcanzando sus niveles máximos en el quinto día (Krishnan RS y Daniel JC; 1967).

Se ha demostrado que tanto el E₂ como la P₄ administrados solos, tienen efectos importantes sobre la síntesis de UTG, tanto a nivel de la transcripción como de la traducción; de tal forma que el contenido de UTG y de sus RNAm se eleva en el útero, después del tratamiento con estrógenos y P₄ (Shen et al., 1983). Estas hormonas inducen, a través de sus receptores intracelulares, la expresión del gen de la UG, interactuando con los elementos de respuesta hormonal localizados en la región promotora 5' del gen (Copez et al., 1985, Bailly et al., 1986, Slatyer et al., 1990).

La expresión del gen de UTG se ha utilizado ampliamente como modelo para evaluar la actividad progestacional de diversos compuestos, así como también se ha utilizado para estudiar los efectos de varias antihormonas (Savouret y Milgrom 1983, Cerbón et al., 1990, Cerbón et al., 1992, Gutierrez-Sagal et al., 1993, Pasapera et al., 1995). Se ha demostrado que

el RU-486 bloquea completamente la activación transcripcional inducida por P_4 y que el tamoxifen inhibe la estimulación inducida por la administración de dosis bajas de estradiol.

Utilizando este modelo de la UTG, Cerbón y cols. (1990) han realizado varios trabajos para estudiar los efectos de progestinas sintéticas derivadas de la 19-Nortestosterona. Utilizaron conejas prepúberes, las cuales se trataron con NET y sus derivados, y se demostró que la interacción de la NET con el RP resulta en un efecto biológico de tipo agonista en términos de síntesis de UTG y de ARNm y que, sin embargo el metabolito 5α DHNET, aún cuando presenta propiedades de unión al RP el efecto biológico resultante de esta interacción no fue de tipo agonista (Cerbón et al., 1990).

Estos resultados dieron pauta a otra serie de estudios para evaluar los posibles efectos antagonistas que podrían presentar los derivados de NET, tanto en la coneja prepúber como en la coneja gestante. Estos estudios se realizaron administrando de manera simultánea los metabolitos de NET con progesterona, en la coneja prepúber y NET y sus metabolitos, en la coneja gestante, utilizando como control de actividad antiprogestacional la antiprogestina RU 486 (Pasapera et al., 1995, Castro et al., 1995). Los parámetros evaluados en estos estudios fueron la síntesis de la UTG y su ARNm, la regulación a la baja del RP, así como la inhibición de la implantación en la coneja gestante.

Los resultados derivados de estos estudios indicaron que el metabolito 5α reducido de NET administrado solo, exhibe una actividad progestacional débil, y que cuando éste es administrado en forma simultánea con progesterona es capaz de inhibir el efecto agonista de la progesterona de una manera dual y dosis dependiente, exhibiendo efectos antagonistas típicos similares a aquellos que presenta el RU486 (Pasapera et al., 1995).

3.12 GENES REPORTEROS.

La habilidad para examinar la actividad transcripcional de secuencias genómicas clonadas, después de la introducción de estos elementos dentro de células apropiadas, ha enriquecido sustancialmente nuestro entendimiento en la regulación de la transcripción de genes de mamíferos. Estos estudios se han simplificado por el desarrollo de genes vectores reporteros. La estrategia básica para analizar las propiedades transcripcionales de elementos de DNA, usando genes reporteros es como sigue:

Para probar los elementos promotores o reguladores funcionales, el DNA de interés se inserta delante de la región 5' codificante del gen reportero, para generar un gen quimérico en que el elemento regulador que controla la expresión del gen reportero. De igual forma, para probar los elementos funcionales enhancer, que por definición pueden aumentar la transcripción cuando se colocan en la posición 5' o 3' de un gen, y en cada orientación relativa para el promotor, el DNA a probar puede ser insertado en la posición 5' o 3' del gen reportero que ya posee un promotor. Esta fusión de genes es introducida subsecuentemente, por una variedad de técnicas, a células en cultivo o a células de animales completos (Alam y Cook 1990).

Existen 2 tipos de transfecciones que se utilizan rutinariamente para introducir el DNA a células de mamíferos. En el primer tipo se puede evaluar la transcripción o expresión de un gen transfectado en un periodo no mayor de 4 días, después de la introducción del DNA. Este proceso por lo general requiere de cosechar las células y evaluar la actividad del gen transfectado, y por lo tanto a este tipo de transfección se le llama TRANSITORIA.

El segundo tipo requiere de la obtención de líneas celulares que contengan un gen o genes, los cuales estén integrados en el DNA cromosómico y, así, utilizando marcadores selectivos se puede producir una línea selectivamente estable o permanente.

Para transfectar o introducir DNA en células de mamíferos existen 3 técnicas:

- 1) Transfección mediante el uso de calcio y fosfato.
- 2) Transfección mediante el uso de dextrán.
- 3) Por electroporación.

Los primeros dos procedimientos producen un ambiente químico que provoca que el DNA se adhiera a la superficie celular. El DNA es posteriormente endocitado por mecanismos que aún no han sido estudiados. La electroporación utiliza un campo eléctrico para abrir los poros de la superficie celular, a través de los cuales el DNA difunde. Tanto el método de electroporación, como el de calcio-fosfato son muy eficientes; sin embargo, la electroporación se recomienda más para células cultivadas en suspensión, mientras que el calcio-fosfato para células adherentes. Posterior a la transfección, es después estimada la capacidad transcripcional del DNA de interés cuantitativamente, mediante la valoración de la actividad *in vitro* del producto del gen reportero, ya sea en el medio de cultivo, o en extractos celulares o, se determina cualitativamente, por coloración histoquímica de células intactas. Aunque la actividad o cantidad del producto del gen reportero es una medida indirecta de las propiedades transcripcionales del DNA de interés, generalmente la actividad del gen reportero es directamente proporcional a la actividad transcripcional (Alam y Cook 1990).

En general, los genes que conforman los vectores reporteros comparten ciertas propiedades (Fig. 7). Algunas veces tienen secuencias de pBR322 o pUC. Usualmente poseen un origen de duplicación procariontica pMB1 y un gen de resistencia a algún antibiótico (β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina). Este hecho permite la propagación y selección del vector en *Escherichia coli*. Además, estos vectores poseen una señal de poliadenilación [poli (A)] eucariótica y un intrón, intrínseco para el gen reportero o derivado de una fuente heteróloga. La presencia de un intrón es necesaria para la producción eficiente de algunos RNAs citoplasmáticos maduros. Por lo tanto, algunas veces se incluyen los intrones en los vectores de expresión. (Alam y Cook 1990).



Figura 7. Ilustración de un vector reportero típico. Representa el origen procariontico de la duplicación y el gen de resistencia a antibióticos. La flecha indica la dirección de transcripción del gen reportero.

3.12.1 CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA.

El gen reportero más popular y más ampliamente usado es el que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT) de *E. coli*. Consistente con las propiedades deseadas de un gen reportero, el gen CAT no es endógeno para células eucariontes, la enzima puede ser fácilmente analizada y su actividad es detectable a niveles bajos.

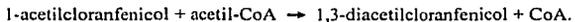
La CAT cataliza la transferencia de grupos acetil de acetil-coenzima A (acetil-CoA) a cloranfenicol. La acetilación catalizada por CAT ocurre sólo en la posición 3-hidroxi:



La generación del producto 1-acetil ocurre por rearrreglo no enzimático:



Este cambio libera la posición 3-hidroxi, una vez más, así que el compuesto es acetilado para formar 1,3 diacetil:



Puesto que las formas acetiladas y no acetiladas poseen diferente solubilidad en solventes orgánicos, se puede separar por cromatografía en capa fina (CCF). Desde luego, este es un método popular para medir la actividad CAT. El [¹⁴C] Cloranfenicol radiomarcado se incubaba con acetil-CoA y el extracto de células transfectadas. El cloranfenicol y sus formas acetiladas son después separadas por CCF y posteriormente se lleva a cabo la autoradiografía. Las formas acetiladas se pueden cuantificar por densitometría, por conteo de centelleo líquido de las formas acetiladas. (Gorman 1985)

El uso de este tipo de vectores quiméricos se ha utilizado recientemente con gran éxito, para el estudio, a nivel molecular, de promotores hormono-regulados (Pothier et al., 1992), ya que a través de sistemas de transfección de estos genes CAT, en células en cultivo, podemos evaluar la actividad transcripcional del gen reportero, cuya regulación se encuentra bajo influencia hormonal, con las ventajas que en las células eucariontes no se presenta actividad CAT endógena que pudier interferir con las respuestas.

JUSTIFICACIÓN

Los estudios enfocados en el mecanismo de acción de las hormonas esteroides han sido de gran importancia en el diseño de nuevas moléculas esteroidales con capacidad anticonceptiva y/o contraceptiva. Debido al papel crucial que juega la progesterona en la función reproductiva, el diseño o descubrimiento de antagonistas de la molécula (antiprogestinas), los cuales actúan a través del bloqueo de los receptores celulares a la hormona, en los órganos blanco, tienen un papel importantísimo, no sólo en la regulación de la fertilidad y terapia clínica, sino también en el estudio del mecanismo de acción, tanto de agonistas como de antagonistas de la acción de la progesterona. En este sentido, el estudio molecular de los efectos hormonales de diversas progestinas con actividad hormonal y/o antihormonal, contribuirá no sólo al entendimiento de su mecanismo de acción, sino también al diseño de nuevos fármacos potencialmente utilizables en la creación de nuevos métodos anticonceptivos, así como en el tratamiento de ciertas patologías, como algunos tipos de cáncer hormono-dependientes, la endometriosis y tumores como los meningiomas, miomas uterinos, etc.

La obtención de un modelo *in vitro* que nos permita evaluar, a nivel molecular, la actividad hormonal, permitirá determinar los efectos progestacionales y antiprogestacionales de las moléculas de NET, LNG y sus metabolitos reducidos.

OBJETIVOS

5.1 OBJETIVOS GENERALES

- Obtener un modelo *in vitro* que nos permita la evaluación, a nivel transcripcional, de la actividad progestacional de diferentes esteroides sintéticos como NET, LNG y sus metabolitos reducidos en el anillo A.
- Determinar los efectos progestacionales de NET, LNG y sus metabolitos reducidos en el anillo A, a través del ensayo de actividad CAT, en células transfectadas.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Preparar los vectores quiméricos CAT, que portan en su secuencia los elementos de respuesta hormonal a progesterona, unidos al cDNA que codifica para la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa, CAT.
2. Cotransfetar los vectores CAT y de expresión de los RP en la línea celular CV-1.
3. Evaluar la actividad progestacional y/o antiprogestacional de las progestinas sintéticas NET, LNG y de sus metabolitos reducidos en el anillo A, mediante la evaluación de la actividad CAT presente en los extractos totales de las células transfectadas.
4. Determinar la actividad antiprogestacional de los metabolitos reducidos de NET cuando éstos son administrados de manera simultánea con el agonista R5020.

HIPÓTESIS

- Las progestinas derivadas de la 19-Nortestosterona como la NET, el LNG así como sus metabolitos reducidos en el anillo A, han demostrado que ejercen múltiples efectos hormonales y/o antihormonales a través de los receptores intracelulares a hormonas esteroides. Sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales se lleva a cabo estos efectos son aún desconocidos. Con el propósito de entender el mecanismo de acción de estas progestinas y sus metabolitos para ejerce sus efectos progestacionales y/o antiprogestacionales, en este trabajo proponemos generar un modelo molecular basado en el uso de vectores reporteros que portan en su secuencia elementos de respuesta a progesterona unidos al gen CAT, que cotransfectados junto con el receptor de progesterona nos permitirán estudiar el mecanismo de acción de estos esteroides, a nivel de la transcripción.

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CONSTRUCCIONES GÉNICAS

Para evaluar la actividad progestacional y/o antiprogestacional de progestinas sintéticas y naturales se utilizaron las siguientes construcciones génicas:

PRE₂-TATA-CAT: Este plásmido posee una secuencia de 20 pares de bases con 2 secuencias correspondientes al elemento de respuesta hormonal para progesterona (PRE) 5'TGTACAGGATGTTCTAGCTAACTGTACA GGATGTTCTGGATCTGAGGTCCACTTCGC unidos a la caja TATA y al cDNA (DNA complementario) que codifica para la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT). (Fig. 8 A, B)

La construcción del gen reportero PRE₂-TATA-CAT se realizó utilizando el plásmido pEMBL 8+TK-CAT. La secuencia promotora de Timidina Cinasa (TK) [-105,-18] se extrajo con enzimas de restricción Bam HI/Bgl II. Se insertó en el plásmido un oligonucleótido sintético, el cual contiene sitios de restricción para Bam HI/Bgl II, los dos elementos de respuesta para progesterona y la caja TATA. Las secuencias de DNA que se utilizaron y que corresponden a los elementos de respuesta antes mencionados, se sintetizaron artificialmente por medio de un sintetizador de oligonucleótidos y purificados convencionalmente.

TATA-CAT: Este se construyó para utilizarse como control del vector PRE₂TATACAT, ya que no contiene en sus secuencias ningún elemento de regulación hormonal, contiene la caja TATA y el cDNA que codifica para la enzima CAT. (figura 8 A)

La construcción del vector TATA-CAT se obtuvo de una manera similar al vector PRE₂-TATA-CAT, pero éste no posee en su secuencia los dos elementos de respuesta para progesterona.

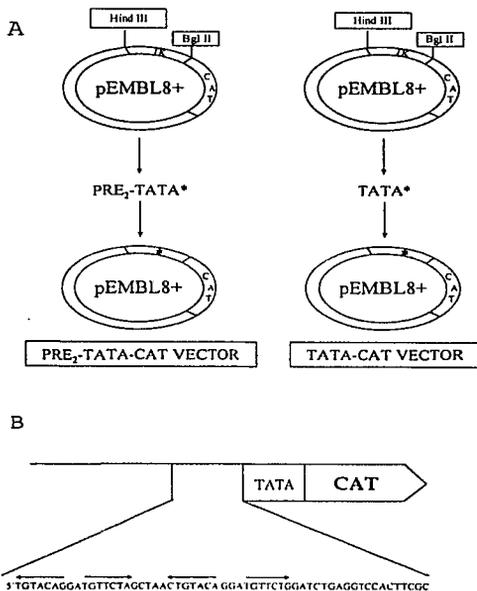


Figura 8. Representación esquemática de los vectores reporteros CAT. A) Las construcciones de los genes reportero PRE_2 -TATA-CAT y TATA-CAT se llevaron a cabo en el plásmido pEMBL8+TK-CAT. El vector TATA-CAT no posee en su secuencia el PRE_2 (derecha). B) Representación esquemática del vector PRE_2 -TATA-CAT y la secuencia completa del oligonucleótido sintético insertado 5' del cDNA CAT. Las flechas indican la estructura palindrómica de los elementos de respuesta.

PKSv rPR: Este vector de expresión codifica para el receptor de progesterona (RP) el cual fue donado por el Profesor E. Milgrom (Laboratoire des Hormones et Reproduction, Bicêtre, Francia) y fue descrito por Guiochon-Mantel et al en 1988 (Fig. 9).

Dichos vectores se amplificaron y purificaron para evaluar los efectos hormonales/antihormonales de varias progestinas.

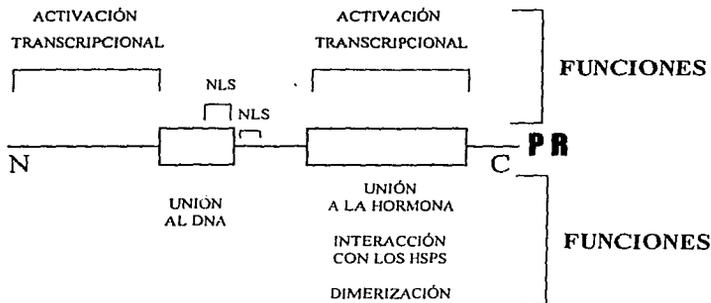


Figura 9. Estructura esquemática y partes funcionales del receptor de progesterona. Las funciones de los tres principales dominios funcionales del receptor de la progesterona (PR) son idénticos. Estos tres dominios funcionales son el dominio N-terminal, el dominio de unión al DNA y el dominio de unión a la hormona. Contiene dos señales de localización nuclear (NLS), la señal constitutiva. La NLS esta dentro del dominio de unión al DNA es activada por la hormona. HSPS: proteína de choque térmico.

7.2 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.

La transformación es un método ampliamente usado, con el cual el DNA plasmídico de interés es introducido a bacterias (generalmente *Escherichia coli*).

Para la transformación de las células bacterianas con DNA plasmídico (circular); el cual contiene un origen de duplicación autónomo y un gen de resistencia a un antibiótico, fue necesario que las bacterias crecieran logarítmicamente en un medio nutritivo, las bacterias se hicieron permeables al DNA plasmídico, por un proceso de desequilibrio térmico a 42°C, de tal forma que el DNA del plásmido adicionado al medio, pudo pasar dentro de la bacteria. Las bacterias que incorporaron el DNA del plásmido, fueron posteriormente seleccionadas con base en su crecimiento en un medio de cultivo de selección en fase sólida, que contiene un antibiótico específico para el cual el plásmido introducido les confiere resistencia y en donde crecen a pesar de esta sustancia.

Se realizaron transformaciones de la bacteria *Escherichia coli* cepa XL1-Blue con los siguientes plásmidos:

- a) PKSV rPR (expresa el receptor de progesterona de conejo).
- b) PRE₂ TATA CAT (dos palíndromos del elemento de respuesta a progesterona en PRE adelante de la caja TATA).
- c) TATA CAT(vector control).

El método que se siguió para la transformación bacteriana descrito a continuación está basado en la técnica descrita por Hanahan en 1983.

1. Antes de comenzar la transformación se preparó hielo seco en baño de acetona, con el objeto de transportar las células competentes antes y después de ser utilizadas para congelarlas inmediatamente.
2. Las células competentes XL1-Blue (casa comercial Strata Gene) se descongelaron sobre hielo, y se agitaron suavemente con la mano. Para la transformación se tomaron 100 µl de las células XL1-Blue y se depositaron en tubos para microcentrifuga eppendorf de 1.5 ml.

3. Se adicionaron 1.7 μl de β -mercaptoetanol, se agitaron suavemente y se mantuvieron en hielo por 10 minutos.
4. Se agregó el plásmido a una concentración final de DNA de 10 ng, se agitó suavemente y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos.
5. Se colocó el tubo a 42°C por 45 segundos. Pasado el tiempo de incubación se pasó inmediatamente a hielo, por 2 minutos.
6. Se añadieron 900 μl de medio SOC, se agitó suavemente y se incubó en un baño a 37°C, durante una hora con agitación constante.

SIEMBRA.

En condiciones totalmente estériles se procedió a sembrar las bacterias transformadas.

- **Siembra Directa (diluida)**

7. Se agitó suavemente el tubo y se transfirieron 100 μl en una caja petri con LB agar y ampicilina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
8. Con una asa bacteriológica se esparcieron los 100 μl sobre la caja petri.
9. Las cajas petri fueron invertidas y se incubaron en un horno a 37°C toda la noche

- **Siembra Concentrada**

10. El contenido de los tubos del paso 6 se transfirió a otros tubos eppendorf, y se centrifugaron a 3 000 r.p.m. por 3 minutos a 4°C.
 11. Se tiró el sobrenadante y el precipitado bacteriano se resuspendió en 100 μl de medio SOC. Se transfirió a una caja petri con LB agar y ampicilina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
 12. Con una asa bacteriológica se esparcieron los 100 μl sobre la caja petri.
 13. Las cajas petri se invirtieron e incubaron a 37°C toda la noche.
- Fue importante que todo el material y soluciones que se utilizaron se encontraran estériles y que se trabajara en una área o campo estéril.

- Las cajas se etiquetaron, indicando el plásmido con que fueron transformadas las bacterias XL1-Blue, fecha, tipo de siembra y concentración de ampicilina.

Resiembra.

Con el objeto de aislar las colonias, se seleccionaron 2 o 3 colonias que crecieron en el medio con ampicilina y se resembraron como sigue:

1. En un campo estéril se tomó una colonia de cada placa y se sembró en una caja petri con LB agar y ampicilina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).
2. Las cajas petri se invirtieron e incubaron en un horno a 37°C toda la noche

Cultivo de las bacterias transformadas en medio líquido.

De las bacterias transformadas se seleccionó una colonia y se cultivo en 10 ml de medio LB (pH 7.4) líquido con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. de ampicilina.

1. En tubos que contenían 10 ml. de LB estéril, se agregó la ampicilina y con una asa bacteriológica se sembró una colonia XL1-Blue de la caja de colonias previamente reaisladas.
2. Se dejó creciendo toda la noche a 37°C con agitación constante.

Congelación de bacterias transformadas.

Los cultivos en medio líquido se congelaron con glicerol en una concentración de 3×10^{10} células/ml. a -20°C, para posteriormente ser utilizadas en la preparación de DNA plásmidico con las técnicas de mini y maxi prep.

7.3 PREPARACIÓN, EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.

7.3.1 MINI PREPARACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS .

Para purificar y verificar la integridad de los plásmidos introducidos en los cultivos bacterianos, se utilizó el método de Mini prep, el cual ofrece DNA plasmídico altamente puro. En esencia, las bacterias transformadas se incubaron en medio líquido y cuando el cultivo se encontró en su fase logarítmica de crecimiento, las bacterias se recuperaron por centrifugación y se trataron con lisosima y detergente iónico (SDS alcalino) para la recuperación del DNA plasmídico; posteriormente, este DNA se lavó con fenol/cloroformo y precipitado con etanol (29 y manual de Notesof Promega)

Esta técnica de mini prep se llevó a cabo utilizando el método descrito en Notesof Promega:

1. Las bacterias transformadas se inocularon en 25 ml. de LB + 50 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Se cultivaron toda la noche a 37°C con agitación vigorosa y aireación suficiente. Al día siguiente, el cultivo bacteriano se centrifugó a 4 000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
2. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 5 ml. de NaCl 10 mM, se centrifugó a 4 000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.
3. El precipitado se resuspendió en 600 μl de la solución de lisis bacteriana y se incubó en hielo por 20 minutos.
4. Se adicionó 1.2 ml. de SDS-alcalino. y se mezcló suavemente, para posteriormente incubarlo en hielo por 10 minutos.
5. Se agregaron 750 μl de acetato de sodio 3 M pH 4.8, y se mezcló suavemente, para incubarse en hielo durante 20 minutos.
6. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. y se colectó el sobrenadante.

7. Se adicionaron 25 μ l de RNAsa A y se incubó en baño María 30 minutos a 37°C.
8. Para que el DNA quede libre de proteínas, el DNA se lavó con 2 volúmenes iguales de fenol/cloroformo. Para separar la fase acuosa y la fase orgánica, se centrifugó a 4 000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Entre la fase orgánica (se encuentra abajo y es de color amarillo por el fenol) y la acuosa (la de arriba y es transparente) quedó una capa blanca, la cual contiene principalmente proteínas y RNA. La fase orgánica y la capa de proteínas se desechó utilizando sólo la acuosa (fase donde se encuentra el DNA).
9. Los ácidos nucleicos se precipitaron con dos volúmenes iguales de etanol absoluto frío, se mezcló y se dejó toda la noche a -20°C. Se colectó el precipitado por centrifugación a 14 000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.
10. Se quitó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70 %. Se centrifugó a 14 000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se secó al vacío el precipitado.
11. Se disolvió el precipitado en 160 μ l de agua estéril y se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 ml.
12. Se adicionaron 40 μ l de NaCl 4 M, y se mezcló.
13. Se adicionaron 200 μ l de PEG 13%, se mezcló y se dejó en hielo por 1 hora
14. Se colectó el DNA por centrifugación a 14 000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C. En este paso el DNA no es visible debido a que se encuentra completamente puro.
15. Se lavó el precipitado con 500 μ l de etanol al 70 % y se centrifugó a 14 000 r.p.m. durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se secó al vacío el precipitado.
16. El precipitado se resuspendió en 50 μ l de TE pH 7.4 y para conocer la concentración de DNA obtenida se leyó la absorbencia a 260 nm. Se determinó su concentración 1 unidad de A. a 260 nm = 50 μ g/ml de DNA. Para determinar la ausencia de proteína se verificó que la relación de las lecturas a 260/280 nm no fuera mayor a 1.8
17. Para verificar su pureza y calidad del DNA, se corrió en un gel de agarosa.

7.3.2 MAXI PREPARACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS.

Esta técnica se utilizó para la amplificación de las bacterias transformadas y la purificación del DNA plasmídico. Se utilizaron columnas de QIAGEN TIP 500 siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial QIAGEN, obteniéndose un rendimiento aproximado de 500 µg por 100 ml de incubación bacteriana en medio TBE.

El procedimiento consistió en dejar libre de proteínas, DNA bacteriano y RNA el DNA plasmídico. Sólo el DNA plasmídico se adhirió a las columnas QIAGEN. Posteriormente se recuperó el DNA de la columna, se purificó y precipitó, obteniendo así un DNA altamente puro.

PROCEDIMIENTO.

1. Se inocularon 200 µl de bacterias transformadas en 100 ml de TB (Terrific Broth Medium). + 50 µg/ml ampicilina. Se utilizó medio TB ya que se ha reportado (Tartof y Hobbs 1987) que el uso de este medio (Terrific Broth Medium) da como resultado un incremento de cuatro a seis veces en la producción de un plásmido (29).
2. Se incubaron a 37 °C con agitación constante y ventilación suficiente durante 24 horas.
3. Para precipitar las bacterias, se centrifugó el cultivo a 1 500 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante rápidamente..
4. Se resuspendió el precipitado bacteriano en 10 ml de solución amortiguadora P₁ + RNAsa y se pasó a otro tubo.
5. A la suspensión se le adicionaron 10 ml de Solución amortiguadora P₂, se mezcló suavemente, por inversión del tubo, de 4 a 6 veces (no se mezcló fuerte porque se puede romper el DNA genómico) y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

Nota:

- La solución amortiguadora P₂ debe verificarse que no este precipitado, ya que el SDS suele precipitarse a bajas temperaturas. El lisado debe tener una apariencia viscosa y la lisis no debe durar más de 5 minutos.
6. Se adicionaron 10 ml de solución amortiguadora P₃ frio y se mezcló suavemente, por inversión del tubo, de 5-6 veces, se incubó en hielo por 20 minutos. Se mezcló suavemente la solución varias veces, inmediatamente después de adicionar la solución amortiguadora P₃. Después de la adición de esta solución amortiguadora, la solución se volvió turbia, viscosa y con grumos.
 7. Se centrifugó a 15 000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante. Antes de meter los tubos a la centrifuga, las muestras se mezclaron una vez más.

Nota:

Es muy importante que después de la centrifugación, el sobrenadante sea claro y sin grumos, para poderlo pasar a otros tubos.

8. Se montó la columna QIAGEN 500 y se equilibró adicionándole 10 ml. de solución amortiguadora QBT. La solución amortiguadora se dejó eluir por gravedad.
- Nota: Este paso es importante que se realice en el tiempo libre de los pasos anteriores, para que cuando se tenga el sobrenadante se vierta inmediatamente a la columna.
9. A la columna previamente equilibrada se le adicionó el sobrenadante del paso 7 y se permitió que eluyera por gravedad. En este paso el DNA se adhiere a la columna. El sobrenadante se debe depositar rápidamente en la columna para que no se vuelva turbio.

RECUPERACIÓN DEL PLÁSMIDO.

10. Se lavó la columna de QIAGEN 2 veces con 30 ml. de solución amortiguadora QC.
11. Para separar el DNA de la columna se adicionaron 15 ml. de solución amortiguadora QF, los cuales se colectaron y se añadieron 900 µl de medio SOC.

12. Se precipitó el DNA con 0.7 volúmenes de isopropanol, previamente equilibrado a temperatura ambiente. Se centrifugó inmediatamente a 9 500 r.p.m. por 30 minutos a 4°C.
13. Se lavó el DNA con 15 ml. de etanol al 70% frío, se dejó caer por las paredes sin remover y se centrifugó 15 minutos a 12 000 rpm.
14. Se retiró el etanol y se dejó evaporar al vacío por 10 minutos.
15. Se resuspendió el precipitado en 400 µl de TE pH 7.4 y se agregó la décima parte del volumen de acetato de Na 3M (40µl) + 1 ml. de etanol absoluto frío, se agitó y se dejó precipitar toda la noche a -20°C.
16. Se centrifugó en una microcentrifuga a 14 000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.
17. Se tiró el sobrenadante y al DNA se le agregaron 200 µl de etanol al 70 %, sin resuspender, se centrifugó a 14 000 r.p.m. por 15 minutos.
18. Se tiró el sobrenadante y el etanol restante se evaporó por 10 minutos al vacío.
19. El DNA precipitado se resuspendió en 50 µl de TE pH 7.4.
20. Para conocer la concentración de DNA obtenida, se leyó la absorbencia a 260 nm y 280 nm. Se determinó su concentración. 1 unidad de A. a 260 nm = 50 µg/ml de DNA. Para determinar la ausencia de proteína se verificó que la relación de las lecturas a 260/280 nm no fuera mayor a 1.8.
21. Para verificar su pureza y calidad del DNA, se corrió en un gel de agarosa.

7.3.3 VERIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DEL MINI Y MAXI PREP. POR ELECTROFORESIS EN GELES HORIZONTALES DE AGAROSA.

La electroforesis en geles de agarosa es el método más ampliamente utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de DNA. Esta técnica permite separar mezclas de fragmentos de DNA que no pueden separarse adecuadamente por otras técnicas de fraccionamiento, tales como los gradientes de densidad. Además de que la localización de bandas de DNA se

determina dentro del mismo gel con el colorante fluorescente bromuro de etidio. Con esta técnica se pueden detectar cantidades tan pequeñas como 1 ng de DNA por observación directa del gel radiado con ultravioleta.

La electroforesis de DNA se hizo en geles de agarosa al 1%, en solución amortiguadora de corrida TBE al 0.5X.

PREPARACIÓN DEL GEL AL 1 % DE AGAROSA (50 ML. DE GEL).

1. Se pesaron 0.5 gr. de agarosa y se agregaron 50 ml. de TBE 0.5 X, se disolvió la agarosa calentando durante 2 minutos en un horno de microondas.
2. Para conocer la cantidad de agua evaporada, se pesó la agarosa disuelta en el TBE antes de calentar en el horno de microondas y se pesó después de calentar, agregando el agua faltante. (se dejó enfriar teniendo cuidado de que no solidificara).
3. Para la localización de bandas de DNA dentro del gel se agregó el colorante fluorescente bromuro de etidio 0.5 µg/ml.
4. Se vertió en la cámara de electroforesis y se quitaron las burbujas.
5. Se dejó solidificar y se corrió en 250 ml de solución amortiguadora de corrida (TBE 0.5 X).

PREPARACIÓN DEL DNA E INDICADORES DE PESO MOLECULAR PARA CORRERLO EN EL GEL DE AGAROSA.

1. Para la determinación de la integridad del plásmido purificado se colocaron en tubos eppendorf 0.5-1 µg de plásmido, 2 µl de amortiguador de carga 6X y se completó el volumen a 10 µl con TE pH 7.4 .
2. Se utilizó como marcador de peso molecular el fago λ digerido con Hind III. Se mezcló 1 µg de λ con 1 µl de amortiguador de carga 6X y se completó el volumen a 10 µl con TE pH 7.4.

3. Se colocaron las muestras en los carriles del gel de agarosa al 1 % en TBE 0.5X.
4. La migración de las muestras se hizo a 90 Volts durante 1 hora con solución amortiguadora TBE 0.5 X.
5. Las bandas de los plásmidos se observaron con radiación UV en un transiluminador y se fotografió el gel.

7.4 VERIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Para la verificación de los plásmidos obtenidos se procedió a la digestión del plásmido con las enzimas de restricción, respectivas a los mapas de restricción de cada plásmido.

Las enzimas utilizadas fueron Pst I y Pvu II. las cuales cortan específicamente en las siguientes secuencias 5' CTGCAA↓G3' y 5' CAG↓CTG3' respectivamente .

1. En un tubo eppendorf se colocaron de 1-2 µg de plásmido. 5 µl de solución amortiguadora 10 X y se completó el volumen a 30 µl con agua estéril.
2. Se colocaron 10 U_{µl} de la enzima correspondiente para el plásmido. La enzima se colocó al final de todos los reactivos, debido a que se debe mantener el menor tiempo posible fuera del hielo, para evitar que se degrade o inactive.
3. Se agitó suavemente para homogenizar los reactivos y se incubó la reacción en un baño a 37°C durante 1 hora.
4. Para inactivar la enzima se colocó el eppendorf en un baño a 70°C durante 10 minutos.
5. Para los plásmidos que requirieron doble digestión enzimática se procedió a colocar la segunda enzima y se incubó nuevamente a 37°C durante 1 hora. y posteriormente se inactivó la enzima por calentamiento a 70°C.
6. El número de fragmentos y tamaños de los mismos se compararon con las mapas de restricción correspondientes a cada una de las construcciones.

7.5 CULTIVO CELULAR.

Para evaluar la actividad progestacional y/o antiprogestacional de las progestinas sintéticas se utilizó como modelo celular la línea CV-1 derivada de riñón de mono . Esta línea celular no posee receptores a esteroides, por lo cual fue adecuada para permitir únicamente la expresión de un sólo receptor hormonal y los genes reporteros.

PROCEDIMIENTO.

1. Las células CV-1 se cultivaron a 37°C en medio DMEM complementado con suero de ternera fetal al 10%, 2 mM L-Glutamina, 0.1 U/ml insulina, 100 u/ml penicilina en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ y 95 % de aire.
2. Cuando las células se encontraron al 70% de confluencia, se les retiró el medio y se lavaron con 5 ml. PBS pH 4.
3. Las células crecieron en monocapa adheridas a la caja de cultivo, para separarlas se utilizó 1.5 ml de una solución de tripsina al 0.025 M.
4. Se adicionaron 1.5 ml. de inhibidor de tripsina y se centrifugó a 800 rpm. 3 minutos a temperatura ambiente
5. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM complementado con suero de ternero fetal 10%, 2 mM L-Glutamina, 0.1 U/ml insulina, 100 u/ml penicilina en una atmósfera de húmeda con 5 % de CO₂ y 95 % de aire.

7.6 TRANSFECCIONES.

Calcio-Fosfato, DEAE-dextran, lipofección y electroporación son los métodos más populares por los cuales el DNA es introducido (transfectado) a la célula. Existen dos tipos de transfección: La transfección transitoria y la transfección estable o permanente. Cuando el DNA introducido en células de cultivo no necesariamente se integra primeramente en la cromatina celular para ser expresado, estos ensayos son referidos como transfección transitoria. La transfección estable o permanente, forma líneas celulares que contienen un gen o genes que se integran al DNA cromosómico, estas células y sus clones resultantes se aíslan bajo presión selectiva, por algún gen de resistencia a algún antibiótico puede estar presente en el plásmido introducido (que también posee el gen de estudio) o puede ser cotransfectado con un segundo plásmido. Las técnicas de electroporación, y lipofección se usan para generar transformantes estables. Los métodos de coprecipitación con calcio-fosfato, DEAE-dextran son utilizados para transfecciones transitorias (Frederick et al., 1987. Sambrook et al., 1989, Alam y Cook 1990).

El método que se utilizó para la transfección de la línea celular CV-1 se basó en la coprecipitación con calcio-fosfato. La transfección del DNA a las células eucarióticas produce un precipitado de CaPO_4 y DNA el cual se forma al mezclar lentamente una solución salina (solución amortiguadora-HEPES) que contiene CaCl_2 . Este precipitado se adhiere a la superficie de las células y es visible al microscopio un día después de la transfección. La transfección del DNA a las células eucarióticas, por este método, produce un ambiente que resulta en aumentar la interacción del DNA con la superficie de la célula, el DNA después es endocitado por alguna vía no caracterizada. (figura 10)

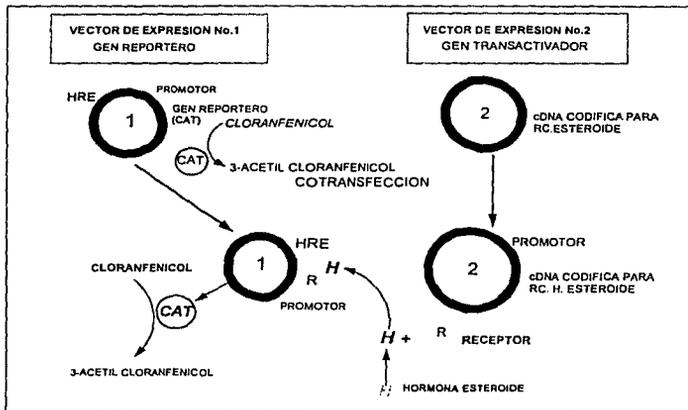


Figura 10. Las células CV-1 se transfectaron por el método de precipitación calcio-fostato. Las células fueron cotransfectadas con el vector de expresión que codifica para el receptor de progesterona y los vectores de expresión PRE₃-TATA-CAT o TATA-CAT (vector control). Después de la transfección, las células se procesaron para medir la actividad CAT.

PROCEDIMIENTO.

1. Las células se incubaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 2 mM de L-glutamina, 0.1 U/ml de insulina, 100U/ml. de penicilina a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5%
2. Antes de la transfección, las células se sembraron (200 000-400 000) en cajas de petri de 60 X 15 mm. por 24 horas a 37°C

3. Cuatro horas antes de la transfección, las células se lavaron con PBS pH 7.4 y se incubaron en medio DMEM sin rojo fenol, que contiene suero tratado con carbón dextran para que el medio se encuentre libre de esteroides.
4. Debido a que las células de la línea celular CV-1 no poseen receptores de esteroides, se contranfectaron con 2 µg del vector de expresión que codifica para RP, junto con el vector reportero correspondiente. Los vectores reporteros que contienen los elementos de respuesta a progesterona (PRE2TATA-CAT) o el vector control TATA-CAT se adicionaron en cantidades de 5 a 10 µg.
5. El DNA total transfectado fue de 20 µg por caja, el cual se alcanzó utilizando DNA de espermatozoides de salmón como acarreador.
6. La transfección se llevó a cabo con 250 µl de CaCl_2 , en agitación constante moderada.
7. Se adicionaron 500 µl de HBS 2X, gota a gota, en agitación constante moderada.
8. El volumen final de la transfección se aforó a 2 ml con agua estéril y filtrada.
9. Se adicionó 1 ml. de esta solución, gota a gota al rededor de las cajas de cultivo que contenían las células CV-1 (200 000-400 000 ccl.).
10. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO_2 y 95 % de aire.
11. Veinticuatro horas después de la transfección, las cajas se lavaron con PBS, se cambió el medio y se agregaron las progestinas a evaluar.

7.6.1 TRATAMIENTOS HORMONALES.

1. Las células transfectadas se trataron con diferentes dosis de los esteroides sintéticos (R5020, NET, 5α-NET, 3β,5α-NET, LNG, RU486) en dosis 100 nanomolar (10^{-7}M) y 10 nanomolar (10^{-8}M).
2. Los esteroides se adicionaron en etanol, a una concentración no mayor de 0.001% y las células se incubaron de 24 a 48 horas, en presencia de los esteroides.

2. Los esteroides se adicionaron en etanol, a una concentración no mayor de 0.001% y las células se incubaron de 24 a 48 horas, en presencia de los esteroides.

7.6.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE CLORANFENICOL ACETIL TRANSFERASA (CAT).

Este sistema reportero es ampliamente utilizado, el cual usa la actividad de cloranfenicol acetil transferasa, como una medida del nivel de expresión de un gen transfectado (Frederick et al., 1987). Esta enzima bacteriana cataliza la transferencia del grupo acetilo de acetil coenzima A al cloranfenicol, para lo cual se utiliza como sustrato de la enzima, el cloranfenicol marcado con carbono 14. En el ensayo, las células transfectadas se colectaron y lisaron por 3 ciclos de congelación y descongelación. Después se obtuvo el extracto celular total mediante centrifugación. Posteriormente, 150 µl del extracto se incubaron en presencia de acetil coenzima A y cloranfenicol marcado radiactivamente. Se obtuvo el cloranfenicol mediante una extracción con un solvente orgánico y se separaron las formas acetiladas y no acetiladas del cloranfenicol por métodos cromatográficos y se evaluaron por autoradiografía. (Figura 10)

PROCEDIMIENTO.

1. Posterior al tratamiento hormonal, las células se recuperaron en solución amortiguadora A (15 mM , tris-HCl, pH 8.00, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 1 mM ditioneítril (DTT), 2 mM EDTA) y se obtuvieron los extractos totales para medir la actividad de CAT.
2. Las células se recuperaron con un gendarme de plástico, raspando varias veces la caja de cultivo celular utilizando 250 µl de la solución amortiguadora A. Este proceso se realizó sobre hielo.
3. El precipitado se colocó en tubos para microcentrifuga y se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 minutos a 4°C, para obtener un precipitado de células y descartar el sobrenadante.
4. Se resuspendieron las células en 300 µl de solución amortiguadora A.

5. Posteriormente, se obtuvieron los extractos totales a través de procesos de congelación (Nitrógeno líquido) y descongelación (37°C), por 3 ciclos
6. Las células lisadas se centrifugaron por 5 minutos a 14 000 rpm a 4°C, se recuperó el sobrenadante (extracto total) y se midió la concentración de proteína en cada uno de los extractos, utilizando el método de Bradford (reactivos de Bio-Rad).
7. La evaluación de la actividad de CAT se hizo de acuerdo con el método de Pothier. Los extractos totales (100µg) se incubaron en solución amortiguadora A con 5 µl de Cloranfenicol marcado con carbono 14 [Actividad Especifica (A. E.) 53.1 mCi/mmol], 20 µl de Acetil CoA 4 mM., en un volumen total de 150 µl, por una hora a 37°C.
8. Posteriormente, se agregaron a las incubaciones 700 µl de acetato de etilo y se agitaron.
9. Se centrifugó a 14 000 rpm por 3 minutos a 4°C para recuperar la fase orgánica donde se encuentra el cloranfenicol marcado.
10. Se evaporó el acetato de etilo en un concentrador de muestras (Speed Vac)
11. El cloranfenicol se recuperó agregando 30 µl de acetato de etilo.

7.6.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).

La cromatografía en capa fina se realizó para separar el cloranfenicol acetilado y no acetilado.

PROCEDIMIENTO.

1. Se preparó la cámara de cromatografía con una pieza de papel filtro (Watman), aproximadamente del tamaño de la cámara de cromatografía y se agregaron 200 ml. de una mezcla de cloroformo/metanol (95:5)
2. Se equilibró la cámara durante 2 horas, hasta que el solvente saturó completamente la cámara.

3. Se depositaron lentamente los 30 μ l del cloranfenicol recuperado con acetato de etilo en la placa de capa fina.
4. Se colocó la placa en la cámara de cromatografía y se corrió la cromatografía durante 45 minutos.
5. Posteriormente, la placa cromatográfica se expuso a una placa de autoradiografía X-OMAT AR, por 24 horas, a temperatura ambiente.

RESULTADOS

8.1 AMPLIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y DIGESTIÓN ENZIMÁTICA DE LOS VECTORES REPORTEROS.

Con el objetivo de evaluar la actividad progestacional y/o antiprogestacional de progestinas sintéticas y/o naturales se utilizaron los siguientes vectores reporteros: PRE₂-TATA-CAT, TATA-CAT y el vector de expresión que codifica para el receptor de progesterona PKSV RPR. Estos vectores reporteros se introdujeron a bacterias XL-1 Blue (Strata Gene). Posteriormente, los vectores se purificaron a partir de las bacterias transformadas, por las técnicas de mini y maxi-prep. Se determinó la concentración y la pureza de los DNAs obtenidos por medio de la lectura de la absorbencia a 260 y 280 nm de diluciones 1:100.

En todos las muestras, la relación de las lecturas a 260/280 nm fue mayor a 1.8, lo cual indicó que los DNAs obtenidos se encontraban puros. Posteriormente, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, para observar la integridad de los DNAs. Se corrió 1 µg del producto de cada purificación y se observaron en un transiluminador.

En la figura 11, se muestra la electroforesis de los DNAs plasmídicos obtenidos después de llevar a cabo la amplificación y purificación del DNA. El primer carril corresponde al DNA de 1 Kilo base (Kb) (fragmentos de 500 pb a 12 Kb), el cual se utilizó como marcador de peso molecular, el segundo carril corresponde al plásmido PKSV RPR (posee el cDNA que codifica para el RP), en el tercer carril se observa el plásmido PRE₂-TATA-CAT (posee dos palíndromos del elemento de respuesta a progesterona) y el cuarto carril corresponde al plásmido TATA-CAT (vector control). No se observa material degradado, lo cual nos indica que el DNA obtenido se encuentra íntegro, tampoco se observa proteínas en el uso de esta técnica.

Los fragmentos que se obtuvieron fueron de los tamaños que se esperaban y como se puede observar, el carril 2 presenta diversas bandas debido a las diferentes formas de superenrollamiento de los plásmidos.



Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, en el cual se muestran los DNAs plasmídicos obtenidos después de llevar a cabo la amplificación y purificación por medio de la técnica de maxiprep. 1. Marcador molecular 1 Kb (fragmentos de 500 pb a 12 Kb), 2. PKSv RPR, 3. PRE₂-TATA-CAT, 4. TATA-CAT.

8.2 REGULACIÓN PROGESTACIONAL DE LA ACTIVIDAD DE CAT DE LOS VECTORES PRE₂ TATA CAT Y TATA CAT.

Las células CV-1 se cultivaron en medio D-MEM-STF 10% y posteriormente sembradas en cajas de petri de 10 cm. de diámetro a una densidad de 300 000 células por caja. Cuando las células llegaron al 75% de confluencia se cotransfectaron por el método de coprecipitación con calcio-fosfato con el vector de expresión que codifica para el RP junto con el reportero PRE₂ TATA CAT o con el reportero TATA CAT. Posteriormente, se estimularon con R5020 (3×10^{-8} M) que es una progestina muy potente, RU486 (antiprogestina) (3×10^{-8} M) y etanol como control.

La actividad de CAT de estas células transfectadas y estimuladas hormonalmente se evaluó como sigue: las células se colectaron y lisaron para obtener los extractos totales. Los extractos fueron incubados con cloranfenicol marcado con C¹⁴ y Acetil CoA. Se obtuvo el cloranfenicol total mediante una extracción orgánica con Acetato de Etilo y posteriormente se separaron las formas acetiladas y no acetiladas del cloranfenicol mediante la técnica de CCF y se revelaron en una película radio sensible.

Los resultados obtenidos en estos experimentos demostraron que la actividad de CAT inducida por R5020 (fig. 12 carriles 9 y 10) sólo ocurrió en las células transfectadas con el vector PRE₂-TATA-CAT, demostrando que la actividad transcripcional del vector reportero se encuentra bajo estricta regulación hormonal por los complejos RP-R5020, el cual se une a los elementos de respuesta a progesterona presentes en el vector. Sin embargo, el vector control TATA-CAT (carriles 3 y 4), que no posee en su secuencia los dos elementos de respuesta a progesterona, fue insensible al estímulo hormonal (fig. 12).

En las siguientes figuras se observan las formas acetiladas y no acetiladas del cloranfenicol, después de ser separadas mediante una cromatografía en capa fina, en orden ascendentes, los puntos radiactivos se observaron de la siguiente forma: Un punto débil en el origen, cloranfenicol no acetilado, y cloranfenicol acetilado (monoacetilado y diacetilado).

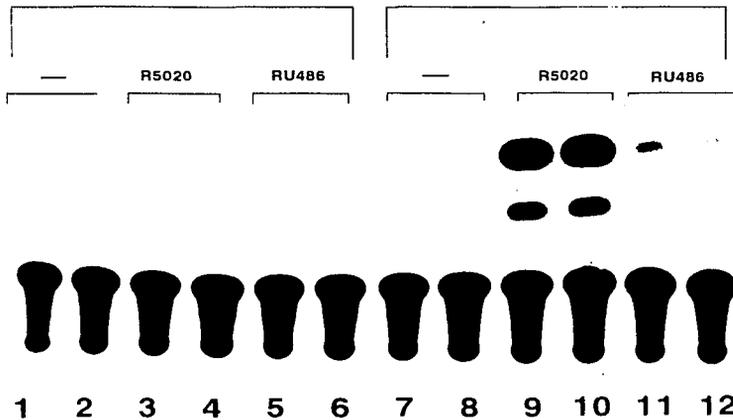
Podemos decir que una actividad de CAT elevada se indujo cuando las células fueron cotransfectadas con PR y PRE₂-TATA-CAT, y después tratadas con R5020, mientras que la antiprogestina RU486 no modificó la actividad de CAT (fig. 12). Es necesario la presencia de los PRE en la región reguladora, ya que la unión del complejo hormona-receptor a este sitio, activa la transcripción de la enzima CAT. Con estos experimentos demostramos que tenemos un modelo de regulación hormonal controlado, por la presencia de un estímulo (la hormona), un receptor (RP) y un efector PRE₂ TATA CAT, el cual responde de una manera positiva induciendo la transcripción en presencia de R5020. Sin embargo, se tiene una inducción basal en presencia de un antagonista, como RU 486. Por lo tanto, utilizando este modelo entonces pudimos estudiar los efectos progestacionales y/o antiprogestacionales de diversas progestinas a nivel de la transcripción. (fig. 12).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Figura 12. Inducción de la actividad de CAT por R5020 y RU486. Las células CV-1 se cotransfectaron con el vector de expresión RP de conejo y el vector TATA-CAT (izquierda) o el reportero PRE₂-TATA-CAT (derecha). La actividad de CAT se midió en los extractos de las células tratadas con R5020 (3×10^{-8} M) (carriles 3, 4 y 9, 10), RU486 (3×10^{-8} M), (carriles 5, 6 y 11, 12) y 0.001% etanol como control (carriles 1, 2 y 7, 8). En orden ascendentes, los puntos radiactivos se observaron de la siguiente forma: Un punto débil en el origen, cloranfenicol no acetilado y cloranfenicol acetilado (monoacetilado y diacetilado). En esta figura se presentan resultados representativos de por lo menos tres experimentos independientes, donde el promotor mínimo TATA CAT no es capaz de ser inducido por el tratamiento hormonal, teniendo una actividad CAT basal similar a aquella mostrada por el vector PRE₂ TATA CAT sin tratamiento.

TATA-CAT

PRE₂-TATA-CAT



8.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD PROGESTACIONAL DE NET, LNG Y SUS METABOLITOS REDUCIDOS EN EL ANILLO A.

Para evaluar la actividad progestacional de las diversas progestinas, las células CV-1 transfectadas con el vector de expresión que codifica para el RP y el vector reportero PRE₂-TATA-CAT, se trataron, a una dosis de 3×10^{-8} M de los siguientes esteroides sintéticos: NET, 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET, LNG, 5 α -LNG y 3 β ,5 α -LNG. Al día siguiente del estímulo se obtuvieron los extractos celulares totales y se evaluó la actividad CAT mediante un ensayo de acetilación del cloranfenicol ¹⁴C. Posteriormente las formas acetiladas y no acetiladas fueron separadas por una CCF.

Los datos obtenidos demostraron que, comparado con el control, (Fig. 13 carril 1), NET (carril 3) y LNG (carril 6) ejercieron un efecto progestacional alto, similar al que se presentó con la progestina sintética R5020 (carril 2). 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET, 5 α -LNG y 3 β ,5 α -LNG exhibieron una actividad progestacional baja (figura 13, carriles 4, 5 y 7, 8).

Los resultados obtenidos en estos ensayos demuestran que las progestinas NET y LNG ejercen un efecto progestacional muy potente, similar al presentado por R5020 (fig. 13 carriles 3, 6, 2 respectivamente).

Por otra parte, los metabolitos reducidos 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET, 5 α -LNG y 3 β ,5 α -LNG presentaron una actividad progestacional muchísimo menor que la presentada por el compuesto original (carriles 4, 5 y 7, 8)

Para demostrar que las células utilizadas carecen del receptor de estrógenos (RE) se transfectaron las células CV-1 con el vector ERE VIT TKCAT el cual posee en su secuencia los elementos de respuesta para estradiol. Cuando se estimuló con estradiol (10^{-9} M) no se observó actividad de CAT (Fig. 13 carril 10), demostrando así que estas células no poseen el RE.

Con estos resultados podemos corroborar que los compuestos derivados de la 19-Nor testosterona poseen una actividad progestacional fuerte y que esta actividad se mide a través de la activación del RP e inducción de la transcripción de genes que portan en su secuencia, elementos de respuesta a progesterona (PREs).

Sin embargo, el metabolismo de estos compuestos da por resultado productos menos activos, hormonalmente, que el compuesto original aún cuando activan la transcripción, no lo hacen con la misma potencia como lo hace la NET, y que de manera contraria, pareciera que ejercen un efecto anti-hormonal.

Para evaluar el efecto de la dosis de NET administrada (fig. 14), así como de sus metabolitos reducidos 5α -NET y $3\beta, 5\alpha$ -NET (fig. 15) sobre la transcripción del vector PRE_2 -TATA-CAT (actividad progestacional) transfectado en las células CV-1, se administraron, dosis diferentes de estas progestinas (de 10^{-6} M a 10^{-11} M), utilizando etanol como vehículo y control. Posteriormente se evaluó la actividad progestacional de cada progestina y se pudo observar que la NET (fig. 14 carril 6) presenta una actividad similar a la que presenta la progestina R5020 (fig. 14 carril 8).

También se evaluó este mismo efecto administrando las mismas dosis de LNG y sus metabolitos 5α -LNG y $3\beta, 5\alpha$ -LNG (fig. 16).

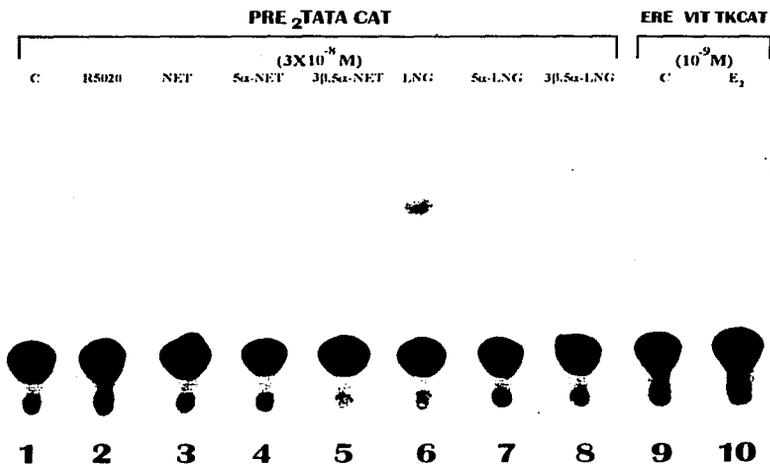


Figura 13. Actividad progestacional inducida por 19-Nor progestinas. Se muestra una autoradiografía representativa del ensayo donde las células CV-1 se cotransfectaron con el vector RP y el plásmido PRE₂ TATA CAT. Estas células posteriormente se trataron a una dosis de 3×10^{-8} M de las diferentes progestinas como se indica en la figura. Se probó también la actividad de CAT en presencia de EREs, transfectando a las células con el vector ERE VIT TKCAT y se estimuló con estradiol (carril 10). Se utilizó etanol al 0.001% como control (carriles 1 y 9)

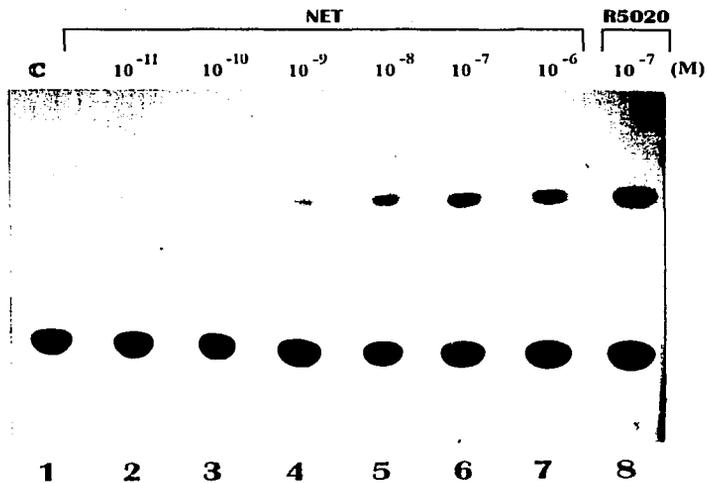


Figura 14. Efecto dosis-respuesta de la Noretisterona. Las células CV-1 se cotransfectaron con el vector de expresión RP de conejo y el vector reportero PRE₂-TATA-CAT. La actividad de CAT se midió en los extractos de las células tratadas con NET a diferentes dosis (de 10^{-11} a 10^{-6} M y R5020 (10^{-7} M) y etanol como control.

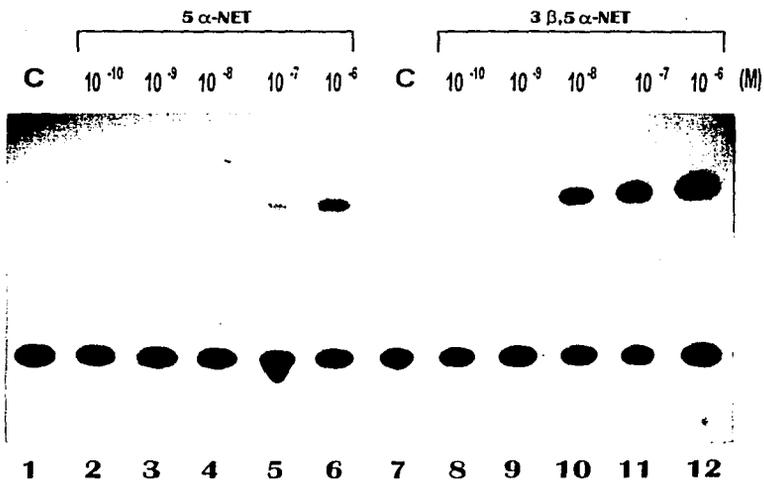


Figura 15. Efecto dosis-respuesta de los metabolitos reducidos en el anillo A de la Noretisterona. La actividad CAT se midió en los extractos de las células tratadas con los metabolitos de NET, a diferentes dosis (de 10^{-10} a 10^{-6} M) y etanol como control (carriles 1 y 7).

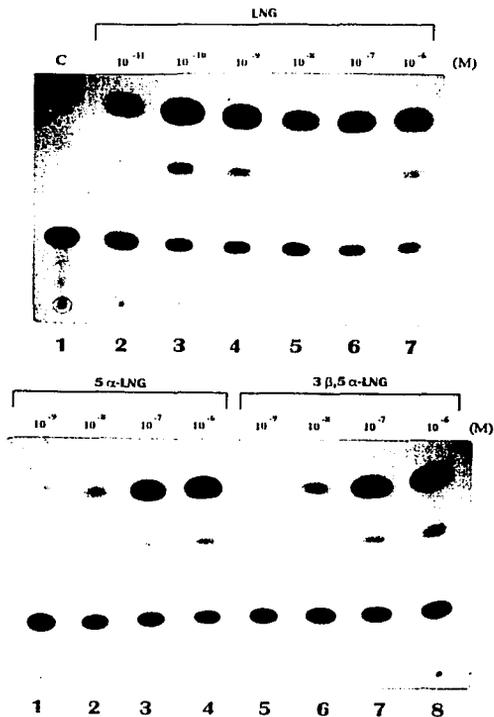


Figura 16. Efecto dosis-respuesta de LNG y sus metabolitos reducidos en el anillo A. La actividad de CAT se medió en los extractos de las células tratadas con LNG y sus metabolitos, a diferentes dosis (de 10^{-10} a 10^{-6} M) y etanol como control.

8.4 EFECTO ANTIPROGESTACIONAL DE RU486.

Los efectos antagonistas que presenta la antiprogesterina RU486 fueron estudiados como sigue: las células transfectadas con los vectores PRE2 TATA CAT y PKSVRP fueron tratadas simultáneamente con R5020 (3×10^{-8} M y 3×10^{-9} M) y RU486 (30 veces más que la dosis agonista). Los resultados obtenidos después de analizar la actividad CAT en los extractos celulares de cada uno de los tratamientos demuestran, que la antiprogesterina RU486 (Fig. 17 carril 4) inhibe la actividad CAT inducida por R5020 (carriles 1 y 2).

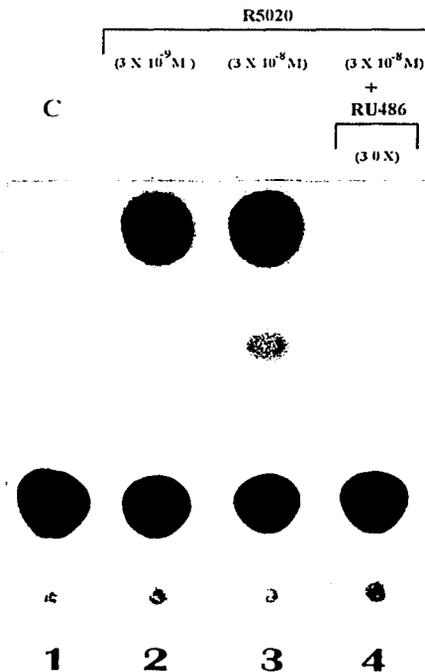


Figura 17. Efecto antiprogestacional de RU486 en la inducción de la transcripción por R5020 del vector PRE₂-TATA-CAT. Las células CV-1 contranfectadas con el vector de expresión PKSVRPR y PRE₂-TATA-CAT se trataron simultáneamente con R5020 ($3 \times 10^{-8} \text{ M}$ y $3 \times 10^{-9} \text{ M}$) y RU 486 (30 veces más que la dosis agonista). Se presenta una fotografía de una autoradiografía correspondiente a un ensayo.

8.5 EFECTO ANTIPROGESTACIONAL DE 5 α -NET.

Los efectos antagonistas previamente documentados (Cerbón MA, Lemus AE, Vilchis F, Pasapera AM, García GA, Pérez Palacios G; 1991) que presentó el metabolito dihidro derivado de NET (5 α NET), se probaron como sigue: las células cotransfectadas con los vectores PRE₂ TATA CAT y PKSVRP se trataron simultáneamente con R5020 (3×10^{-8} M y 1×10^{-7} M) y 5 α -NET (6×10^{-7} y 3×10^{-6} , 30 veces más para cada dosis agonista), utilizando como un control antagonista, el tratamiento simultáneo de las células con R5020 y RU486. Los resultados obtenidos después de analizar la actividad de CAT en los extractos celulares de cada uno de los tratamientos, demuestran, que el metabolito 5 α -NET (Fig. 18 carriles 6 y 8) inhibe la actividad de CAT inducida por R5020 (carriles 1, 3 y 5, 7) en más de un 70 %. Resultados similares se obtuvieron al analizar los extractos celulares de aquellos tratados con R5020 + RU486 (carriles 2 y 4), con lo que se concluye que el mecanismo de acción de 5 α -NET es similar a aquel que presenta el RU486. El cual es a través de su interacción con los RP inhibiendo el desencadenamiento de la maquinaria de transcripción, a través de una inactivación de la región TAF II del RP.

En la figura 18 se puede observar como 5 α -NET (figura 18 carriles 6 y 8) inhibe la actividad de CAT, inducida por R5020 (carriles 1,3 y 5,7) de una manera similar a la que se observó con la antiprogestina RU486 (carriles 2 y 4) inhibiendo la transcripción, a través de una inactivación de la región TAF II del RP.

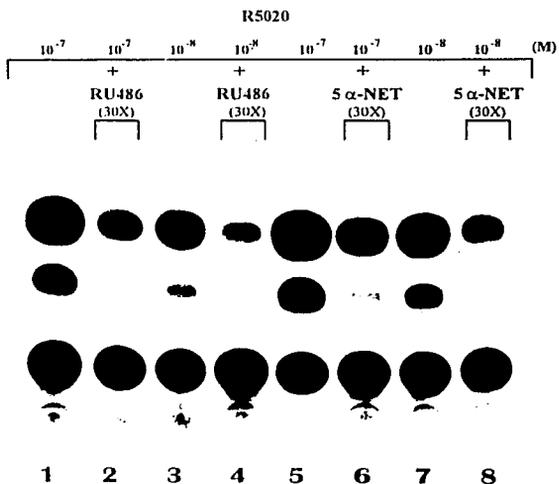


Figura 18. Efecto antiprogestacional de 5 α -NET Y RU486 en la inducción de la transcripción del vector PRE₂-TATA-CAT inducido por R5020. Células CV-1 contranfectadas con el vector de expresión rPR y PRE₂-TATA-CAT se trataron simultáneamente con R5020 (3×10^{-8} M y 1×10^{-7} M) y 5 α -NET o RU 486 (30 veces más por cada dosis agonista). Se presenta una fotografía de una autoradiografía respectiva del ensayo.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la actividad progestacional y antiprogestacional de NET, LNG y sus metabolitos en células CV-1 (derivadas de riñón de mono) las cuales se cotransfectaron con un vector de expresión que codifica para el receptor de progesterona (RP) de conejo y el gen reportero construido PRE₂TATA-CAT que lleva consigo dos elementos de respuesta a progesterona.

Yen y col. en 1993, describieron brevemente, el mecanismo de acción de las hormonas esteroides de la siguiente forma: Las hormonas son secretadas desde sus respectivas glándulas endocrinas, hacia el torrente circulatorio; donde circulan, sobre todo, unidas lipoproteínas plasmáticas de transporte. Los esteroides libres difunden hacia el interior de las células e interactúan con los receptores específicos localizados, mayoritariamente, en el núcleo. Después de unirse con sus receptores específicos, experimentan un cambio conformacional, lo cual los convierte de inactivos a activos. Así, los receptores tienen la capacidad de unirse con los elementos de respuesta específicos localizados en la región promotora de los genes y así activar (o suprimir) la transcripción. Si un gen se activa, por ejemplo, la enzima RNA polimerasa II transcribe la información del gen en ácido ribonucleico mensajero (RNAm), una molécula intermediaria que transporta la información hacia el compartimiento citoplasmático de las células. Aquí, la información es traducida con la maquinaria biosintética produciendo el producto proteínico adecuado especificado por el gen en cuestión (fig. 2) (Yen y Jaffe 1993). En este sentido, nosotros, para evaluar una parte de estos procesos (unión del receptor activado a los elementos de respuesta hormonal) utilizamos como modelo celular la línea CV-1, estas células se cotransfectaron con PR y PRE₂-TATA-CAT; los resultados demostraron que el estímulo de la progestina R5020 utilizada fue capaz de activar la transcripción de la enzima CAT, indicando así que la actividad transcripcional del vector queda bajo la regulación del RP, formando un complejo hormona-receptor activado, el cual une a los PRE para activar la transcripción de la enzima CAT.

Nuestros estudios también confirmaron y ampliaron informes previos en los que se considera a los receptores, como proteínas que son producidas por un gen diferente y que difunden y se

unen con su nuevo sitio de acción, es decir, los elementos *cis* reguladores localizados en el gen sobre los cuales van a ejercer su efecto. En este sentido, los receptores de los esteroides son factores *trans*, porque son producidos a partir de genes ubicados en otros sitios y deben difundirse hacia sus elementos HRE análogos, que en general se localizan en las regiones 5'-reguladoras de sus genes blanco (Yen y Jaffe 1993). De acuerdo con esto, los elementos PRE son elementos *cis* que parecen actuar sólo cuando uno o más factores *trans* (PR) se unen a ellos. Para la inducción de la transcripción por progestinas, no obstante del receptor de progesterona, se requiere la presencia de Elementos de Respuesta a Progesterona en la plantilla para que el receptor funcione como factor transactivador (Klein-Hitpass et al., 1990), así como también, los elementos básicos de transcripción como la caja TATA.

En este estudio se utilizó como gen reportero el plásmido PRE₂TATA-CAT, el cual posee un secuencia de 20 pares de bases con dos secuencias correspondientes a los elementos de respuesta a progesterona unidos a la caja TATA. Se utilizaron 2 PREs, ya que se ha demostrado que una copia de PRE aumenta cinco veces la transcripción, dependiente de RP, y que dos copias de PRE aumentan 27 veces, indicando que las dos copias PRE funcionan cooperativamente *in vivo*. (Tsai et al., 1989) en presencia del estímulo hormonal.

Basándonos en este modelo, dicho estudio muestra que NET, LNG y sus metabolitos reducidos en el anillo A ejercen diversos efectos hormonales y antihormonales, a través del PR. La LNG y el NET poseen propiedades progestacionales puesto que éstas inducen actividad de CAT en la presencia, tanto del gen reportero PRE₂ TATA-CAT, como del PR en células CV-1. El metabolito dihidro reducido 5 α -NET ejerce ambos efectos progestacional y antiprogestacional ya que indujo una actividad de CAT débil, comparada con NET y R5020 (fig.13). No obstante, este metabolito inhibió la síntesis de la enzima CAT inducida por R5020 cuando las células se trataron simultáneamente con R5020 y 5 α -NET (fig. 14). Estos efectos antiprogestacionales de 5 α -NET observados fueron similares a los observados con RU486 (fig. 14). Nuestros datos también sugieren que la actividad antiprogestacional de 5 α - NET previamente reportada *in vivo* (Pasapera et al., 1995) está mediada a través de PR y ocurre a nivel transcripcional. Con estos resultados, nosotros confirmamos los resultados previos de

Cerbón y cols. donde se demostró que NET y LNG son compuestos con actividad progestacional muy fuerte que además son capaces de inducir la síntesis de UG y de su RNAm, la cual está regulada, de manera específica, por progesterona, en el útero de la coneja (Cerbón et al., 1990). Estos autores proponen un posible efecto antiprogestacional de 5α -NET, ya que el compuesto es capaz de inhibir la síntesis de UG inducida por progesterona. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales, tanto los metabolitos reducidos de NET, así como las de otras progestinas, ejercen sus efectos biológicos, incluyendo aquellos de tipo antiprogestacional son desconocidos.

Sin embargo, los datos en la literatura, demuestran que estos metabolitos pueden interactuar con los diferentes receptores de hormonas esteroides, lo que apoya la hipótesis de que todos estos efectos hormonales pudieran llevarse a cabo mediante su unión con los receptores hormonales. Aunque el tipo de respuesta biológica generada de estas interacciones tiene que ser explorado. En el caso de las respuestas de tipo agonista, es relativamente fácil determinar si el mecanismo de acción de la progestina es por medio de su unión al receptor que se une. Sin embargo, en caso de las respuestas parciales de tipo agonista, agonista débil, antagonista fuerte o sinérgicas, las vías a explorar sobre su mecanismo de acción son múltiples, y éstas pueden ir desde la activación del receptor, la transactivación, la translocación nuclear, la dimerización de los receptores, la inhibición de la interacción Receptor-ADN, o el secuestro o la ausencia de factores de transcripción importantes en este proceso, entre otras.

De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados confirman que, como se ha demostrado para varios esteroides sintéticos (Teutsch et al., 1984, Nique et al., 1994), 5α NET muestra ambas actividades agonista y antagonista. A partir de este estudio no se pudo determinar si la calidad de la respuesta (agonista o antagonista) está relacionada con la afinidad del receptor o con la estructura química del ligando, ya que Nique y cols. en 1994 propusieron que una antihormona pura puede considerarse como un compuesto el cual, exclusivamente, estabiliza la conformación inactiva del receptor, mientras que un antagonista mixto podría ser capaz de estabilizar las conformaciones activa e inactiva en diversa magnitud (Nique et al., 1994).

La estimulación hormonal podría aumentar la tasa de transcripción hasta cinco veces por encima del nivel basal. En nuestro modelo celular cotransfectado con PR y PRE₂-TATA-CAT el estímulo de las progestinas fue capaz de activar la transcripción de la enzima CAT, indicando así que las progestinas unieron al RP y este complejo hormona-receptor unió a los PRE estimulando hasta más de 50 veces el nivel basal.

La potencia de las hormonas esteroides se correlaciona con: 1) la afinidad de los receptores por las hormonas (o los fármacos) y 2) la eficiencia del complejo hormona-receptor activado para regular la transcripción. Las afinidades elevadas llevan a la prolongada ocupación del HRE y a la estimulación sostenida de la transcripción. Sobre esta base, puede comprenderse el mecanismo de acción de ciertos fármacos que son anti-hormonas (Yen y Jaffe 1993).

La habilidad para examinar la actividad transcripcional de secuencias genómicas clonadas después de la introducción de estos elementos a células apropiadas, ha enriquecido sustancialmente nuestro entendimiento de la regulación de la transcripción de genes de mamíferos. Estos estudios han sido grandemente simplificados por el desarrollo de genes vectores reporteros. Es importante mencionar que la línea celular CV-1 derivada de riñón de mono, usada en estos estudios, es un modelo apropiado para evaluar actividades hormonal y antihormonal, debido a que carece de receptores a esteroides. De esta manera, podemos introducir el receptor esteroide deseado y evaluar sólo los efectos propios de la interacción de los esteroides con el receptor. Así fue posible determinar los mecanismos moleculares de acción de cada compuesto con un método específico y altamente sensible, sin interferencia debida a la presencia de varios receptores de esteroides, como ocurre en tejidos blanco (Savouret et al., 1994)

CONCLUSIONES

En base a los resultados generados de este estudio se concluyen que:

- La actividad de CAT (una forma indirecta para medir la actividad transcripcional), fue inducida solamente por R5020 en células transfectadas con el vector PRE₂-TATA-CAT; demostrando así que la actividad transcripcional del vector reportero se encuentra bajo la regulación del complejo RP-hormona el cual une a los elementos de respuesta a progesterona presentes en el vector, mientras que el vector TATA-CAT, que no posee en su secuencia los dos elementos de respuesta a progesterona, fue insensible a la transcripción mediada por PR. Podemos decir entonces que la actividad de CAT, fue normalmente inducida cuando las células fueron cotransfectadas con PR y PRE₂-TATA-CAT, y estimuladas con R5020, mientras la antiprogestina RU486 no modificó la actividad de CAT.
- Proponemos que la NET, el LNG y sus metabolitos reducidos en el anillo A ejercen sus efectos hormonal y antihormonal a un nivel transcripcional, a través de formar complejos "activados" al unirse al PR y a su vez este complejo hormona-receptor unirse con los PRE y desencadenar la transcripción.
- Los metabolitos reducidos 5 α -NET y 3 β ,5 α -NET exhibieron una actividad progestacional baja.
- El metabolito 5 α -NET es capaz de inhibir el efecto agonista de la P₄, exhibiendo efectos típicos antagonistas similares a los que presenta RU486.
- Nuestros resultados también apoyan el uso de construcciones CAT albergando elementos de respuesta a esteroides como modelos apropiados para la evaluación de agentes contragestacionales nuevos en cultivo de tejidos.

APÉNDICE

TRANSFORMACIÓN.

Soluciones:

1.- Medio de cultivo líquido LB (Luria Bertani)

10 g de triptona grado bacteriológico.

5 g de extracto de levadura grado bacteriológico.

5 g de NaCl.

Agua c.b.p. 1000 ml.

Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH. y se esterilizó por autoclave.

2.- Solución de ampicilina 12.5 mg/ml.

12.5 mg/ml ampicilina

Amortiguador de fosfatos 0.6 M pH 6.4

Se esterilizó por filtración en Millipore 0.45 mm.

Se utilizó a una concentración final de 50 µg/ml de ampicilina.

3.- Medio de cultivo LB sólido (agar)

10 g de triptona grado bacteriológico.

5 g de extracto de levadura grado bacteriológico.

5 g de NaCl.

5 g de agar grado bacteriológico 1.5% (p/v)

Agua c.b.p. 1000 ml.

Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH. y se esterilizó por autoclave.

4.- Escherichia coli cepa XL1-Blue con las siguientes características *reA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 sup E44 relA1 lac [F'pro AB lacI ΔM15Tn10 (Tet)]* (STRATA GENE).

5.- Glicerol.

6.- β -mecaptoetanol 25 mM

Dilución 1:10

Almacenar a 4°C

7.- Medio SOB

a) Medio SOB

20g Bactotripton

5g Extracto de levadura

10mM NaCl

2.5mM KCL

Aforar a 1 lt. y esterilizar en autoclave.

Almacenar a 4°C.

b) Solución 2M de Mg

1M $MgCl_2$

1M $MgSO_4$

Esterilizar por filtración con microfiltros de 0.22 μm

Almacenar a 4°C.

Para cada 100 ml. de Medio SOB, añadir 1 ml. de la solución 2M de Mg (la concentración final de Mg es 20 mM)

8.- Medio SOC

Por cada 100 ml. de medio SOB agregar 1 ml de Solución de glucosa 2M

Se debe de agregar la solución de glucosa 2M, en el momento que se va a utilizar.

9.- Solución de glucosa 2M

36.04 g de Glucosa

Agua desionizada cbp. 100 ml

Filtrar con microfiltros de 0.22 μm y esterilizar.

MINI PREP.

Soluciones.

1.- Medio LB líquido suplementado con ampicilina (50 µg/ml). (ver apéndice transformación No. 1)

2.- EDTA 0.5 M (pH 8)

186.1 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Etilendiaminotetraacetato de sodio).

800 ml de H_2O .

Se ajustó el pH a 8.0, se aforó a 1000 ml y se esterilizó por autoclave.

3- Solución para lisis de bacterias.

Tris-HCl 25mM pH 8.0.

EDTA 10 mM.

Glucosa al 15%.

Lisosima (2mg/ml.).

Esterilización por autoclave.

4.- SDS- alcalino.

NaOH 0.2 N.

SDS al 1%.

5.- Acetato de sodio 3 M pH 4.8.

Disolver 3 moles de acetato de sodio en un volumen mínimo de agua, ajustar el pH 4.8.

Esterilizar por autoclave.

6.- RNAasa A.

1mg/ml. de ribonucleasa A.

Almacenar a -4°C

7.- Fenol saturado pH 7.8

Se licuó el fenol a 68°C y se adicionó 8-hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%. Se adicionó un volumen igual de Tris-HCL 0.5 M (pH 8) y se agitó durante 10 minutos, después de los cuales se descartó la fase acuosa (superior). Se repitió la operación dos veces más y se adicionó un volumen igual de Tris-HCL 0.1 M (pH 8). Se agitó durante 15 minutos y se descartó la fase acuosa. Se repitió la misma operación hasta que el pH del fenol fue superior a 7.8. El fenol se almacenó con 0.1 volúmenes de Tris-HCL 0.1 M (pH 8) conteniendo 0.2% de β-mercaptoetanol. Se almacenó en un frasco obscuro a 4°C.

8.- Solución fenol/cloroformo.

1 volumen de fenol saturado pH 7.8

1 volumen de cloroformo.

Se preparó justo antes de usarse.

9.- Etanol al 70%.

Etanol 70%.

H₂O estéril 30%.

10.- Solución Tris-EDTA (TE). pH 8

10 mM Tris HCl pH 7.4

1mM EDTA pH 8.0

11.- Etanol absoluto 100%

12.- NaCl 4 M

23.37 g NaCl

Agua desionizada cbp 100 ml.

13.- Polietilenglicol (PEG) 13%.

1.3 gr. PEG

cbp 10 ml. de H₂O Estéril

MAXI PREP.

Soluciones.

1.-TB (Terrific Broth Medium)

12 g de bacto-triptona grado bacteriológico.

24 g de extracto de levadura grado bacteriológico.

4 ml de glicerol.

Ajustar a pH 7.5 con NaOH. Aforar a 900 ml. y esterilizar en autoclave.

2.- Solución amortiguadora P₁. pH 8.0.

50 mM Tris-HCl.

10 mM EDTA pH 8.0.

A esta solución amortiguadora se adicionó RNAsa (1mg/ml. de Ribonucleasa A).

3.- Solución amortiguadora P₂.

0.2 N NaOH.

1% SDS.

4.- Solución amortiguadora P₃.

Acetato de potasio 3M pH 5.5.

5.- Solución amortiguadora QBT (para equilibrar la columna QIAGEN 500).

750mM NaCl.

50 mM MOPS.

15 %. Etanol

15 % Tritón
Ajustar pH 7.0.

6.- Solución amortiguadora QC.(para lavar las columnas).

1M NaCl.
50 mM MOPS.
15 % Etanol
Ajustar PH 7.0.

7.- Solución amortiguadora QF.(Para recuperar el plásmido de las columnas).

1.25M NaCl.
50 mM Tris-HCl.
15% Etanol

8.- Isopropanol.

9.- Etanol al 70%.

70 ml Etanol absoluto.
10 ml Agua estéril.

10.- Solución Tris-EDTA (TE).

ELECTROFORESIS EN GELES HORIZONTALES DE AGAROSA.

Soluciones.

1.- Solución amortiguadora TBE 5X (solución stock).

54 g Tris base .
27.5g Acido bórico.
20 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0).

Agua desionizada cbp. para 1 lt.

Se esterilizó por autoclave.

2.- Bromuro de etidio 10mg/ml.

Disolver el colorante en agua.

Guardar en un frasco ámbar a 4°C.

3.- Solución TE. pH 7.4

10 mM Tris Hcl pH 7.4

1mM EDTA pH 8.0

4.- Gel de Agarosa al 1% en TBE.

0.5 g de agarosa

50 ml. de TBE 0.5 X

0.5 µg/ml bromuro de etidio

5.- Marcadores de peso molecular.

- Lamda cortado con Hind III (λ Hind III).

- Fi 174 cortado con Hae III (ϕ X 174/ Hae III).

- 1 kb (fragmentos de 500 pb a 12 Kb)

6.- Amortiguador de carga para DNA 6X (Loading solución amortiguadora)

0.25 %Azul de bromofenol

0.25% Xileno cianol

15% ficoll (tipo 400)

Se preparó en condiciones estériles y se guardó a 4°C

VERIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

1.- Solución amortiguadora 10 X para la enzima PstI.

50mM Tris-HCl pH 8.0.

10mM MgCl₂.

50 mM NaCl.

2.- Solución amortiguadora 10 X para la enzima Pvu II.

50mM Tris-HCl pH 8.0.

6 mM MgCl₂.

50 mM KCl.

50 mM NaCl.

3.- Enzimas Pst I y Pvu II. las cuales cortan en las siguientes secuencias 5' CTGCAA↓G3' y 5' CAG↓CTG3' respectivamente .

CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN.

Soluciones.

1.- Medio Dulbecco para cultivo celular.

Para 5 lt.

4500 mg Dulbecco

4.5 lt. Agua bidestilada estéril

18.6 g Bicarbonato de sodio (para ajustar el pH a 7.4)

Esterilizar por filtración (filtros de 0.22 μm)

2.- Medio DMEM (Dulbeco Modified Eagle)

Medio para cultivo celular.

Para 500 ml.

450 ml Medio Dulbecco
50 ml Suero de ternera fetal (10%)
10 ml Penicilina 50u/ml./Streptomycin.
5 ml L-glutamina-2 mM.
5 ml piruvato sodio 1 mM.
Filtrar con vacío (filtros de 0.22 μ m).

3.- Solución amortiguadora HBS-P2

Para 1 lt.
16 g NaCl (280 mM)
0.74g KCl (10 mM)
2 g Glucosa (12 mM)
10 g Hepes (50 mM)
10 ml Fosfato 100X
Agua estéril cbp 1lt.
Ajustar a pH 7.05-7.1
Mantener a 4°C
Esterilizar por filtración (filtros de 0.22 μ m)

4.- Fosfato 100 X (100 ml.)

2.5 g $\text{Na}_2\text{H PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Mantener a 4°C
Esterilizar por filtración (filtros de 0.22 μ m)

5.- PBS pH 7.4

6.- DMSO Para congelar las células

90% Suero fetal.
10% DMSO.

7.- CaCl₂ 1 M

11.10 g CaCl₂

Agua cbp 100 ml.

Esterilizar por filtración (filtros de 0.22 µm)

Mantener a 4°C

8.- Tripsina 0.25 % en PBS-EDTA 5 mM.

Parar 400 ml.

40 ml Tripsina 2.5

356 ml PBS

4 ml EDTA pH 8 5mM.

9.- Solución amortiguadora A

60 mM KCL

15 mM Tris HCl pH 8.00

15 mM NaCl

2 mM EDTA

0.15 mM Spermine

1mM Dithiohereitol (DTT)

40mM PMSF

Mantener a 4°C.

10.- Suero de Ternera tratado con carbón-dextrán.

0.05 g Dextrán

0.5 g Carbón

100 ml Suero de Ternera.

Al suero se le agregó el carbón-dextrán y se calentó 56°C durante 20 minutos en agitación constante, se centrifugó 5 minutos a 3 000 r.p.m., se obtuvo el sobrenadante

por decantación y se repitió la técnica. Se recuperó el sobrenadante de la segunda centrifugación y se filtró en filtros de 0.45 μ . Se almacenó a 4°C.

11.- Cloranfenicol marcado con C¹⁴

Actividad específica 53.1 mCi/mmol.

12.- Acetil CoA 4 mM.

13.- Acetato de etilo.

14.- Solución de cloroformo/metanol (95:5)

200 ml.

Cloroformo 190 ml.

Metanol 10 ml

ESTEROIDES.

1. Levonorgestrel 13 β -etnil-17 α -etnil 17 β -hidroxi-4-gonan-3-ona.

2. R5020 17 α ,21-dimetil-19-nor-4,9-pregnandiona-3,20-diona

• Levonorgestrel y R5020 fueron obtenidos de Sigma Co., St. Louis, MO; USA.

3. Noretisterona 17 α -etnil-17 β -hidroxi-19-nor-4-androsten-3ona fue obtenido de Schering Mexicana, México.

4. 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET, 5 α -LNG, Y 3 β ,5 α -LNG, fueron obtenidos por síntesis química

5. RU486 17 β -hidroxi-11 β -[4-dimetilamino-fenil]-17 α [1propinil] estra-4,9-dien-3-ona. Fue proporcionado por Roussel Uclaf (Romanville, France).

Los esteroides fueron adicionados en 0.001% etanol

REFERENCIAS

- Akerblom IW, Slater EP, Beato M, Baxter JD, Mellon PL; 1988, Negative regulation by glucocorticoids though interference with a cAMP responsive enhancer. Science 241:350-353.
- Alam J, Cook JL; 1990, Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription. Analytical Biochemistry 188:245-254.
- Allan GF, Ing NH, Tsai SY, Srinivasan G, Weigel NL, Thompson EB, Tsai M-J, O'Malley BW; 1991, Synergism between steroid response and promoter elements during cell-free transcription. J Biol Chem 266:5905-5910.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housmann DE, Evans RM; 1987, Cloning of human mineralocorticoid receptor cDNA: structural and functional Kinship with the glucocorticoid receptor. Science 237:268-275.
- Auricchio F; 1989, Phosphorylation of steroid receptors. J Steroid Biochem 32:613-622.
- Auricchio F, Migliaccio A, DiDomenico M, Nola E; 1987, Oestradiol stimulates tyrosine phosphorylation and hormone binding activity of its own receptor in a cell-free system. EMBO J 6:2923-2929.
- Bagchi MK, Tsai SY, Tsai MJ, o'Malley BW; 1990, Identification of a functional intermediate in receptor activation in progesterone-dependent cell-free transcription. Nature 345:547-550.
- Bailly A, Le PC, Rauch M, Milgrom E; 1986, Sequence-specific DNA binding of the progesterone receptor to the uterogloobin gene: effects of hormone, antihormone and receptor phosphorylation. EMBO J 5:3235-3241.
- Baniahmad A, Ha I, Reinberg D, Tsai S, Tsai MJ, O'Malley BW; 1993, Interaction of human thyroid hormone receptor- β with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. Proc Natl Acad Sci USA 90:8832-8836.

- Beato M; 1989, Gene regulation by steroid hormones. Cell 56:335-344.
- Beato M, Barettoni D, Bruggemeier U, Chalepakis G, Hache RJG, Kalff M, Pina B, Schauer M, Slater EP, Truss M; 1991, Characterization of DNA receptor interaction. In: Nuclear Hormone Receptors (Parker MG, ed.) pp 197, Academic Press, New York.
- Beato M, Chalepakis G, Shauer M, Slater EP; 1989, DNA regulatory elements for steroid hormones. J Steroid Biochem 32:737-748.
- Beato M, Sánchez-Pacheco A; 1996, Interaction of steroid hormone receptors with the Transcription initiation complex. Endocrine Reviews 17:587-608.
- Beaulieu EE; 1970, The action of hormone metabolites a new concept in Endocrinology. Rev Eur Etod Clin Biol. 15:723-726
- Berry M, Metzger D, Chambon P; 1990, Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. EMBO J, 9, 2811.
- Beyer C, Gonzalez-Mariscal G; 1991, In: Reproduction, Growth and Development. A Negro Vilar and G Pérez-Palacios, Eds. Raven Press, New York, pp 199-208.
- Blanco JC, Wang IM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW, Jurutka PW, Haussler MR, Ozato K; 1995, Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. Proc Natl Acad Sci USA 92:1535-1539.
- Bocquel MT, Kumar V, Stricker C, Chambon P, Gronemeyer H; 1989, The contribution of the N-and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. Nucleic Acids Res 17:2581-2595.
- Braselton WE, Lin TJ, Ellegood JO, Mills TM, Mahesh VB; 1979, Accumulation of norethisterone and individual metabolites in human plasma during short and long term administration of contraceptive dosage. Am J Obstet Gynecol. 133:154-160.

- Brown M, Sharp PA; 1990, Human estrogen receptor forms multiple protein-DNA complexes. J Biol Chem 65:11238.
- Bruggemeier U, Kalff M, Franke S, Scheiderei C, Beato M; 1991, Ubiquitous transcription factor OTF-1 mediates induction of the mouse mammary tumor virus promoter through synergistic interaction with hormone receptor. Cell 64:565-572.
- Bruggemeier U, Rogge L, Winnacker EL, Beato M; 1990, Nuclear factor I acts as a transcription factor on the MMTV promoter but competes with steroids hormone receptors for DNA binding. EMBO J 9:2233-2239.
- Buetti E, Kuhnel B, Diggelmann H; 1989, Dual function of nuclear factor I binding site in MMTV transcription regulation. Nucleic Acids Res 17:3065-3078.
- Bullock DW, Willen GF; 1974, Regulation of a specific uterine protein by estrogen and progesterone in ovariectomized rabbits. Proc Soc Exp Biol Med 146:294-298.
- Buratowski S; 1994, The basics of basal transcription by RNA polymerase II. Cell 77:1-3.
- Cadepond F, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, Jibard N, Hollenberg SM, Giguere V, Evans RM, Baulieu E-E; 1991, Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticoid receptor in a nonfunctional state. J Biol Chem 266:5834-5841.
- Callebaut I, Renoir JM, Lebeau MC, Massol N, Burny A, Baulieu EE, Mornon JP; 1992, An immunophilin that binds 90,000 heat shock protein: main structural features of mammalian p59 protein. Proc Natl Acad Sci USA 89:6270-6274.
- Camacho-Arroyo I, Pasapera A, Pérez-Palacios G, Cerbón M; 1995, La progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del sistema nervioso central. Rev Invest Clin 47:329-340.
- Carson-Jurica MA, William T, Schrader, Bert W, O'Malley; 1990, Steroid Receptor Family: Structure and Functions. Endocrine Reviews. Vol. 11. No. 2. 201-220..
- Castro I, Cerbón MA, Pasapera AM, Gutiérrez-Sagal R, García GA, Orozco C, Camacho-Arroyo I, Anzaldúa R, Pérez-Palacios G; 1995, Molecular mechanisms of the antihormonal

- and antiimplantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. Mol Reprod Dev. 40:157.
- Cato ACB, Herderson D, Fonta H; 1987, The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. EMBO J 6: 363-368.
- Cato ACB, Miksicek R, Schutz G, Arnemann J, Beato M; 1986, The hormone regulatory element of mouse mammary tumour virus mediates progesterone induction. EMBO J 5:2237-2240.
- Cerbón MA, Lemus AE, Vilchis F, Pasapera AM, García GA, Pérez Palacios G; 1991, A-ring reduced derivatives of Norethisterone exert antihormonal effects. In: Negro Vilar A, Pérez-Palacios G, Eds. Reproduction Growth and Development. New York: Raven Press. Vol. 71:175-187.
- Cerbón MA, Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, García GA, Pérez Palacios G; 1990, Variable expression of the Uteroglobin gene following the administration of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. J Steroid Biochem 36:1-6.
- Cerbón, M:A., Castro, I., Pasapera, A.M., Gutierrez-Sagal, R., Anzaldua,R., and Pérez-Palacios, G; 1992, Molecular mechanisms involved in the antihormonal and anti-implantation of 5 α -dihydronorethisterone (5 α -NET) in rabbits. Ninth International Congress of Endocrinology. Abs. p. 14.04.099. pp 501.
- Chalepakis G, Schauer M, Cao X, Beato M; 1990, Efficient binding of glucocorticoid receptor to its responsive element requires a dimer and DNA flanking sequences. DNA Cell Biol 9:355-368.
- Chávez B, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca, Pérez-Palacio G; 1985, Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. J Steroid Biochem . 22:121-126.

- Clarke CL, Sutherland RL; 1990, Progesterin Regulation of Cellular Proliferation. Endocrine Reviews, 11:266-302.
- Copez de Haro MS, Nieto A; 1985, Primary structure of rabbit lung uteroglobin as diduad of a cDNA. FEBS Lett 193:247-249.
- Daniel JC; 1976, Blastokinin and analogous proteins. J Reprod Fertil (suppl). 25:71-83.
- DeMarzo AM, Beck CA, Oñate SA, Edwards DP; 1991, Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of 90-Kda heat shock protein. Proc Natl Acad Sci USA 88:72-76.
- Denis M, Poellinger L, Wikstrom Ac, Gustafsson JA; 1988, Requirement of hormone for thermal conversion of the glucocorticoid receptor to a DNA-binding state. Nature 333:686-688.
- Denis M, Wikstrom AC, Gustafsson JA; 1987, The molybdate-stabilized nonactivated glucocorticoid receptor contains a dimer of Mr 90,000 non-hormone-binding protein. J Biol Chem 262: 11803-11806.
- Denner LA, Schrader WT, O'Malley BW, Weigel NL; 1990, Hormonal regulation and identification of chicken progesterone receptor phosphorylation sites. J Biol Chem 265: 16548-16555.
- Denner LA, Weigel NL, Maxwell BL, Schrader WT, O'Malley BW; 1990, Regulation of progesterone receptor-mediated transcription by phosphorylation. Science 250:1740-1743.
- Denton RR, Koszewski NJ, Notides AC; 1992, Estrogen receptor phosphorylation: hormonal dependence and consequence on specific binding. J Biol Chem 267:7263-7268.
- Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK, Yammamoto KR; 1990, Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation form a single DNA element. Science 249: 1266-1272.

- Don Y, Aronsson M, Gustafsson JA, Okret S; 1989, The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. Correlation to cellular glucocorticoid response. J Biol Chem 264: 13679-13683.
- Editorial Progesterins 1996: Present and Future. J Steroid Biochem Molec Biol Vol. 59 No. 5/6 pp357-363.
- EL-Ashry D, Onate SA, Nordeeu SK, Edwards DP; 1989, Human progesterone receptor complexed with the antagonist RU486 binds to humane response elements in structurally altered form. Mol Endocrinol 3:1545-1558.
- Elliston JF, Beekman JM, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ; 1992, Hormone activation of Baculovirus expressed progesterone receptors. J Biol Chem 267: 5193-5198.
- Emmas CE, Fawell SE, Hoare SA, Parker MG; 1992, Effect of ligand binding and DNA binding on the structure of the mouse oestrogen receptor. J Steroid Biochem Mol Biol 41:291-299.
- Eriksson P, Wrangé O; 1990, Protein-protein contacts in the glucocorticoid receptor homodimer influence its DNA binding properties. J Biol Chem 265: 3535-3542.
- Evans RM; 1988, The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240:889-895.
- Evans RM, Hollenberg SM; 1988, Zinc fingers: gilt by association. Cell 52:1-3.
- Fawell SE, Lees JA, White R, Parker MG; 1990, Characterization and colocalization of steroid binding and dimerization activities in the mouse estrogen receptor. Cell 60:953.
- Fawell SE, White R, Hoare S, Sydenham M, Page M, Parker MG; 1990, Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164, 384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. Proc Natl Acad Sci USA 87:6883-6887.
- Forman BM, Samuels HH; 1990, Interactions among a subfamily of nuclear hormone receptors: the regulatory zipper model. Mol Endocrinol 4:1293-1301.

- Frederick M, Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith, Struhl. Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 1 1987. New York. (The Red Book Bulletin)
- Fuller PJ; 1991, The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. FASEB J. 5, 3092.
- Garfield RE, Baulieu EE; 1987, The antiprogestone steroid RU486: a short pharmacological and clinical review, with emphasis on the interruption of pregnancy. Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab. 1:207-221.
- Gorman C, Moffat L, Howard B; 1982, Recombinant genomes which express choramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. Mol. Cell Biol 2: 1044.
- Granner DK; 1976, Restoration of sensitivity of cultured hepatoma cells to cyclic nucleotides show permissive effect of dexamethasone. Nature 259:572-573.
- Green S, Chambon P; 1991. The oestrogen receptor: from perception to mechanism. En: Nuclear Hormone Receptors (Parker MG, ed.) pp15, Academic Press, New York.
- Gronemeyer H; 1991, Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. Annu Rev Genet 25:89-123.
- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H., Lescop P., Sar S., Atger M., Perrit-Appianat M. and Milgrom E; 1989, Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: Evidence for interaction between monomers. Cell 57:1147-1154.
- Guiochon-Mantel A, Lossfelt H, Ragot T, Bailly A, Atger M, Misrahi M, Perricaudet M, Milgrom E; 1988, Receptors bound to antiprogestin form abortive complexes with hormone responsive elements. Nature 336:695-698.
- Gutierrez-Sagal R, Pérez-Palacios G, Langley E, Pasapera AM, Castro I, Cerbón MA; 1993, Endometrial Expression of Progesterone Receptor and Uteroglobin Genes During Early Pregnancy in the Rabbit. Molecular Reproduction and Development 34:244-149.

- Hanahan D; 1983, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Mol Biol 166:557-558.
- Harrison SC; 1991, A structural taxonomy of DNA-binding domains. Nature 353, 715.
- Hicks Gómez JJ, Díaz Zagoya JC; 1988, Bioquímica e Inmunología II. Ed. Fac. Medicina UNAM. México D.F.
- Hilliard J, Croxatto HB, Hayward JN, Sawyer CH; 1966, Norethindrone blockade of LH release to intrapituitary infusion of hypothalamic extract. Endocrinology 79:411-419.
- Hirst MA, Hinck L, Danielsen M, Ringold GM; 1992, Discrimination of DNA response elements for thyroid hormone and estrogen is dependent on dimerization of receptor DNA binding domains. Proc Natl Acad Sci USA 89:5527-5531.
- Hollenberg SM, Evans RM; 1988, Multiple and cooperative transactivation domains of the human glucocorticoid receptor. Cell 55:899-906.
- Hollenberg SM, Giguere V, Segui P, Evans RM; 1987, Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. Cell 49:39-46.
- Horwitz; 1993, Mechanism of hormone resistance in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 26:119-130.
- Ing NH, Beekman JM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW; 1992, Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). J Biol Chem 267:17617-17623.
- Isoma V, Isotalo H, Orava M, Torkely T, Jane O; 1979, Changes in cytosol and nuclear progesterone receptor concentrations in the rabbit uterus and their relation of progesterone regulated uteroglobin. Biochem Biophys Res Commun. 88:1337.
- Jacq X, Brou C, Lutz Y, Davidson I, Chambon P, Tora L; 1994, Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by estrogen receptor. Cell 79:107-117.

- Jensen EV, Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER; 1968, A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Proc Natl Acad Sci USA 59:632.
- Jonat C, Rahmsdorf H, Park K, Cato A, Gebel S, Ponta H, Herrlich P; 1990, Antitumor promotion and antiinflammation: down-regulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. Cell 62:1189-1204.
- Kalf M, Gross B, Beato M; 1990, Progesterone receptor stimulates transcription of mouse mammary tumor virus in a cell-free system. Nature 344:360-362.
- King WJ, Greene GL; 1984, Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells. Nature 307:745-747.
- Klein-Hitpass L, Tsai SY, Greene G, Clark MJ, O'Malley BW; 1989, Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element. Mol Cell Biol 9:43.
- Klein-Hitpass L, Tsai SY, Weigel NI, Allan GF, Riley D, Rodriguez R, Schrader WT, Tsai MJ, O'Malley BW; 1990, The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. Cell 60:247.
- Krishnan RS, Daniel JC; 1967, "Blastokinin" inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. Sci 158:490-492.
- Kumar V, Chambon P; 1988, The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. Cell 55:145-156.
- Landers JP, Spelsberg TC; 1992, New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. Crit. Rev. Euk. Gene Express 2:19.
- Larrea F, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores J, Pérez-Palacios GJ; 1987, The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. J Steroid Biochem 27:657-663.

- Lees JA, Farrel SE, Parker MG; 1989, Identification of two transactivation domains in the mouse oestrogen receptors. Nucleic Acids Res. 17:5477.
- Less J, Fawell S, While R, Parker M; 1990, A 22-amino-acid peptide restores DNA-binding activity to dimerization-defective mutants of the estrogen receptor. Mol Cell Biol 10: 5529-5531.
- Logeat F, Le C, Pamphile R, Milgrom E; 1985. The nuclear-bound form of the progesterone receptor is generated through a hormone-dependent phosphorylation. Biochem Biophys Res Commun 131:421-427.
- Loosfelt H, Fridlansky F, Savouret JF, Atger M, Milgrom E; 1981, Mechanism of action of progesterone in the rabbit endometrium: induction of uteroglobin and its RNA. J Biol Chem 256,3465.
- Lucibello FC, Slater EP, Joos KU, Beato M, Muller R; 1990, Mutual transrepression of Fos and the glucocorticoid receptor: involvement of a functional domain in Fos which is absent in FosB. EMBO J 9:2827-2834.
- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Singler PB; 1991, Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. Nature 352:497-505.
- MacDonald PN, Sherman DR, Dowd DR, Jefcoat SC, DeLisle RK; 1995, The vitamin D receptor interacts with general transcription factor IIB. J Biol Chem 270:4748-4752.
- Mader S, Kumar V, de Vemeuil H, Chambon P; 1989, Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. Nature 338, 271.
- McGynty DA, Djeressi C; 1958, Some chemical and biological properties of 19-nor -17-ethynyltestosterone. Ann N Y Acad Sci 71:500-515.
- McPhail MK; 1934, The assay of progestin. J Physiol(London) 83:146-149.

- Medici N, Nigro V, Abbondanza C, Moncharmont B, Molinari AM, Puca GA; 1991, *In vitro* binding of the purified hormone-binding subunit of the estrogen receptor to oligonucleotides containing natural or modified sequences of an estrogen-responsive element. Mol Endocrinol 5:555-563.
- Meei-Huey J, Langan-Fahey SM, Craig J; 1993, Estrogenic Actions of RU486 in Hormone-Responsive MCF-7 Human Breast Cancer cells Endocrinology 132:2622-2630.
- Meyer ME, Pornon A, Ji J, Chambon P, Gronemeyer H; 1990, Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. EMBO J 9:3923-3932.
- Miesfeld R, Godowski PJ, Maler BA, Yamamoto KR; 1987, Glucocorticoid receptor mutants that define a small region sufficient for enhancer activation. Science 236:423-427.
- Migliaccio A, DiDomenico M, Green S, Falco A, Kajtaniak EL, Blasi, Chambon P, Auricchio F; 1989, Phosphorylation on tyrosine of *in vitro* synthesized human estrogen receptor activates its hormone binding. Mol Endocrinol 3:1061-1069.
- Miksicek R, Borgmeyer U, Nowock J; 1987, Interaction of the TGGCA-binding protein with upstream sequence is required for efficient transcription of mouse mammary tumor virus. EMBO J 6:1355-1360.
- Mordacq JC, Linzer DIH; 1989, Co-localization of elements required for phorbol ester stimulation and glucocorticoid repression of proliferin gene expression. Genes Dev 3: 760-769.
- Muller GG, Herranen AM, Jervell KF; 1990, Studies on the mechanism of action of estrogens. Recent Prog Horm Res 14:95-139.
- Muller M, Baniahmad C, Kaltshmidt C, Renkawitz R; 1991, Multiple domains of the glucocorticoid receptor involved in synergism with the CACC box factor(s). Mol Endocrinol 5:1498-1503.

- Murdoch FE, Meier DA, Furlow D, Grunwald D, Gorski J; 1990, Estrogen receptor binding to a DNA response element in vitro is not dependent upon estradiol. Biochemistry 29:8377.
- Nique F, Van de Velde P, Brénaud J, Hardy M, Philibert D, Teutsch G; 1994, 11- β amino alkoxy phenyl restradiol, a new series of pure antiestrogens. J Steroid Biochem Mol Biol 1:21.
- Notides AC, Lerner N, Hamilton DE; 1981, Positive cooperativity of the estrogen receptor. Proc Natl Acad Sci USA 78:4926-4930.
- Nowock J, Borgmeyer U, Paschel A, Rupp AW, Sippel AE; 1985, THE TGGCA protein binds to the MMTV-LTR, the adenovirus origin of replication, and BK virus. Nucleic Acids Res 13:2045-2062.
- Ohara-Nemoto Y, Stromstedt P-E, Dahlman-Wright K, Nemoto T, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J; 1990. The steroid-binding properties of recombinant glucocorticoid receptor: a puntative role for heat shock protein hsp90. J Steroid Biochem 37:481-490.
- Okret S, Tu D, Tanaka H, Cairns B, Gustafsson JA; 1991, The mechanism for glucocorticoid-resistance in a rat hepatoma Cell variant that contains functional glucocorticoid receptor. J Steroid Biochem Mol Biol 40:353-361.
- Onate SA, Estees PA, Welch WJ, Nordeen SK, Edwards DP; 1991, Evidence that heat shock protein-70 associated with progesterone receptors is not involved receptor-DNA binding. Mol Endocrinol 5:193-2004.
- Orti E, Mendel DB, Smith LI, Munck A; 1989, Agonist- dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells. J Biol Chem 264: 9728-9731.
- Pasapera AM, Cerbón MA, Castro I, Gutierrez R, Camacho AI, García AG, Pérez Palacios G; 1995, Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. Biol Reprod 52:426-432.

- Pérez-Palacios G, Cerbón MA, Paspera AM, Castro I, Enriquez J, Vilchis f, García GA, Morali G, Lemus AE; 1992, Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. J Steroid Biochem Molec Biol. 41: 479.
- Pérez-Palacios G, Chavez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M, Pérez AE; 1981, Mechanisms of action of contraceptive synthetic progestins. J Steroid Biochem. 15:125-130.
- Pérez-Palacios G, Fernández-Aparicio MA, Medina M, Zacarías-Villareal J, Ulloa Aguirre A; 1981, On the mechanism of action of progestins. Acta Endocrinol (Copenh) 97:320-328.
- Pham TA, Elliston JF, Nawaz Z, Mc Donnell DP, Tsai MJ, O'Malley BW; 1991, Antiestrogen can establish nonproductive receptor complexes and alter chromatin structure at target genes. Proc Natl Acad Sci USA 88:3125-2129.
- Philibert D, Moguilewsky M, Mary I, Lecaque D, Toumehine C, Secchi J, Deraedt R; 1985, Pharmacological profile of RU486 in animals. In: Baulieu EE, Segal SJ (eds) The Antiprogestin Steroid RU486 and Human Fertility Control. Plenum Press, New York, pp 49-68.
- Picard D, Kumar V, Chambon P, Yamamoto KR; 1990, Signal transduction by steroid hormones: nuclear localization is differentially regulated in estrogen and glucocorticoid receptors. Cell Regul 1:291.
- Picard D, Yamamoto KR; 1987, Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. EMBO J 6:3333-3340.
- Pothier F, Ouellet M, Julien JP, Guerin SL; 1992, An improved cat assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. ADN Cell Biol. 11:83-90.
- Power RF, Mani SK, Codina J, Conneely OM, O'Malley BW; 1991, Dophaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. Scienc 254:1636-1639.

- Redeuilh G, Moncharmont B, Secco C, Baulieu EE; 1987, Subunit composition of the molybdate-stabilized "8-9 S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus. J Biol Chem 262:6969-6975.
- Reekm SR, Humpherey RR, Windson BL, Sakowski R, Creger PL, Edgren RA; 1979, Competitive progesterone antagonists: Receptor Binding and biologic activity of testosterone and 19-nor-testosterone derivatives. Fertil Steril 31:552-561.
- Reel S R, Humpherey RR, Shih Y, Windsor BL, Sakowski R, Creger PL, Edgren RA; 1979, Competitive progesterone antagonists: Receptor binding and biologic activity of testosterone and 19-nor-testosterone derivatives. Fertil Steril 31:552-561.
- Reese JC, Katzanellenbogen BS; 1991, Differential DNA-binding abilities of estrogen receptor occupied with two classes of antiestrogens: studies using human estrogen receptor overexpressed in mammalian cells. Nucleic Acids Res 19: 6595-6602.
- Revez C, Chappel CI, Gaudry R; 1960, Masculinization of female foetuses in the rat by progestational compounds. Endocrinology. 66:140-144.
- Rexin M, Busch W, Gehring U; 1988, Chemical cross-linking of heteromeric glucocorticoid receptors. Biochemistry. 27:5593-5601.
- Rodriguez R, Weigel NL, O'Malley BW, Scradler WT; 1990, Dimerization of chicken progesterone receptor *in vitro* can occur in the absence of hormone and DNA. Mol Endocrinol 4:1782-1790.
- Sabbah M, Gouilleux F, Sola B, Redeuilh G, Baulieu E-E; 1991, Structural differences between the hormone and antihormone estrogen receptor complexes bound to the hormone response element. Proc Natl Acad Sci USA 88:390-394.
- Sambrook EF, Fritsch T, Maniatis; 1989, Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. N.Y.

- Samuel SC, Yen RB; 1993, Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico. 3ra. Ed. Editorial médica panamericana.
- Savouret JF, Milgrom E; 1983, Uterogloblin: a model for the study of progesterone action in mammals. DNA 2:99-104.
- Savouret JF, Redeihul G, Sokhavut Sar, Chauchereau A, Woodruff K, Parker GM, Milgrom E; 1994, Interplay between estrogens, progestins and A-P on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. J Biol Chem 269:28955.
- Schauer M, Chalepakis G, Willmann, Beato M; 1989, Binding of hormone accelerates the kinetics of glucocorticoid and progesterone receptor binding to DNA. Proc Natl Acad Sci USA 86:1123-127.
- Scheidereit C, Westphal HM, Carlson C, Bosshard H, Beato M; 1986, Molecular model of the interaction between the glucocorticoid receptor and the regulatory elements of inducible genes. DNA 5:383-391.
- Schule R, Muller M, Otsuka-Murakami H, Renkawitz R; 1988, Cooperativity of the glucocorticoid receptor and the CACCC-box binding factor. Nature 332:87-90.
- Schule R, Muller M, Otsuka-Murakami H, Renkawitz R; 1988, Many transcription factors interact synergistically with steroid receptors. Science 242:1418-1420.
- Schule R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM; 1990, Functional antagonism between oncoprotein c-jun and the glucocorticoid receptor. Cell 62:1217- 1226.
- Schulman IG, Chakravarti D, Juguilon H, Romo A, Evans RM; 1995, Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation. Proc Natl Acad Sci USA 92:8288-8292.
- Schwabe JWR, Rhodes D; 1991, Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. Trends Biochem Sci 16:291-296.

- Sheirdan PL, Krett NL, Gordon JA, Horwitz KB; 1988, Human progesterone receptor transformation and nuclear down-regulation are independent of phosphorylation. Mol Endocrinol 2:1329-1342.
- Shen XZ, Tsai MS, Bullock DW, Woo SL; 1983, Hormonal regulation of rabbit uteroglobin gene transcription. Endocrinol 112:871-876.
- Sheridan PL, Evans RM, Horwitz KB; 1989, Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptors. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. J Biol Chem 264.6520-6528.
- Shoupe D, Mishell DR; 1989, Norplant: subdermal implant system for long-term contraception Am J Obstet Gynecol 160:1286.
- Slater EP, Redeuilh G, Beato M; 1991, Hormonal regulation of vitellogenin genes: an estrogen-responsive element in the Xenopus A2 gene and a multihormonal regulatory region in the chicken II gene. Mol Endocrinol 5:386-396.
- Slatur EP, Redevihl G, Theis K, Suske G, Beato M; 1990, The uteroglobin promoter contains a non canonical estrogen responsive element. Mol Endocrinol 4:604-610.
- Smith DF, Faber LE, Toft DO; 1990, Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. J Biol Chem 265:3996-4003.
- Strahle U, Boshart M, Klock G, Stewart F, Schutz G; 1989, Glucocorticoid- and progesterone-specific effects are determined by differential expression of the respective hormone receptors. Nature 339:629-632.
- Strahle U, Schmid W, Shutz G; 1988, Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. EMBO J 7:3389-3395.
- Sullivan WP, Madden BJ, Cormick DJ, Toft DO; 1988, Hormone-dependent phosphorylation of the avian progesterone receptor. J Biol Chem 263: 14717-14723.

- Tai PKK, Albers MW, Chang H, Faber LE, Schreiber SL; 1992, Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. Science 256:1315-1318.
- Takimoto GS, Tasset DM, Eppert AC, Horwitz KB; 1992. Hormone-induced progesterone receptor phosphorylation consists of sequential DNA-independent and DNA-dependent stages: analysis with zinc finger mutants and the progesterone antagonist ZK98299. Proc Natl Acad Sci USA 89:3050-3054.
- Teutsch G, Costerousse G, Philibert D, Deraed R. Steroids derivatives, U. S. Patent Us 4, 447 424 (08/05/89) C.A. 101 1984 130575 m.
- Tone Y, Collingwood TN, Adams M, Chatterjee VK; 1994, Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor. J Biol Chem 269:31157-31161.
- Toohey MG, Lee JW, Huang M, Peterson DO; 1990. Functional elements of the steroid hormone-responsive promoter of mouse mammary tumor virus. J Virol 64: 4477-4488.
- Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P; 1988. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. Nature 333:185-188.
- Touray M, Ryan F, Jaggi R, Martin F; 1991. Characterization of functional inhibition of the glucocorticoid receptor by Fos/Jun. Oncogene 6:1227-1234.
- Trapman J, Klaassen P, Kuiper G, Van der Korput J, Faber PW, Van Rooij H, Geurts van Kessel A, Voorhorst M, Mulder E, Brinkmann AO; 1988. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. Biochem Biophys Res Commun. 153:241.
- Truss M, Beato M; 1993, Steroid Hormone Receptors: Interaction with Deoxyribonucleic Acid and Transcription Factors. Endocrine Reviews. 14:459-479.
- Truss M, Beato M; 1989, Steroid Hormone Receptors: Interaction with Deoxyribonucleic Acid and Transcription Factors. Endocrine Review. 14:459-479.

- Truss M, Chalepakis G, Slater EP, Mader S, Beato M; 1991, Functional interaction of hybrid response elements with wild type and mutant steroid hormone receptors. Mol Cell Biol 11:3247-3258.
- Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NI, Dahlman K, Gustafsson JA, Tsai MJ, O'Malley BW; 1988, Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. Cell 55:361-369.
- Tsai Sy, Tsai MJ, O'Malley BW; 1989, Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to a transcriptional synergism at target enhancer. Cell 57:442.
- Ulmann A, Teutsch G, Philibert D; 1990, RU486. Sci AM 262:42-48.
- Van Look PFA; 1988, Postovulatory methods of fertility regulation. In World Health Organization, Ed. Research in Human Reproduction. Biennial Report 1986-1987. pp 153-173.
- Vilchis F, Chavés B, Pérez AE, García GA, Angeles A, Pérez Palacios G; 1986, Evidence that a non-aromatizable metabolite of Norethisterone induce estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. J Steroid Biochem. 24:525-531.
- Wayne BC, Milgrom E, Mauvais-Jarvis P; 1983, Progesterone and Progestins. Raven Press. New York.
- Webster NJ, Green S, Jin JR, Chambon P; 1988, The hormone binding domain of the estrogen and glucocorticoids receptors contain an inducible transcription activation function. Cell 54:199-207.
- Weigel NL, Cartel TH, Schrader WT, O'Malley BW; 1992, Chicken progesterone receptor is phosphorylated by a DNA-dependent protein kinase during *in vitro* transcription. Mol Endocrinol 6:8-14.
- Welshons WV, Lieberman ME, Gorski J; 1984, Nuclear localization of unoccupied estrogen receptor. Nature. 307:747-749.

Willmann T, Beato M; 1986, Steroid-free glucocorticoid receptor binds specifically to mouse mammary tumor virus DNA. Nature 324:688-691.

Wrange O, Eriksson P, Perlmann T; 1989, The purified activated glucocorticoid receptor is a homodimer. J Biol Chem 264:5253-5259.

Yamamoto KR; 1985, Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. Annu Rev Genet 19:209-252.

Ylikomi T, Bocquel MT, Berry M, Gronemeyer H, Chambon P; 1992, Cooperation of prostosignals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. EMBO J 11:3681-3694.