



00396

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL METABOLISMO DEL GESTODENO A
NIVEL DE ORGANO BLANCO**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA CELULAR)**

PRESENTA

BIOL. EXP. CLAUDIA VERÓNICA ZAGA CLAVELLINA

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. ANA ELENA LEMUS BRAVO

MÉXICO, D.F.

2000



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.

JURADO ASIGNADO:

| | |
|----------------------|--|
| Presidente | Dr. Fernando Larrea Gallo. |
| Primer Vocal | Dra. Gabriela Morali de la Brena. |
| Segundo Vocal | Q.F.B. Ana Elena Lemus Bravo. |
| Tercer Vocal | M. en C. Cristina Lemini Guzmán. |
| Secretario | Dr. Josué Garza Flores. |
| Suplente | Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano |
| Suplente | Dr. Gregorio Pérez Palacios. |

Comité Tutorial.

Dra. Gabriela Morali de la Brena
M. en C. Pablo Gustavo Damián Matsumura.

Agradezco al Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, las facilidades prestadas para el desarrollado de este trabajo, realizado en laboratorio de Bioquímica Hormonal del Departamento de Biología de la Reproducción.

Los estudios de maestría fueron posibles gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca crédito No. 118259.

A mis padres, quienes con su esfuerzo, palabras de aliento y fe me han ayudado a lograr esta meta. Gracias por su confianza y por siempre procurar lo mejor para mí. Con todo mi amor y respeto.

A Ana Elena Lemus, por su guía y apoyo incondicional en cada una de las etapas de este proyecto, pero sobre todo, por aquello que no se paga con nada, por su cariño, por su respeto, por su ánimo, por su confianza en mí y porque siempre que dudé ella estuvo conmigo para acompañarme y ayudarme a retomar el camino.

A Dios, por ayudarme a entender lo afortunada que soy.

A mis hermanos, Francisco, Antonio y Gerardo por supuesto, con todo mi corazón.

A Adolfo e Isaac, por ser una fuente inconmensurable de luz, amor y energía.

A mis viejos y nuevos amigos: Susana Gerardo, Fermín Sebastián, Manuel Cárdenas, Angel Rangel, Sara Córdova, Rocío García, René Santillán, Héctor Flores, Jorge Luis Hidalgo y Marcela López, quienes con la suma de pequeños y grandes detalles me han demostrado su amistad y cariño.

A Fabián, por ser mi fuerza y convencerme de volver a creer. Por todo lo que tú y yo sabemos, gracias.

A Ruth, por que cada día me enseña algo nuevo, con absolutamente todo mi cariño.

AGRADECIMIENTOS.

Al M. en C. Pablo Damián Matsumura quien amablemente proporcionó el sistema de levaduras utilizado en este proyecto y siempre me asesoró en el manejo del mismo.

Al Dr. Gustavo García de la Mora y a la Dra. Ivonne Grillasca de la Facultad de Química de la UNAM, por la síntesis de los derivados del Gestodeno.

Al M.V.Z. Octavio Villanueva encargado del bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán quien en forma profesional proporcionó los animales utilizados en cada uno de los experimentos.

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DEL GSD..... | 3 |
| METABOLISMO PERIFÉRICO DEL GSD..... | 4 |
| CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS..... | 4 |
| <i>Efecto sobre el metabolismo de lípidos.....</i> | 4 |
| <i>Efecto sobre metabolismo de carbohidratos.....</i> | 5 |
| <i>Efecto sobre variables hemostáticas.....</i> | 5 |
| <i>Influencia del GSD sobre el metabolismo del EE.....</i> | 6 |
| CARACTERÍSTICAS FARMACODINÁMICAS..... | 6 |
| <i>Perfil progestacional.....</i> | 6 |
| <i>Perfil Androgénico.....</i> | 7 |
| <i>Perfil Estrogénico.....</i> | 8 |
| JUSTIFICACION..... | 10 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 11 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 11 |
| HIPÓTESIS..... | 11 |
| MATERIALES..... | 12 |
| COMPUESTOS HORMONALES..... | 12 |
| MATERIAL BIOLÓGICO..... | 13 |
| <i>Animales.....</i> | 13 |
| <i>Levaduras Saccharomyces cerevisiae.....</i> | 13 |
| MÉTODOS..... | 13 |
| PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL..... | 13 |
| SÍNTESIS DE LOS DIHIDRO Y TETRAHIDRO DERIVADOS DEL GSD..... | 13 |
| <i>Síntesis del derivado 5α dihidro-GSD.....</i> | 14 |
| <i>Síntesis de los derivados 3α,5α- y 3β,5α- tetrahidro GSD.....</i> | 14 |
| <i>Cromatografía de Elución Rápida.....</i> | 14 |
| <i>Criterios de pureza química.....</i> | 15 |
| <i>Cromatografía en capa fina del GSD y sus derivados.....</i> | 15 |
| DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE APARENTE DE DISOCIACIÓN (Kd) Y EL NÚMERO DE SITIOS DE UNIÓN (NSU) DEL RECEPTOR DE ESTROGENOS..... | 15 |
| <i>Obtención del citosol (fracción soluble de la célula) como fuente del receptor de estrógenos.....</i> | 15 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Cinética de saturación para los diferentes receptores intracelulares de hormonas esteroideas.</i> | 16 |
| <i>Condiciones de incubación</i> | 17 |
| <i>Análisis de Scatchard.</i> | 17 |
| AFINIDAD DEL GSD Y SUS DERIVADOS POR EL RECEPTOR INTRACELULAR DE ESTRÓGENOS..... | 17 |
| DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TIPO ESTROGÉNICA DEL GSD Y DE SUS DIHIDRO Y TETRAHIDRO DERIVADOS EN EL SISTEMA DE EXPRESION RE-ERE DE LEVADURAS <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 19 |
| <i>Análisis de actividad de β-galactosidasa.</i> | 20 |
| INDUCCIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA DEPENDIENTE DE ESTRÓGENOS EN LA HIPÓFISIS ANTERIOR DE LA RATA HEMBRA CASTRADA..... | 21 |
| <i>Tratamientos.</i> | 21 |
| <i>Gradientes lineales de sacarosa.</i> | 22 |
| <i>Condiciones de Incubación.</i> | 22 |
| <i>Fraccionamiento del gradiente.</i> | 23 |
| DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA..... | 23 |
| ANALISIS ESTADISTICO | 24 |
| RESULTADOS | 25 |
| SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS REDUCIDOS DEL GSD. | 25 |
| CARACTERÍSTICAS DE UNIÓN DEL RECEPTOR INTRACELULAR DE ESTRÓGENOS..... | 28 |
| AFINIDAD DEL GSD Y SUS DERIVADOS 5α -GSD, $3\beta,5\alpha$ - Y $3\alpha,5\alpha$ - GSD POR EL RECEPTOR INTRACELULAR DE ESTRÓGENOS. | 29 |
| DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE TIPO ESTROGÉNICA MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE LA TRANSACTIVACIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN RE-ERE DE LEVADURAS. | 31 |
| INDUCCIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA DEPENDIENTE DE ESTRÓGENOS EN LA HIPÓFISIS ANTERIOR DE LA RATA HEMBRA CASTRADA. | 37 |
| DISCUSIÓN | 39 |
| BIBLIOGRAFIA | 44 |

RESUMEN

El Gestodeno (GSD) es una progestina sintética utilizada en formulaciones anticonceptivas hormonales. Estudios clínicos han relacionado su uso con la inducción de efectos estrogénicos, situación controversial ya que éste es incapaz de interactuar con el receptor intracelular de estrógenos (RE).

Utilizando análisis de competencia, se demostró que los derivados reducidos del GSD, el $3\beta,5\alpha$ -GSD y el $3\alpha,5\alpha$ -GSD interactúan con el RE de manera específica, no así el GSD ni el 5α -GSD.

Para establecer si esta interacción se traduce en efectos a nivel genómico, se utilizó un sistema de transactivación en *Saccharomyces cerevisiae* transfectadas con un vector reportero, que contiene un elemento de respuesta a estrógenos que regula la expresión del gen de la β -galactosidasa. El $3\beta,5\alpha$ -GSD y el $3\alpha,5\alpha$ -GSD mostraron un efecto agonista de tipo estrogénico, siendo el primero el más efectivo. Ni el GSD ni el 5α -GSD transactivaron el sistema.

La actividad de β -galactosidasa inducida por los tetrahidro derivados fue inhibida significativamente al adicionar al sistema el antiestrógeno ICI-182,780, lo que confirma que sus efectos son mediados por el RE. Al estimular simultáneamente al sistema con estradiol y los tetrahidro derivados se observó un efecto de tipo aditivo.

Finalmente, utilizando un modelo *in vivo* se demostró que el derivado $3\beta,5\alpha$ -GSD restableció, en forma dosis-dependiente, el contenido de receptor de progesterona dependiente de estrógenos en la hipófisis anterior de rata hembra castrada.

Los resultados indican que la potencia estrogénica del GSD está mediada principalmente por su derivado $3\beta,5\alpha$ -GSD, lo que en parte explica los efectos de tipo estrogénico observados en las usuarias de GSD.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas cinco décadas, las progestinas sintéticas, han sido una de las principales herramientas empleadas en la regulación de la fertilidad de la mujer. En este tiempo, los mecanismos responsables de su efecto anticonceptivo, de la inducción de cambios metabólicos, así como de sus reacciones adversas, han sido extensamente estudiados (Fotherby y Caldwell, 1994).

El uso de diferentes progestinas sintéticas en formulaciones anticonceptivas ha sido relacionado con la generación de una gama de efectos hormonales adicionales al efecto progestacional, los estudios encaminados a esclarecer su modo de acción han demostrado que la biotransformación de estos compuestos, a nivel de los órganos blanco, modula la expresión de sus diferentes actividades biológicas, ya que sus productos de transformación metabólica interactúan con diferentes receptores intracelulares para hormonas esteroides. El efecto biológico de estas interacciones puede resultar en la expresión de actividades agonistas, antagonistas y/o sinérgicas (Kuhl, 1987; Pérez-Palacios y cols., 1992).

En la década de los 70's, con el objetivo de disponer de anticonceptivos hormonales orales (AO) con una mayor selectividad en su actividad progestacional, con los que se tuviera mayor control en el ciclo ovárico y potente actividad antigonadotrófica, se desarrolló una serie de compuestos entre los que destaca el **Gestodeno (GSD: 13 β -etil - 17 α -etnil-17 β hidroxi-4,15-gonadien-3-ona)**, progestina derivada de la 19-nor testosterona, que junto con el Desogestrel (DSG), el Acetato de Nomegestrol y el Norgestimato constituyen la tercera generación de progestinas sintéticas (Wilde y Balfour, 1995), en esta nueva generación, se trató de reducir al mínimo las dosis administradas y los cambios metabólicos adversos, evitando así los efectos androgénicos y estrogénicos no deseados (Kuhl, 1996).

La potencia progestacional del GSD se ha evaluado en función de diversos parámetros, entre los que se encuentra su capacidad para inhibir la ovulación, lo que

permite controlar el ciclo ovárico (Halbe y cols., 1998; Sullivan y cols., 1999). Este control se ejerce mediante la inhibición de la síntesis y liberación de las gonadotropinas hipofisarias: hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Hemrika y cols., 1993); los estudios iniciales experimentales demostraron que la administración de 40 µg de GSD es suficiente para inhibir el pico de LH en un 65% y en un 55% el de FSH, e inhibir la ovulación (Spona y Huber, 1987).

CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS DEL GSD.

La alta potencia progestacional del GSD, permite administrarlo en dosis muy bajas en comparación con las progestinas sintéticas de generaciones anteriores. La formulación de GSD en dosis de 75 µg combinado con 20 o 30 µg Etinil Estradiol (EE) en una preparación monofásica es la que más ampliamente se utiliza (Wilde y Balfour, 1995).

Los estudios del perfil farmacocinético del GSD demostraron que luego de la administración a mujeres, de una dosis única de 75 µg de GSD vía intravenosa, se exhibió la máxima concentración plasmática (6 ug/l) a los 10 minutos de su aplicación, mientras que las concentraciones en muestras de plasma obtenidas después de 1.5 y 10 hs fueron de 3.5 y 1 ug/l respectivamente (Düstenberg y cols., 1987; Kuhl, 1996).

La biodisponibilidad (cercana al 100%) y ventajas farmacocinéticas del GSD, son superiores a las presentadas por otras progestinas; los factores que pueden contribuir a los altos niveles circulantes de GSD (cuando se administra en combinación con EE) son los elevados niveles de la globulina que une a hormonas sexuales (SHBG), los cuales se encuentran incrementados por efecto del componente estrogénico (EE), circunstancia que se complementa con el hecho de que el GSD presenta muy alta afinidad por esta proteína transportadora. (Stanczyk, 1997; Wilde y Balfour, 1995). Existen reportes que indican que el GSD circulante se encuentra unido a SHBG de un 64% a un 76%, lo que contrasta con el 32, 35 y 47% de unión del total circulante de 3-cetodesogestrel, Noretisterona (NET) y Levonogestrel (LNG) respectivamente. (Kuhl, 1996; Stanczyk, 1997)

METABOLISMO PERIFÉRICO DEL GSD.

Los primeros estudios realizados en el humano con el objetivo de determinar el metabolismo hepático del GSD, permitieron detectar en orina de mujeres mediante la técnica de HPLC, y después de la administración de 500 µg de GSD-¹⁴C, productos de biotransformación, en los cuales se determinó que las hidroxilaciones fueron las principales modificaciones que tuvo la molécula de GSD (Düstenberg y cols., 1987).

Estudios del metabolismo *in vitro* del GSD, en citosol y microsomas de hígado humano, demostraron que los metabolitos dihidro-derivados 5α y en mayor proporción el 5β son los principales productos de bioconversión, y que los derivados tetrahidro se encuentran en menor proporción, que las hidroxilaciones se llevan a cabo en la fracción microsomal y que son catalizadas por la isoenzima CYP3A4 del citocromo P450 (Ward y Back, 1993).

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

Efecto sobre el metabolismo de lípidos.

Los efectos de tipo estrogénico sobre el metabolismo de lípidos se caracterizan por inducir incremento en la concentración sérica de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), así como un decremento en los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C). (Carr y Ory, 1997; Koh, y cols.,1999).

Existen reportes en los que se ha estudiado el efecto sobre el perfil de lípidos de formulaciones tanto monofásicas como trifásicas que contienen GSD, éstos indican que durante un periodo de 24 ciclos no existen cambios clínicamente significativos, pero se observa incremento en las fracciones HDL3 y HDL2, lo que a su vez provoca aumento en los niveles totales de HDL-C; por lo que las alteraciones inducidas en el perfil de lípidos, no necesariamente se traducen en efectos adversos. (Crosingnani y cols., 1987; Chez, 1989; Wilde y Balfour, 1995; Levesque y cols., 1997; Wiegratz y cols., 1998).

Un estudio hecho en mujeres mexicanas demostró que la administración de una formulación monofásica de GSD/EE durante doce meses, no indujo cambios significativos en la concentración de colesterol total ni en la fracción LDL; pero sí se observó incremento en HDL, lo cual se atribuyó a la falta de un efecto androgénico y/o a un efecto intrínseco de tipo estrogénico del GSD; además, se observó que durante el periodo de estudio se presentó una tendencia a incrementar los niveles de triglicéridos, los cuales nunca sobrepasaron los estándares de normalidad (Garza-Flores y cols., 1994).

Efecto sobre metabolismo de carbohidratos.

En relación a los efectos reales sobre el metabolismo de carbohidratos, hay datos que indican que éstos se deben inicialmente a un efecto progestacional, por lo que las progestinas de tercera generación no representan un riesgo real sobre el metabolismo de carbohidratos ya que las dosis administradas son muy bajas comparadas con los AO que contienen progestinas de generaciones anteriores (principalmente LNG) (Wilde y Balfour, 1995; Petersen y cols., 1996); sin embargo, existen alteraciones en los niveles de tolerancia a la glucosa que han sido atribuidas a efectos de tipo estrogénico. Estudios de corte clínico han demostrado que el uso de formulaciones con GSD/EE han causado alteraciones desfavorables en el control glicémico al incrementar la resistencia a la acción de la insulina (Kuhl, 1996; Wiegratz y cols., 1998).

Efecto sobre variables hemostáticas.

Cambios de tipo protrombótico que se traducen en un incremento en el riesgo de complicaciones tromboembólicas, son atribuidos a efectos típicamente estrogénicos los cuales consisten principalmente en un aumento en los niveles de factores activos procoagulantes como fibrinógeno y los factores II, VII, VIII, IX y X, aunado en la mayoría de las ocasiones a una disminución en los niveles de antitrombina III (Wilde y Balfour, 1995; Fotherby y Caldwell, 1994).

Estudios sobre los efectos de los anticonceptivos que contienen GSD indican, que únicamente existe un pequeño incremento en factores de coagulación, principalmente en el VII (en un 20%), X y XII, acompañado de una disminución en los niveles de proteína C activada y antitrombina III; y concluyen que el aumento en los parámetros procoagulatorios puede estar balanceado por cambios compensatorios en el sistema fibrinolítico (Shoupe, 1994; Winkler, 1998).

Influencia del GSD sobre el metabolismo del EE.

En un estudio controversial Jung-Hoffmann y Kuhl (1989), concluyen que el GSD impide, por lo menos parcialmente, el metabolismo del EE en la mujer. Se postula que un posible mecanismo que explicaría esta observación es que el GSD puede tener un efecto inhibitorio sobre el sistema enzimático que metaboliza al EE en 2-hidroxi-EE (el cual involucra al citocromo P-450), lo que explicaría los altos niveles circulantes de EE (Stanczyk, 1997).

A partir de estos estudios, han surgido otras investigaciones (Guengerich, 1990), que han corroborado este efecto del GSD, pero además también han demostrado que otras progestinas como el 3-cetodesogestrel, el LNG y la NET tienen este efecto sobre el citocromo hepático P-450 IIIA4, aunque es el GSD el más efectivo.

CARACTERÍSTICAS FARMACODINÁMICAS.

Perfil progestacional.

El GSD, tiene una actividad progestacional de aproximadamente el doble de la que presenta el LNG (Spona y cols., 1987; Fuhrmann y cols., 1995; Kuhl, 1996) lo cual se correlaciona con su afinidad relativa de unión al receptor de progesterona (RP) (Pollow y cols., 1989); otro parámetro de potencia progestacional es la inhibición del crecimiento folicular, lo que contribuye a la excelente eficacia anticonceptiva de esta progestina. (Lete y Morales, 1997; Thorneycroft, 1998).

El efecto sobre el endometrio, es otro de los parámetros usados, ya que se sabe que por un lado los estrógenos son responsables de la proliferación, mientras que los progestágenos se encargan de transformar a este órgano en un endometrio secretor (Wilson y cols., 1998); como ya se mencionó anteriormente el GSD es una progestina extremadamente potente ya que necesita de 2 a 3 mg /ciclo para transformar el endometrio, lo que contrasta con los 5 a 6 mg/ciclo de LNG (Wilde y Balfour, 1995). Así, con la administración a mujeres de una formulación trifásica que contiene 75ug GSD / 20ug EE, se observó la generación de endometrio denominado quiescente (sin proliferación), en donde no hubo crecimiento pero sí una clara transformación a un endometrio secretor (Coenen y cols, 1996; Rabe y cols., 1997).

Perfil Androgénico

Un aspecto importante del perfil endocrinológico de las progestinas sintéticas derivadas de la 19-nortestosterona es su actividad androgénica. Uno de los primeros estudios hechos con el GSD fue el de su efecto sobre las glándulas sexuales accesorias de ratas machos castrados, en los cuales se midió el incremento en el peso de la vesícula seminal. Los resultados de este estudio mostraron que el GSD presentó una potencia similar a la del LNG, y mínima potencia androgénica comparada con el propionato de testosterona. Al estudiar la actividad biológica del GSD sobre el proceso de diferenciación sexual en ratas hembras, no se observaron efectos de tipo androgénico (Elger y cols., 1987).

La alta afinidad relativa de unión del GSD por el receptor intracelular de andrógenos (RA) es similar a la que presenta el DSG y el LNG.(Fuhrmann y cols., 1995; Wilde y Balfour, 1995). Los reportes de investigación clínica indican que las manifestaciones metabólicas (metabolismo de lípidos y carbohidratos) y sintomáticas (acné, hirsutismo, e incremento en peso corporal) de mujeres en tratamiento con formulaciones que contienen GSD, indican una actividad androgénica muy discreta, lo que permite suponer que la alta afinidad por el RA no se traduce en un incremento en la inducción de efectos fisiológicos típicamente androgénicos (Jones, 1995; Darney, 1995).

En estudios hechos en un sistema *in vitro*, se observó que el complejo GSD-RA no fue capaz de inducir efectos a nivel genómico ni de transactivar el gen reportero marcador de actividad androgénica (Fuhrman y cols., 1995).

Perfil Estrogénico

El tema más controversial del perfil hormonal del GSD es sin duda alguna, la parte correspondiente a la actividad de tipo estrogénica. Por una parte existen reportes en los que se demuestra claramente que el GSD no presenta afinidad por el receptor intracelular de estrógenos (RE) (menos de 0.1%) (Willey Balfour, 1995; Kuhl 1996; Fuhrman y cols., 1995); sin embargo, otros estudios han demostrado que algunas líneas celulares neoplásicas cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos, proliferan cuando son tratadas con GSD, se demostró también que esta proliferación está mediada vía unión al RE y que puede ser inhibida por compuestos con actividad antiestrogénica.(Chatherino y cols., 1993; Kalkhoven y cols, 1994; Schoonen y cols., 1995).

La inconsistencia entre el perfil de afinidad del GSD con el RE y las atribuciones de actividad estrogénica también se han presentado en estudios de tipo clínico. A principios de la década de los 90, comenzaron a surgir datos en relación a los efectos indeseables en las usuarias de las progestinas de tercera. generación, básicamente aquellas cuya formulación contiene GSD o Desogestrel (DSG), estos estudios multicéntricos de tipo epidemiológico y clínico revelaron que el uso de estas progestinas incrementa de 2 a 3 veces el riesgo de padecimientos de tipo tromboembólico (si se compara con progestinas de generaciones anteriores), los cuales son considerados efectos de tipo estrogénico (WHO 1995a; WHO 1995b; Jick y cols., 1995; Levesque y Courtois, 1997; Levesque y cols.; 1997Weiss, 1999).

Estos estudios iniciales han sido motivo de posteriores análisis, y se ha afirmado que el incremento en el riesgo no es significativo y es comparable con el riesgo inherente al uso de anticonceptivos de cualquier generación (Suissa y cols., 1997; Schiwing y Shelton.,1997).

Existen antecedentes que han demostrado que otras progestinas sintéticas como la Noretisterona (NET), la cual es estructuralmente muy similar al GSD y al igual que éste no interacciona con el RE, exhibe una amplia gama de efectos hormonales (Bullock y Bardin, 1977, Chavez y cols., 1985; Vilchis y cols., 1987) entre los que se encuentran los de tipo estrogénico, androgénico e incluso antihormonal (Reekm, y cols., 1979; Larrea y cols., 1983; Garza-Flores y cols., 1986; Cerbón y cols., 1991; Garza-Flores y cols., 1991). Estudios encaminados a esclarecer esta variedad de efectos demostraron que esta progestina se metaboliza *in vivo* a nivel de órganos blanco, siendo biotransformada a compuestos reducidos en el anillo A como son el 5 α -dihidro NET (5 α -NET) y los tetrahydro derivados 3 α , 5 α - y 3 β , 5 α -tetrahydro NET (Larrea y cols., 1987).

La 5 α reducción de la molécula de NET disminuye la afinidad del metabolito resultante (5 α -DHNET) por el receptor intracelular de progesterona (RP) (Pérez-Palacios y cols., 1992), y aún más, este compuesto expresa efectos antiprogestacionales (Cerbón y cols., 1990). Por otro lado, la misma 5 α reducción incrementa la afinidad por el receptor de andrógenos (RA), lo cual en forma paradójica se traduce en una significativa disminución de los efectos de tipo androgénico (Lemus y cols., 1997).

Por otro lado, los metabolitos tetrahydro-reducidos (3 α ,5 α - y 3 β ,5 α -NET) interaccionan con alta afinidad con el RE, e inducen respuestas típicamente estrogénicas como la inducción de la síntesis de receptores intracelulares de progesterona y el incremento del peso uterino en ratas castradas, así como la restauración de conducta sexual en ratas macho castradas (Chávez y cols., 1985; Vilchis y cols., 1986; Morali y cols., 1990).

El hecho de la existencia de una gran similitud entre la estructura química de NET y de GSD particularmente en el anillo A, planteó la posibilidad de que el mecanismo por el cual este último estuviera ejerciendo efectos de tipo estrogénico sería el mismo que se ha descrito para NET, es decir a través de sus derivados tetrahydro reducidos.

JUSTIFICACION

Actualmente, millones de mujeres en el mundo usan formulaciones hormonales anticonceptivas que contienen Gestodeno, por lo que es de gran importancia esclarecer a nivel bioquímico y molecular el mecanismo de acción por el cual esta progestina sintética que no interacciona con el receptor intracelular de estrógenos, puede expresar efectos biológicos de tipo estrogénico.

OBJETIVO GENERAL

ESCLARECER EL MECANISMO DE ACCIÓN A NIVEL MOLECULAR DEL GESTODENO, PROGESTINA SINTÉTICA DE TERCERA GENERACIÓN, A TRAVÉS DEL CUAL EXPRESA EFECTOS BIOLÓGICOS DE TIPO ESTROGÉNICO.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la afinidad relativa de unión del GSD y de sus derivados 5 α -dihidro GSD y 3 β ,5 α - y 3 α ,5 α -tetrahidro GSD con el receptor intracelular de estrógenos (RE).

Estudiar en condiciones *in vitro* la actividad de tipo estrogénica del GSD y sus derivados utilizando un sistema de expresión en levaduras.

Determinar en experimentos *in vivo* la actividad de tipo estrogénica del Gestodeno y de sus derivados mediante la inducción del receptor de progesterona dependiente de estrógenos en la hipófisis anterior de la rata hembra castrada.

HIPÓTESIS

LOS EFECTOS DE TIPO ESTROGÉNICO QUE HAN SIDO ATRIBUIDOS AL GESTODENO, PROGESTINA SINTÉTICA INCAPAZ DE INTERACTUAR CON EL RECEPTOR INTRACELULAR DE ESTRÓGENOS, SON MEDIADOS POR ALGUNOS DE SUS DERIVADOS REDUCIDOS EN EL ANILLO A AL UNIRSE A LOS SITIOS ACTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS Y ACTIVAR GENES ESTROGENO-DEPENDIENTES.

MATERIALES

COMPUESTOS HORMONALES

El Gestodeno (GSD= 13β -etil- 17α -etinil- 17β -hidroxi-4,15-gonadien-3-ona) empleado en el estudio, fue donado generosamente por Schering, AG (Berlin).

El estradiol radiactivo utilizado como radioligando, así como el correspondiente esteroide radioinerte, se adquirieron en Amersham International plc (Bucks. Inglaterra)

- ◆ [2,4,6,7- ^3H]Estradiol (E_2)= 1,3,5(10)-estrantrieno-3,17 β -diol
a.e.= 97 Ci/mmola
-

- ◆ ORG-2058= 16 α -etil-21-hidroxi-19-nor-4-pregneno-3,20-diona
- ◆ 5 α -Dihidrotestosterona (DHT)= 17 β -hidroxi-5 α -androstano-3-ona.
- ◆ 5 α -Dihidrogestodeno (5 α -GSD)= 13 β -etil -17 α -etinil -17 β -hidroxi-3-ona.
- ◆ 3 α ,5 α -Tetrahidrogestodeno (3 α ,5 α -GSD) = 13 β -etil -17 α -etinil -5 α ,15-gonadieno-3 α ,17 β -diol
- ◆ 3 β ,5 α -Tetrahidrogestodeno (3 β ,5 α -GSD)= 13 β -etil -17 α -etinil -5 α ,15-gonadieno-3 β ,17 β -diol
- ◆ ICI 182,780= 7 α -[9-(4,4,5,5,5-pentafluoro pentil sulfinol) nonil]- 1,3,5 (10)-estrantrien-3,17 β -diol.
- ◆ Benzoato de Estradiol (BE_2)=1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol-3 il-benzoato.

El ICI 182,780 (Zeneca Farma) fue proporcionado gentilmente por el Dr. Alfredo Ulloa y Aguirre.

Los compuestos químicos, reactivos y disolventes utilizados en todos los estudios fueron de grado analítico.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Animales

Se utilizaron ratas hembras adultas (240-290 g de peso) y prepúberes (30 días de edad, y 90-100 g de peso) de la cepa Wistar:INNSZ. Los animales se mantuvieron con comida y agua *ad libitum* y con períodos de luz/obscuridad de 14 /10 h.

Levaduras *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizaron levaduras de la cepa RS188N cotransfectadas con un plásmido de expresión (pC2) que contiene el gen que codifica para el receptor de estrógenos humano (REh) y cuya expresión es dependiente de cobre (Butt y cols.,1988), así como con un plásmido reportero el cual contiene el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) unido al gen que codifica para la β -galactosidasa como indicador de actividad (Lyttle y cols., 1992)

MÉTODOS.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

SINTESIS DE LOS DIHIDRO Y TETRAHIDRO DERIVADOS DEL GSD

Debido a que los derivados dihidro y tetrahidro reducidos del GSD no se encuentran disponibles en forma comercial, fue necesario sintetizarlos. El método de obtención utilizado fue el reportado por Bowers y cols. (1958) con algunas modificaciones.

Síntesis del derivado 5 α dihidro-GSD

El primer paso de la reacción consistió en la reducción del GSD a su derivado 5 α -GSD, se utilizaron Litio (Li) y Amoníaco (NH₃) como agentes reductores en condiciones anhidras. El producto de la reacción, el 5 α -GSD, se cristalizó con acetato de etilo:hexano (3:7) para su posterior purificación en un sistema de cromatografía en columna.

Síntesis de los derivados 3 α ,5 α - y 3 β ,5 α - tetrahidro GSD

El derivado 5 α -GSD, se utilizó como precursor en reacciones de reducción separadas para la síntesis de los dos tetrahidro derivados.

El 3 α ,5 α -GSD se sintetizó usando L-selectride (tri-sec-butil-borohidruro de sodio) como agente reductor, la reacción se llevó a cabo en condiciones anhidras a -78 °C .

El 3 β ,5 α -GSD se obtuvo por reducción del 5 α -GSD utilizando borohidruro de sodio (NaBH₄) en metanol anhidro.

Cromatografía de Elución Rápida

Para la separación y purificación de los productos de las diferentes reacciones se utilizó una columna empacada con Silica Gel (70-230 mallas ASTM), en donde cada uno de los productos eluye según su polaridad. Se utilizó una mezcla de acetato de etilo:hexano (3:7), se colectaron fracciones de 12 ml cada una monitoreando los productos mediante cromatografía en capa fina utilizando la misma mezcla de disolventes (Still y cols., 1978).

Criterios de pureza química .

La caracterización y determinación de la pureza de cada compuesto sintetizado, se llevó a cabo mediante las determinaciones de punto de fusión y sus espectros de absorción en infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

Cromatografía en capa fina del GSD y sus derivados.

Antes de ser utilizados en los diferentes experimentos, los compuestos se sometieron a una cromatografía en capa fina para verificar su pureza, primero en un sistema de cloroformo:acetona (9:1) y posteriormente un sistema de benceno-acetato de etilo (2:1), los esteroides se detectaron en las placas con luz UV a 240 nm.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE APARENTE DE DISOCIACIÓN (Kd) Y EL NÚMERO DE SITIOS DE UNIÓN (NSU) DEL RECEPTOR DE ESTROGENOS.

Con el objetivo de caracterizar las propiedades fisicoquímicas del receptor de estrógenos y asegurar que éste cumple con las propiedades ya establecidas se hizo una cinética de unión y se determinó su constante aparente de disociación (Kd) y el número de sitios de unión (NSU).

Obtención del citosol (fracción soluble de la célula) como fuente del receptor de estrógenos.

El útero de ratas hembra prepúberes se utilizó como fuente de este receptor. Los animales se decapitaron y los úteros se removieron y lavaron en una solución amortiguadora TEDLM (Tris-HCl 20mM pH7.4, EDTA 15 mM, ditiotreitól 0.25 mM, leupeptina 10µg/ml, molibdato de sodio 10mM), se secaron con papel filtro y se pesaron inmediatamente.

Los úteros se homogeneizaron en TEDLM en una proporción 1:6 peso (p): volumen (v) con un politrón Brikmann PT 10\35 (Brikmann, Instruments Co. Houston, TX EUA), manteniéndolos a 4°C. Una vez obtenido el homogeneizado, se centrifugó a 30,000 rpm x 1 h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman XL-90 en un rotor SW50.1 (Beckmann, Instruments Inc Palo Alto, CA. EUA). El sobrenadante (citosol ó fracción soluble) se utilizó inmediatamente para los experimentos de unión.

La determinación de la concentración de proteínas se hizo por el método de Bradford (1976).

Cinética de saturación para los diferentes receptores intracelulares de hormonas esteroideas.

La determinación de la Kd y del NSU al equilibrio se hizo mediante la incubación de la preparación citosólica (con concentración promedio de proteína de 2.0 mg/ml) con concentraciones crecientes de E₂-³H.

La curva de Unión Total se hizo utilizando concentraciones de 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 10 y 15 nM, cada una de estas concentraciones estuvieron compuestas por 1.0 nM del radioligando específico (³H) y la concentración final se ajustó con el correspondiente ligando radioinerte.

En forma paralela, la Curva de Unión Inespecífica se hizo agregando un exceso de 100X del ligando no radiactivo (100,150,200,500,700,1000 y 1500 nM)

Condiciones de incubación

La incubación del citosol con el radioligando se realizó durante un período de 18 h, a 4°C, una vez terminada ésta, la separación de los esteroides libres de los unidos a los receptores se realizó agregando una suspensión de carbón activado /dextrán (t-70) en una relación 10:1 en buffer TEDLM, agitando por un período de 5 minutos y centrifugando a 3,000 rpm por 10 minutos en una centrífuga Beckman modelo J-6B, rotor JS-4.2. En el sobrenadante se localizan los complejos esteroide-receptor y en el precipitado todos los esteroides no unidos. De ese sobrenadante se tomaron por triplicado alícuotas (100 µl) para determinar la cantidad de radiactividad (^3H) en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb (Packard Downers Grove, IL. EUA), utilizando una solución de centelleo específica para muestras acuosas.

Tomando en cuenta la actividad específica del $\text{E}_2\text{-}^3\text{H}$, se calcularon las pmolas de ligado unidas al receptor, en el volumen total de incubación. La unión específica se determinó sustrayendo la unión no específica de la unión total.

Análisis de Scatchard.

Los resultados se graficaron a la manera de Scatchard (1949), la cual consiste en la linearización de los datos obtenidos en la curva de saturación, y en la obtención, para cada uno de los puntos de la relación entre la concentración de esteroide unido y el que se mantuvo libre, pudiendo calcular así la K_d y el NSU.

AFINIDAD DEL GSD Y SUS DERIVADOS POR EL RECEPTOR INTRACELULAR DE ESTRÓGENOS.

La caracterización de la afinidad del GSD y sus dihidro y tetrahidro derivados por este receptor se determinó mediante estudios de competencia.

Las alícuotas de la fracción soluble de los úteros (con concentración promedio de proteína de 2.0 mg/ml), se incubaron durante 18 h a 4°C con una concentración constante (1nM) del radioligando tritiado, y con concentraciones crecientes (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 500 nM) de los diferentes competidores radioinertes (GSD, 5α-GSD , 3β,5α-GSD y 3α,5α-GSD).

El esteroide libre se separó del complejo esteroide-receptor al adicionar 0.8 ml de la suspensión de carbón-dextrán. Los tubos se agitaron durante 5 minutos y se centrifugaron a 3,000 rpm por 10 min a 4°C y se tomaron alícuotas del sobrenadante para determinar el contenido de radiactividad por medio de un espectrómetro de centelleo líquido.

El 100% de unión se consideró al valor obtenido con 1nM del radio ligando.

Con el análisis de competencia se obtuvieron datos como la Concentración Inhibitoria al 50 % (IC50) que es la concentración molar del inhibidor que disminuye el 50% la unión del radioligando con su receptor específico.

Las Afinidades Relativas de Unión (ARU) se calcularon para los diferentes receptores intracelularesde acuerdo a la siguiente fórmula (Reel y cols., 1979)

$$ARU = \frac{[L]_{50\%}}{[C]_{50\%}} \times 100$$

En donde:

ARU= Afinidad Relativa de Unión.

[L]_{50%} = Concentración molar de ligando específico que disminuye al 50% la unión del radioligando al receptor.

[C]_{50%} = Concentración molar de competidor que disminuye al 50% la unión del radioligando al receptor.

y las constantes de inhibición (K_i) se determinaron mediante la ecuación del método descrito por Cheng y Prussoff (1973).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + (C / K_d)}$$

En donde:

K_i = Constante de Inhibición (nmolas/l)

IC_{50} = Es la concentración molar del inhibidor que disminuye al 50% de la unión del radioligando con el receptor.

C= Concentración molar del radioligando.

K_d = Constante de disociación del ligando.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE TIPO ESTROGÉNICA DEL GSD Y DE SUS DIHIDRO Y TETRAHIDRO DERIVADOS EN EL SISTEMA DE EXPRESION RE-ERE DE LEVADURAS *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras de la cepa RS188N, fueron transfectadas y hechas impermeables según el método descrito por Sherman y cols. (1982). Se encuentran cotransfectadas con un plásmido de expresión pC2 que contiene el gen que codifica para el receptor de estrógenos humano (REh) (Greene y cols.,1986) y cuya expresión es dependiente de cobre (Butt, y cols., 1988), así como con un plásmido reportero el cual contiene el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) unido al gen que codifica para la β -galactosidasa, de tal manera que al adicionar algún compuesto con actividad estrogénica, éste se unirá al RE y activará la síntesis de la β -galactosidasa como indicador de actividad.(Lyttle y cols., 1992)

Análisis de actividad de β -galactosidasa.

Las levaduras se crecieron en un medio que contiene todos los aminoácidos esenciales además de glucosa, durante toda la noche a 32°C con agitación constante, de modo que a una longitud de onda de 600 nm la densidad óptica (D.O.) fuera de 0.5 lo cual equivale a una concentración celular de $2-7 \times 10^7$ células/ml. El volumen total de cada prueba individual fue de 5 ml, este volumen fue tratado por un periodo de una hora con sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) hasta una concentración final 100 μM

Posteriormente los tratamientos con los diferentes esteroides se hicieron por un periodo de 4.5 h a 32°C con agitación constante; transcurrido este tiempo, las levaduras se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 minutos y se resuspendieron en buffer Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 30 mM, KCl 10mM y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM). Después de ser resuspendidas, se adicionaron perlas de vidrio (472-600 micras) para poder romper mecánicamente la pared celular y 20 μl de fluoruro de metil fenil sulfonilo (FMFS) a una concentración de 40 mM como inhibidor de proteasas; posteriormente mediante agitación y centrifugación a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, en una microcentrífuga Sorvall RMC-14 (Dupont), se obtuvo la fracción citosólica.

Alicuotas de 100 μl de citosol (concentración promedio de 0.5mg/ml de prot.) se incubaron con 900 μl de buffer Z y con 0.8 mg/ml de β -d-galactósido de o-nitrofenol (GONF) como substrato de la enzima β -galactosidasa, durante un periodo de 10 minutos a una temperatura de 32°C, transcurrido este tiempo la reacción se detuvo con 0.5 ml de carbonato de sodio 1M y la mezcla se leyó a una longitud de onda de 420 nm.

$$\text{Actividad } \beta \text{ gal} = \frac{\text{D.O.420} \times 1.7}{0.0045 \times [\text{proteína}] \times V \times T}$$

En donde:

Actividad β -gal=Es la actividad de β -galactosidasa expresada en nmola/ min/ mg
proteína

D.O.420 = Es la densidad óptica del producto a 420nm.

1.7 = Es un factor constante.

0.0045= Es la densidad óptica de 1 nmola/ml deL GONF

[proteína] = Es la concentración de proteínas en mg/ml

V= Es el volumen extraído para la prueba (ml)

T= Es el tiempo en minutos que duró la reacción.

INDUCCIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA DEPENDIENTE DE ESTRÓGENOS EN LA HIPÓFISIS ANTERIOR DE LA RATA HEMBRA CASTRADA.

Se ha demostrado que la inducción y expresión del Receptor de Progesterona en hipófisis anterior de rata es inducida por estrógenos (Kato y cols, 1978; Evans y col., 1978) por lo tanto, se determinó la actividad estrogénica *in vivo* del derivado 3 β -GSD en función de este marcador biológico

Tratamientos.

Para este experimento se utilizaron grupos de 25 ratas hembra con un período de 21 días de castración.

Grupo I: Se trataron a los animales por vía s.c. con 0.5, 1. y 1.5 mg de 3 β -GSD /día por 6 días consecutivos.

Grupo II: Los animales fueron tratados por vía subcutánea con 10 μ g de BE₂ por el mismo periodo de tiempo que el grupo I.

Grupo III: Vehículo como control un grupo de animales fue tratado con 100 μ l de propilenglicol (ppg).

Una vez finalizados los tratamientos, los animales se decapitaron, se obtuvieron las hipófisis anteriores, se colocaron en buffer TEDLM con glicerol al 10% y se mantuvieron a 4°C, posteriormente se homogeneizaron en 350 μ l del mismo buffer, se centrifugó a 30,000 rpm por 1h a 4°C. La concentración de proteínas fue normalizada a un promedio de 14 mg/ml.

Gradientes lineales de sacarosa.

El patrón de sedimentación del complejo ORG-2058³H - RP se determinó mediante la utilización de gradientes lineales de densidad de sacarosa (20-35%).

Los gradientes de un volumen de 5ml se formaron a partir de dos soluciones de sacarosa, una al 20% y otra al 35% en buffer TEDLM con glicerol al 10%. El gradiente se preparó por medio de un formador de gradientes (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ. EUA)

Condiciones de Incubación.

La fracción citosólica (350 μ l) cuya concentración de proteínas se normalizó a 14 mg/ml, se incubó durante un periodo de 4 h con [³H-6-7]-ORG-2058 4nM a una temperatura de 4°C. Posteriormente, toda la mezcla de incubación se colocó en la parte

superior de un gradiente. En forma paralela se preparó otro gradiente que contenía albúmina sérica de bovino (ASB) como referencia, ya que su coeficiente de sedimentación es conocido (4.6 unidades Svedberg (S)). Los gradientes se centrifugaron por 2.5 h en una ultracentrífuga Beckman XL-90 con un rotor vertical VTI a 64,000 rpm a una temperatura de 4°C.

En el caso en el que se comprobó la inducción del RP se hizo un gradiente paralelo en el que la fracción citosólica se incubó simultáneamente con 4nM de [³H-6-7]-ORG-2058 y 500 nM de ORG-2058 radioinerte (un exceso de 125X), lo que permitió comprobar la afinidad del receptor inducido por el 3β,5α-GSD o el BE2.

Fraccionamiento del gradiente.

Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación, los gradientes se fraccionaron con un fraccionador (Buchler Instruments, NJ USA) y a cada una de las fracciones (volumen aproximado de 80 μl) se le determinó el contenido de ³H (dpm) en un espectrómetro de centelleo líquido cuyas lecturas se graficaron individualmente para cada fracción.

DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

Tomando en cuenta el número total de las fracciones de los gradientes y el número de fracción en el que se presentaba el mayor contenido de radiactividad (dpm) se hizo el siguiente cálculo:

$$C. S. = \left[\frac{X}{Y} \right] \times 4.6$$

En donde:

C.S. = Coeficiente de sedimentación (Unidades Svedberg)

X = Número total de fracciones del gradiente de ASB - Número de la fracción con mayor contenido de ASB

Y = Número total de fracciones del gradiente del RP - Número de la fracción con mayor contenido de ^3H

4.6 = coeficiente de sedimentación de la ASB

ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados de la actividad β -galactosidasa se analizaron estadísticamente con la prueba de t-Student (Steel y Torrie, 1988), la diferencia entre los grupos se consideró significativa cuando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS REDUCIDOS DEL GSD.

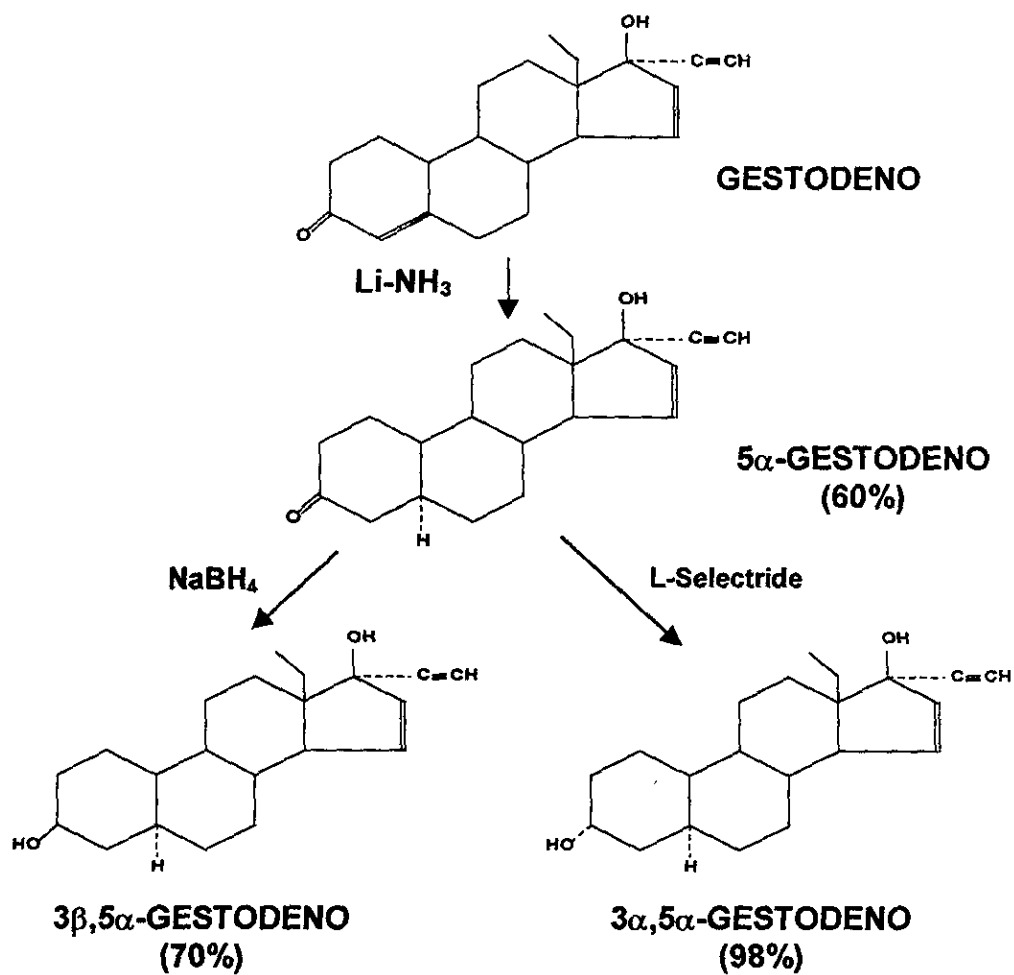


Figura 1. Síntesis de los derivados dihidro y tetrahidro reducidos del GSD.

Rendimiento, caracterización y purificación de:

5 α -GSD

El rendimiento de la reacción para obtener el 5 α -GSD puro fue del 60%. Los métodos de caracterización y pruebas para determinar pureza fueron:

Punto de fusión de 168-170 °C; espectro de absorción en el infrarrojo IR (KBr)= 3362, 3258, 3047, 2948, 2924, 2857, 2086, 1697 cm⁻¹; Resonancia magnética nuclear ¹H RMN (300MHz, CDCl₃) δ 5.92 (dd, J=5.7 y 1.5 Hz, 1H), 5.67 (dd, J=5.7 y 3.6 Hz, 1H), 2.60 (s, 1H), 0.867 (t, J=7.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) 11.11, 20.36, 25.60, 29.51, 30.30, 30.37, 33.70, 38.74, 41.21, 43.67, 45.59, 47.91, 48.53, 55.80, 56.50, 74.89, 83.06, 83.82, 132.01, 135.56, 211.51; espectrometría de masas EM M⁺ m/e =313.

3 α ,5 α -GSD.

El rendimiento de esta reacción fue de 98%, y sus constantes fisicoquímicas y espectroscópicas fueron:

Punto de fusión de 178-181 °C; un espectro de absorción en el infrarrojo IR (KBr) de 3567, 3392, 3252, 3051, 2929, 2089 cm⁻¹; ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 5.93 (dd, J=5.7 y 1.52 Hz, 1H), 5.65 (dd, J=5.7 y 3.6 Hz, 1H), 4.09 (m, 1H), 2.60 (s, 1H), 0.85 (t, J=7.5 Hz, 3H); ¹³C (75 MHz, CDCl₃) 11.10, 20.38, 23.56, 25.18, 29.60, 30.74, 32.90, 33.45, 36.15, 39.05, 40.54, 46.96, 48.33, 55.87, 56.81, 66.33, 74.68, 83.31, 83.33, 132.30, 135.33; espectrometría de masas EM M⁺ m/e =315.

3 β ,5 α -GSD.

Se obtuvo un 70% de rendimiento, se hicieron las mismas pruebas para la caracterización y determinación de la pureza de este compuesto, siendo el punto de fusión de 139-141°C; espectro de absorción en infrarrojo IR (KBr)= 3373, 3281, 3058, 2919, 2859 cm^{-1} ; ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 5.84 (dd, $J=5.5$. y 1.2 Hz, 1H), 5.57 (dd, $J=5.5$. y 3.6 Hz, 1 H), 3.47 (m, 1H), 2.53 (s, 1H), 0.768 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) 10.83, 20.21, 25.37, 28.12, 29.42, 30.60, 33.22, 35.27, 38.86, 41.17, 42.86, 45.95, 48.11, 55.68, 56.60, 70.05, 74.18, 83.32, 131.99, 135.25; y espectrometría de masas EM M^+ $m/e = 315$.

CARACTERÍSTICAS DE UNIÓN DEL RECEPTOR INTRACELULAR DE ESTRÓGENOS

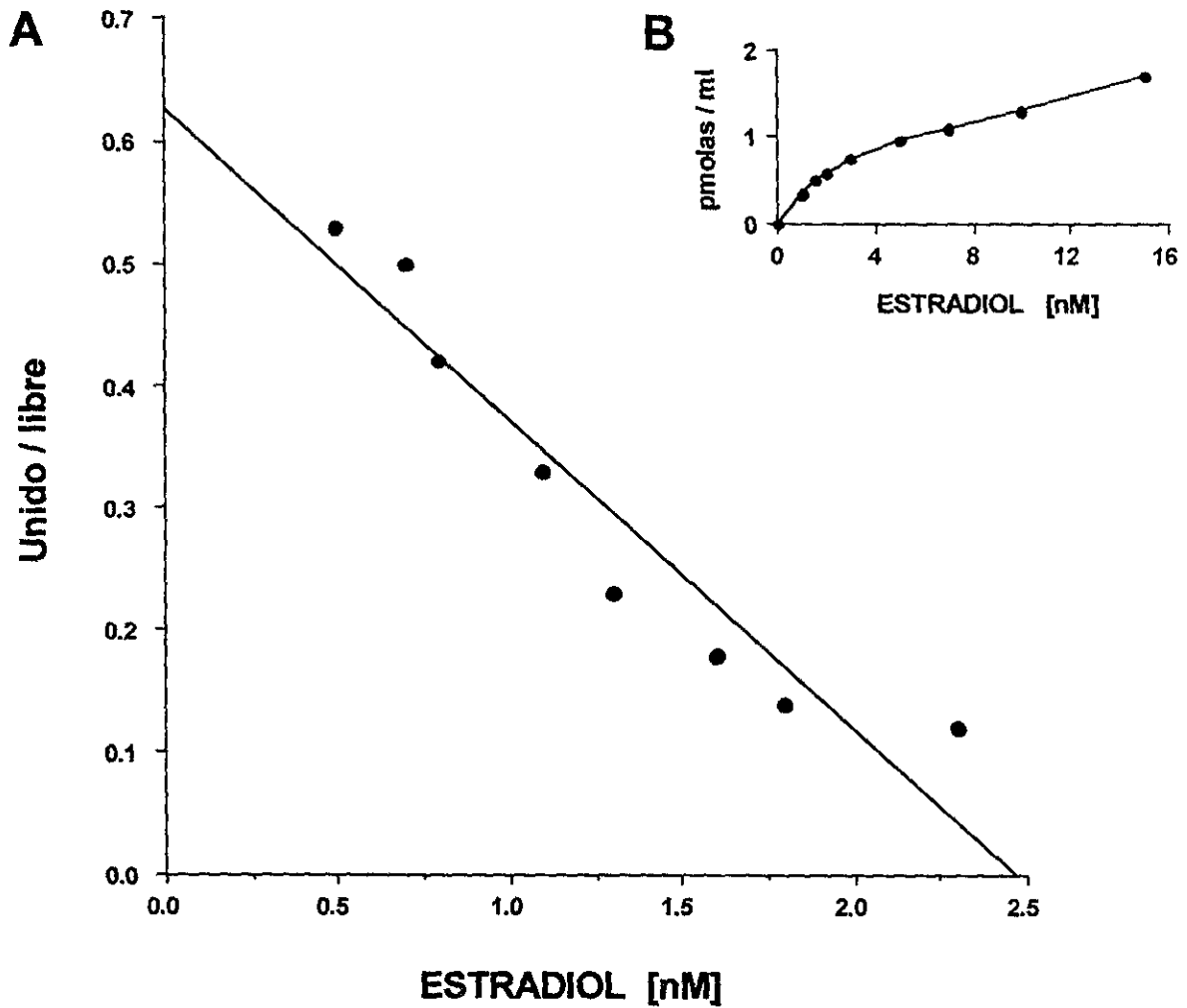


Figura 2. Cinética de unión del Receptor Intracelular de Estrógenos. A) Gráfica de Scatchard B) Curva de saturación del RE con concentraciones crecientes de E_2 - 3H .

La figura 2, panel A muestra la linearización de los datos según Scatchard obtenidos del estudio de la cinética de unión del RE con el E_2 (panel B), en donde la K_d fue de 3.94×10^{-9} y el número estimado de sitios de unión (NSU) de 2.47 nmolas/mg proteína.

AFINIDAD DEL GSD Y SUS DERIVADOS 5 α -GSD, 3 β ,5 α - Y 3 α ,5 α - GSD POR EL RECEPTOR INTRACELULAR DE ESTRÓGENOS.

Una vez determinadas las características de cinética de unión en condiciones de saturación del RE, se procedió a investigar y calcular la afinidad del GSD y sus derivados, por este receptor.

La figura 3 muestra la afinidad de unión para el RE, en donde ni el GSD ni el 5 α -GSD, presentaron afinidad por el receptor, al igual que la DHT utilizada como control negativo, en cambio los derivados 3 β ,5 α -GSD y el 3 α ,5 α -GSD unieron con una afinidad relativamente elevada. El estradiol utilizado como control positivo tuvo una afinidad a la que se asigna un valor del 100%.

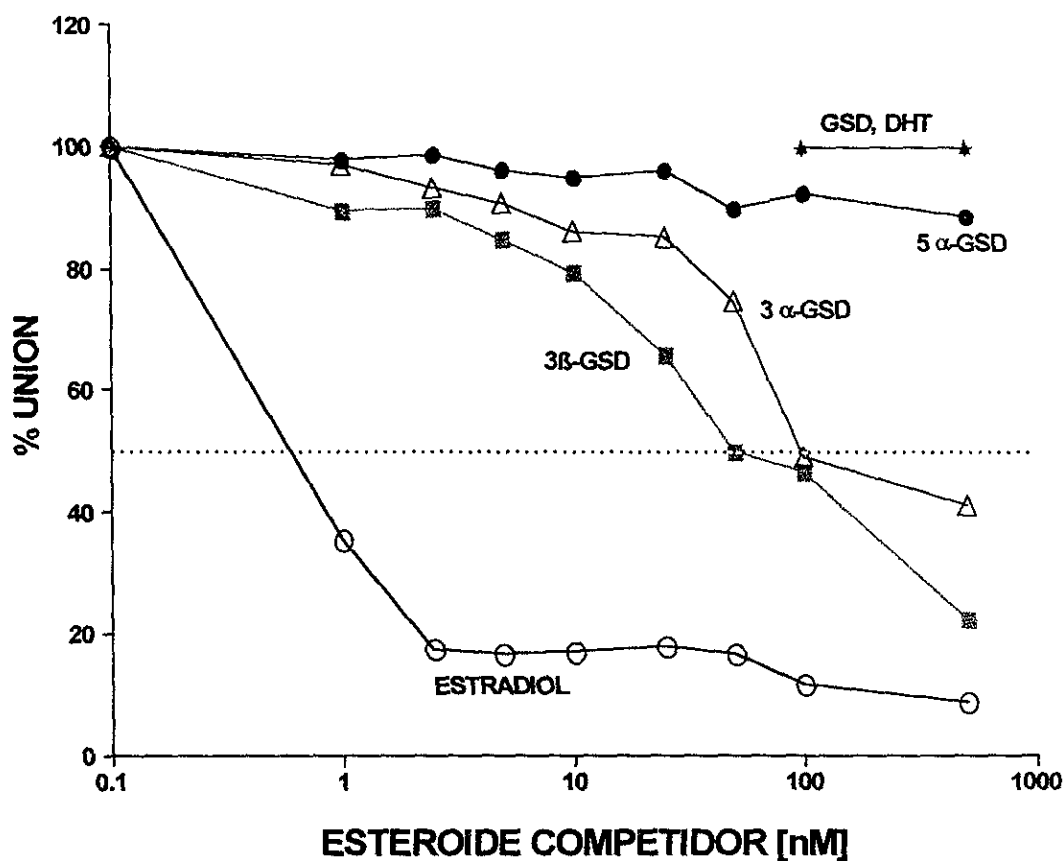


Figura 3. Análisis de competencia del GSD y sus derivados 5 α -GSD, 3 β ,5 α -GSD y 3 α ,5 α -GSD E₂-³H por los sitios de unión del RE.

Tabla 1. Características de afinidad del GSD y sus metabolitos, por el RE

| RE | | |
|---|-------|----------------|
| Kd=3.94 nM | | |
| NSU=2.47 | | |
| Competidor | ARU | K _i |
| GSD | ----- | ----- |
| 5α-GSD | ----- | ----- |
| 3β,5α-GSD | 1.34 | 40 |
| 3α, 5α-GSD | 0.67 | 80 |
| DHT | ----- | ----- |
| E₂ | 100 | 0.53 |

La tabla 1 muestra las características de unión del GSD y cada uno de sus metabolitos por el RE de útero de rata prepúber; la ARU se expresó en porcentaje, tomando como 100% la unión del E₂. La K_i también fue calculada para cada uno de los esteroides competidores.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE TIPO ESTROGÉNICA MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE LA TRANSACTIVACIÓN DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN RE-ERE DE LEVADURAS.

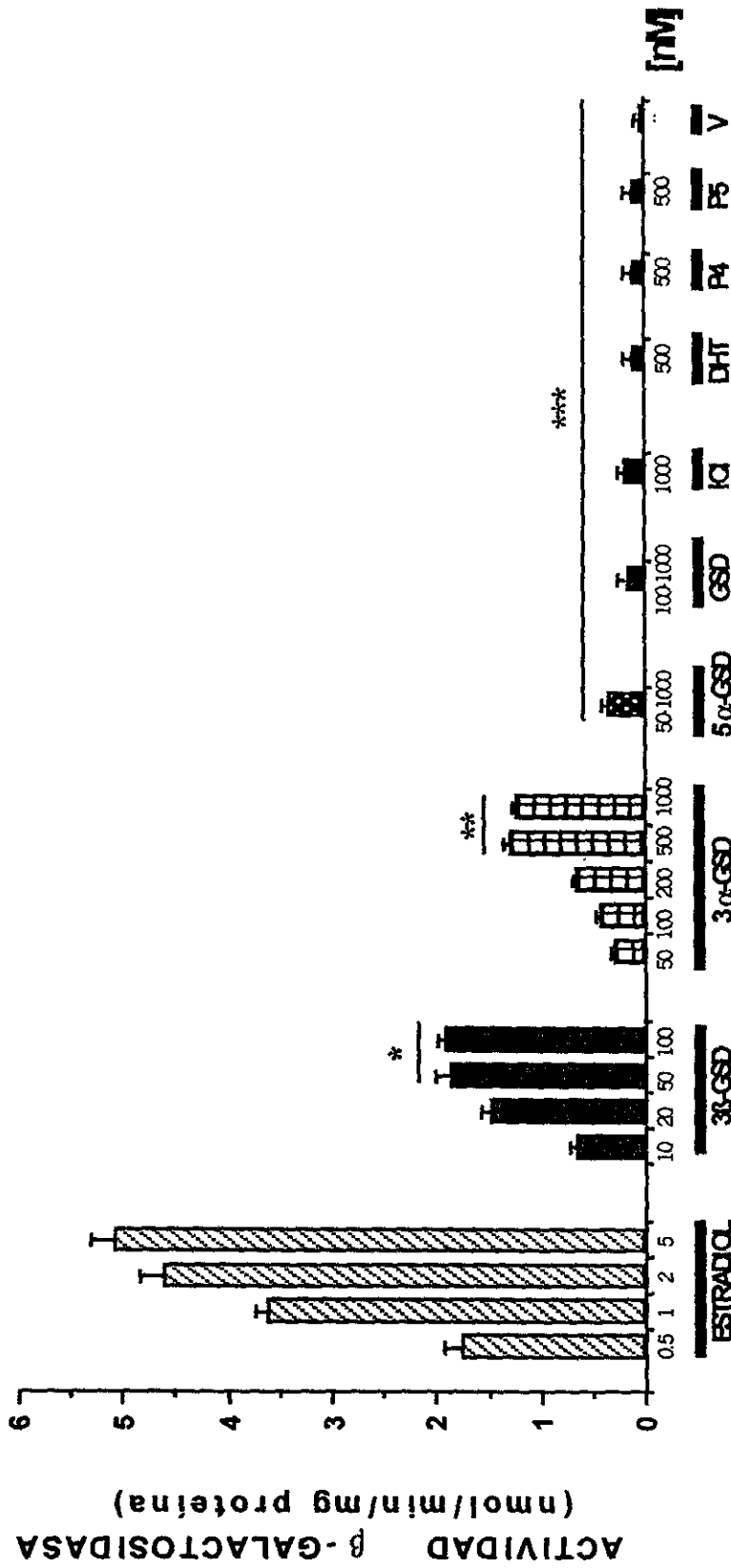
Este sistema permitió analizar el efecto estrogénico del GSD y sus derivados mediante la determinación de la actividad enzimática de β -galactosidasa. El E_2 se utilizó como control positivo, ya que es el transactivador natural del sistema. La figura 4 muestra la actividad de β -galactosidasa al estimular con E_2 , GSD y sus derivados.

Se puede observar que la mayor actividad se presentó con 5 nM de E_2 , mientras que para el derivado tetrahidro $3\beta,5\alpha$ -GSD su máxima actividad se presentó a una concentración de 100 nM y el $3\alpha,5\alpha$ -GSD a 500nM. El efecto de ambos derivados presentó una relación dosis-respuesta.

Comparando la actividad del E_2 (5nM), el derivado $3\beta,5\alpha$ -GSD (100 nM) es 27 veces menos potente; y éste a su vez es 14 veces más efectivo que su isómero $3\alpha,5\alpha$ -GSD.

El comportamiento del derivado 5α -GSD fue diferente, ya que a todas las dosis probadas (100 a 1000 nM) presentó la misma actividad, siendo ésta menor a la presentada por el E_2 a cualquiera de sus concentraciones.

El GSD fue incapaz de inducir actividad β -galactosidasa en cualquiera de las dosis probadas. Por otra parte, el antiestrógeno puro ICI 182,780 tuvo un comportamiento estadísticamente idéntico al presentado por el GSD ($p < 0.005$), mientras que la DHT, P_4 y P_5 , empleadas como controles negativos, no presentaron actividad.



* p < 0.0005 vs E₂ 5nM
 ** p < 0.005 vs E₂ 5nM
 *** p < 0.05 vs E₂ 5nM

Figura. 4 Inducción de la actividad β-galactosidasa a través de la transactivación del sistema RE-ERE en levaduras.

Para corroborar que el efecto observado en el experimento anterior era mediado por el RE, se coestimuló el sistema de levaduras con los esteroides estudiados en presencia del antiestrogénico ICI 182,780. En este experimento se utilizaron las concentraciones de los esteroides que presentaron la mayor actividad enzimática de β -galactosidasa incubados simultáneamente con 1000 nM de ICI 182,780. En la figura 5 se observa que la actividad del E_2 , $3\beta,5\alpha$ -GSD y $3\alpha,5\alpha$ -GSD disminuye en un 85%, 41% y 52% respectivamente. Por otro lado, no hubo cambio significativo en la actividad enzimática al estimular el sistema con GSD o 5α -GSD en presencia o ausencia de ICI 182,780.

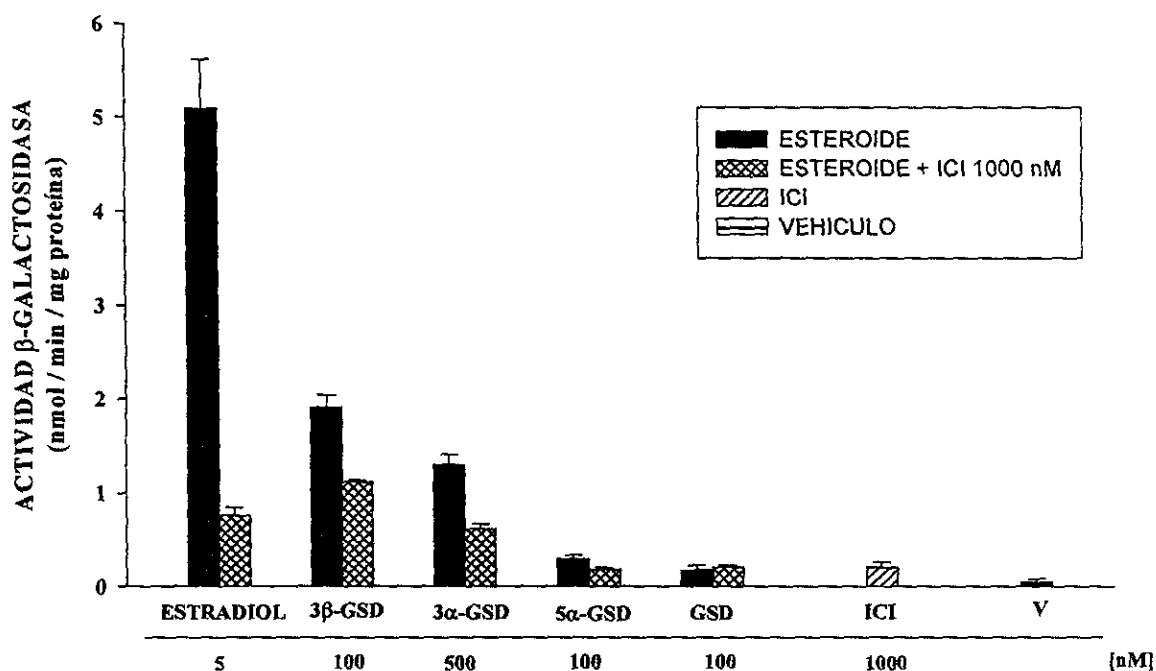


Figura 5. Efecto antiestrogénico del ICI 182-780 sobre la actividad β -galactosidasa en el sistema RE-ERE en levaduras.

Al tratar a las levaduras simultáneamente con E₂ en una concentración de 0.5 nM y GSD o cada uno de sus derivados a las concentraciones a las que presentaron la mayor actividad (figura 6), se observó que en los casos en los que se adicionó E₂+3β,5α-GSD y E₂+3α,5α-GSD el efecto fue exclusivamente aditivo. Este efecto se inhibió significativamente al adicionar el ICI 182,780 ya que la actividad β-galactosidasa disminuyó en 57% y 47% respectivamente.

En un experimento adicional, se estudió el efecto simultaneo 3β,5α-GSD (100nM) con: GSD, 5α-GSD o 3α,5α-GSD. Los resultados obtenidos demostraron un efecto aditivo. Al adicionar ICI 182,780 al sistema, la actividad exhibida por GSD, 5α-GSD o 3α,5α-GSD disminuyó entre un 50 a 60% (Figura 7).

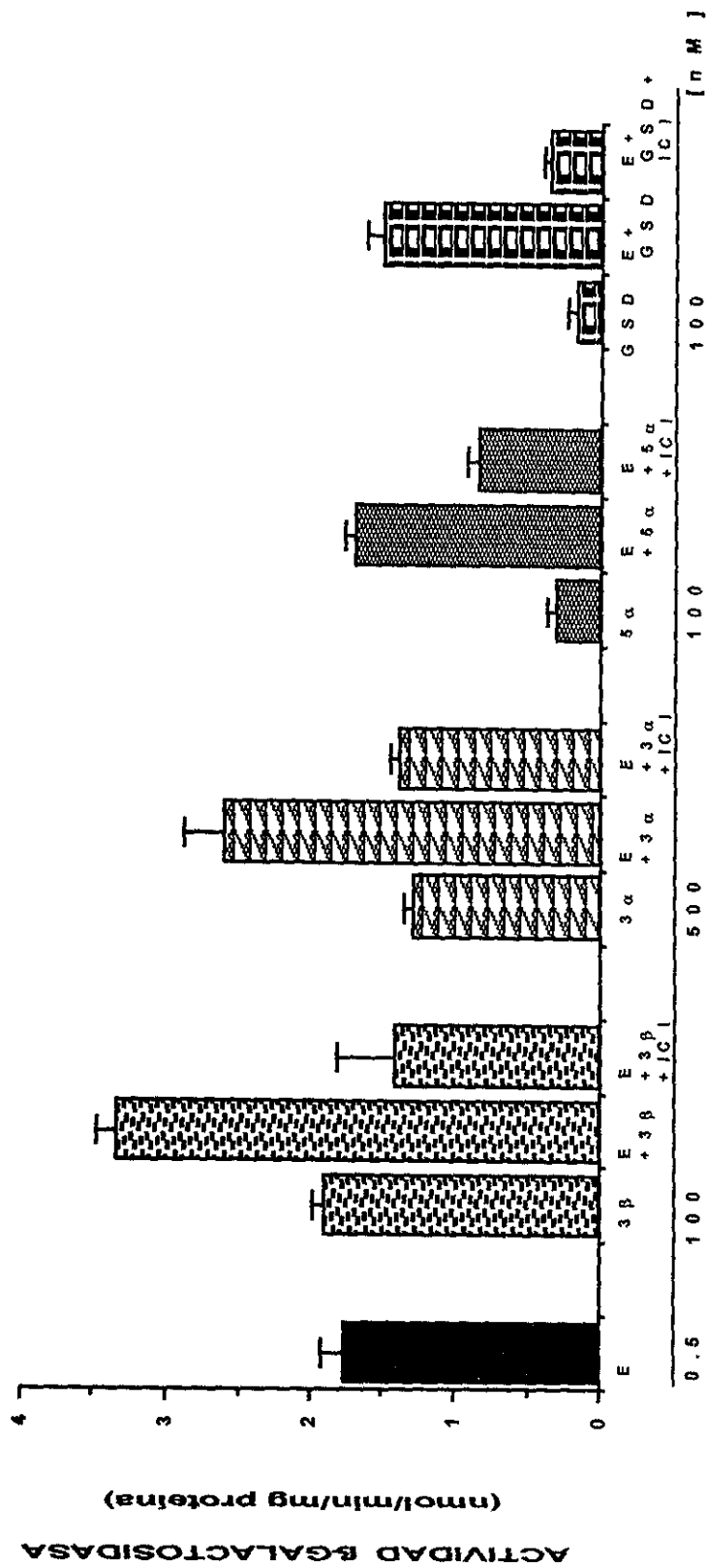


Figura 6. Efecto del Estradiol o del ICI 182,780, suministrados en combinación conl GSD y cada uno de sus metabolitos, sobre la actividad de β-galactosidasa en el sistema RE-ERE de levaduras.

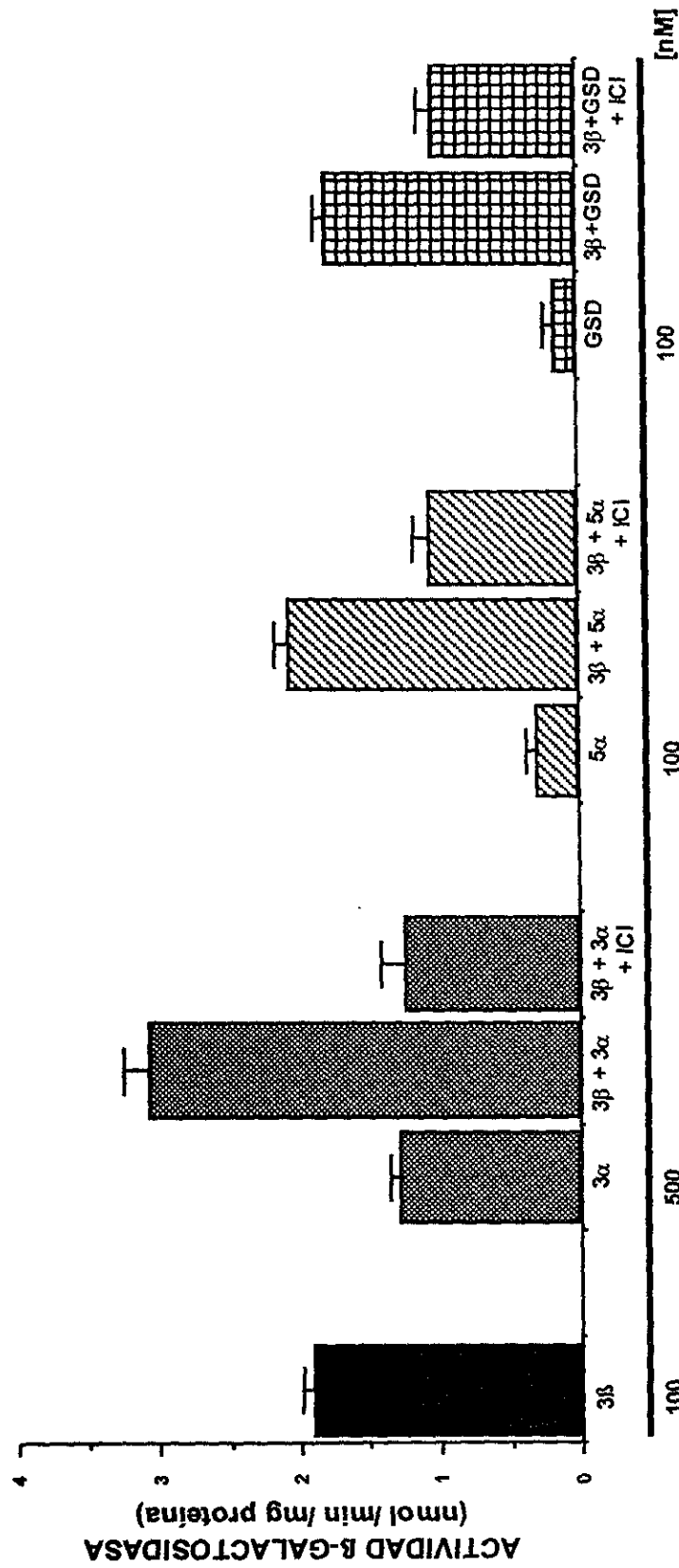


Figura 7. Efecto del 3β,5α-GSD y de ICI 182,780 sobre la actividad β-galactosidasa con GSD y cada uno de sus metabolitos en el sistema RE-ERE de levaduras.

INDUCCIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA DEPENDIENTE DE ESTRÓGENOS EN LA HIPÓFISIS ANTERIOR DE LA RATA HEMBRA CASTRADA.

En virtud de que los receptores intracelulares de progesterona (RP) en la hipófisis anterior de la rata son totalmente dependientes de estrógeno, se empleó este modelo *in vivo* para el estudio de actividad estrogénica del $3\beta,5\alpha$ -GSD. En el panel A de la figura, se muestra en el gradiente lineal de sacarosa la presencia de un complejo RP-ORG-2058 ^3H cuyo coeficiente de sedimentación fue de 7.6 unidades Svedberg (S) resultado de la incubación de la fracción citosólica de la hipófisis anterior del grupo de animales tratados con BE_2 (control positivo). En los animales control tratados con ppg el gradiente de la fracción citosólica no mostró la presencia del RP capaz de interaccionar con el radioligando específico ORG-2058 ^3H .

En el panel B se muestra la inducción del RP en los animales que fueron tratados tanto con 1.0 como con 1.5 mg de $3\beta,5\alpha$ -GSD /día/6d, los coeficientes de sedimentación de estos complejos fueron de 8.05 y 7.82 S respectivamente. La especificidad de la unión entre el RP inducido y el radioligado, se comprobó en gradientes paralelos después de la incubación de la fracción citosólica de la hipófisis de los animales castrados tratados con 1.5 mg de $3\beta,5\alpha$ -GSD en presencia de un exceso (125X) de ORG-2058 radioinerte. En este experimento se observó claramente la supresión de la unión del RP con el radioligando.

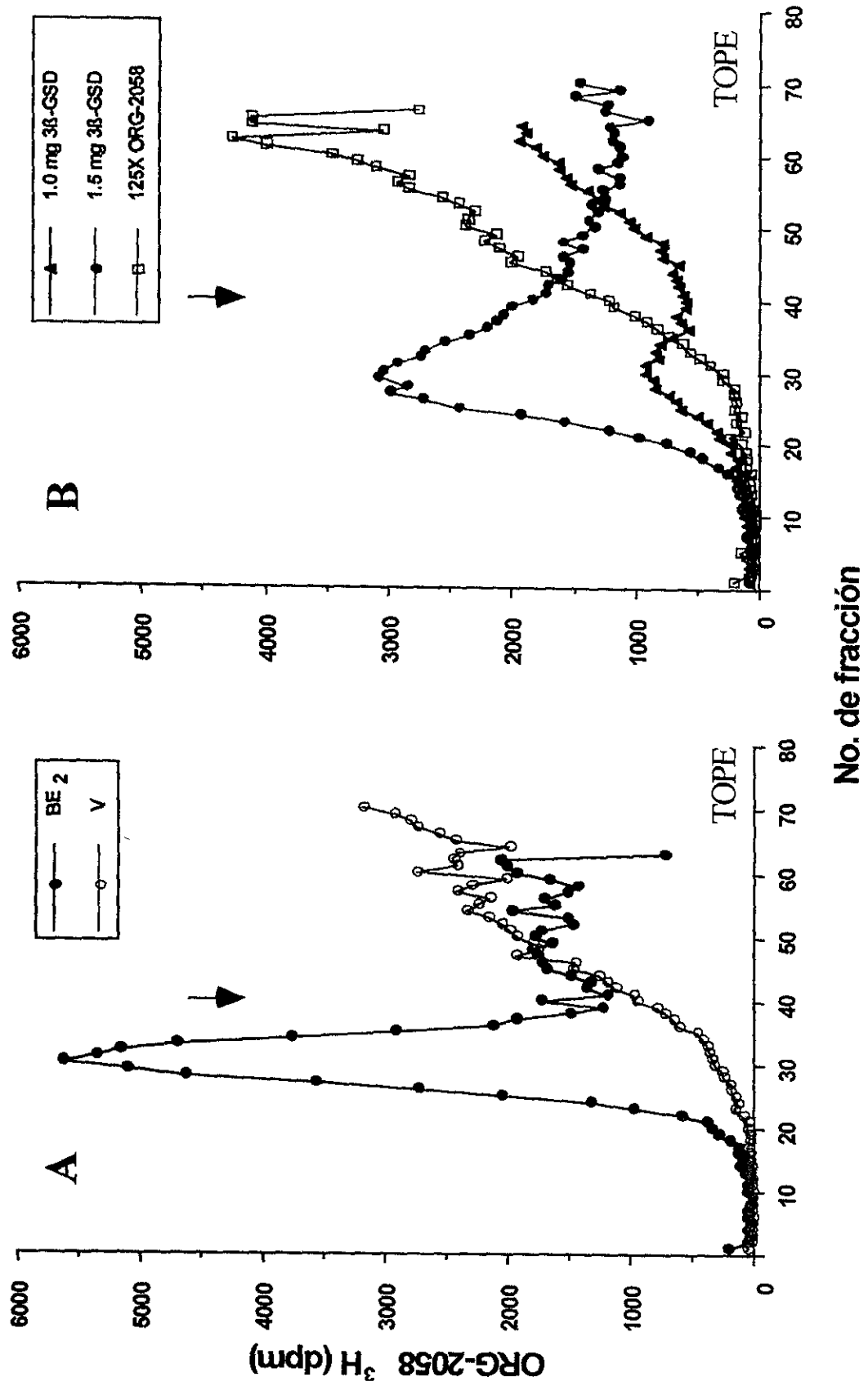


Figura 8. Inducción del receptor de progesterona dependiente de estrógenos en la hipófisis anterior de rata hembra castrada.

DISCUSIÓN

El análisis integral de los resultados obtenidos en las diferentes fases experimentales de este estudio, permite concluir que los efectos estrogénicos observados después de la administración del Gestodeno, progestina sintética ampliamente usada en formulaciones anticonceptivas hormonales, son inducidos a través de dos de sus metabolitos reducidos en el anillo A de su molécula, los cuales interactúan con el receptor intracelular de estrógenos y activan, a nivel genómico elementos de respuesta hormonal de genes regulados por estrógenos. Con los modelos experimentales empleados, se demostró que los efectos farmacológicos de tipo estrogénico, inducidos por los derivados reducidos del Gestodeno son débiles y que además no sinergizan con el estradiol cuando se administran simultáneamente.

El estudio de interacción del Gestodeno y sus metabolitos reducidos en el anillo A con el receptor de estrógenos se realizó por medio de un análisis de competencia con preparaciones de citosol de úteros de ratas prepúberes, empleando estradiol-³H como radioligando (Figura 3). Los resultados confirmaron y ampliaron las observaciones anteriores (Düstenberg y cols., 1987; Wilde y Balfour, 1995) que indican que el Gestodeno no es capaz de unirse a los sitios activos del receptor intracelular de estrógenos, hallazgo que fue previamente utilizado como evidencia para señalar que el Gestodeno no podía inducir efectos de tipo estrogénico. Sin embargo, en este estudio queda demostrado que el derivado 3 β ,5 α -tetrahidro Gestodeno se une específicamente al receptor de estrógenos, aunque con una afinidad de unión significativamente inferior a la del estradiol. El isómero 3 α ,5 α -Gestodeno también interactúa con el receptor intracelular de estrógenos exhibiendo una unión cuya afinidad es significativamente menor que la del derivado 3 β ,5 α -Gestodeno (Tabla 1).

Estos resultados son similares a los previamente informados para Noretisterona, otra progestina sintética de la serie 19-nor, en donde sus tetrahidro derivados 3 β ,5 α - y 3 α ,5 α - interactúan específicamente con los receptores intracelulares de estrógenos aunque con una

afinidad relativa de unión mayor que los correspondientes metabolitos del Gestodeno (Chávez y cols.,1985). En el presente estudio se demostró que el derivado 5α - dihidro GSD no se une al receptor de estrógenos, lo cual correlaciona con el mismo reporte de Chávez y cols. (1985) en el que el derivado dihidro de la Noretisterona no es capaz de interactuar con este receptor.

Con base a la afinidad relativa de unión exhibida por los tetrahidro derivados del Gestodeno, era posible suponer que su potencia sería significativamente menor que la de los derivados reducidos de la Noretisterona y que la del estradiol. Sin embargo, la interacción, con una afinidad relativamente alta de unión de un compuesto esteroide con los receptores intracelulares específicos, no necesariamente implica la expresión de un efecto hormonal agonista, ya que en ocasiones, el efecto inducido puede ser antagonista.

Con el objetivo de establecer si la interacción de los derivados $3\beta,5\alpha$ - y $3\alpha,5\alpha$ - del Gestodeno, con el receptor de estrógenos, se traduce en un efecto a nivel genómico, se utilizó un sistema de transactivación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales están cotransfectadas con un plásmido de expresión que codifica para el RE humano, así como con un vector reportero que contiene un ERE que regula la expresión del gen de la β -galactosidasa, cuya actividad en este sistema es un marcador de actividad estrogénica. Este modelo, permite evaluar actividades de tipo agonista, antagonista y/o sinergista (Lyttle y cols., 1992).

Los resultados demostraron que el Gestodeno fue incapaz de transactivar el sistema y por lo tanto no indujo ningún incremento en la actividad basal de la β -galactosidasa. Un resultado similar se obtuvo con la adición del derivado 5α -Gestodeno que tampoco fue capaz de inducir la activación del sistema. Estos hallazgos son congruentes con la demostración de que el Gestodeno y el 5α -Gestodeno, en los estudios de competencia, no interactuaron con el receptor intracelular de estrógenos. La observación de que el derivado $3\beta,5\alpha$ -Gestodeno fue capaz de inducir actividad de β -galactosidasa, demostró que el compuesto en este sistema tiene un claro efecto agonista de tipo estrogénico y que la transactivación del gen reportero fue de tipo dosis-respuesta y similar a la observada con

estradiol, aunque con una potencia significativamente menor, lo que correlaciona con las afinidades de unión con el receptor intracelular de estrógenos.

El isómero 3 α ,5 α -Gestodeno también fue efectivo en la inducción de la activación de la β -galactosidasa, mostrando un claro efecto de tipo estrogénico y un comportamiento también de tipo dosis-respuesta pero con una potencia menor que la ejercida por el 3 β ,5 α -Gestodeno, una observación que también correlaciona con sus correspondientes afinidades de unión con el receptor intracelular de estrógenos (Figura 4).

Para proporcionar una mayor evidencia experimental de que los efectos de tipo estrogénico de los derivados reducidos en el anillo A del Gestodeno son mediados por el receptor de estrógenos, se realizaron una serie de experimentos en los que se suministraron al sistema de levaduras los derivados del Gestodeno y un antiestrógeno no esteroideal muy potente, el ICI-182,780. Los resultados demostraron que la adición del antiestrógeno disminuye significativamente la transactivación de la β -galactosidasa, inducida por los derivados 3 β ,5 α - y 3 α ,5 α - del Gestodeno. Estos resultados confirman que los efectos agonistas de tipo estrogénico del Gestodeno son mediados por el receptor intracelular de estrógenos, particularmente por el hecho de que el mecanismo de acción antiestrogénico del ICI-182,780 involucra su interacción con el sitio activo de este receptor (Figura 5).

En virtud que los anticonceptivos orales que contienen Gestodeno están combinados con etinil estradiol, fue interesante investigar si el Gestodeno y/o sus derivados reducidos en el anillo A podían ejercer un efecto estrogénico de tipo sinergista, que concordara con la hipótesis manejada a nivel clínico, en la que se menciona la posibilidad de que el Gestodeno potencia los efectos del componente estrogénico. Los resultados demostraron claramente que ni el Gestodeno ni sus derivados exhiben un efecto sinergista al incubarlos simultáneamente con E₂ (figura 6), y que el efecto resultante de coestimular al sistema con E₂ + Gestodeno y/o sus derivados es de tipo aditivo. La actividad β -galactosidasa resultante también se inhibió significativamente al adicionar ICI 182-780.

Los resultados del estudio en el que se estimuló el sistema con 3 β ,5 α -Gestodeno suministrado simultáneamente con Gestodeno y/o los derivados 5 α -Gestodeno y 3 α ,5 α -Gestodeno, demostraron un efecto de tipo sumatorio en la inducción de la actividad; este efecto fue inhibido al adicionar al sistema el mismo antiestrógeno (Figura 7).

En la última fase de este estudio y con el objeto de confirmar los resultados obtenidos en el sistema de expresión en levaduras, se utilizó un modelo animal *in vivo* en el cual se investigó si el derivado 3 β ,5 α -Gestodeno posee la capacidad de inducir el receptor intracelular de progesterona en la hipófisis anterior de ratas hembras adultas castradas, tomando ventaja del hecho de que en esta estructura, los receptores de progesterona son dependientes y sensibles a estrógenos (Kato y cols, 1978; Evans y cols., 1978). En esta forma se demostró que el derivado 3 β ,5 α -Gestodeno restableció, en forma dosis-dependiente, el contenido de RP en una forma similar a la ejercida por el benzoato de estradiol, aunque con una potencia significativamente menor (Figura 8).

Estos resultados, son similares a lo reportado previamente para el derivado 3 β ,5 α -NET (Vilchis y cols., 1986); sin embargo, la potencia estrogénica del derivado 3 β ,5 α -Gestodeno es aproximadamente tres veces menor, lo cual a su vez correlaciona con las ARU por el RE (Chávez y cols, 1985, Figura 8)

Estos resultados en conjunto, proporcionan una explicación plausible para los hallazgos experimentales que han demostrado que concentraciones altas de progestinas derivadas de la 19-nortestosterona, incluyendo al Gestodeno, estimulan la proliferación dependiente de estrógeno de líneas celulares de carcinoma mamario (Catherino y cols, 1993; Kalkhoven y cols., 1994; Schoonen y cols., 1995).

Este trabajo presenta por primera vez evidencias bioquímicas y moleculares que permiten dilucidar el mecanismo de acción mediante el cual el Gestodeno ejerce efectos de tipo estrogénico, los cuales son mediados principalmente por su derivado tetrahidro 3 β ,5 α -Gestodeno. Estos estudios, pueden también explicar en parte los efectos de tipo estrogénico observados en las usuarias de anticonceptivos que contienen esta progestina, e indican que

la potencia estrogénica del Gestodeno mediada por sus metabolitos reducidos, es similar o incluso menor a la presentada por los correspondientes metabolitos de Noretisterona, lo cual concuerda con los reportes recientes en los que se sugiere que no existe una diferencia significativa en el riesgo de padecimientos de tipo tromboembólico venoso entre las usuarias de anticonceptivos orales que contienen Gestodeno u otra progestina derivada de la 19-nortestosterona (Farmer y Preston, 1995; Spitzer y cols., 1996, WHO 1998; IFFS, 1999)

BIBLIOGRAFIA

- Bowers A., Ringold H. J., Derot E. (1958). Steroids CL 19-nordihydrotestosterone derivatives. J. Am. Chem. Soc. 80:6115-6121.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Bullock L.P., Bardin C.W. (1977). Androgenic, synandrogenic, and antiandrogenic actions of progestins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 286:321-330
- Butt T.R., Khan M.I., Marsh J., Ecker D. J., Crooke S.T. (1988). Ubiquitin-metallothionein fusion protein expression in yeast. J. Biol. Chem. 263:16364-16371.
- Carr R.B., Ory H. (1997). Estrogen and Progestin components of Oral Contraceptives: Relationship to Vascular disease. Contraception 55:267-272.
- Cerbón M.A., Pasapera A.M., Gutiérrez-Sagal R., García G.A., 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., Lemus A. E., Vilchis F., Pasapera A.M., García G.A., Pérez-Palacios G. (1991). A-Ring reduced derivatives of norethisterone exert antihormonal effects. En: *Reproduction, Growth and Development*. Eds. A. Negro Vilar y G. Pérez-Palacios, New York:Raven Press. 175-187.
- Coenen C.M., Hollanders J.M., Rolland R., Spielmann D., Bulte J.(1996). The effects of a low-dose gestodene-containing oral contraceptive on endometrial histology in healthy women. Eur. J. Contracept.Reprod.Health Care. 1:325-329.
- Crosingnani P.G., Vergadoro F., Giudici G.A., Vigotti G., Vergani C, Franceschetti F., Cesana B., Orlandi R. 1987. A study of the metabolic effects of monophasic gestodene and desogestrel preparations En: *Gestodene. Development of a new gestodene-containing low-dose oral contraceptive*. Ed. M. Elstein.Carnforth: Parthenon Publishing Group Ltd, 105-110.
- Chaterino, W.H., Jeng M.H., Jordan V.C. (1993) Norgestrel and gestodene stimulate breast cancer cell growth through an oestrogen receptor mediated mechanism. Br. J. Cancer 67:945-952.
- Chávez B.A., Vilchis F., Pérez A.E., García G.A., Grillasca I., Pérez-Palacios G. (1985). Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduce metabolites. J. Steroid Biochem. 22:121-126.
- Cheng Y.C., Prusoff W. H.(1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. Bioch. Pharm. 22:3099-3108
- Chez R.A. (1989). Clinical aspects of three new progestogens: Desogestrel, gestodene, and norgestimate. Am. J. Obstet. Gynecol. 160: 1296-1300.

- Darney P.D. (1995). The androgenicity of progestins. Am. J. Med. 98:1A-104S-1A-110S.
- Düstenberg B., Tack J.W., Krause W., Hümpel M. (1987) Pharmacokinetics and biotransformation of gestodene in man. En: *Gestodene. Development of a new gestodene-containing low-dose oral contraceptive*. Ed. M. Elstein. Carnforth: Parthenon Publishing Group Ltd, 35-44.
- Elger W., Steinbeck H., Schillinger E., Losert W., Beier S. (1987) Endocrine-pharmacological profile of gestodene. En: *Gestodene. Development of a new gestodene-containing low-dose oral contraceptive*. Ed. M. Elstein. Carnforth: Parthenon Publishing Group Ltd. 19-33.
- Evans R. W., Sholiton L. J., Leavitt W. W. (1978). Progesterone receptor in the rat anterior pituitary: effect of estrogen priming and adrenalectomy. Steroids 31:69-81.
- Farmer R., Preston T. (1995). The risk of venous thromboembolism associated with low oestrogen dose oral contraceptives. J. Obstet. Gynecol. 15:195-200.
- Farmer R., Lawrenson R., Thompson C, Kennedy J, Hambleton R. (1997). Population based study of risk of venous thromboembolism associated with various oral contraceptives. Lancet 349:83-88
- Fotherby K., Caldwell A.D.S. (1994) New progestogens in oral contraception. Contraception. 49:1-32
- Fuhrmann U., Slater E.P., Fritzscheier K.H. (1995) Characterization of the novel progestin gestodene by receptor binding studies and transactivation assays. Contraception 51:45-52.
- Garza-Flores J., Menjivar M., Cárdenas M., Reynoso M., García G.A., Pérez-Palacios G. (1991). Further studies on the antigonadotropic mechanism of action of norethisterone. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 38:89-93.
- Garza-Flores J., Valles de Bourges V., Martínez M., Vázquez-Estrada L., Bassol S, Recio R., Pérez-Palacios G. (1994). Safety and efficacy of a combined oral contraceptive: gestodene 75 micrograms plus ethinyl estradiol 30 micrograms in Mexican women. Adv. Contracept. 10:19-26.
- Garza-Flores J., Vilchis F., García G.A., Menjivar M., Pérez-Palacios G. (1986). A-ring reduction enhances the antigonadotropic potency of norethisterone Acta Endocrinologica (Copenh) 112:278-283.
- Greene G.L., Gilna P., Waterfield M., Baker A., Hort Y. Shine J. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. Science 231:1150-1154.
- Guengerich F.P. (1990). Inhibition of oral contraceptive steroid-metabolizing enzymes by steroids and drugs. Am. J. Obstet Gynecol. 163:2159-2163.
- Halbe H.W., de Melo N.R., Bahamondes L., Petracco A., Lemgruber M., de Andrade R. P., da Cunha D. C., Guazelli C. A., Baracat E. C. (1998). Efficacy and acceptability of two monophasic oral contraceptives containing ethinylestradiol and either desogestrel or gestodene. Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care 3:113-120

- Hemrika D.J., Slaats E.H., Kennedy J.C., Robles-Korsen T.J.M.V., Schoemaker J. (1993). Pulsatile luteinizing hormone secretion during the first and the fourth cycle on two different oral contraceptives containing gestodene. Acta Endocrinologica (Copenh) 129:229-236.
- International Federation of Fertility Societies. (1999) Consensus Conference on Combination Oral Contraceptives and Cardiovascular Disease. Fertil.Steril. 71:1S-6S.
- Jick H., Jick S.S., Gurewich V., Myers M. W., Vasilakis C. (1995). Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen componets. Lancet 346:1589-1593.
- Jones E.E. (1995). Androgenic effects of oral contraceptives:implications for patient compliance. Am. J. Med. 98:1A-116S – 1A-119S.
- Jung-Hoffmann C, Kuhl H. (1989). Interaction with the pharmacokinetics of ethinylestradiol and progestogens contained in oral contraceptives.Contraception. 40:299-312.
- Kalkhoven E., Kwakkenbos-Isbrücker L., de Laat, S.W., van der Saag P.T., van der Burg B. (1994). Synthetic progestins induce proliferation of breast tumor cell lines via the progesterone or estrogen receptor. Mol. Cell. Endocrinol.102:45-52.
- Kato J., Onouchi T., Okinaga S. (1978). Hypothalamic and hipophysial progesterone receptors: estrogen-priming effects, differential localization, 5 α -dihydroprogesterone binding, and nuclear receptors. J. Steroid Biochem. 9:410-427.
- Koh K.K., Cardillo C., Bui M.N., Hathaway L., Csako G., Waclawiw M.A., Panza J.A., Cannon III R.O. (1999). Vascular Effects of Estrogen and Cholesterol-Lowering Therapies in Hypercholesterolemic Postmenopausal Women. Circulation 99:354-360
- Kuhl H., (1987) Progestagens in contraception. Wien. Med. Wochenschr. 137:433-440.
- Kuhl H. (1996). Comparative pharmacology of newer progestogens. Drugs. 51:188-215.
- Larrea F., Escobar N., Garza-Flores J., Moctezuma O., Martínez-Campos A., Pérez-Palacios G. (1983). Nuclear translocation of estradiol receptors by the *in vivo* administration of norethisterone: An alternate mechanism for gonadotropin inhibition. J. Steroid. Biochem. 19:1747-1752.
- Larrea F., Vilchis F., Chávez B., Pérez A.E., Garza-Flores J., Pérez-Palacios G. (1987). The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. J. Steroid Biochem. 27:657-663.
- Lemus A.E., Vilchis F., Damsky R., Chávez B., García G.A., Grillasca I., Pérez-Palacios G.(1992). Mechanism of action of levonorgestrel: *In vitro* metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. J. Steroid Biochem.Molec. Biol. 41:881-890.
- Lemus A.E., Enríquez J., García G.A., Grillasca I., Pérez-Palacios G.(1997) 5 α -reduction of norethisterone enhances its binding affinity for androgen receptors but diminishes its androgenic potency. J. Steroid Biochem. Molec. Biol.60:121-129.

- Lete I., Morales P. (1997) Inhibition of follicular growth by two different oral contraceptives (monophasic and triphasic) containing ethinylestradiol and gestodene. Eur. J. Contracept.Reprod.Health Care 2:187-91
- Levesque H., Borg J.Y., Courtois H.(1997) The vascular risk of third generation contraceptive pills. J. Mal. Vasc. 22:5-12.
- Levesque H., Courtois H. (1997). Estrogen therapy and venous thromboembolic disease.Rev. Med. Interne 6:620S-625S
- Lidegaard O.(1996). Oral contraceptives and venous throemboembolism: an epidemiological review. Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care. 1:13-20.
- Lyttle C.R., Damian-Matsumura P., Juul H., Butt T. R. (1992). Human estrogen receptor regulation in a yeast model system and studies on receptor agonists and antagonists. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 42:677-685.
- Moralí G., Lemus A.E., Oropeza M.V., García G.A., Pérez-Palacios G.(1990). Induction of male sexual behavior by norethisterone: Role of its A-ring reduce metabolites. Pharmacol. Biochem. Behav. 37:477-484.
- Pérez-Palacios G., Chavez B., Escobar N., Vilchis F., Larrea F., Lince M., Pérez A.E. (1981)a. Mechanisms of action of contraceptive synthetic progestins. J. Steroid Biochem. 15: 125-130.
- Pérez-Palacios G, Fernández-Aparicio M.A., Medina M., Zacarías-Villareal J., Ulloa-Aguirre A. (1981)b. On the mechanism of action of progestins. Acta Endocrinologica (Copenh), 97: 320-328.
- Pérez-Palacios G., Cerbón M.A., Pasapera A.M., Castro J.I., Enríquez J., Vilchis F., García G.A., Moralí G., Lemus A.E.(1992). Mechanisms of hormonal and antihormonal actions of contraceptive progestins at the molecular level. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 41:479-485.
- Petersen K.R., Skouby S.O., Jespersen J. (1996). Contraception guidance in women with pre-existing disturbances in carbohydrate metabolism. Eur. J. Contracept Reprod Health Care. 1:53-59.
- Pollow K, Juchem M, Grill HJ, Elger W, Beier S, Henderson D, Schmidt-Gollwitzer K, Manz B. (1989). Gestodene: a novel synthetic progestin-characterization of binding to receptor and serum proteins. Contraception 40:325-341.
- Rabe T., Leppien G., Fossman W.G., Hessing C., Vladescu E., Runnebaum B. (1997). A study of the influence of a gestodene-containing triphasic oral contraceptive on endometrial morphology. Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care. 2: 193-201
- Reel J.R., Humphrey R.R., Shih Y-H., Windsor B.L., Sakowski R., Creger P.L., Edgren R.A.(1979). Comparative progesterone antagonists: receptor binding and biologic activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives.Fertil. Steril. 31:552-561.

- Rosing J., Nicolaes T.G.A.F., Thomassen M.C.L.G.D., van Oerle R., van der Ploeg P.M.E.N., Heijnen P., Hamulyak K., Hemker H.C. (1997) Oral contraceptives and venous thrombosis: different sensitivities to activated protein C in women using second-and third-generation oral contraceptives. Brit. J. Haematol. 97:233-238.
- Scatchard G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660-672.
- Schoonen W.G.E.J., Joosten J. W. H., Kloosterboer H.J. (1995). Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-Nortetosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: I. MCF-7 cell lines. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 55:423-437.
- Schwing P.J., Shelton J. (1997). Modeled estimates of myocardial infarction and venous thromboembolic disease in users of second and third generation oral contraceptives. Contraception. 55:125-129.
- Sherman F., Fik G.R., Hicks J.B. (1982). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Manual.* Cold. Spring Harbor Lab., New York
- Shoupe D. (1994). New progestins-clinical experiences: Gestodene. Am. J. Obstet. Gynecol. 170: 1562-1568.
- Siekmann L., Siekmann A., Bidlingmaier F., Brill K., Albring M. (1998). Gestodene and desogestrel do not have a different influence on concentration profiles of ethinylestradiol in women taking oral contraceptives results of isotope dilution mass spectrometry measurements. Eur. J. Endocrinol. 139: 167-77.
- Spitzer W.O., Lewis M.A., Heinemann L. A. J., Thorogood M., Mac Rae. (1996) Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. British Medical Journal 312:83.88.
- Spona J, Huber J. (1987) Inhibition of ovulation with gestodene En: *Gestodene. Development of a new gestodene-containing low-dose oral contraceptive.* Ed. M. Elstein. Carnforth: Parthenon Publishing Group Ltd, 45-55.
- Stanczyk F.Z. (1997). Pharmacokinetics of the new progestogens and influence of Gestodene and Desogestrel on Ethinylestradiol metabolisms. Contraception. 55:273-282.
- Steel R.G.D., Torrie J.H. Comparaciones entre dos medias muestrales. En: *Bioestadística. Principios y procedimientos.* México McGraw-Hill/Interamericana, 2ª Ed. 1988:88-96.
- Still W.C., Kahan M., Mitra A. (1978). Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. J. Org. Chem. 43:2923-2925.
- Suissa S., Blais L., Spitzer W. O., Cusson J., Lewis M., Heinemann L. (1997). First-time use of newer oral contraceptives and the risk of venous thromboembolism. Contraception 56:141-146.
- Sullivan H., Furniss H., Spona J., Elstein M. (1999). Effect of 21-day and 24-day oral contraceptive regimens containing gestodene (60 ug) and ethinyl estradiol (15 ug) on ovarian activity. Fertil Steril 72:115-20
- Thorneycroft I.H. (1998). Cycle control with oral contraceptives: A review of the literature. Am. J. Obstet Gynecol. 180:S280-S287.

- Thorneycroft I.H.(1999). Update on androgenicity. Am. J. Obstet. Gynecol. 180:S288-S294.
- Thorogood M. (1998) Oral contraceptives and thrombosis. Curr. Opin. Hematol. 5:350-354.
- Vilchis F., Chávez B., Pérez A.E., García G.A., Angeles A., Pérez-Palacios G.(1986). Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. J. Steroid Biochem. 24:525-531.
- Wakeling A.E., Bowler J. (1992). ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. J. Steroid Biochem. Molec Biol. 43:173-177.
- Ward S., Back D.J. (1993). Metabolism of gestodene in human liver cytosol and microsomes in vitro. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.46:235-243.
- Weiss G. (1999) Risk of venous thromboembolism with third-generation oral contraceptives: A review.Am. J. Obstet. Gynecol. 180:S295-S301.
- WHO (1995a). World Health Organization collaborative study of cardiovascular disease and steroid hormone contraception: Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: result of international multicentre case-control study. Lancet. 346:1575-1582.
- WHO (1995b). World Health Organization Collaborative Study of Cardiovascular Disease And Steroid Hormone Contraception: Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. Lancet 346:1582-1588.
- WHO a report of Scientific Group (1998) Cardiovascular disease and steroid hormone contraception. WHO technical report series 877:41-51
- Wiegratz I., Jung-Hoffmann C., Gross W., Kuhl H. (1998). Effect of two oral contraceptives containing ethinyl estradiol and gestodene or norgestimate on different lipid and lipoprotein parameters. Contraception 58:83-91.
- Wilde M.I., Balfour J.A.(1995). Gestodene. A review of its pharmacology, efficacy and tolerability in combined contraceptive preparations. Drugs. 50:364-395.
- Wilson J.D., Foster D.W., Kronenberg H.M., Larsen P.R. Mechanisms of action of hormones that act as transcription-regulatory factors.1998 En: *Williams textbook of Endocrinology*.Philadelphia:W.B. Saunders Company. 55-143.
- Winkler U.H. (1998). Effects on hemostatic variables of desogestrel- and gestodene-containing oral contraceptives in comparison with levonorgestrel-containing oral contraceptives: A review. Am. J. Obstet. Gynecol. 179:S51-61

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA