



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**“EVALUACION TRANSCRIPCIONAL DE LA ACTIVIDAD
ANDROGENICA *IN VITRO* DE TRES PROGESTINAS
DERIVADAS DE LA 19-NORTESTOSTERONA Y SUS
METABOLITOS REDUCIDOS EN EL ANILLO A”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

Bióloga: NORMA ANGÉLICA GALICIA CANALES

Directora de Tesis: Dra. Ana María Pasapera Limón.



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN
MEDICINA REPRODUCTIVA, HOSPITAL DE GINECOLOGÍA-OBSTETRICIA "LUIS CASTELAZO
AYALA" CLINICA 4, DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, BAJO LA DIRECCIÓN
DE LA DRA. ANA MARÍA PASAPERA LIMÓN.

MI AGRADECIMIENTO A CONACYT, DGEP Y AL IMSS POR EL APOYO ECONÓMICO BRINDADO PARA LA REALIZACIÓN DE DICHO TRABAJO. ASI COMO, A LA FACULTAD DE CIENCIAS Y A LA FACULTAD DE MEDICINA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO POR MI FORMACIÓN ACADEMICA.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Langley por su colaboración en la realización de este trabajo, por proporcionarme los plásmidos del sistema de vectores reporteros y del sistema del doble híbrido del receptor de andrógenos, por el tiempo invertido en la revisión de la tesis y por sus valiosas sugerencias para enriquecer la tesis.

A la Dra. Ana María Pasapera Limón por su asesoría, sus comentarios, sugerencias y por apoyarme a concluir con este trabajo.

Al Dr. Enrique Pedernera, al Dr. Alejandro García por su disposición, su comprensión para finalizar la escritura de la tesis. Así también, por haber formado parte del Comité Tutoral y haber dirigido el proyecto de Tesis.

Al Dr. Pedro Nicolás Velázquez, a la Dra. Irma Peralta por su apoyo incondicional, por estar siempre interesados en las cosas que realizo y junto con la Dra. Beatriz González por impulsarme a concluir el trabajo de tesis y permitirme hacer uso de sus respectivos laboratorios y equipo para la búsqueda de información y la escritura de la tesis.

A la Dra. Yolanda López Vidal por su apoyo y colaboración, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible obtener el grado.

A la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva del Hospital de Ginecología-Obstetricia de la Clínica 4 "Luis Castelazo Ayala" por permitirme el uso de sus instalaciones para desarrollar este trabajo.

A todos los Investigadores, Técnicos y compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva por su apoyo y amistad.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, a la Facultad de Ciencias y la Facultad de Medicina por mi formación Académica.

DEDICATORIAS

A Dios por brindarme la oportunidad de vivir todas las cosas que vivo día a día, por estar siempre cerca de mí y por darme la fuerza suficiente para enfrentar las adversidades.

A mis padres Concepción Canales y Tomás Galicia por estar siempre a mi lado, por apoyarme en mis decisiones, por demostrarme que a pesar de todas las adversidades siempre se debe de continuar sin decaer.

Aquellas personas tan especiales que nos dan la oportunidad de seguir viviendo a través de sus órganos y tejidos, y sobre todo aquella persona[†] que sin conocerme me dio la oportunidad de volver a ver nuevamente. Además, de enseñarme a responder con la misma actitud ante los demás.

INSTANTES

Sí pudiera vivir nuevamente mi vida
En la próxima trataría de cometer más errores,
No trataría de ser tan perfecto, me relajaría más,
Sería más tonto de lo que he sido, de hecho
Tomaría muy pocas cosas con seriedad,
Sería menos higiénico,
Correría más riesgos, haría más viajes, contemplaría,
Más atardeceres, subiría más montañas, nadaría más ríos,
Iría a más lugares a donde nunca he ido,
Comería más helados y menos habas,
Tendría más problemas reales y menos imaginarios.
Yo fui una de esas personas que vivió sensata y
Políticamente cada momento de su vida,
Claro que tuve momentos de alegría
Pero sí pudiera volver atrás
Trataría de tener solamente buenos momentos.
Por sí no lo saben, de eso esta hecha la vida,
sólo de momentos;
No te pierdas el ahora.
Yo era uno de esos que nunca iban a ninguna parte
Sin un termómetro, una bolsa de agua caliente,
Un paraguas y un paracaídas.
Sí pudiera volver a vivir, viajaría más liviano,
Sí pudiera volver a vivir, comenzaría a andar descalzo
A principios de la primavera y seguiría así hasta
Concluir el otoño.
Daría más vueltas en calesita, contemplaría más
Amaneceres y jugaría con los niños.
Sí tuviera otra vez la vida por delante...
Pero tengo 85 años y sé que estoy muriendo.

Gorge Luis Borges

INDICE

ABSTRACT

RESUMEN

ABREVIATURAS

| | Páginas |
|--|---------|
| 1. INTRODUCCION | |
| 1.1 Ciclo Menstrual..... | 1 |
| 1.2 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada..... | 5 |
| 1.3 La Progesterona..... | 8 |
| 1.4 Actividad Biológica de la Progesterona..... | 11 |
| 1.5 Progestinas Sintéticas..... | 12 |
| 1.6 Clasificación de las Progestinas..... | 15 |
| 1.6.1 Pregnanos..... | 16 |
| 1.6.2 Estranos..... | 16 |
| 1.6.3 Gonanos..... | 17 |
| 1.6.3.1 Gonanos Secundarios..... | 17 |
| 1.6.3.2 Progestágenos Híbridos | 17 |
| 1.7 Receptores Nucleares..... | 22 |
| 1.8 Mecanismo de Acción de los Receptores a Hormonas Esteroides | 27 |
| 1.9 Receptor de Andrógenos | 29 |
| 1.9.1 Dominio Amino Terminal..... | 31 |
| 1.9.2 Dominio de unión al ADN | 32 |
| 1.9.3 Región Bisagra..... | 33 |
| 1.9.4 Dominio de unión al Ligando..... | 34 |
| 2. ANTECEDENTES | 39 |
| 2.1 Androgenicidad de las Progestinas..... | 39 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 48 |
| 4. HIPÓTESIS | 50 |
| 5. OBJETIVOS | 51 |
| 5.1 Objetivo General..... | 51 |
| 5.2 Objetivos Específicos..... | 51 |
| 6. JUSTIFICACIÓN | 52 |
| 7. METODOLOGIA | 53 |
| 7.1 Material Biológico..... | 53 |
| 7.1.1. Vectores de Expresión..... | 53 |
| 7.1.2 Vectores Reporteros..... | 53 |
| 7.1. 3 Vectores de Expresión para el Sistema del Doble Híbrido | 53 |
| 7.2 Esteroides..... | 54 |
| 7.3 Cepa Bacteriana..... | 54 |

| | |
|---|----|
| 7.4 Cultivo Celular..... | 55 |
| 7.5 Métodos..... | 55 |
| 7.5.1 Transformación de Bacterias..... | 55 |
| 7.5.2 Manipulación del DNA..... | 56 |
| 7.5.2.1 Extracción y Purificación del DNA plásmidico..... | 56 |
| 7.5.3 Transfección Transitoria..... | 56 |
| 7.5.4 Estimulación Hormonal..... | 57 |
| 7.5.5 Ensayo Enzimático de Vectores Reporteros..... | 57 |
| 7.5.6 Ensayo de β -galactosidasa..... | 57 |
| 7.5.7 Análisis Estadístico..... | 57 |
| 7.5.8 Sistema del vector reportero MMTV-LUC y el RA..... | 58 |
| 7.5.9 Interacción del Sistema del Doble Híbrido de RA... .. | 61 |
| | |
| 8. RESULTADOS | 64 |
| 8.1 Actividad Androgénica inducida por NET, LNG, GSD y sus... .. | 64 |
| 8.2 Evaluación Androgénica de NET, LNG, GSD y sus | 68 |
| 8.3 Interacción Amino y Carboxilo Terminal de RA estimulado... .. | 70 |
| | |
| 9. DISCUSION | 74 |
| | |
| 10. CONCLUSIONES | 79 |
| | |
| 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |

ABSTRACT

Norethisterone, Levonorgestrel and Gestodene are synthetic 19-nortestosterone-derived progestins widely employed as contraceptives as well as in hormone replacement therapy. The bioconversion of these 19-Nor progestins into 5α -, $3\alpha,5\alpha$ - and $3\beta,5\alpha$ - A-ring reduced metabolites, may potentially confer to the resulting product particular agonistic or antagonistic properties.

Since the 5α -reduced metabolites are able to bind the androgen and progesterone receptors, the purpose of this study was to assess the androgenic activity of these three different synthetic progestins and their corresponding A-ring reduced metabolites at the transcriptional level. In this context, transactivation assays were performed in CV-1 cells cotransfected with expression vector for AR and MMTV-LUC as androgen-responsive reporter gene. The results obtained from these studies demonstrated that 5α -NET and NET possess a strong androgenic activity, similar than that exerted by 5α dihydrotestosterone (DHT). Levonorgestrel (LNG), Gestodene (GSD) and their 5α -reduced derivatives exert significant androgenic activity but to a lower extent. In contrast, the $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydro derivatives resulted in a significant lower androgen-induced transcriptional activation. To determine if the agonistic effects exerted by 5α reduced metabolites were mediated by inducing the conformational changes in the androgen receptor, we employed the mammalian two-hybrid assay in HeLa cells. As expected, data obtained for these studies to induce the AR NH₂-terminal and carboxyl-terminal interaction in a two-hybrid protein assay demonstrate that NET and its 5α reduced metabolite are the most potent androgenic compounds able to induce the N/C interaction, more than 40-fold induction than control. The lower affinity synthetic progestins (NET, LNG and GSD) and their corresponding A-ring 5α -reduced metabolites require higher concentrations, <100 nM to induce 10-fold induction of the N/C interaction. In contrast the $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydro derivative resulted in a significant induction of the N/C interaction at concentrations up to 100 nM. The results indicate that these assay systems are suitable for measuring the androgenic effect of different synthetic progestins at the transcriptional level. In these assays, 5α reduction of NET, LNG, and GSD exhibit potent androgenic effects at the transcriptional level correlating with the conformational changes necessary to activate the two hybrid transcription system, allowing us to confirm that the single or multiple hormonal transcription effects of these compounds are partially mediated by its A-ring-reduced derivatives after bound to the different steroid receptors at target tissues.

RESUMEN

Las progestinas sintéticas Noretisterona, Levonorgestrel y Gestodeno, derivadas de la 19-nortestosterona son fármacos que mimetizan la acción de la progesterona y son ampliamente utilizadas como agentes anticonceptivos, en la regulación del ciclo menstrual, en la terapia de reemplazo hormonal y en el tratamiento de algunos cánceres como: cérvico-uterino, mama y próstata. Se ha demostrado que estas progestinas sintéticas se biotransforman en metabolitos dihidro-reducidos y tetra-reducidos en el anillo A de la molécula de la nortestosterona a nivel de su órgano blanco y son capaces de interactuar con receptores a hormonas esteroides desencadenando efectos hormonales, agonistas o antagonistas diferentes a las del producto inicial, siendo capaces de unirse al receptor de progesterona y andrógenos y ocasionar efectos colaterales como alopecia, hirsutismo, acné y alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos..

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad androgénica de estas tres progestinas NET, LNG, GSD y sus metabolitos 5α -dihidro, $3\alpha,5\alpha$ y $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro-reducidos en el anillo A, a nivel transcripcional. Para evaluar su actividad androgénica se utilizó un modelo molecular *in vitro* altamente eficiente basado en la detección luminiscente de la expresión del gen reportero *luciferasa de luciérnaga*, cuya transcripción está regulada por *elementos de respuesta a andrógenos*, insertados en la región promotora del *virus del tumor mamario de ratón*. Para determinar las propiedades agonistas de estas progestinas y sus metabolitos correspondientes, se empleó el sistema del doble híbrido en células de mamífero y se cuantificó la afinidad de los diferentes ligandos para promover la interacción amino-carboxilo terminal del receptor de andrógenos.

Los resultados obtenidos de los ensayos de vectores reporteros demuestran que 5α -Noretisterona y Noretisterona poseen una fuerte actividad androgénica similar a Testosterona y DHT. LNG y GSD y sus metabolitos 5α -reducidos también demuestran una actividad androgénica, conjuntamente con los metabolitos $3\alpha,5\alpha$ -reducidos de estas progestinas. Con el sistema de doble híbrido, los resultados fueron semejantes, siendo capaces de promover la conformación amino-carboxilo terminal del receptor de andrógenos, pero su androgenicidad es menor en comparación a las hormonas naturales T y DHT. Finalmente, podemos concluir, que estas metodologías son adecuadas para cuantificar la actividad hormonal de las progestinas sintéticas e interactuar con el receptor de andrógenos y provocar un cambio conformacional necesario para activar la transcripción y la expresión génica. Adicionalmente, se confirma que los metabolitos de estas progestinas son capaces de interactuar con el receptor de andrógenos y su biotransformación a compuestos dihidro-reducidos aumenta su capacidad de interacción con el receptor de andrógenos, al sufrir la tetrahidro-reducción hace disminuir o anula su capacidad de interactuar con el receptor de andrógenos y probablemente este cambio conformacional, que adquiere le permite interactuar con otros receptores a hormonas esteroides y desencadenar su efecto biológico.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------|---|
| aa | Aminoácidos |
| AF-1 | Región de Transactivación 1 |
| AF-2 | Región de transactivación 2 |
| AR | Receptor de Andrógenos |
| ARE | Elemento de respuesta a andrógenos |
| C | Molécula de Carbono |
| CBP | Proteína de unión a CREB |
| 3 α ,5 α -LNG | Isómero tetra-hidroreducido de LNG |
| 3 β ,5 α -LNG | Isómero tetra-hidroreducido de LNG |
| 3 α ,5 α -NET | Isómero tetra-hidroreducido de GSD |
| 3 β ,5 α -NET | Isómero tetra-hidroreducido de GSD |
| 3 α ,5 α -NET | Isómero tetra-hidroreducido de NET |
| 3 β ,5 α -NET | Isómero tetra-hidroreducido de NET |
| 5 α -GSD | Isómero 5 α de GSD |
| 5 α -LNG | Isómero 5 α de LNG |
| 5 α -NET | Isómero 5 α de NET |
| COOH | Carboxilo Terminal |
| CTE | Extensión Carboxilo Terminal |
| DBD | Dominio de unión al DNA |
| DIR | Dominio de interacción |
| DNA ó ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ER | Receptor de estrógenos |
| ER α | Receptor de estrógenos alfa |
| ER β | Receptor de estrógenos beta |
| FSH | Hormona Folículo Estimulante |
| FTSE | Factores de transcripción de secuencia específica |
| FRET | Transferencia de energía de resonancia fluorescente |
| GR | Receptor de Glucocorticoides |
| GSD | Gestodeno |
| GTF | Factor general de transcripción |
| HAT | Actividad de acetil transferasa |
| HREs | Elemento de respuesta hormonal |
| Hsp | Proteína de choque térmico |
| Kb | kilobases |
| LBD | Dominio de unión al ligando |
| LH | Hormona Luteinizante |
| LNG | Levonorgestrel |
| LUC ó Luc | Luciferasa |
| MMTV | Virus del tumor mamario del ratón |
| MPA | Acetato de Medroxiprogesterona |
| NET | Noretisterona |
| NH ₂ | Región Amino Terminal |
| NLS | Señales de localización nuclear |
| NPC | Complejo del poro nuclear |

| | |
|----------------|---|
| NR | Receptores nucleares |
| NTD | Dominio amino terminal |
| PA | Plásmínogeno |
| P ₄ | Progesterona |
| PCOS | Síndrome de Ovario Poliquístico |
| PPAR α | Factor proliferador de peroxisómas alfa |
| PR | Receptor de progesterona |
| PRA | Isoforma A del receptor de progesterona |
| PRB | Isoforma B del receptor de progesterona |
| RAR | Receptor de ácido trans-retinoico |
| RM | Receptor de mineralocorticoides |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNAP | RNA polimerasa |
| RXR | Receptor de ácido 9- <i>cis</i> retinoico |
| SHBG | Hormona transportadora de globulinas |
| TAF | Factor de interacción con TBP |
| TBP | Proteína de unión a la caja TATA |
| TR | Receptor de hormona tiroidea |

1. INTRODUCCION

1.1 EL CICLO MENSTRUAL

El útero juega un papel importante en la sobrevivencia de las especies; en él ocurren procesos vitales para la perpetuación de las especies, el más importante es la implantación del huevo fertilizado. En los mamíferos el útero esta compuesto de varias capas una de ellas es el endometrio, es un tejido muy dinámico que se prepara para la impantación y desencadena una serie de ciclos que incluyen proliferación, diferenciación y desprendimientos de la capa endometrial, lo que contituye la menstruación en respuesta a factores endócrinos y paracrinos.

El ciclo menstrual es la secuencia repetitiva de la función del sistema hipotálamo-hipófisis-gónada (ovario) con cambios morfológicos y fisiológicos en los órganos blanco: ovario, útero, oviducto y vagina (tracto reproductivo). El primer día que marca el inicio del ciclo, es el comienzo del sangrado menstrual. El promedio de duración de cada ciclo es de 28 a 40 días, aproximadamente (Yen, 1991).

Los cambios estructurales y funcionales que ocurren en los órganos genitales (blanco), dentro del lapso de tiempo que dura cada ciclo, están regulados bajo el dominio de las hormonas sexuales de los ovarios. El ciclo menstrual se divide en dos fases, de acuerdo al desarrollo ovárico, denominadas fase folicular y fase lútea (Figura 1). Adicionalmente, se ha llamado ciclo menstrual bifásico cuando las dos fases están presentes.

La fase folicular, comprende una duración aproximada de 13 días, es el período en el cual ocurre el desarrollo de un folículo preovulatorio. La hormona folículo estimulante (FSH) promueve el desarrollo de los folículos antrales a preovulatorios y la maduración del ovocito. Adicionalmente, induce la proliferación celular y la síntesis tanto de su receptor como de varios factores que de forma autócrina o parácrina regulan la función de las células de la granulosa, potenciando o contrarrestando los efectos de las gonadotropinas (Yen, 1991; Fauser y van Exuden, 1997).

Los andrógenos producidos por las células de la teca, debido al efecto trófico de la hormona luteinizante (LH), son aromatizadas a estrógenos en las células de la granulosa gracias a la acción de la FSH, la cual induce la transcripción de la P₄₅₀ aromatasa (Misrahi *et al.*, 1998).

La selección del folículo destinado a ovular esta asociado a la alta capacidad de biosintetizar y secretar andrógenos, estrógenos, progestágenos e inhibina (Tesark y Mendoza, 1995). La integridad de la producción de estas hormonas es dependiente de la interacción entre las células de la teca y las células de la granulosa. La actividad de cada una, esta modulada por cambios en las enzimas esteroideogénicas, del

citocromo P₄₅₀ aromatasa y por una variedad de factores de crecimiento que operan por medio de mecanismos autócrinos y parácrinos (Zelevnik y Benyo, 1994; Sullivan, 1995).

A su vez los estrógenos inducen la proliferación de las células de la granulosa y, conjuntamente con la FSH, la síntesis de receptores para LH. La presencia de LH durante la fase folicular es indispensable para proveer a las células de la granulosa los sustratos para la aromatización; su ausencia en esta fase no inhibe el crecimiento folicular, pero si la maduración y la capacidad del ovario para llevar a cabo completamente el proceso esteroidogénico (Hillier *et al.*, 1994).

La fase lútea u ovulación, en un ciclo menstrual normal de 28 días, la ovulación ocurre aproximadamente a la mitad, es decir a los 14 días después del comienzo de la menstruación.

La LH es la encargada de la producción de progesterona y de la luteinización del folículo preovulatorio, así como, para completar la maduración del ovocito, la reanudación de su meiosis (la FSH también participa) y la ruptura folicular. Estos últimos eventos ocurren en la mitad del ciclo, durante el cual la secreción de la LH se incrementa significativamente de forma temporal durante aproximadamente 48 horas (Hilliart *et al.*, 1994). Durante esta fase del ciclo la LH y la FSH actúan de forma sinérgica lo que favorece al crecimiento del folículo en los días previos a la ovulación (Fillican, 1999). La tasa de secreción de estrógenos comienza a disminuir aproximadamente un día antes de la ovulación a la vez que comienzan a secretarse pequeñas cantidades de progesterona (Yen, 1991).

Con el pico preovulatorio de LH ocurren una serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que culminan con la ruptura folicular y la ovulación. El folículo presenta un aumento en el flujo sanguíneo y en la permeabilidad capilar, lo que permite que el líquido intersticial y el folicular sean ricos en proteínas plasmáticas, entre ellos el plasminógeno. Por otro lado, la LH estimula la síntesis de proteínas responsables de la diferenciación de las células de la granulosa para convertirse en células luteinizantes y de la secreción de esteroides, así como, del activador de plasminógeno (PA).

El PA convierte el plasminógeno del líquido folicular e intersticial en plasmina, la cual activa a la colagenasa que junto con otras proteasas de serina completan la proteólisis de la colágena. Finalmente disminuye la tensión de la pared folicular, hasta que ocurre la ruptura del folículo y por consiguiente la ovulación (Espey y Lipner, 1999).

Durante las primeras horas tras la expulsión del óvulo del folículo, las células de la granulosa interna y de la teca, se convierten rápidamente en células luteínicas. Aumentan su diámetro dos veces o más, y se llenan de inclusiones lipídicas. Este proceso se denomina luteinización y al conjunto de la masa de las células se denomina cuerpo lúteo.

En la fase lútea, las concentraciones plasmáticas de FSH alcanzan los niveles más bajos. No se requiere de FSH para mantener el cuerpo lúteo. La combinación de inhibina con estrógenos y progesterona, suprime la secreción de FSH y previene la iniciación de la foliculogénesis. Por otro lado, la LH es indispensable para la síntesis de las hormonas sexuales, principalmente progesterona e inhibina.

Cuando en la fase lútea empieza a decaer la concentración de estrógenos y progesterona, ocurre un incremento temporal en los pulsos de la hormona liberadora de gonadotropinas (Gn-RH), el cual se va incrementando progresivamente a lo largo de los primeros días de la fase folicular (Yen, 1991).

En la transición de la fase lútea-folicular, se lleva a cabo la foliculogénesis. Esta comienza en la fase lútea tardía del ciclo previo y continúa durante la transición lútea-folicular. En este punto, la declinación del cuerpo lúteo esta asociada con la rápida disminución de las concentraciones plasmáticas de estradiol y resulta en el incremento de la secreción de FSH (aproximadamente dos días antes de la menstruación).

Esta fase se distingue por una secuencia de cambios dinámicos que envuelven la terminación de la función lútea y la reactivación del sistema Gn-RH-gonadotropinas (Figura 1).

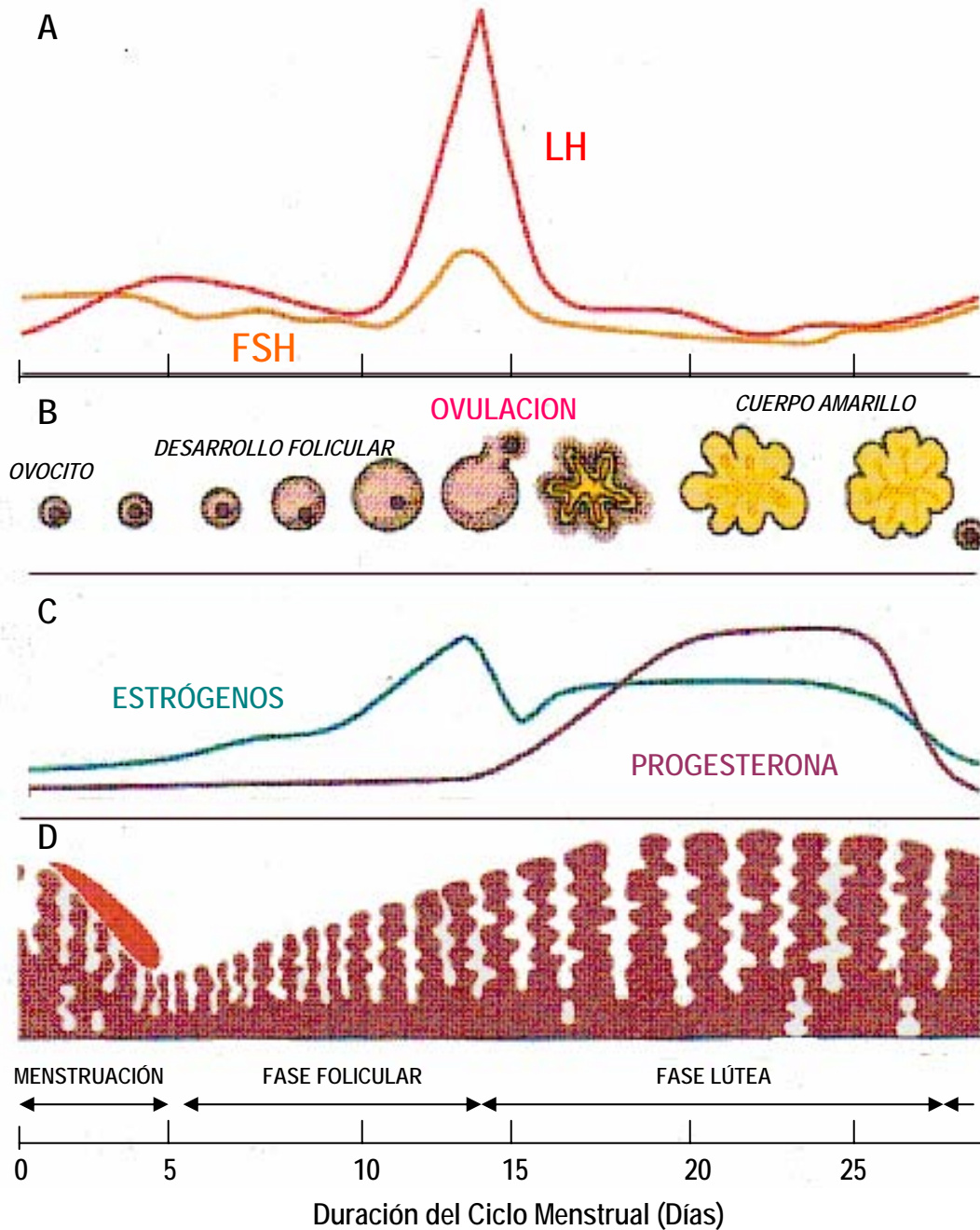


Figura 1. Ciclo menstrual. La coordinación del ciclo B) ovárico, y D) uterino, está controlado por las A) hormonas gonadotrópicas y C) hormonas esteroides. Durante la fase folicular el ovocito madura y el útero se prepara para recibirlo, en ausencia de fertilización, el endometrio inicia su desprendimiento, desencadenando la menstruación (Scott, 2000).

El ciclo menstrual es crucial para la reproducción y representa la integración de tres diferentes ciclos 1) el ciclo ovárico, 2) el ciclo uterino y 3) el ciclo cervical que se encarga de permitir la entrada del espermatozoide al tracto reproductor femenino en el momento adecuado. Estos eventos se comunican a través de las hormonas que dependen de la liberación pulsátil de Gn-RH, del hipotálamo y la posterior secreción episódica de gonadotropinas hipofisarias (Couchman y Hammond, 2000).

1.2 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GÓNADA

En las mujeres, la reproducción forma parte de un concierto armonioso basado en un sistema de comunicaciones entre hipotálamo-hipófisis-gónada (ovario) para lograr la madurez sexual en la pubertad, el desarrollo del folículo ovárico y la ovulación.

La jerarquía del control cíclico comienza en el hipotálamo, situado en el cerebro. Este órgano cerebral influye sobre la producción de hormonas polipeptídicas que actúan sobre el lóbulo anterior de la glándula hipofisaria (adenohipófisis). Las hormonas hipofisarias (LH y FSH) se dispersan por la sangre a todo el organismo y actúan sobre los ovarios, que a su vez se estimulan a producir sus propias hormonas sexuales esteroideas (Carlson, 2000). (Figura 2)

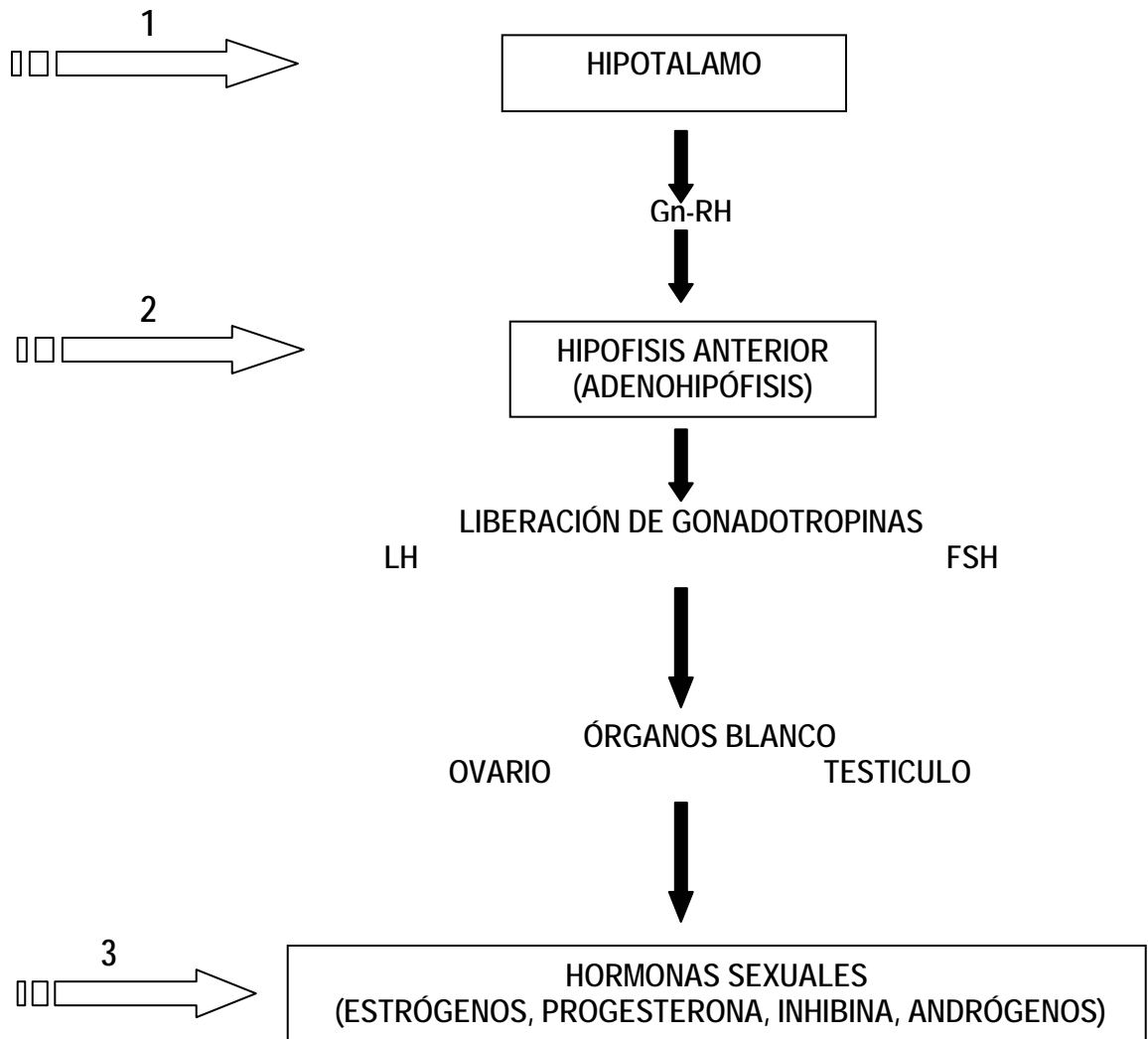


Figura 2. Diagrama de la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada con tres sitios de retroalimentación. Las flechas (1-3) indican los niveles de retroalimentación positiva o negativa.

Existe un reloj neuronal en el hipotálamo que se activa a intervalos regulares, lo que produce la liberación periódica de hormona liberadora de gonadotropina hacia la vasculatura porta hipotalámica-hipofisiaria. A continuación la Gn-RH interactúa con su receptor afín en gonadotropos y causa la liberación de LH y FSH a partir de la adenohipófisis. Las gonadotropinas LH y FSH, originan el crecimiento y la maduración del folículo de De Graaf en los ovarios, y de la producción de estrógenos y progesterona por dichos órganos. Esta última a su vez ejerce regulación mediante retroalimentación sobre hipófisis e hipotálamo.

Dado que la liberación de Gn-RH es intermitente, la liberación de LH y FSH es pulsátil, hay un generador de impulsos de hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica (Knobil, 1981; Wilson *et al.*, 1984).

La naturaleza intermitente, pulsátil, de la liberación de hormonas es esencial en la conservación de ciclos menstruales ovulatorios normales, puesto que, la administración constante de Gn-RH da por resultado el cese de la liberación de LH y FSH, disminuyendo la producción de estradiol y progesterona.

En la figura 2 se representan esquemáticamente los puntos de control hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. El primer nivel de control hormonal reside en el hipotálamo, pulsos de hormona liberadora de gonadotropinas (Gn-RH) inducen la liberación de gonadotropina en la hipófisis y ponen en marcha el ciclo ovárico mensual con el desarrollo del folículo, biosíntesis de esteroides y ovulación.

En la hipófisis, mediante la producción de sus hormonas en respuesta a la estimulación del hipotálamo, existe un segundo nivel de control hormonal de la reproducción. La adenohipófisis (parte anterior de la hipófisis), produce diversas hormonas en respuesta a factores ambientales que son transportados por el sistema porta hipofisiario. Bajo la influencia de la Gn-RH y la retroalimentación directa de los niveles sanguíneos de las hormonas esteroides, la adenohipófisis segrega dos hormonas gonadotrópicas polipeptídicas, la FSH y la LH. En ausencia de un factor inhibidor (dopamina) procedente del hipotálamo, la hipófisis anterior también produce prolactina, que actúa sobre la glándula mamaria (Teppa y Terán, 2002).

Los ovarios, y durante el embarazo la placenta, constituyen el tercer nivel de control hormonal. En respuesta a los niveles sanguíneos de las hormonas de la adenohipófisis, las células de la granulosa de los folículos ováricos convierten los andrógenos (androstenediona y testosterona), sintetizados por la teca interna, en estrógenos (principalmente estrona y el 17β -estradiol) que luego pasan a la circulación sanguínea. Después de la ovulación, la progesterona es el principal producto secretor del folículo, luego de su conversión en cuerpo lúteo. Hacia el final del embarazo, la placenta complementa la producción de la hormona esteroide ovárica mediante la síntesis de sus propios estrógenos y progestágenos. También produce la hormona polipeptídica denominada gonadotropina coriónica humana (HCG) que actúa en el ovario manteniendo la actividad del cuerpo lúteo durante el embarazo. El lactógeno placentario humano (somatotropina) actúa

sobre el cuerpo amarillo, promueve el desarrollo de la mama porque potencia los efectos de los estrógenos y la progesterona y estimula la síntesis de la leche materna.

Los puntos de control funcionan a través de los mecanismos de retroalimentación positiva o negativa. La retroalimentación es negativa cuando las hormonas sexuales reducen su secreción por órdenes del hipotálamo-hipófisis. Se convierte en retroalimentación positiva cuando la actividad endócrina del hipotálamo-hipófisis aumenta.

1.3 LA PROGESTERONA

La gran mayoría de las funciones fisiológicas que se realizan en el organismo son a través de la acción de las hormonas esteroides, las cuales están representadas químicamente por una gran diversidad de moléculas que median una multitud de efectos esenciales como: el mantenimiento del embarazo, la conducta, el metabolismo, la reproducción, el balance electrolítico, la regulación del sistema inmunológico y la respuesta inflamatoria, en mamíferos y en vertebrados (Nobel *et al.*, 2001). Estos incluyen ácidos biliares, vitamina D, algunos alcaloides, glucósidos cardíacos, sapogeninas, y esteroides. Su nombre deriva de la palabra griega *estereos-sólido*, lo cual denota que los esteroides constituyen una familia sólida residual que permanece después de la saponificación de las grasas animales. Los esteroides se han definido por su estructura química como lípidos no saponificables, con una escasa solubilidad en agua y solubles en solventes orgánicos. Tienen en común el poseer como núcleo químico el ciclopentanoperhidrofenantreno. (Leningher *et al.*, 1994).

La mayoría de las hormonas esteroides sexuales (estrógenos, progestágenos y andrógenos), se biosintetizan en las glándulas de secreción interna (suprarrenal, ovario y testículo) y en otros órganos que también tienen actividad esteroideogénica como placenta e hígado fetal. Debe señalarse, que algunas hormonas se forman a partir de sustratos esteroides a nivel de los órganos blanco. El colesterol es el esteroide de mayor importancia y es el precursor de las hormonas esteroides, tiene una estructura de 27 átomos de carbono (C₂₇).

La progesterona (P₄), aislada en (1929) por Corner y Allan, es la hormona esteroide que participa en la ovulación, realiza 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 la lactancia. Adicionalmente, en forma conjunta con los estrógenos, modula un número importante de efectos primordiales en el sistema nervioso central y en órganos periféricos durante la etapa reproductora de la vida. (Lemus *et al.*, 2004, Drummond, 2006).

La estructura química de la progesterona y sus derivados hidroxilados, reducidos o ambos (progesterona natural) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono. Los órganos encargados de la 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 (Graham *et al.*, 1997; Nobel *et al.*, 2001; Serrano Molina, 2003).

La biotransformación de colesterol a progesterona implica tres cambios conformacionales en la molécula e implica pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral C-17, oxidación del grupo alcohol en el C-3 y la migración del doble enlace del anillo B al anillo A. La molécula de progesterona, una vez que se ha sintetizado, puede servir como sustrato para la síntesis de un grupo de compuestos conocidos como progestágenos naturales (Figura 3). 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 órganos blancos. Estas modificaciones enzimáticas de la progesterona modulan su actividad biológica intrínseca y ocurren fundamentalmente en los anillos A y D, así como, en la cadena lateral (Lemus y Pérez-Palacios, 2004).

Los órganos principales donde actúa la P₄ son: el útero, la glándula mamaria y el cerebro (Graham y Clarke, 1997). La P₄ se une al receptor de progesterona (isoforma A o B) y desencadena su efecto biológico.

Las células que son blanco de acción de la progesterona como el útero, sufren un aumento en la cantidad de receptor de progesterona inducido por la acción de los estrógenos de tal forma que estas células son así preparadas para responder al estímulo de la progesterona después de la ovulación. Dado que incrementan las concentraciones de progesterona en el plasma, es la responsable de la falta de la ovulación en el embarazo, vía un sistema de retroalimentación negativo en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, éste efecto inhibitorio descrito desde hace muchos años fue la base y principio de la creación de muchos de los anticonceptivos que contienen un análogo de la P₄, denominados progestinas sintéticas) (Bardin *et al.*, 1983).

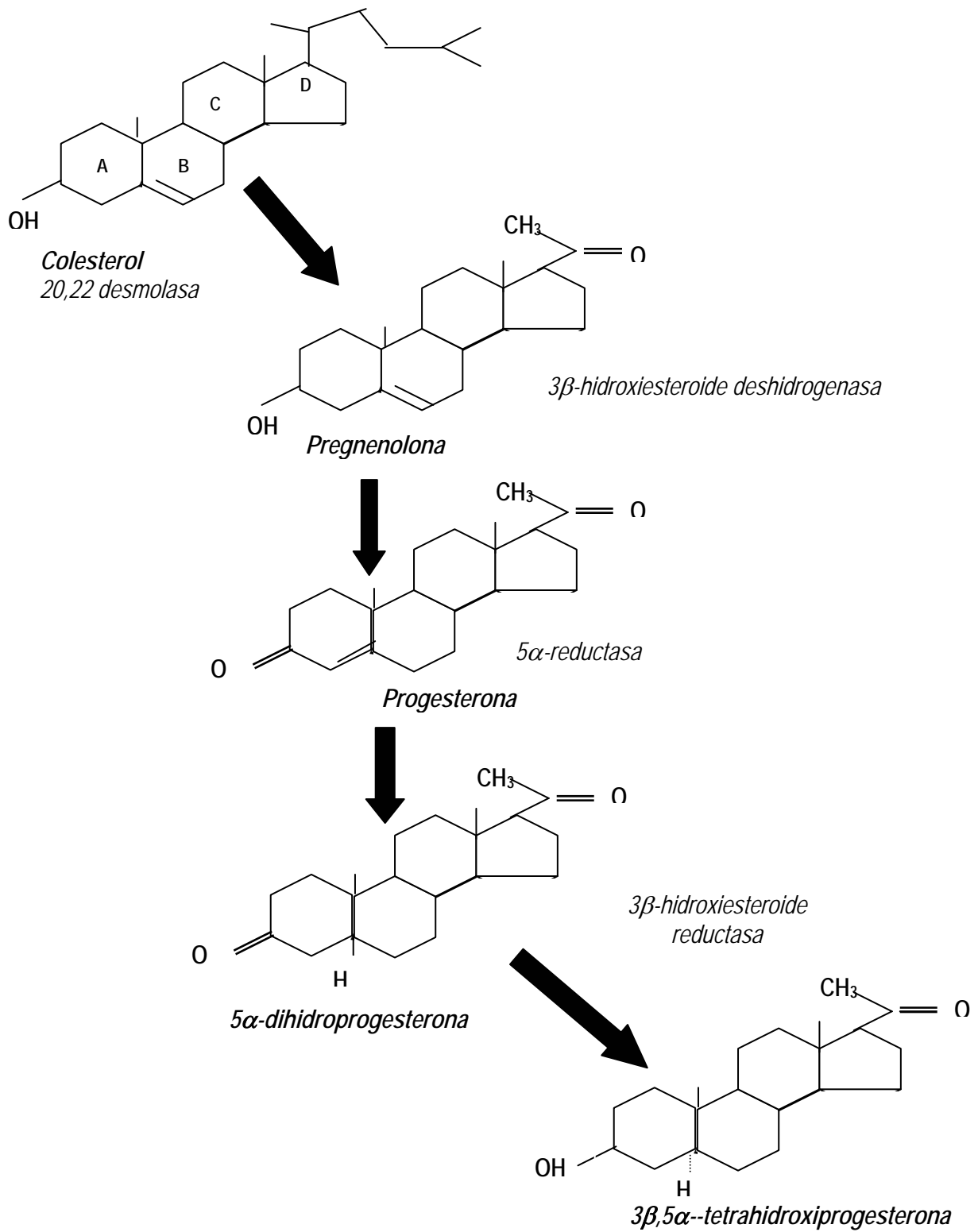


Figura 3. Biosíntesis de la progesterona a partir del colesterol y formación de progestinas naturales reducidas en el anillo A (dihidro y tetrahidro-derivados) a partir de la P₄.

1.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PROGESTERONA

La mayoría de los efectos inducidos por la progesterona, sus productos de conversión metabólica o ambos, a nivel del aparato reproductor femenino, requieren de la preparación previa de los órganos blancos por medio de la acción de estrógenos. Esta dependencia estrogénica de la progesterona obedece a que la síntesis del receptor intracelular de progesterona es regulado por estrógenos (Lemus y Pérez-Palacios, 2003). Sin embargo, algunas otras acciones de la progesterona y/o sus metabolitos, particularmente en el sistema nervioso central, no requieren del efecto previo de los estrógenos, pero si requieren de dos mecanismos de acción: uno genómico y no genómico (Zeng *et al.*, 1994).

Entre los efectos estrógeno-dependientes más importantes de la progesterona y de las progestinas se encuentra: el de la preparación adecuada del endometrio para efectuarse la implantación del óvulo fecundado. Este proceso incluye la maduración del endometrio y de la capa muscular de las trompas de Falopio. La progesterona induce cambios fisicoquímicos en el moco cervical, que lo hacen inaccesible a la penetración espermática. Una vez implantado el huevo, el papel de la progesterona es imprescindible para el mantenimiento de la gestación. Durante esta etapa, la progesterona causa relajación del músculo uterino y disminuye la excitabilidad del miometrio; Adicionalmente, asegura el crecimiento uterino a través del aumento de proteínas, glucagón, lípidos y colágena. En los roedores, la progesterona regula la producción de uteroglobina en el útero gestante. Adjuntamente, ejerce un efecto inmunosupresor, por ello contribuye a evitar el rechazo del producto de la concepción. En etapas finales de la gestación, la progesterona induce el desarrollo de los alvéolos secretores de la glándula mamaria, hecho necesario para el proceso de lactogénesis (Lemus y Pérez-Palacios, 2003).

Durante el ciclo menstrual, la progesterona y las progestinas desempeñan un importante papel regulador en la secreción de gonadotropinas hipofisarias a través de los mecanismos de retroalimentación a diferentes niveles del sistema nervioso central. Por otra parte, los progestágenos naturales y sintéticos ejercen un efecto antigonadotrópico (retroalimentación negativa), lo cual ha conducido a la síntesis de un gran número de derivados que en la actualidad se utilizan como agentes reguladores de la fertilidad.

La progesterona *per se* participa también, en la liberación de dopamina de las terminales del sistema negroestriado, un proceso de gran importancia neuroendócrina. A dosis fisiológicas, la progesterona puede ejercer un efecto natriurético transitorio y parece no tener efectos importantes o significativos sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

En plasma, la progesterona está unida a albúmina y a la globulina de unión a corticosteroides (CBG), pero no muestra unión apreciable a la globulina de unión a esteroides sexuales (SHBG). La vida media de la

progesterona es de alrededor de 5 minutos y la hormona se metaboliza principalmente en hígado hasta generar metabolitos hidroxilados y sus conjugados son sulfatados y glucurónicos (Graham y Clarke, 1997). La vía común en el catabolismo de la progesterona y las progestinas sintéticas incluye dos etapas secuenciales: 1) reducción del anillo A en los C-3 y C-5 y en la cadena lateral y 2) formación de glucorónidos. Esta última etapa es esencial para incrementar de manera significativa la polaridad de la molécula, la cual resulta en compuestos hidrofílicos que facilitan su excreción por vía urinaria y por heces fecales. Los análogos sintéticos experimentan menos metabolismo hepático y por lo tanto, su vida media es más prolongada.

1.5 PROGESTINAS SINTÉTICAS

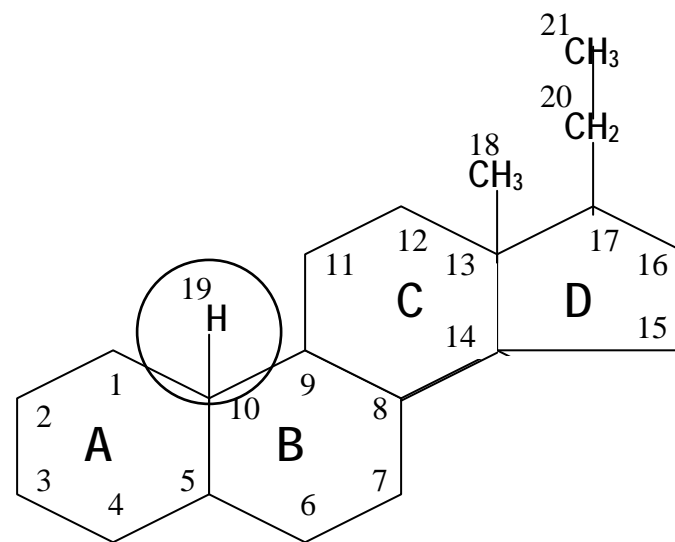
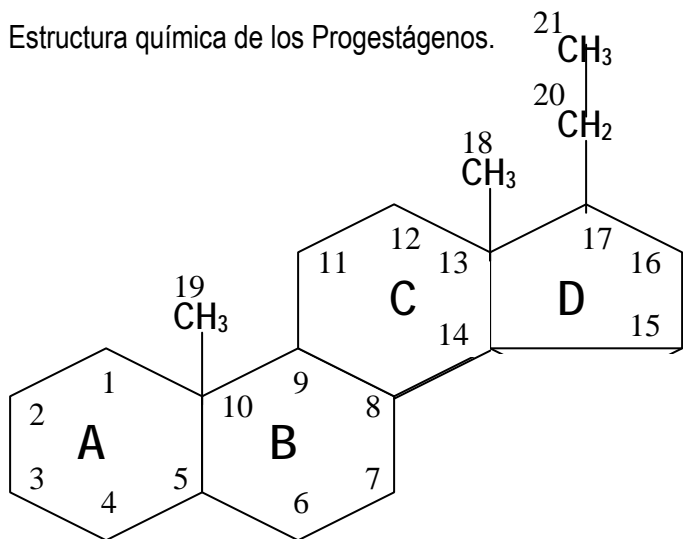
Los progestágenos incluyen a la progesterona (hormona natural), los derivados de 17α -acetoxiprogesterona de la serie de los pregnanos, los derivados de la 19-nortestosterona (estranos) y el norgestrel y compuestos similares de la serie de los gonanos. Los progestágenos han sido llamados con diversos nombres a los compuestos que poseen actividades biológicas semejantes a las de la progesterona y se les nombra progestágenos, agentes progestacionales, progestinas, progestinas sintéticas, gestágenos o gestógenos (Stanczyk, 2001).

Las progestinas o progestágenos son fármacos que transforman un endometrio tratado con estrógenos a un endometrio secretor. Han sido descubiertas gracias a modificaciones en la estructura química de las hormonas esteroides naturales, como la progesterona y la testosterona. Adicionalmente, su función ha sido comprobada experimentalmente en ensayos *in vivo* e *in vitro*. Esto ha permitido tener progestinas con mayor potencia y biodisponibilidad. Actualmente son ampliamente utilizadas como agentes anticonceptivos, en la terapia de reemplazo hormonal, en la terapia hormonal de enfermedades ginecológicas y en la regulación del cáncer de mama, cérvico-uterino, endometrial y de próstata (Apgar *et al.*, 2000; Sitruk, 2000; Hillisch *et al.*, 2003; Raudrant y Rabe, 2003; Stanczyk, 2003; Kaunitz, 2004; Benagiano *et al.*, 2004; Kuhl, 2005).

Las progestinas sintéticas, pueden ser administradas solas o en combinación con estrógenos, de manera continua o intermitente, existen en varias presentaciones, ya sea en forma de píldoras, la más común, inyección, anillos, dispositivos y hoy en día en forma de parches (Kaunitz, 2004). Las progestinas difieren ampliamente en su estructura química, en su farmacocinética y en su potencia. Como consecuencia de las modificaciones que sufre la molécula, presentan grandes diferencias entre ellas y una gran diversidad de efectos biológicos (figura 4). Por esto es importante que los médicos prescriban a las pacientes

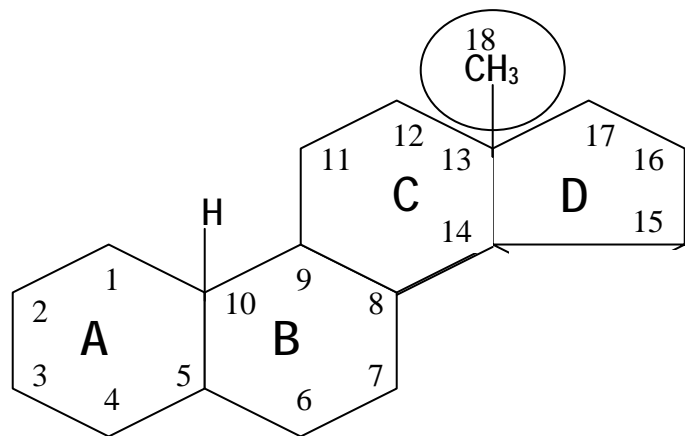
formulaciones de progestinas con la dosis adecuada, la progestina que mejor le convenga de acuerdo a sus necesidades clínicas, que conozca las propiedades biológicas que presentan y que los efectos adversos que presenten sean mínimos o nulos (Schindler *et al.*, 2003; Raudrant y Rabe, 2003; Kuhl, 2005).

Figura 4. Estructura química de los Progestágenos.

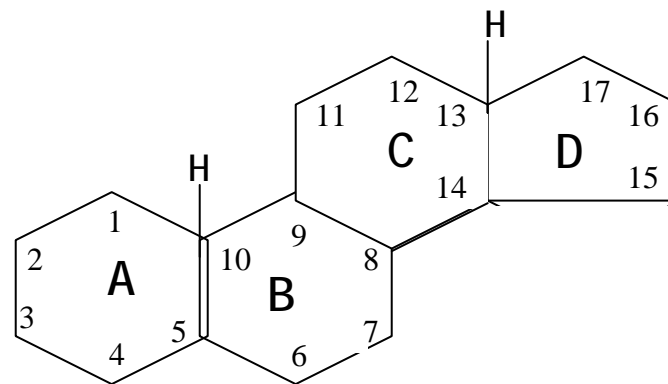


PREGNANO

NOR-PREGNANO



ESTRANO



GONANO

1.6 CLASIFICACIÓN DE LOS PROGESTINAS

Los progestágenos han sido clasificados de acuerdo a su estructura química, a su combinación con otros esteroides, por su actividad biológica, por su biodisponibilidad, por su administración y por su metabolismo o la dosis de sus componentes *v. e.*: de acuerdo a la cantidad de etinil-estradiol componente con el cual se combinan los progestágenos.

La progesterona es el esteroide natural que produce el cuerpo lúteo durante la segunda mitad del ciclo ovárico. Las progestinas sintéticas son compuestos que imitan la acción de la progesterona y pueden ser de dos tipos:

I. Derivados de la progesterona. Estos se subdividen en derivados pregnano y no pregnano; los primeros consisten en compuestos acetilados, que se emplean en la terapia de reemplazo hormonal.

La modificación química de la progesterona, al adicionarse un grupo hidroxilo y un acetato en el carbono 17, da lugar al acetato de 17-hidroxiprogesterona, la cual tiene cierta actividad progestacional. Cuando esta manipulación se lleva a cabo en el C-6, se logran progestinas como el acetato de medroxiprogesterona, el acetato de megestrol, el acetato de ciproterona, el acetato de clormadinona y la medrogestona.

Otro grupo de progestágenos relacionado con la progesterona es el de los desmetilados en el C-10 y son llamados 19-norprogestinas, las cuales incluyen demegestona, promegestona y acetato de nomegestrol.

2. Derivados de la testosterona. Estos se subdividen en dos grupos, dependiendo de si tienen o no un grupo etinilo. Los etinilados pueden subdividirse en derivados estrano y gonano. La adición del grupo etinilo al carbono 17 de la testosterona ocasiona que pierda androgenicidad y gane efecto progestacional. La eliminación del grupo metilo en el carbono 10 de la testosterona aumenta la actividad progestacional y elimina la androgenicidad. Existen cuatro derivados importantes: 1) noretisterona, 2) noretinodrel, 3) linestrenol y 4) etinodiol. La sustitución del grupo etinilo por el grupo metilo en el carbono 13 de la noretisterona da lugar a una progestina con mayor potencia llamado norgestrel. Al eliminar el grupo cetona del carbono 3 del levonorgestrel y al adicionar el grupo metileno en el C-11 se obtiene el desogestrel. El doble enlace entre los C-15 y 16 da lugar al gestodeno, y la formación de un grupo oxima en el C-3 y un grupo acetato en el C-17 produce el norgestimato (Moorjani *et al.*, 1991; Schwing y Shelton, 1997).

En la figura 5 se presenta tres grupos de hormonas esteroides sexuales: pregnanos, estranos y gonanos. Ciertos compuestos-norpregnanos, drospirenona y dinogesteno se encuentran en combinaciones con otros elementos químicos o con los mismos progestágenos; a estos se les ha denominado progestágenos híbridos (Kafriksen y Adashi, 2002; Kuhl, 2005).

Kuhn (2005) describe una nueva clasificación de las progestinas sintéticas de acuerdo a sus componentes químicos esteroideos. El toma en cuenta cuatro grupos principales de progestinas e incluye subdivisiones de gonanos primarios y secundarios. En los siguientes párrafos se describen las características y se resumen en la tabla 1 con sus propiedades biológicas (Kafrissen y Adashi, 2002; Kuhl, 2005).

1.6.1 Pregnanos

Los pregnanos pueden ser divididos en tres subgrupos. El primero consiste en derivados del acetato de 17α -hidroxiprogesterona que han sido obtenidos gracias a la manipulación química de la molécula de progesterona (figura 5). La posición del C-6 y el C-17 han sido factores importantes para su actividad progestacional. Sin embargo, la manipulación del C-17 ha ocasionado cambios radicales en cuanto a la función y actividad biológica de la molécula. La progesterona pierde su actividad biológica con la introducción de un grupo α -hidroxilo en la posición del C-17. La esterificación de este grupo no solo restaura la actividad progestacional, sino que proporciona el sustrato para el acetato del 17α -hidroxiprogesterona y lo convierte en un fármaco activo. Actualmente, se han empezado a realizar modificaciones en el C-6 de la molécula del pregnano. Un ejemplo de ello son: acetato de medroxiprogesterona (MPA), acetato de megestrol, clormadinona y ciproterona. El grupo de los pregnanos también incluyen a los progestágenos híbridos como: norpregnanos y drospirona. (Stanczyk, 2003; Schindler *et al.*, 2003; Kuhl, 2005)

1.6.2 Estranos

La estructura del estrano carece del radical angular metilo en el C-19, entre el anillo A y B. La eliminación de un radical en cierta posición de la molécula, se abrevia con la palabra NOR que significa que no hay radical. En este caso, hay una eliminación del radical metilo en el C-19 de la molécula de la testosterona y cambia sus propiedades biológicas de progestacionales a androgénicas. Sin embargo, la unión de un grupo etinil ($C\equiv CH$) en el C-17 hace que el compuesto sea más potente en sus efectos progestacionales (figura 5). Este tipo de reacciones químicas ha permitido la síntesis de noretindrona, considerado como el primer progestágeno altamente activo, capaz de llevar a cabo la anticoncepción. Todos los estranos son 19-noresteroides (McGuire *et al.*, 1990, Kuhl, 2005)

1.6.3 Gonanos

La estructura del gonano carece de radicales angulares metilados en el C-18 y C-19. Aunque hay un grupo etinil entre los anillos C y D en el C-13. Las modificaciones químicas en el gonano hace que se conviertan en

agentes progestacionales más potentes que los estranos. Se han subdividido en gonanos primarios y secundarios (Kafrissen y Adashi, 2002; Kuhl, 2005).

1.6.3.1 Gonanos Primarios

El Norgestrel y el Levonorgestrel (LNG) son derivados del 13-etilgonano. En 1960, fueron clasificados como los primeros gonanos. El norgestrel y el LNG, fueron sintetizados por adquirir mayor potencia progestacional que la noretindrona, pero también incrementan las propiedades androgénicas del compuesto, con efectos adversos a nivel metabólico. El siguiente paso fue obtener compuestos sintéticos con mayor actividad progestacional y reducir los efectos colaterales provocados por la actividad androgénica (figura 5).

1.6.3.2 Gonanos Secundarios

Hay tres gonanos que pertenecen a esta subdivisión: el norgestimato, desogestrel y gestodeno (figura 5). El norgestimato tiene un grupo oximal (-C=N-OH) en la posición 3 de la molécula del gonano. Este grupo característico hace que reduzca su actividad androgénica comparado con el levonorgestrel. El Desogestrol es un gonano muy específico, ya que la manipulación en el C-11 da la habilidad de interactuar con el receptor de progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides. La potencia de unión con el receptor va a depender de la sustitución de radicales en la estructura del gonano. El *Gestodeno* difiere del norgestrel, por su doble enlace entre el C-15 y el C-16. La sencilla configuración que adquiere con el doble enlace ocasiona una alteración en su actividad, principalmente en el arreglo del anillo D en el C-17 (Kuhl, 1996; Kuhl, 2005).

1.6.4 Progestágenos Híbridos (19-norpregnanos)

Los 19-norpregnanos son híbridos de pregnanos y estranos. Estos compuestos son derivados del acetato 17 α -hidroxiprogesterona, pero no tiene un radical metilo en el C-19 con relación a los estranos. El *nomegestrel* es un miembro importante de esta serie, aunque hay muy pocos reportes al respecto y se emplea como anticonceptivo en forma de implantes (Coutinho *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 1999)

La *nestorona* es otro miembro de la serie de los 19-norpregnanos, este posee un grupo metilo en C-16, posee una débil biodisponibilidad, hay una gran diversidad de presentaciones ya sea en inyecciones, implantes y anillos vaginales. Ensayos de afinidad hormona-receptor ha demostrado que interactúa con gran afinidad con el receptor de progesterona, mejor que el levonorgestrel, y no interactúa con el de estrógenos ni con el de andrógenos, por lo tanto sólo presenta una actividad progestacional (Kumar *et al.*, 2000).

El *Dinogestano* es un anticonceptivo reciente, incluido en los estranos y se caracteriza por un grupo cianometilo ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{N}$); Este compuesto se administra por vía oral y algunas evidencias sugieren que carece de actividad androgénica, pero posee débil efecto glucocorticoide y una actividad antigonadotrópica. Adicionalmente, inhibe el crecimiento endometrial y por lo tanto, se ha comenzado a utilizar en el tratamiento de la endometriosis (Oettel *et al.*, 1998; Deroo y Korach, 2006).

La *Drospirenona*, es un anticonceptivo derivado de la espiranolactona y es un potente esteroide con actividad antimineralocorticoide y antiandrogénica que causa retención de potasio y, por supuesto, con actividad progestacional (Kafrissen y Adashi, 2002; Kuhn, 2005).

Los efectos hormonales de estas progestinas, que se emplean como anticonceptivos, en la terapia de reemplazo hormonal y otros padecimientos, se resumen en la tabla 1.

Figura 5. Clasificación de los Progestágenos Kafirissen y Hadais, 2004; Kuhl, 2005.

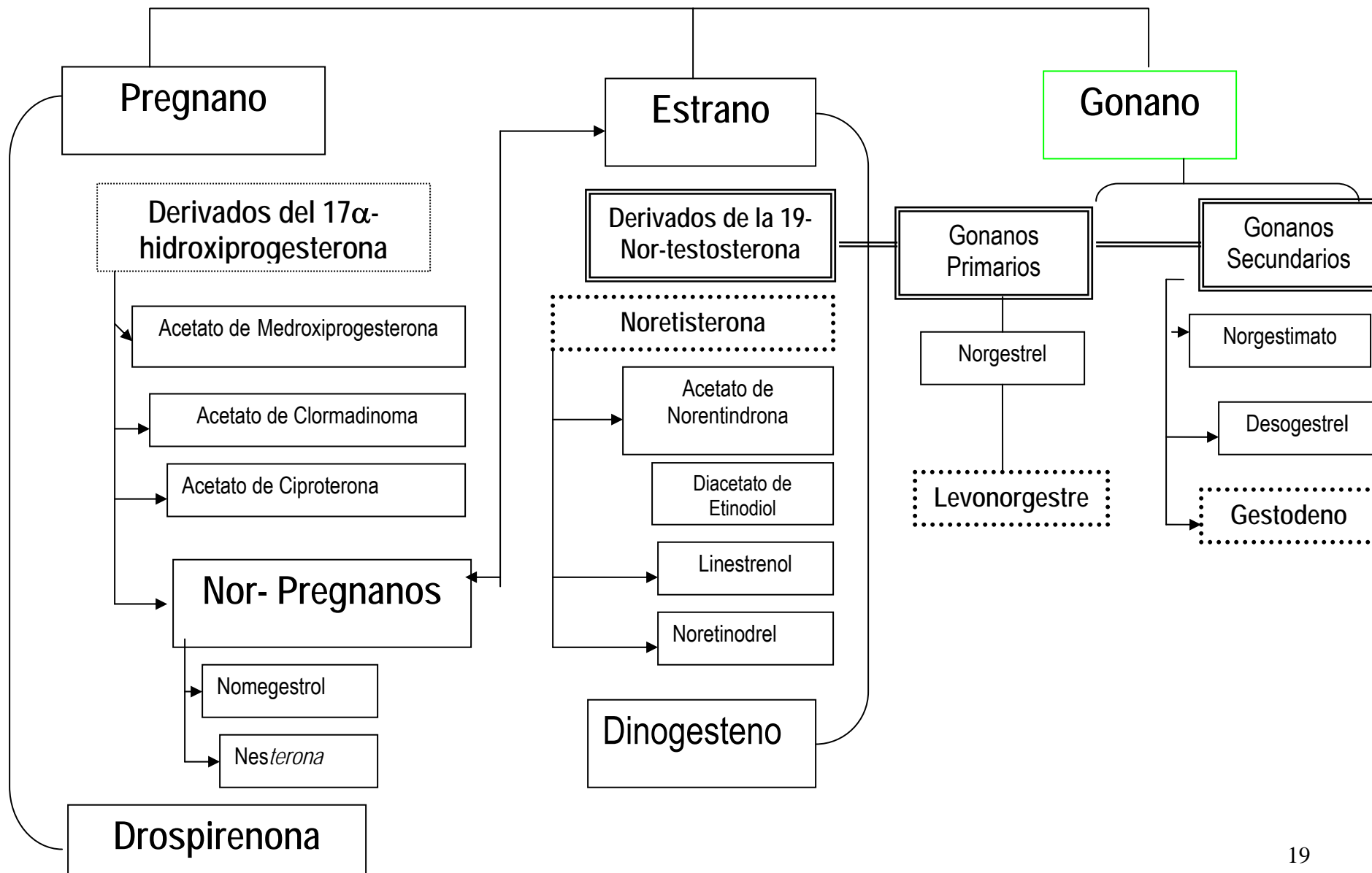


Tabla 1. Efectos Biológicos de las Progestinas Naturales y Sintéticas

| Progestina | EFECTOS HORMONALES | | | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|-----------------|-------------|--------------------|-----------------|-----------------|------------------------|
| | Progestacional | Antigonadotrópico | Antiestrogénico | Estrogénico | <i>Androgénico</i> | Antiandrogénico | Glucocorticoide | Antimineralocorticoide |
| Progesterona | + | + | + | --- | --- | ± | + | + |
| Didrogestrona | + | --- | + | --- | --- | ± | --- | ± |
| Medrogestona | + | + | + | --- | --- | ± | --- | --- |
| Derivados 17α-hidroxilados | | | | | | | | |
| Acetato de Clormadinona | + | + | + | --- | --- | + | + | + |
| Acetato de ciproterona | + | + | + | --- | --- | ++ | + | --- |
| Acetato de Megestrol | + | + | + | --- | ± | + | + | --- |
| Acetato de Medroxiprogesterona | + | + | + | --- | ± | --- | + | --- |
| Derivados 19-nor progesterona | | | | | | | | |
| Acetato de nomegestrol | + | + | + | --- | --- | ± | --- | --- |
| Promogestona | -- | + | + | --- | --- | --- | --- | --- |
| Trimegestona | + | + | + | --- | --- | ± | --- | ± |
| Derivados-de la Espirolactona | | | | | | | | |
| Drospirenona | + | + | + | --- | --- | + | --- | + |

| EFECTOS HORMONALES | | | | | | | | | |
|--|----------------|-------------------|-----------------|-------------|-------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----|
| Progestina | Progestacional | Antigonadotrópico | Antiestrogénico | Estrogénico | Androgénico | Antiandrogénico | Glucocorticoide | Antimineralocorticoide | |
| <i>Derivados de la 19-nor-testosterona</i> | | | | | | | | | |
| <i>Noretisterona</i> | + | + | + | + | + | --- | --- | --- | --- |
| Linestrenol | + | + | + | + | + | --- | --- | --- | --- |
| Noretinodrel | ± | + | ± | + | ± | --- | --- | --- | --- |
| <i>Levonorgestrel</i> | + | + | + | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Norgestimato | + | + | + | --- | + | --- | --- | --- | --- |
| 3-ceto-desogestrel | + | + | + | --- | + | --- | + | --- | --- |
| <i>Gestodeno</i> | + | + | + | --- | + | --- | + | + | + |
| Dinogesteno | + | + | ± | ± | --- | + | --- | --- | --- |

Tabla tomada de Schindler *et al.*, 2003. (+) Efectivo, (±) débilmente Efectivo, (-) No Efectivo.

1.7 RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares (RN) tienen un amplio espectro de funciones importantes en el metabolismo y desarrollo masculino y femenino de los vertebrados y sobre todo en los mamíferos. Estos participan en funciones del sistema inmunológico, de la homeostasis, y en la regulación de algunas enfermedades ginecológicas. Actualmente, un 20% de los medicamentos que se prescriben a nivel mundial son ligandos para receptores nucleares con una selectividad específica para cada tipo de receptor nuclear (Togashi *et al.*, 2005).

Los RN son factores de transcripción que son activados por moléculas o ligandos pequeños y específicos. Comprenden una gran familia de proteínas e incluyen a receptores para hormonas esteroides, tiroideas, los ácidos retinóicos, la vitamina D, el factor proliferador de peroxisomas, los ácidos grasos, metabolitos del colesterol, xenobióticos y eicosanoides los cuales juegan un papel importante en la expresión génica. Los receptores de hormonas esteroides (andrógenos, estrógenos, progesterona y otros) son una sub-clase de los receptores nucleares y regulan una gran variedad de procesos celulares como el metabolismo, el desarrollo, el crecimiento, la diferenciación y la señalización endócrina, la muerte celular programada y están involucrados en procesos inmunológicos (Evans, 1988; McKenna *et al.*, 1999; Weatheran *et al.*, 1999; O'Malley, 2000; Altucci y Gronemeyer, 2001; Franco *et al.*, 2003; Glass *et al.*, 2004; Charla *et al.*, 2004; Togashi *et al.*, 2005).

Los RN tienen tres dominios funcionales importantes: un dominio amino terminal variable (NH₂-) denominado A/B que contiene funciones de activación (AF-1), un dominio de unión al DNA (DBD) o dominio C y una región intermedia que une al DBD y el dominio de unión al ligando (LBD), llamada región bisagra o denominada región D; finalmente hacia el extremo carboxilo terminal (COOH-), se localiza el dominio de unión al ligando denominado región E/F que también, contiene una región de transactivación denominada AF-2 (Weatheran *et al.*, 1999;) (Figura 6).

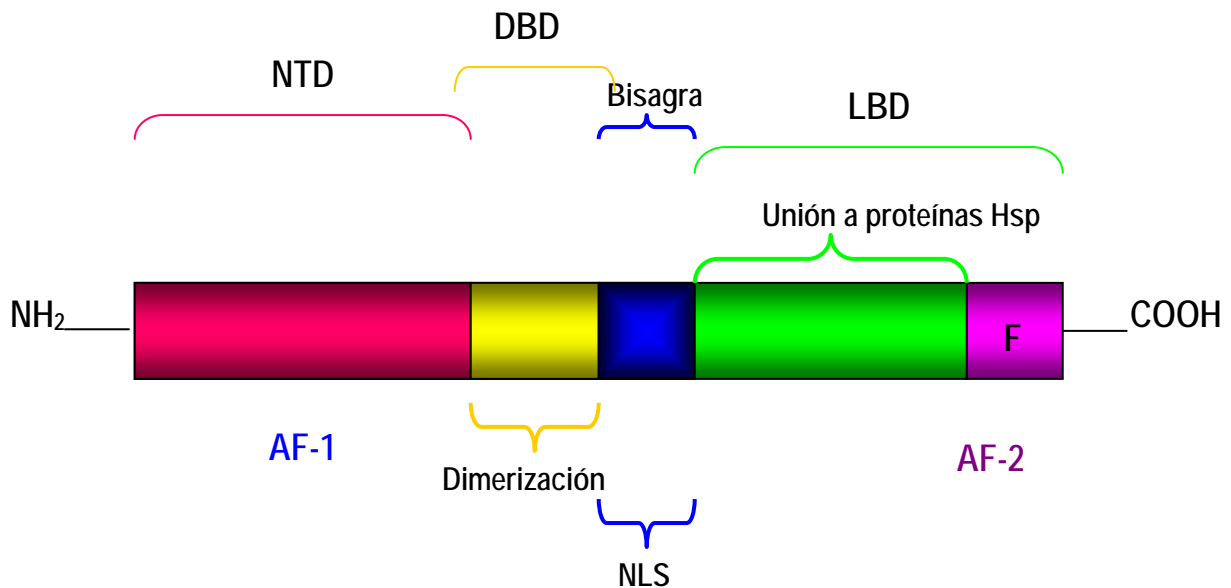


Figura 6. Esquema de la estructura general de los receptores nucleares. Su estructura comprende tres dominios: el dominio amino-terminal, el dominio de unión al DNA, una región bisagra intermedia entre el DBD y el dominio de unión al ligando. Adicionalmente, de presentar zonas de reconocimiento para transactivación y para reclutar coactivadores y correpresores para su regulación génica.

El dominio A/B presenta mayor variabilidad tanto en tamaño como en secuencia entre los receptores nucleares. En algunos casos, como el receptor de andrógenos (AR) y el PPAR α , presenta un dominio de transactivación de gran potencia conocido como AF-1. Un aspecto importante, es el hecho de que este dominio, es blanco de fosforilaciones, que afectan la actividad transcripcional de los receptores (Rochette-Egly *et al.*, 1992;; Rochette-Egly *et al.*, 1997). Por ejemplo, se ha visto que se incrementa, su capacidad de transactivación cuando es fosforilado por MAPK. El sitio AF-1 tiene como principal característica el no depender de la unión al ligando para ejercer su actividad de transactivación (Figura 6).

El DBD es el dominio más conservado entre los receptores nucleares. Presenta una extensión carboxilo terminal (CTE) y dos dedos de zinc que se extienden a lo largo de 60 a 70 aminoácidos (aa), cada uno de los cuales está formado por un átomo de zinc coordinado por cuatro residuos de cisteína. El reconocimiento de la secuencia de unión al DNA la realizan los aa de la denominada caja P, ubicados en la base del primer dedo de zinc. Adicionalmente, este dominio contiene a los aa encargados de la dimerización del receptor en la caja D (Beato y Klug, 2000; Tsai y O'Malley, 1994). Este dominio está constituido por dos α -hélices que forman entre sí un ángulo recto. La primera es la llamada hélice de reconocimiento, la cual se une al surco mayor del DNA y contiene el primer dedo de zinc, así como a la caja P. La segunda hélice se inicia con el CTE y hasta el segundo dedo de zinc, incluyendo la caja D (Luisi *et al.*, 1991)

La región D se encuentra poco conservada entre los receptores nucleares y actúa como bisagra entre los dominios LBD y DBD, lo cual permite que la proteína se pliegue y altere su conformación. En algunos casos como en PR, AR y GR contiene una señal de localización nuclear (NLS), así como regiones de transactivación en TR y GR (Giguere *et al.*, 1986; Picard y Yamamoto, 1987; Hollenberg y Evans, 1988; Guichon-Mantel *et al.*, 1989).

La región LBD está formada por 12 α -hélices, las cuales se distribuyen de forma que crean una cavidad de características hidrofóbicas, en donde se une el ligando (Weatheran *et al.*, 1999) (Figura 7). El LBD posee una gran cantidad de funciones, ya que Adicionalmente de la unión del ligando, interactúa con diferentes moléculas como las proteínas de choque térmico (hsp), interviene en la homó y heterodimerización de los receptores, presenta una señal NLS en el caso de los receptores de hormonas esteroides y posee una potente región de transactivación dependiente del ligando que se conoce como AF-2 (Tsai y O'Malley, 1994).

Cuando el ligando se une al receptor, este sufre un cambio conformacional muy importante que provoca que el receptor se compacte y presente la región de transactivación (AF-2), originada en la hélice 11 o 12. En esta región (Figura 7), cuando el receptor ha sido activado por el ligando, interactúan los diferentes

correguladores involucrados en la actividad transcripcional del receptor. Considerando las estructuras tridimensionales del dominio de unión a ligando obtenidas en presencia de agonistas y antagonistas, se ha propuesto que el mecanismo que siguen las moléculas con actividad antagonista se basa en impedir que la región AF-2, y específicamente la hélice 12, adquiera la conformación correcta, lo cual reduce o incluso evita la interacción con correguladores (Pike *et al.*, 2000) (Figura 7).

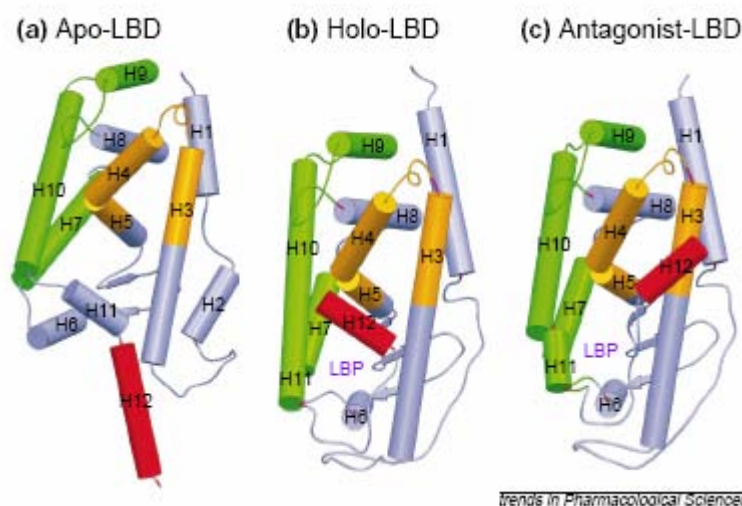


Figura 7. Esquema general, de los tres estados conformacionales, que adquiere el dominio de unión al ligando de los receptores nucleares, basado en los análisis cristalográficos del receptor de ácido retinóico. a) Configuración del LBD del receptor en ausencia de un ligando, b) la configuración del LBD en presencia de un ligando agonista y c) la configuración del LBD en presencia de un ligando antagonista. En esta figura las α -hélices (H1-H12) se representan como barras, las flechas representan las hojas β plegadas, la zona de dimerización se señala en verde, el sitio de interacción de coactivadores o correpresores se muestra en naranja y la hélice 12 que abriga los residuos del dominio de activación (AF-2) se muestra en rojo, los elementos estructurales se señalan en violeta. LBP representa la cavidad de unión al ligando (Tomado de Bourguet *et al.*, 2000).

1.9 MECANISMO DE ACCION DE LOS RECEPTORES A HORMONAS ESTEROIDES

Las hormonas esteroides: progestágenos, andrógenos, estrógenos, glucocorticoides y mineralocorticoides, son producidas por células endocrinas que las secretan al torrente sanguíneo, el cual las transporta hasta las células blanco, a las cuales penetran por difusión simple y es entonces cuando se unen de manera específica a su receptor.

El mecanismo de acción general de los receptores para hormonas esteroides es similar al de otros miembros de la familia de los receptores nucleares. La localización de los receptores de las hormonas esteroides AR, PR, GR y MR es principalmente citoplásmica, con excepción del receptor de estrógenos cuya localización es preferencialmente nuclear. Los receptores de hormonas esteroides, cuando no se encuentran unidos a su ligando, se asocian a diversas proteínas como las hsp (90,70, p160 y p23 un complejo de tetrapéptidos, y inmunofilinas FKBP (proteína de unión FKB506)) que los estabilizan y permiten su maduración, su sitio de unión en receptor de andrógenos han sido mapeados y se localizan en los aminoácidos 670-676 del dominio de unión al ligando (de Franco *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2003; Prescott y Coezee, 2006).

La disociación de estas chaperonas se ha considerado cuando el ligando se une al dominio de unión al ligando del receptor a hormonas esteroides provocando un rearrreglo del LBD, una vez activado se transporta al núcleo. Actualmente, hay evidencias experimentales, sugieren que las chaperonas no se disocian del receptor en el citoplasma de la célula blanco, sino que lo acompañan hasta el núcleo (Kaul *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2003; Prescott y Coezee, 2006).

Una vez que los receptores se han unido a su ligando, en el caso de los receptores ubicados en el citoplasma, estos sufren un cambio conformacional que origina la exposición de las regiones de señalización nuclear, las cuales son reconocidas por el complejo del poro nuclear (NPC) permitiendo su paso al interior del núcleo (Lazar, 2003). Los receptores de hormonas esteroides unidos al ligando forman homodímeros, los cuales reconocen elementos de respuesta hormonal (HREs) de cada receptor esteroide, constituidos como se menciono anteriormente, por secuencias palindrómicas. Cuando los receptores se han unido a los HREs, reclutan una serie de proteínas correguladoras que se encargan tanto de remodelar la cromatina, como de reclutar y estabilizar la formación del complejo de iniciación de la transcripción (Figura 8).

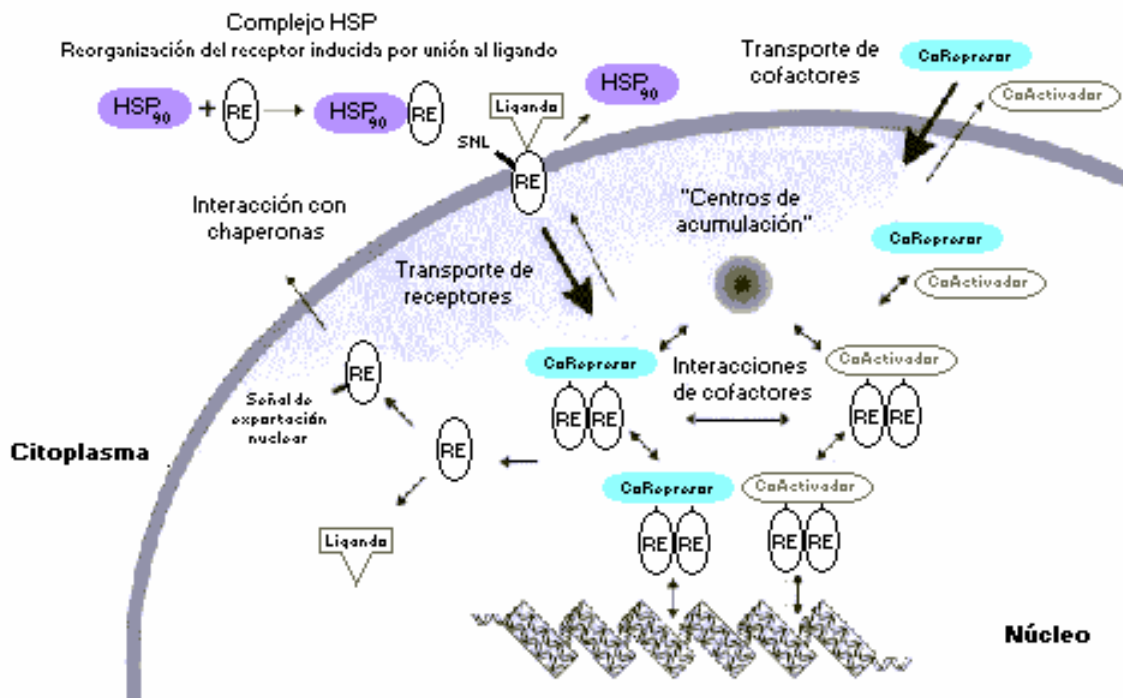


Figura 8. Mecanismo de acción de los receptores nucleares. Modelo que integra la distribución celular y el mecanismo de acción de los receptores a hormonas esteroides, (SR indica a la familia de receptores a hormonas esteroides). Los SR pueden interactuar con proteínas chaperonas y de choque térmico (HSP90) en el citoplasma. Cuando interactúan con el ligando (hormonas agonistas o antagonistas) se introducen al núcleo gracias a las señales de localización nuclear, donde interactúan con diversos complejos de coactivadores y correpresores hasta afectar la transcripción (Hager *et al.*, 2000).

1.9 RECEPTOR DE ANDROGENOS

Los andrógenos llevan a cabo un amplio rango de respuestas fisiológicas y en el desarrollo biológico de cada individuo. Son especialmente importantes en la diferenciación sexual, en la maduración de la pubertad sexual, en el mantenimiento de la espermatogénesis y la regulación de las gonadotropinas. Su actividad está mediada por su unión a un receptor específico denominado receptor de andrógenos (Roy *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2005; Prescott y Coetzee, 2006).

El receptor de andrógenos (RA) forma parte de la superfamilia de receptores nucleares con actividad transactivadora que requiere de un ligando para funcionar como un factor de transcripción (Laudet, 1997; Owen y Zelent, 2000), y provoca la expresión de genes blanco (Chang *et al.*, 1988; Lubahn *et al.*, 1988; Trapman *et al.*, 1988; Tsai y O'Malley, 1994; Mangelsdorf DJ, *et al.*, 1995; McKenna NJ, *et al.*, 1999; Kun Lee y Chang, 2003).

En base a la comparación de secuencias de ADN y proteína de este receptor y otros de esta familia mediante análisis evolutivo con algoritmos en programas de computación (Amero *et al.*, 1992), se ha demostrado, que proceden de un ancestro común, que probablemente, solo mediaba un mecanismo de transducción simple. Así mismo, estos estudios indican, que el precursor común de los receptores nucleares, es diferente al de otros factores de transcripción.

El RA tiene en común con los miembros de la superfamilia de los receptores nucleares tres dominios funcionales: el dominio NH₂-terminal de transactivación (o dominio A/B), el dominio de unión al ADN (DBD), una región bisagra intermedia entre el DBD y LBD, y el dominio de unión al ligando (LBD) en la región C-terminal. Mediante el análisis de mutaciones y deleciones de receptores nucleares en experimentos de transfección han localizado funciones de activación transcripcional que se han identificado en la región NH₂-terminal denominada AF-1 que funciona de manera ligando independiente, cuando artificialmente fue separado del dominio de unión al ligando creando un receptor constitutivamente activo (Tora *et al.*, 1989; Jenster *et al.*, 1993). La AF-2, dependiente del ligando, se localiza en el dominio de unión al ligando y mutaciones o deleciones en este dominio reduce la actividad transcripcional en respuesta al ligando (Tora *et al.*, 1989; Gronemeyer, 1992; He *et al.*, 1993; Bevan *et al.*, 1999) (Figura 9).

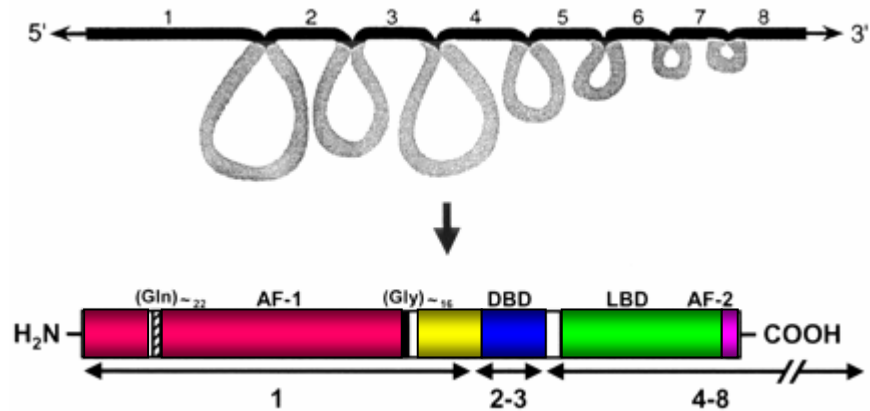


Figura 9. Organización estructural del receptor de andrógenos y sus dominios estructurales. El gen del RA está organizado de 8 exones y 7 intrones; la proteína está compuesta de tres dominios principales: el dominio N-terminal, el dominio de unión al DNA y el dominio de unión al ligando. Adicionalmente posee dos funciones de transactivación AF-1 y AF-2 que son localizadas dentro del dominio N-terminal y LBD, respectivamente. (Tomado de Roy *et al.*, 2001).

El ADN complementario (ADNc) que codifica para el RA humano se clonó en 1998 (Lubahn *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 1988; Trapman *et al.*, 1988). Con el conocimiento de la secuencia de bases del ADNc, el gen se localizó con precisión en el brazo largo del cromosoma X (Xq) de los marsupiales, monotremas y mamíferos euterios, lo cual sugiere que esta región se ha conservado en estos tres grupos desde hace 150 millones de años a partir de un ancestro común, en la región q11-12 (Lubahn *et al.*, 1988). Adicionalmente, se demostró que el RA contiene una región de unión al ADN conservada rica en cisteínas (Spencer *et al.*, 1991; Lubahn *et al.*, 1988).

El gen del RA es un gen de copia simple que abarca 75-90 kilobases (kb) de ADN genómico (Kuiper *et al.*, 1989; Brinkmann *et al.*, 1989). La región codificante para la proteína, contiene aproximadamente 2757 pares de bases (pb), que se encuentran distribuidas en 8 exones, estos exones están separados por 7 intrones de tamaño variable, que van desde 36 kb hasta 0.7 kb (figura 9) que son llamados de la A-H ó 1-8 (Quigley *et al.*, 1995). El promotor del gen RA humano (RAh) carece de las cajas TATA/CCAAT y potencialmente los elementos reguladores consisten de una pequeña GC, una amplia cantidad de homopurinas y contienen sitios de unión falsos para el factor de transcripción SP1, característico de los promotores de mantenimiento (Faber *et al.*, 1991; Faber *et al.*, 1993).

La proteína que codifica el gen RA tiene un peso molecular de 110-114 kDa (Quarmby *et al.*, 1990; Jenster *et al.*, 1991) que comprende de 910 a 919 aminoácidos y una isoforma más pequeña de 87 kDa (Wilson y McPhaul, 1994). Estas isoformas parecen ser producidas debido a un codón de iniciación alterno (ATG) dentro de la región codificante del gen RA. El nivel de expresión relativa de las dos isoformas parece variar considerablemente de una célula a otra. En general, el RA más grande predomina cinco veces sobre el RA pequeño. Las dos isoformas al parecer son idénticas en su respuesta a los agonistas y antagonistas y no se han observado consecuencias en su coexpresión en células de respuesta a andrógenos.

El RA tiene una alta afinidad ($K_d=0.2$ nmol/L) y especificidad por andrógenos (DHT y T), con una baja capacidad (un sitio de unión por molécula del RA).

1.9.1 El Dominio Amino Terminal:

El dominio NH₂-terminal del RA esta codificado por el exón 1 y ocupa la mayor parte de la proteína del aminoácido 1 hasta el 537. Es importante para la función de activación transcripcional de la proteína y también contiene una secuencia inhibitoria. Es el menos homólogo en su secuencia y el más variable en tamaño entre todos los receptores a esteroides. Contiene una función de activación (AF-1), existe otra en el dominio de unión al ligando (AF-2), se ha reportado una interacción entre el dominio amino-terminal y el

dominio de unión al ligando que puede jugar un papel importante en la actividad transcripcional de los receptores nucleares (Langley *et al.*, 1995; Ikonen *et al.*, 1997). En el dominio amino-terminal del RA, la AF-1 se localiza en dos distintas regiones que despliegan una especificidad de línea celular y de promotor, y se encuentran entre los aminoácidos 110 a 379 y 369 a 494 (Jenster *et al.*, 1993). El grupo de Alen en 1999, demostraron que el dominio amino terminal interactúa físicamente con coactivadores y con el dominio de unión al ligando, lo que sugiere que esta interacción puede ser un prerrequisito para el reclutamiento eficiente de coactivadores para el receptor nativo y para la actividad transcripcional.

El dominio amino-terminal del receptor de andrógenos a diferencia de otros miembros de la subfamilia de receptores a hormonas esteroides, contiene trechos con aminoácidos homopoliméricos, el trecho que se encuentra más cerca del amino-terminal es el de poliglutaminas (poliGlu) y están entre los aminoácidos 58 a 79, son en promedio 21 más o menos 2 residuos de glutamina (La Spada *et al.*, 1992) aunque se consideran normal de 11 a 31 repeticiones. Esta región es altamente polimórfica, existen 29 diferentes tamaños del alelo y el 90 % de las mujeres son heterocigotas para el tamaño de esta repetición (Edwards *et al.*, 1992). Aunque las funciones de estas regiones en el RA todavía no se conocen con exactitud, hay evidencias de que los estrechos de poliGlu y poliprolinas, pueden ser importantes en la regulación de la transcripción, vía interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción (Gerber *et al.*, 1995), tal vez formando láminas β que actúan como cremallera polar para acoplar proteínas específicas complementarias, involucradas en la activación de la transcripción (Perutz *et al.*, 1994).

1.9.2 Dominio de unión al ADN

El dominio de unión al ADN, que es una región rica en cisteínas, se encuentra entre los aminoácidos 538 a 627 y es codificado por los exones 2 y 3 del gen del RA. La secuencia de aminoácidos en este dominio es la región más altamente conservada entre los miembros de la familia de receptores a esteroides, los dedos de zinc del RA tienen aproximadamente 80 % de similitud en aminoácidos con el RG, el RM y el RP (Freedman, 1992). Esta región está conformada por dos dedos de zinc, el primero (559-579 aa) es codificado por el exón 2 y el segundo (595-614 aa) por el exón 3. Este dominio reconoce específicamente los HREs que se encuentran en la región promotora de los genes andrógeno regulados. El primer dedo de zinc contiene la información primaria para el reconocimiento de los HREs específicos, este incluye los aminoácidos discriminatorios en la base de este dedo de zinc en el RA (Gly 577, Ser 578 y Val 581) lo que confiere la especificidad en el reconocimiento del ADN (Umesono y Evans, 1989), a estos residuos se les ha llamado la caja P (por dedo proximal). Basado en las secuencias de la caja P, el RA, el RG y el RM se han clasificado

como el grupo GSCKV (Jenster *et al.*, 1995). El segundo dedo de zinc estabiliza la unión del receptor al ADN, contactando las uniones azúcar-fosfato de las secuencias adyacentes (Beato, 1989), y también contiene 5 aa en el tallo del dedo de zinc que proveen discriminación del espacio intermedio entre los dedos de zinc (Umesono y Evans, 1989).

El RA se une como homodímero a elementos de respuesta a andrógenos (AREs) específicos, en una manera cooperativa, como es su unión al ARE que se encuentra en la región promotora del gen de probasina (Kasper *et al.*, 1994). Sin embargo, tanto el RA como el RP pueden reconocer elementos de respuesta a glucocorticoides consenso GGTACAnnnTGTTCT (Beato, 1989). Por otra parte, los aminoácidos en los dedos de zinc también son necesarios para la función normal del RA. Estudios de mutagénesis *in vitro* han determinado que la cisteína 569, que se encuentra en medio del primer dedo de zinc, juega un papel esencial en la estabilidad del receptor-ADN (Warriar *et al.*, 1994). El estudio de mutaciones que ocurren naturalmente también ha llevado a la identificación de otros aminoácidos necesarios para la unión al ADN, incluyendo los residuos de cisteína requeridos para mantener la arquitectura de los dedos de zinc (Zoppi *et al.*, 1993; Lumbroso *et al.*, 1993; Baldazzi *et al.*, 1994). Las secuencias fuera de los dedos de zinc pueden también contribuir a la unión del RA al ADN. Se ha observado que deleciones en el dominio amino-terminal reducen de dos a seis veces la afinidad por el ADN (Kellio *et al.*, 1994), sugiriendo que este dominio del receptor contribuye a la estabilidad del complejo unido al ADN. Extractos nucleares de varios tejidos y líneas celulares pueden aumentar la interacción del RA (dominio de unión al ADN) con AREs del gen C3 de la proteína de unión prostática regulada por andrógenos (De Vos *et al.*, 1994), lo que sugiere que existen factores ubicuos que interactúan con el dominio de unión al ADN y estabilizan la interacción con el ADN de una manera cooperativa.

1.9.3 Región Bisagra

La región bisagra se encuentra entre el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando, y tiene una baja homología entre el RA y otros receptores. Esta región está codificada por la porción 5' del exón 4 (aminoácidos 628 al 670), y contiene la mayor parte de la señal de localización nuclear del RA, formada por un conjunto de aminoácidos básicos en las posiciones 629-633 (Simental *et al.*, 1991; Jenster *et al.*, 1993). El NLS del RA está constituido por una señal nuclear bipartita con residuos en el dominio de unión al ADN y en la región bisagra. Estos aminoácidos tienen homología con los sitios de localización nuclear (NLS) del antígeno T grande del SV-40. La mutagénesis de cualquiera de los dominios básicos en los NLS implica la permanencia del RA en citoplasma en ausencia de hormona, y poca localización en el núcleo en presencia

de la hormona. Los NLS se han observado también en el RG, en el RP, RVD y RT (Guichon-Mantel *et al.*, 1989; LaCasse *et al.*, 1993; Luo *et al.*, 1994).

La localización del RA ha sido controversial, ya que en diferentes estudios se han encontrado diversas distribuciones (Jenster *et al.*, 1993). En células Cos-7 el RA no unido al ligando se encuentra en el citoplasma y es totalmente translocado al núcleo en 30 min al adicionar su ligando (Georgett *et al.*, 1997). También se ha demostrado que el citoesqueleto está involucrado en el mecanismo de transporte del RA al núcleo. Ozanne y colaboradores (2000) demostraron que la proteína de unión a actina, llamada filamina un componente del citoesqueleto de 280 kDa, interactúa con el RA. Los autores observaron que en células deficientes de filamina el RA permanecía en el citoplasma aún después de una prolongada exposición a un andrógeno sintético, la mibolerona, y la translocación al núcleo se restauró cuando la línea celular recuperó la expresión de filamina.

1.9.4 Dominio de unión al ligando

El dominio de unión al ligando se encuentra en la región carboxilo-terminal del RA, está codificado por la porción 3' del exón 4 y por los exones 5 al 8, comprendiendo los aminoácidos 670 a 919. La secuencia de aa despliega una identidad de cerca del 50% con sus correspondientes residuos del RM, del RP y del RG. Una de las principales funciones de este dominio es la unión de andrógenos con alta afinidad y alta especificidad. La unión del RA a su ligando induce una transformación del receptor, llevando a la disociación de proteínas de choque térmico, la dimerización del receptor y un incremento en afinidad por el ADN (Grino *et al.*, 1987; Colvard y Wilson, 1987).

Mora y Gronemeyer (1998), hicieron posible el estudio cristalográfico del dominio de unión al ligando, determinado su configuración tridimensional. De acuerdo a sus estructuras cristalinas, el dominio de unión al ligando tiene pliegues con 12 hélices α (H1-H12) y una rotación β , con dos cadenas β antiparalelas, dando lugar a una estructura de varias capas de hélices. Se ha visto que cuando se une un andrógeno, las hélices 10 y 11 se hacen continuas, liberando la hélice 12, la cual tiene un movimiento conformacional notable, cubriendo o actuando como tapadera para la cavidad de unión del ligando, de esta manera el receptor encierra a su ligando (figura 10). La cavidad en la cual se une el andrógeno, se compone de aa hidrofóbicos que están aproximadamente entre los codones 735 y 787, y entre los 855 y 865. Esta cavidad une al anillo A de las hormonas esteroides, por lo que también pueden ser reconocidas otras hormonas esteroides, como la progesterona, ya que difieren sólo en el anillo D, pero los receptores son selectivos para su propia hormona.

La estabilización de la cavidad de unión al ligando es mediante fuerzas de van der Waals y por uniones de hidrógenos (Gobinet *et al.*, 2002).

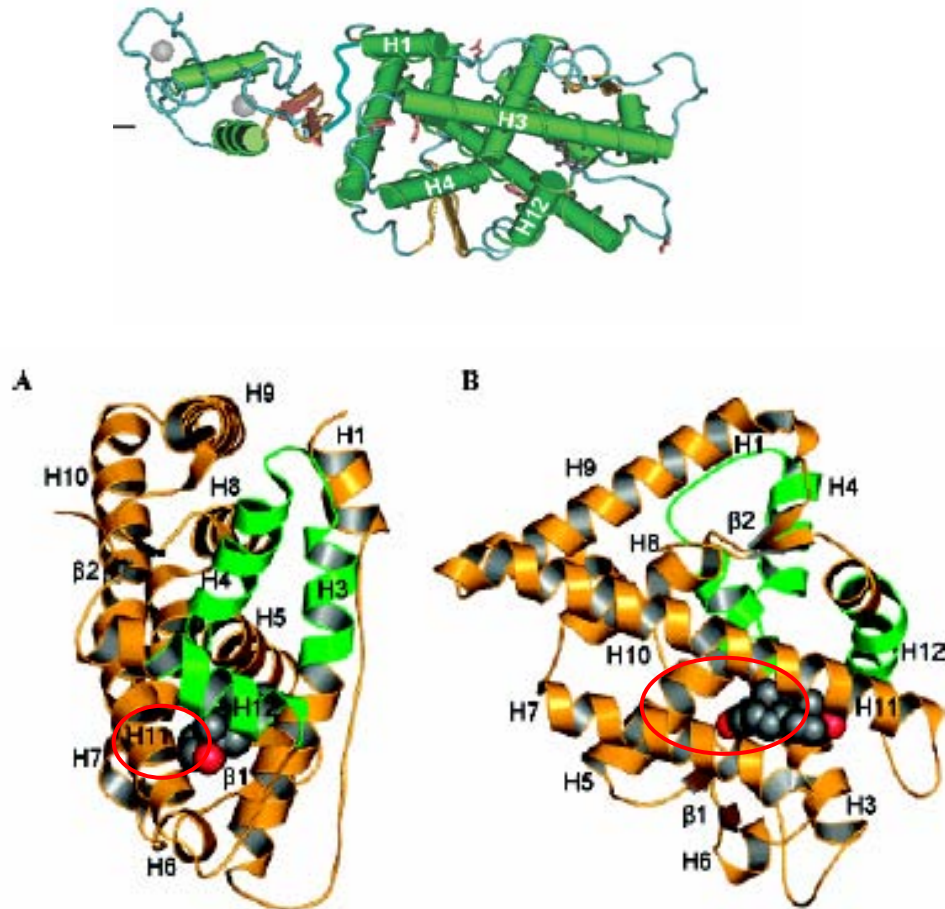


Figura 10. Estructura tridimensional del dominio de unión al ligando del receptor de andrógenos humano, en interacción con un agonista (DHT)-. A) Vista frontal y B) vista del ligando en interacción con el RA. En color verde se observa la región de activación AF-2 del receptor de andrógenos.

El dominio de unión al ligando también está involucrado en la dimerización del RA. El receptor de andrógenos se une a sus AREs como un homodímero, con cada monómero que reconoce una mitad del elemento de respuesta palindrómica (Wong *et al.*, 1993). Tanto el dominio de unión al ADN como el dominio de unión al ligando, están involucrados en la dimerización del receptor.

En ausencia del dominio amino-terminal del RA, la dimerización ocurre constitutivamente de una manera hormona-independiente, pero el receptor entero requiere de la unión al andrógeno para efectuar la dimerización. Estos datos sugieren que el dominio amino-terminal del receptor inhibe la dimerización, y que la unión del ligando y la unión al ARE cambia la conformación para vencer la inhibición impuesta por el dominio amino-terminal. La dimerización entre los monómeros estabiliza la orientación de la estructura dinámica de tal manera que el primer dedo de zinc de cada monómero se une a una mitad del ARE, con un espacio de tres pares de bases entre los sitios de unión, proveyendo una orientación espacial correcta sobre el ADN.

Langley *et al.*, 1998, indican que para que ocurra la dimerización del RA, es necesario una interacción entre los dominios amino y carboxilo terminal del receptor, esta interacción es dependiente de la unión al andrógeno y la interacción podría tener un arreglo antiparalelo de los monómeros del RA. Esta interacción esta correlacionada con la alta afinidad de ligandos agonistas que posean actividad androgénica *in vivo* y poseen la capacidad para promover la interacción N/C y activar la transcripción, se ha demostrado que la interrupción de l ensamble amino-carboxilo del RA sirve para evaluar ligandos antagonistas para el receptor de andrógenos (Kraus *et al.*, 1995; Ikonen *et al.*, 1997; Berrevoets *et al.*, 1998; Langley *et al.*, 1998; Kempainen *et al.*, 1999; Bevan *et al.*, 1999; Tetel *et al.*, 1999; Sagsvold *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2001; Bubulya *et al.*, 2001; He y Wilson, 2002; Ghali *et al.*, 2003).

El LBD es probablemente la región más compleja del receptor, no solamente responde al reconocimiento del ligando sino uqe posee una superficie de interacción con las proteínas de choque térmico, la homodimerización y también señales responsables para introducirse al núcleo (Robin-Jagerschmidt *et al.*, 2000).

Dentro del dominio de unión al ligando, se encuentra una función de activación ligando dependiente (AF-2), está se localiza en la región carboxilo terminal, en la hélice 12 e incluye los aa 881 al 889 (McLean *et al.*, 1997; Lavery y McEwan, 2005).

Las señales de transducción del RA, parecen estar mediadas a través de un número de proteínas correguladores, que interactúan con regiones de activación tanto en el dominio amino-terminal como en dominio de unión al ligando (AF-1 y AF-2)

Para que ocurra la transcripción, es necesaria la formación de un complejo preiniciador en la región promotora del gen blanco, que involucra numerosos factores de transcripción generales, que permitirán el ensamble del ARN polimerasa II al ADN. Los receptores de esteroides activan genes blancos estabilizando este complejo de preiniciación a través de interacciones directas con la maquinaria de transcripción, incluyendo los factores TFIIB, TBP, TFIID y TFIIF. Para que ocurran estas interacciones es necesaria la presencia de las dos funciones de transactivación (AF-1 y AF-2) en el receptor, que actúan de manera sinérgica e interactúan con moléculas proteínicas que actúan como correguladores (Gao et al., 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 ANDROGENICIDAD DE LAS PROGESTINAS

Las progestinas sintéticas noretisterona, levonorgestrel y gestodeno son ampliamente utilizadas por más de 20 millones de mujeres en todo el mundo como anticonceptivos en su vida reproductiva, en el climaterio, menopausia y postmenopausia como terapia de reemplazo hormonal, administrada en varias formulaciones solas o combinadas (Neuman, 1994; Slominsky y Wortsman, 2000; Affandi, 2002;).

Entre las progestinas utilizadas en la terapia hormonal que presentan actividad androgénica, las más androgénicas son las derivadas de la 19-nortestosterona. (Lobo, 1988; Neuman et al., 1988; Kuhl, 1995; Hapgood *et al.*, 2004; Kuhl, 2005).

Los efectos andrógenos eran evaluados por el crecimiento de la próstata ventral en respuesta al tratamiento de acuerdo al *protocolo de Hershberger*, Estos estudios permitieron entonces la organización de dichos compuestos en categorías cuyos efectos eran paralelos a aquellos de los esteroides endógenos, sin embargo, esto limitó el espectro biológico de muchos compuestos lo que se tradujo en resultados discrepantes entre los laboratorios, aún cuando se hablará de la misma progestina (Edgren *et al.*, 1967). Actualmente, se han desarrollado metodologías moleculares con alta sensibilidad, para detectar los efectos hormonales Androgénicos y antiandrogénicos de progestinas sintéticas (Kemppainen et al., 1999; Escande et al., 2006)

Las progestinas sintéticas *per se* presentan una actividad progestacional al igual que la progesterona al interactuar con los RP a nivel genómico y no genómico (Smith *et al.*, 1991; Bauliue *et al.*, 1991; Li-Xiaotao *et al.*, 2004; Wessler *et al.*, 2006). Las progestinas sintéticas se biotransforman, al igual que las hormonas naturales, a nivel de su órgano blanco y los productos resultantes son capaces de interactuar con receptores localizados dentro de las células blanco. El efecto biológico de estas interacciones puede resultar en actividades agonistas, antagonistas y sinérgicas, dependiendo de la naturaleza del receptor al que se unan (Edgren *et al.*, 1960; Pérez-Palacios *et al.*, 1981; Chávez *et al.*, 1985; Henzl, M, 1996; Lemus y Pérez-Palacios, 1998; Couzinet *et al.*, 1999;). (Tabla1)

Adicionalmente, de la actividad progestacional y su alta interacción con el receptor de progesterona, algunas progestinas también pueden interactuar con el receptor de andrógenos, desencadenando efectos androgénicos.

Se ha definido como una progestina androgénica aquella que presenta efectos androgénicos. La acción de los andrógenos depende de la interacción específica con el receptor de andrógenos para desencadenar los efectos androgénicos (Gooren y Bunck, 2004). Estos se ven reflejados en alteraciones a nivel periférico, ovárico y en la corteza adrenal (Millar, 2001; Denneister *et al.*, 2002; Baneroft, 2002 Stanczyl, 2003). Un gran número de mujeres que utilizan progestinas como parte de su terapia hormonal presentan signos y síntomas androgénicos. Los signos androgénicos presentes, en dichas personas, se observan reflejados en los órganos

blanco como: la piel y el cabello en forma de seborrea, acné, hirsutismo, alopecia, y otras alteraciones fisiológicas probablemente inducidas por el metabolismo de estas progestinas como: insomnio, fatiga, depresión, náusea, vómito, mastodinia, síndrome de tensión premenstrual, y/o se manifiesta con el síndrome de ovario poliquístico (PCOS). Otro trastorno que igualmente se observa es el hiperandrogenismo asociado con disturbios en la menstruación, amenorrea, obesidad, y anormalidades metabólicas (Marslew *et al.*, 1991; Raudrant y Rabe, 2000; Sitruk-Ware, 2004; Hapgood *et al.*, 2004)..

La gran diversidad de efectos androgénicos en las mujeres también están asociados a riesgos en la salud como dislipidemia, aterosclerosis, infartos al miocardio, trombosis intravascular y un incremento en la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, Adicionalmente de desordenes en el metabolismo de la insulina (resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y diabetes *mellitus* de tipo 2) (Rabe *et al.*, 1994; Diamant-Kandarakis *et al.*, 1995; Rittmaster, 1995; David, 1999; Raudrant y Rabe, 2003).

En pacientes con cáncer, también se incrementa el riesgo de displasia de endometrio y de mama (Rabe *et al.*, 1994). En ovario poliquístico ocasionan una sobreproducción de andrógenos periféricos y ováricos, asociados a la obesidad y resistencia a la insulina (Hopkinson *et al.*, 1998; Balen, 1999). Las mujeres con este síndrome presentan hirsutismo, acné, alopecia y desordenes ginecológicos, acompañados con riesgos de aborto, alteraciones menstruales (ciclos anovulatorios), y por lo tanto, infertilidad (Rabe *et al.*, 1994; Glass y Kase, 1997).

En el tratamiento de infertilidad, puede resultar en la sobre-estimulación de la ovulación y aumentar la probabilidad de embarazos múltiples (Glass y Kase, 1999). Aunque no se ha definido por completo, algunos estudios sugieren, la posible relación del incremento de andrógenos con el alto riesgo de pre-eclampsia, diabetes gestacional y mortalidad perinatal durante el embarazo (Sidelnikova *et al.*, 1991; Glass y Kase, 1999; Acromite *et al.*, 1999).

Los efectos androgénicos de las progestinas tienen un impacto negativo en el desarrollo fetal o neonatal con el uso inapropiado de los anticonceptivos (Kemppainen *et al.*, 1999). Adicionalmente, pueden desarrollar una gama de alteraciones en órganos endócrinos en usuarias que las emplean como terapia de reemplazo hormonal (Nuget *et al.*, 2003).

La actividad biológica de las progestinas sintéticas depende de muchos factores, tales como: su estructura, su afinidad por el RP (isoforma A más activa, isoforma B menos activa) o por otros receptores a esteroides como el RA, RG, RM, RE α y β , del órgano blanco considerado, de las condiciones de su estudio, de las dosis y de sus transformaciones metabólicas. Las respuestas biológicas de las progestinas, propician que existan interacciones que relacionan a varios sistemas como: el metabolismo de los lípidos, carbohidratos y proteínas, la regulación del agua y los electrólitos, homeostasis, fibrinólisis, así como los sistemas cardiovascular e inmunológico (Pascualini *et al.*, 1998; Kuhl, 2005).

En el laboratorio se ha estudiado la actividad biológica de las progestinas NET, LNG, GSD derivadas de la 19-nortestosterona y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A, dichos estudios *versan* sobre análisis bioquímicos y de interacción de las progestinas con los diferentes receptores hormonales contenidos en los diferentes órganos blanco. Los resultados obtenidos de estos trabajos han demostrado que estas progestinas pueden interactuar con diferentes receptores hormonales, RP, RA y RE, presentando respuesta de tipo agonista y/o antagonista, del receptor al cual se une (Chávez *et al.*, 1985; Cerbón *et al.*, 1991; Pérez-Palacios *et al.*, 1992; Kuhn, 2005).

Se ha demostrado que las progestinas 19-nor progestinas (NET, LNG y GSD) son biotransformadas hacia varios metabolitos a nivel de órganos blanco y se ha observado que en estudios de ratas a cerca del metabolismo de NET, el metabolito $3\alpha,5\alpha$ -NET fue el principal metabolito encontrado en órganos blanco dependientes de estrógenos como el útero y vagina (Larrea *et al.*, 1987, Stanczyk y Roy, 1990; Lemus *et al.*, 1992; Lemus *et al.*, 2000; Lemus *et al.*, 2001; Blom *et al.*, 2001; Pasapera *et al.*, 2002). (Figura 11))

La bioconversión de noretisterona hacia 5α -NET, $3\alpha,5\alpha$ -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET metabolitos reducidos en el anillo A, podría conferir a estos productos resultantes, propiedades agonistas o antagonistas, y pueden interactuar con el receptor de progesterona, estrógenos o andrógenos (Chávez *et al.*, 1985; Negro-Vilar y Pérez-Palacios, 1991; Markiewickes y Gurrpide, 1994; Dicjkema *et al.*, 1998, Schoonen *et al.*, 2000).

Estudios recientes *in vitro* en líneas celulares órgano blanco (T47-D) y no órgano blanco (CV-1) acerca del metabolismo de NET se biotransforma rápidamente a productos reducidos en el anillo A de la molécula, siendo el metabolito 3α y 5α -NET el producto principal de su bioconversión. Las líneas celulares al ser estimuladas con NET poseen una actividad 5α -reductasa y 3α -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3α -HSD), que modifican a la NET generando productos capaces de interactuar con los RE, RA, RP, RG (Pasapera *et al.*, 2002). (Figura 11).

De manera similar, lo mismo ocurre con gestodeno y levonorgestrel, Además, de pertenecer a las progestinas derivadas de la 19-no testosterona y la reducción la lleva acabo en el anillo A de la molécula (Lemus *et al.*, 1992; Lemus *et al.*, 2001).

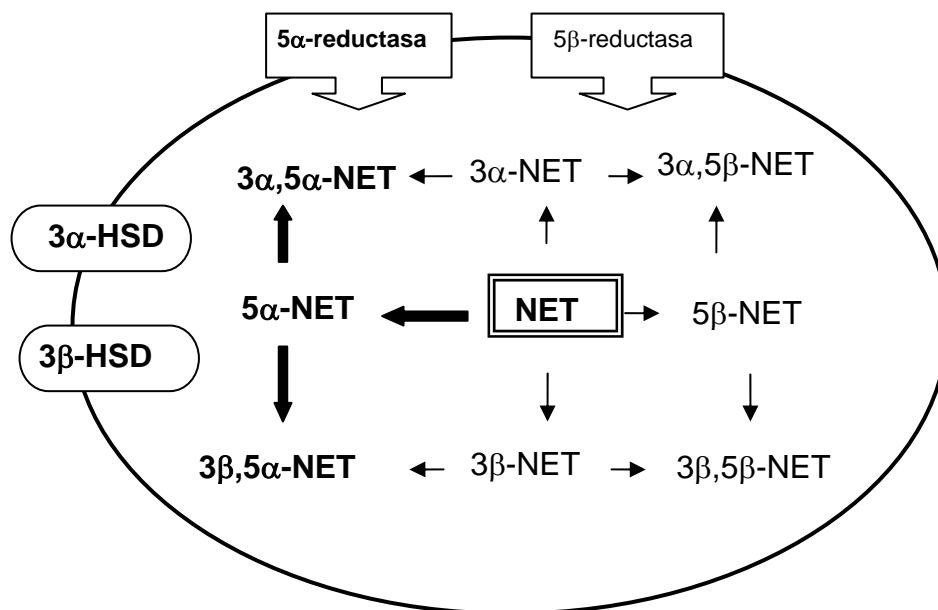


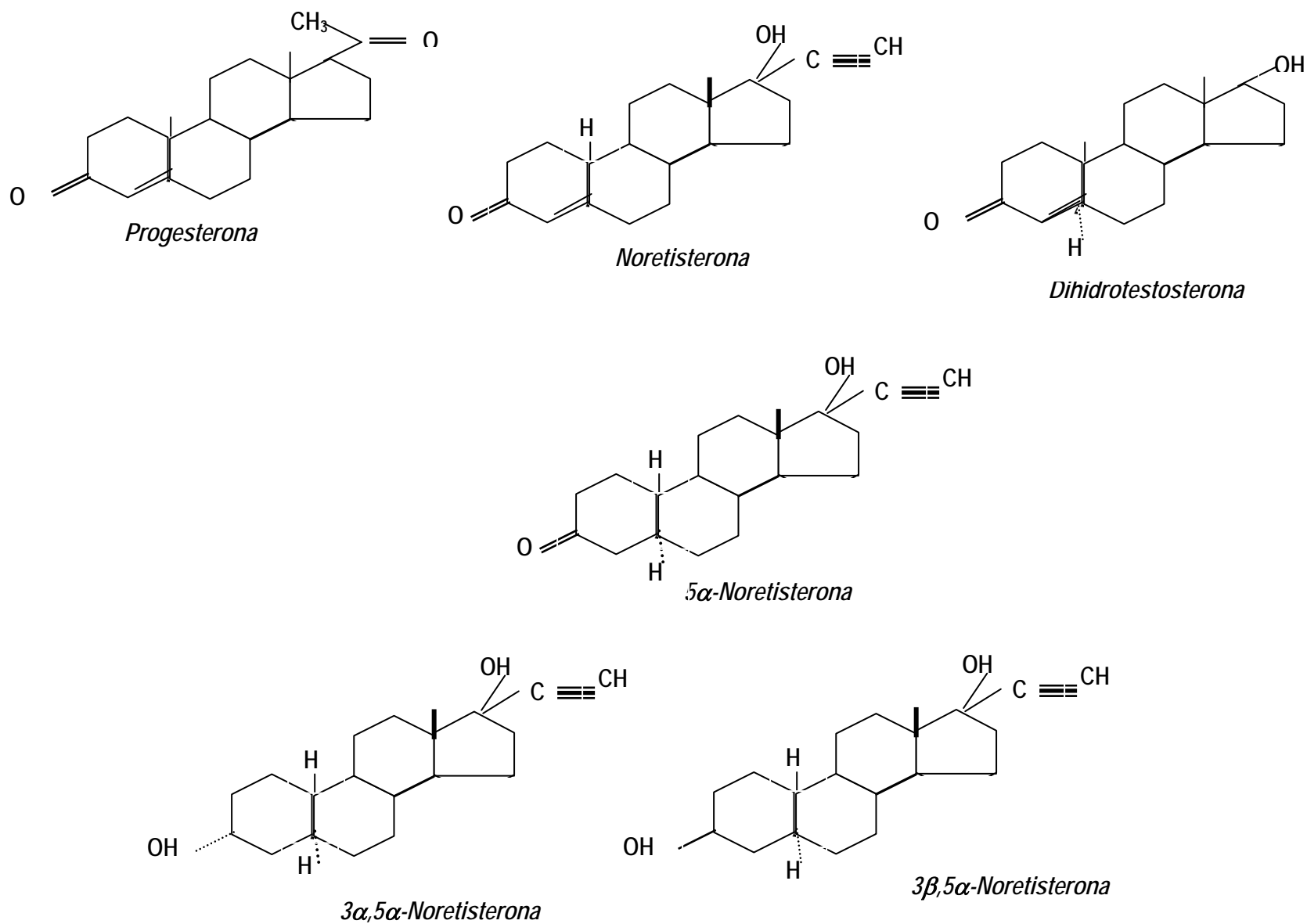
Figura 11. Biotransformación de Noretisterona a compuestos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A de la molécula, a través de la acción enzimática de 5 α -reductasa y la hidroxisteroide-deshidrogenasa. Esta biotransformación es similar para las progestinas Levonorgestrel y Gestodeno.

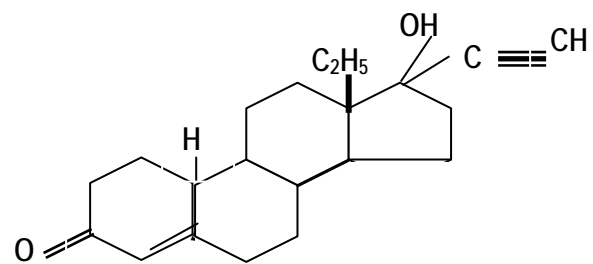
La reducción en el anillo A de las progestinas sintéticas de la serie 19-nor como son: NET, LNG y el GSD, a sus metabolitos correspondientes 5α -dihidro y $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro reducidos (Figura 12), resulta en la pérdida de su actividad progestacional. A pesar de que los derivados dihidro reducidos se unen principalmente a los receptores de progesterona y andrógenos, los derivados tetrahidro-reducidos adquieren efectos de tipo estrógeno ya que interactúan con el RE (Markiewicks *et al.*, 1992; Schoonen *et al.*, 1995; Pasapera *et al.*, 1995).

Con la finalidad de evaluar a nivel transcripcional la actividad andrógena de estas progestinas sintéticas y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A, se han tomado como referencia varios estudios que se han realizado sobre el análisis de desplazamiento de ligando del receptor andrógenos con NET, LNG, GSD y con sus respectivos metabolitos en presencia del DHT y T comparado con aquellos para los otros receptores, RP y RE. Estos han demostrado que la potencia competitiva de la NET y sus derivados para los sitios de unión del receptor difieren, no sólo para cada receptor sino también para cada compuesto en particular. La NET fue el competidor más eficiente para el RP, seguido por el 5α -NET. La reducción enzimática en el anillo A de la molécula de 5α -NET a compuestos tetrahidro-reducidos resulta en la pérdida completa de su afinidad por el RP. A diferencia, 5α -NET compite más eficientemente por el RA que la NET. El metabolito $3\beta,5\alpha$ -NET fue el que mostró más alta afinidad por el RE, seguido por su isómero $3\alpha,5\alpha$ -NET. Sin embargo, NET y 5α -NET no mostraron afinidad por el RE (Chávez *et al.*, 1985).

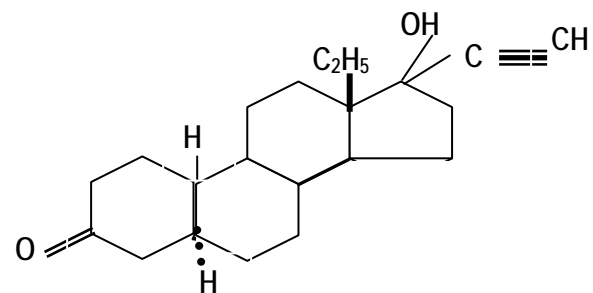
Se ha reportado que la progestina Levonorgestrel, en experimentos de afinidad de unión relativa, posee mayor afinidad por el RP y el RA, mientras que su metabolito 5α -LNG presenta exclusivamente afinidad por el RP. En cuanto al GSD, posee afinidad por el RP, RE y una débil afinidad por el RA, sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en recientes reportes refieren su preferencia por el receptor de estrógenos (Lemus *et al.*, 2001; Kuhl, 2001; Kuhl, 2005)

Figura 12. Progestinas Sintéticas: NET, LNG, GSD y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A de la molécula. En comparación con la progesterona natural que presenta actividad progestacional y DHT con propiedades androgénicas. ***tienes DHT con doble ligadura!!

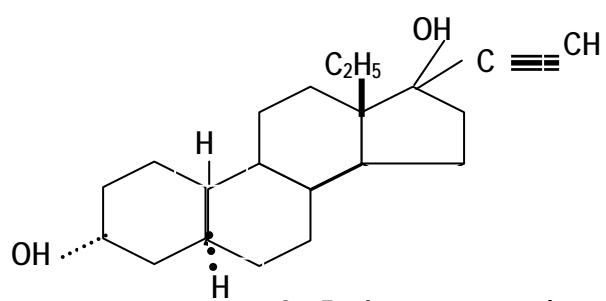




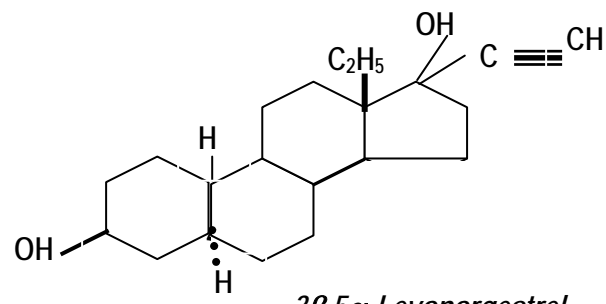
Levonorgestrel



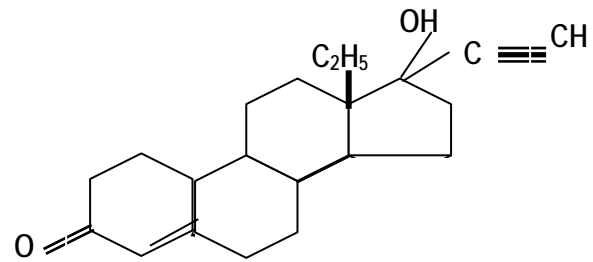
5α-Levonorgestrel



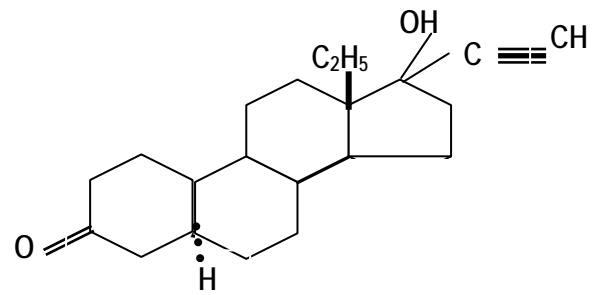
3α,5α-Levonorgestrel



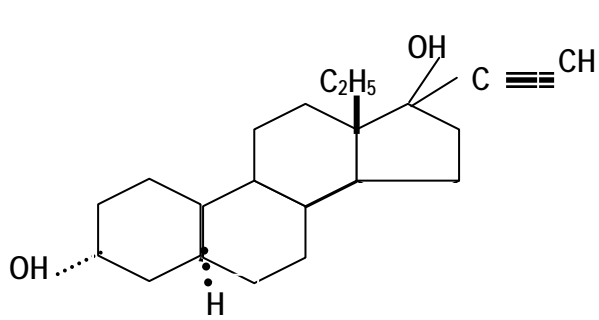
3β,5α-Levonorgestrel



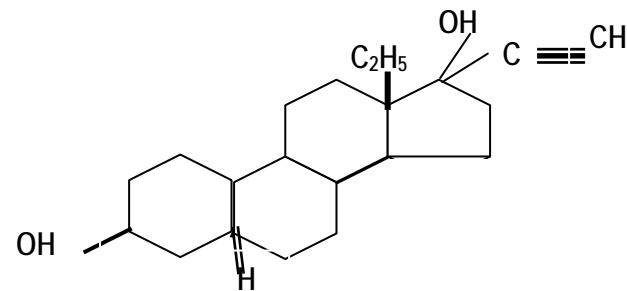
Gestodeno



5α-Gestodeno



3α,5α-Gestodeno



3β,5α-Gestodeno

La NET provoca una gama de efectos hormonales diversos, esto es debido principalmente a que estas progestinas se biotransforman a nivel de los órganos blanco y los productos resultantes tienen la capacidad de interactuar con los otros receptores hormonales (Pérez-Palacios *et al.*, 1981; Chávez *et al.*, 1985). Se ha demostrado que el compuesto 5α reducido de NET tiene la capacidad de interactuar con los receptores de progesterona y andrógenos, y el metabolito $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro-reducido de NET se une al receptor de estrógenos (Larrea *et al.*, 1987).

Sin embargo, en ensayos de afinidad de unión relativa por el ligando se ha determinado que las reducciones en el anillo A de la molécula de NET, reducen la afinidad de la molécula por el receptor de progesterona y con ello su actividad progestacional, así se demostró que el metabolito 5α -NET exhibe una actividad progestacional muy pobre mientras que el $3\beta,5\alpha$ -NET que ha sufrido una doble reducción en el anillo A, ha perdido totalmente la afinidad por el RP y adquiere una alta afinidad por el receptor de estrógenos (Chávez *et al.*, 1985).

También se ha reportado que las progestinas NET, LNG y GSD presentan una fuerte actividad estrogénica. Esto sucede a nivel de transcripción y es diferente para cada tipo de RE alfa y beta (Pasapera *et al.*, 2001). Los efectos estrogénicos de estos compuestos a nivel de la transcripción, han sido evaluados, sin embargo los resultados son muy controversiales, ya que existen en la literatura quienes apoyan la capacidad la actividad estrogénica de las progestinas, y otros que las rechazan. Varios estudios muestran que en efecto, estas progestinas presentan una fuerte actividad estrogénica, en sistemas de transactivación de genes reporteros que contienen en su región promotora, elementos de respuesta a estrógenos activados por el RE α y β . (Pasapera *et al.*, 2001; García-Becerra *et al.*, 2003).

Estudios sobre el mecanismo de acción de las progestinas a nivel molecular (Pasapera *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 1995), han utilizado la uteroglobina (UG) uterina de coneja como marcador de actividad progestacional. Ellos demostraron que la interacción de la NET con el RP resulta ser agonista, ya que es capaz de inducir la síntesis de UG y RNAm de la misma manera que lo hace la progesterona (P_4) (Cerbón *et al.*, 1990; Pasapera *et al.*, 1995a). Contrariamente, el efecto resultante de la interacción del metabolito 5α -NET con el RP no fue de tipo agonista sino completamente antagonista (Pasapera *et al.*, 1995^a). Estos resultados ilustran claramente como una sola molécula es capaz de producir efectos antagónicos debido a la capacidad de biotransformación de los órganos blancos.

Recientemente, se demostró que los derivados 5 α -reducidos de NET, LNG y GSD, así como las moléculas originales, tenían la capacidad de activar la transcripción de genes andrógeno-dependientes (García-Becerra *et al.*, 2004).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de las progestinas sintéticas, principalmente aquellas derivadas de la 19-nortestosterona como Noretisterona, Levonorgestrel y Gestodeno, son ampliamente utilizadas como terapia anticonceptiva por más de 15 millones de mujeres en todo el mundo por su capacidad para inhibir la ovulación a través de la supresión de la liberación cíclica de gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH). Adicionalmente, se prescriben en la regulación del ciclo menstrual, en la terapia sustitutiva hormonal en mujeres, en proceso de climaterio y menopausia y en algunos cánceres hormono-dependientes como mama, endometrial, cérvico-uterino y próstata.

Uno de los problemas de la utilización de estas terapias es que, posterior a su administración, las progestinas ejercen efectos androgénicos como: acné, hirsutismo, alopecia y alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Estos efectos secundarios constituyeron la primera indicación de que estos compuestos ó sus derivados metabólicos podrían activar al receptor de andrógenos. Adicionalmente, varios estudios *in vivo* e *in vitro* de estas progestinas han reportado que poseen afinidad por el receptor de andrógenos (Chávez et al., 1985; Lobo, 1988; Cabeza *et al.*, 1995; Daney *et al.*, 1995)

Se ha determinado que estas progestinas se biotransforman a compuestos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A de la molécula. Al biotransformarse, estos metabolitos podrían adquirir la capacidad de interactuar con otros receptores a hormonas esteroides y desencadenar efectos diferentes a los del producto inicial.

Los mecanismos a través de los cuales las progestinas sintéticas presentan efectos de tipo androgénico Adicionalmente del progestacional, no han sido esclarecidos a la fecha. Los datos existentes en la literatura apoyan la hipótesis de que estos efectos se ejercen a través de la interacción de estos metabolitos con los diferentes receptores hormonales y que estos son mediados por un mecanismo similar al modo de acción de las hormonas esteroides naturales. Sin embargo, no existían datos que corroboraran esta hipótesis a nivel transcripcional.

Para determinar los mecanismos de acción de estas progestinas y sus metabolitos, en este trabajo se propuso evaluar el efecto transcripcional de estas tres progestinas y sus metabolitos correspondientes reducidos en el anillo A de la molécula y definir el papel biológico que tiene el receptor de andrógenos para mediar estos efectos. En este sentido, se utilizó un ensayo de transfección transitoria utilizando un vector reportero del gen de la luciferasa de luciérnaga regulado por elementos de respuesta a andrógenos. Adicionalmente, para corroborar las propiedades agonistas de estas progestinas y sus metabolitos, se empleó el sistema del doble híbrido en células de mamífero, ya que previamente se ha reportado que la unión de hormonas naturales agonistas, como testosterona y dihidrotestosterona, causan cambios

conformacionales en la molécula que promueven la interacción de los dominios amino y carboxilo terminal del receptor de andrógenos y que esta interacción es importante para las funciones de dimerización, unión al DNA y la actividad transcripcional.

Adicionalmente, este tipo de sistemas permite estudiar la regulación que ejercen estos receptores a nivel molecular, permitiendo hacer estudios a varios niveles desde la activación del receptor hasta la regulación de la transcripción de proteínas específicas. Este estudio se desarrolló en un contexto promotor-célula específico después de la administración de estas tres progestinas sintéticas y sus metabolitos dihidro- y tetrahidro-reducidos. Se valoraron *in vitro* los efectos androgénicos sobre la transactivación mediada por el receptor de andrógenos y sobre la afinidad de las progestinas y sus metabolitos reducidos para inducir la formación del complejo amino-carboxilo terminal del receptor de andrógenos y poder llevar cabo el funcionamiento correcto del receptor de andrógenos para provocar su efecto biológico.

4. HIPOTESIS

Los efectos biológicos de las hormonas esteroides son principalmente mediados a través de la transcripción de genes específicos, la cual es el resultado de la interacción de estas moléculas con sus receptores intracelulares específicos, que permiten la fosforilación, dimerización y a su vez unirse con secuencias específicas dentro del DNA presentes en los genes hormono regulados. Las progestinas sintéticas NET, LNG y GSD son esteroides sintéticos capaces de interactuar con el receptor de andrógenos, por lo tanto, en estudios in vitro, las progestinas sintéticas y sus metabolitos serán capaces de inducir la transcripción de genes reporteros que presentan en su secuencia reguladora elementos de respuesta hormonal androgénica. Así también, estas progestinas señalan un patrón de conversión metabólica similar al de las hormonas esteroides naturales progesterona y testosterona, por lo tanto, los compuestos dihidro-reducidos potenciarán su efecto androgénico y disminuirá su efecto androgénico al sufrir la tetrahidro-reducción en el anillo A de cada progestina.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad andrógénica de NET, LNG, GSD y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A sobre la transcripción de promotores hormono-regulados, en células no blanco de hormonas esteroides.

5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

I. Evaluar el efecto Androgénico de NET, LNG, GSD y sus metabolitos reducidos en el anillo A, a nivel de transcripción inducida por el receptor de andrógenos. Para ello, se utiliza un gen reportero regulado por un promotor sintético que contiene elementos de respuesta a andrógenos (MMTV-LUC), cotransfectado con el RA humano, en células CV-1 no blanco para ningún receptor a hormonas esteroides,

II. Construir una curva dosis respuesta de transactivación del RA inducida por NET, LNG, GSD y sus metabolitos correspondientes 5α , $3\beta,5\alpha$ y $3\alpha,5\alpha$ en la línea celular CV-1.

III. Establecer las propiedades agonistas de cada progestina y sus metabolitos 5α , $3\alpha,5\alpha$ y $3\beta,5\alpha$ a través de la interacción Amino-Carboxilo terminal del RA con el empleo del sistema del doble híbrido del RA células de mamíferos.

6. JUSTIFICACION

El uso de las progestinas sintéticas como terapia anticonceptiva y sustitutiva en la mujer, principalmente aquellas derivadas de la 19-nortestosterona, ha sido una práctica que se ha ido incrementando con el tiempo. Sin embargo, los efectos colaterales resultantes de la administración de estos compuestos, sobre todo aquellos de tipo estrógeno y androgénico, deberían ser más ampliamente estudiados.

En el IMSS, el número de mujeres que utilizan anticonceptivos orales basados en estas progestinas asciende a más de 354,147, 6.2% de la población femenina que utiliza algún método anticonceptivo. A estas se le suman aquellas que utilizan inyectables que son más de 125,599 lo que constituye el 2.2% de la población de mujeres que regulan su fertilidad. Por lo tanto, se habla de un número importante de la población que corren el riesgo potencial de presentar efectos no deseables causados por el uso de progestinas sintéticas.

En este sentido, debido a la importancia que tienen las progestinas sintéticas como agentes estimulantes de la transcripción y a su amplio uso como anticonceptivos y en la terapéutica de algunos cánceres hormono-dependientes, en esta tesis se propuso estudiar, en líneas celulares no órgano blanco de andrógenos, la regulación hormonal de la transcripción ejercida por el estímulo de esteroides sintéticos en presencia de uno o más factores importantes para la transcripción.

La relevancia de este proyecto radica en que por una parte, permitirá el diseño de nuevas estrategias para la evaluación y mejoramiento de los fármacos ya existentes en el mercado y aquellos de nueva creación. Por otra parte, permitirá la formación de recursos humanos en Biología Molecular aplicada a la Medicina, quienes tendrán a su alcance el conocimiento y el manejo de metodologías altamente resolutivas en Biología Molecular, hecho que permitirá desarrollar una nueva etapa de investigación de frontera en el estudio de la regulación hormonal en México.

7. METODOLOGÍA

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

7.1.1 Vectores de Expresión

pCMV-hRA: Corresponde al receptor de andrógenos humano y ha sido donado por la Dra. Elizabeth Wilson de la Universidad de Carolina del Norte, USA (Lubahn *et al.*, 1988).

7.1.2 Vectores Reporteros

pMMTV-LUC: Esta construcción contiene el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) que contiene elementos de respuesta andrógenos, delante del cDNA que codifica para la luciferasa de luciérnaga y fue donado por Ron Evans (Yin *et al.*, 2003).

pRL-CMV: contiene el promotor/enhancer del citomegalovirus unidos al cDNA de la luciferasa *Renilla reniformes*, el cual le confiere una alta expresión constitutiva. Adicionalmente de funcionar como control interno de transfección (Boletín Técnico de Promega, Madison, USA).

7.1.3 Vectores de Expresión para el sistema del Doble Híbrido

pVP-ABC: Estos plásmidos confieren la región amino-terminal del receptor de andrógenos, así como el dominio de unión al DNA y parte de la región bisagra (aminoácidos 1-660 del RA). Fusionado al dominio de activación del factor de transcripción VP16 del virus del herpes simple.

pGAL-LBD: Este plásmido contiene la región carboxilo terminal del RA (aa 624-919), que incluye el dominio de unión al ligando y de transactivación AF-2. Esta fusionada a la región de unión de DNA de GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*. (Langley, 1995).

pG5-E1b-LUC: Este vector reportero posee cinco copias del elemento de respuesta de GAL4 (una proteína activadora de *Saccharomyces cerevisiae*), un promotor E1b-TATA unidos a la secuencia que codifica para la luciferasa de luciérnaga.

Estos vectores que conforman el sistema del doble híbrido fueron donados por la Dra. Elizabeth Langley (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

pSV-βGal: contiene el cDNA de β-galactosidasa que corresponde a un control interno para normalizar la eficiencia de la transfección (Promega, Madison, USA incluir año).

7.2 Esteroides

Los esteroides que se usaron a lo largo de este estudio fueron: la Noretisterona (17 α -etinil-17 β -hidroxi-4-gonano-3-ona), el Levonorgestrel (13 β -etinil-17 α -etinil-17 β -hidroxi-4-gonano-3-ona) y el Gestodeno (13 β -etil-17 β -hidroxi-4, 15-gonadieno-3-ona) (Figura 12) fueron adquiridos de la casa comercial Sigma (St. Louis MO, USA). Los metabolitos reducidos (5 α , 3 α ,5 α , 3 β ,5 α) de cada uno de estos compuestos (Figura 12) fueron sintetizados en la Facultad de Química, UNAM por el Dr. Gustavo de la Mora, por la técnica descrita según Bowers y colaboradores (1958).

Los agonistas naturales empleados del receptor de andrógenos fueron Testosterona (T) y 5 α -dihidrotestosterona (DHT) adquiridos en la casa comercial Sigma (St. Louis MO, USA).

Se utilizaron como antagonistas del RA, al acetato de ciproterona y la 4-hidroxi-flutamida, donados por la Dra. E. Langley (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM).

7.3 Cepa Bacteriana

La cepa de *E. coli* JM109, empleada fue obtenida de la casa comercial Promega (Boletín Técnico de Promega, Madison, USA), suministradas en alícuotas de 200 μ l y con 3 ng de células competentes como control (control positivo), en este trabajo se describe en la siguiente tabla 2:

Tabla 2. Cepa de *E. coli*.

| CEPA | GENOTIPO | UTILIDAD |
|------------------------------------|---|-----------|
| <i>E. coli</i> JM 109 (PROMEGA) | recA1, gyrA96, thi1, hsdR17 (r, m1) relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [f, tra D36, pro A+B ⁺ , lac1 [°] Z Δ M15] | clonación |

La bacteria *E. coli* fue crecida a 37°C con agitación de un medio rico Luria-Bertani (LB) o en placa utilizando el mismo medio con 1.5 % (p/v) de agar. La composición de los medios se describe en los manuales de

laboratorio (Sambrook *et al.*, 1990; Sambrook *et al.*, 2001). El crecimiento de los cultivos se midió por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Ultrapec 2000 (Pharmacia Biotech).

Las células de *E. coli* se conservaron durante largos periodos de tiempo a -70°C en medio de crecimiento con glicerol al 15% (p/v), después de haber sido alicuotadas.

7.4 Cultivo Celular

La línea celular CV-1 (células derivadas de riñón de mono verde africano) y la línea celular HeLa (línea epitelial de carcinoma de cervix humano) que fueron donadas gentilmente por el Dr. Jean Savouret (Le Kremlin Bicetre, Francia). Las líneas celulares empleadas no expresan receptores a andrógenos o progestinas endógenas.

Estas fueron mantenidas en cultivo a 37 °C en una atmósfera de humedad y 5% de CO₂ en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM-H, Gibco BRL Inc., Gaithersburg, MD, USA) alto en glucosa [con rojo de fenol (Gibco BRL, life technologies)], suplementado con 10% de suero fetal de bovino (FBS), con 0.1 UI/ml penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina. Las células fueron pasadas tres veces por semana usando tripsina-EDTA (0.25%).

7.5 MÉTODOS

7.5.1 Transformación de Bacterias

La transformación de las células competentes de *E. coli* se realizó mediante la técnica de choque térmico, siguiendo el método físico-químico descrito por Hanahan (Hanahan, 1983; Hanahan, 1985). A continuación se describe en breve la técnica que se empleó para la transformación de la cepa bacteriana:

Los plásmidos mencionados en la sección anterior fueron previamente cuantificados y diluidos a una concentración de 10 ng/μl.

Para introducir el DNA exógeno de los plásmidos de interés en la cepa bacteriana se depositó en un vial el DNA del plásmido a la concentración indicada con 100 μl de bacterias competentes de la cepa JM-109, se mezcló suavemente y se dejó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se dio un choque térmico (42°C por 55 segundos), inmediatamente se transfirieron en hielo por 5 min. Se adicionaron 900 μl de medio LB. Posteriormente, se agitaron por una hora a 37°C y finalmente se sembraron 20 μl del cultivo en cajas de LB-agar con Ampicilina (100 μg/ml) y se incubaron de 8 a 12 horas a 37°C. Al transcurrir el periodo de incubación se picó una colonia que contenía el DNA de interés y se puso a crecer en 5 ml de medio LB con

antibiótico a 37°C por 8 horas a 3000 rpm. Una vez crecidas, se hicieron alícuotas de 1 ml, se adiciono glicerol al 15 % como crioprotector y se congelaron a -70 °C.

7.5.2 Manipulación del DNA

7.5.2.1 Extracción y Purificación del ADN plasmídico

Para la extracción y purificación de los diferentes ADN plasmídicos de *E. coli* se empleó el estuche comercial QIAGEN ENDO-free plasmid purification kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) se siguieron las instrucciones de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante con algunas modificaciones.

Este estuche esta diseñado para la purificación por arriba de 500 µg de DNA plasmídico y esta basado en la extracción de ADN por lisis alcalina. Adicionalmente, nos permite obtener ADN libre de endotoxinas que mejora las condiciones de transfección al introducirlo a las líneas celulares.

Se picó una colonia recién aislada y se inoculó en 5 ml de medio LB (100 µg/ml ampicilina) para su crecimiento. Posteriormente, se tomaron 250 µl de bacterias conteniendo el ADN de interés en 250 ml de medio LB con ampicilina (100 µg/ml ampicilina). Se pusieron a crecer nuevamente por 8 horas a 37°C durante 16 horas, con agitación vigorosa (200 rpm). Se centrifugó a 600 rpm por 15 minutos a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 10 ml de la solución P1. Se adicionaron 10 ml de la solución P2, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionaron 10 ml de la solución P3 y se mezcló. El lisado se adicionó a la columna de QIAfilter Cartridge y se incubo a temperatura ambiente por 10 minutos. Se insertó el embolo en la columna QIAfilter Cartridge y el lisado se transfirió a la columna QIAGEN Tip Maxi previamente equilibrada con 10 ml de la solución QBT. Se permitió que el lisado pasara por la columna por gravedad. Se lavó dos veces la QIAGEN Tip con 30 ml de la solución QC y se eluyó el ADN con 15 ml de la solución QF. El ADN se precipitó con 10.5 ml de isopropanol, se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

Para determinar la pureza y concentración de los plásmidos, el ADN se resuspendió en TE y se determinó su concentración por medio de la lectura de la absorbancia a 260 y 280 nm. La electroforesis fue realizada en un gel de agarosa al 1.2 % en una solución de corrida de TBE 1X, para observar la integridad del ADN. Se corrieron 0.5 µg de cada producto de purificación y se observaron en un transiluminador de luz UV a 260/289 nm.

7.5.3 Transfección Transitoria

Los métodos de introducción del ADN al interior de la célula que se emplearon fueron lipofectamina (liposomas que contienen lípidos catiónicos) de lipofectamine™ reagent (Invitrogen Life Technologies) para el modelo de transactivación del RA y con Efecteno no-liposómico (QUIAGEN, Inc., Valencia, CA), basado en dendrímeros que condensan al DNA para obtener una máxima eficiencia en la transfección, para el sistema del doble híbrido en mamíferos.

7.5.4 Estimulación Hormonal

Posterior a la transfección, las células fueron estimuladas a diferentes dosis (concentraciones molares) de hormonas naturales utilizadas como controles positivos, antihormonas por presentar efectos antagónicos y las progestinas de interés, así como sus metabolitos reducidos en el anillo A. Adicionalmente de emplear como control el vehículo en el cual fueron disueltos las progestinas y sus metabolitos.

Después de las 24 horas de estimulación hormonal correspondiente, se aspiró el medio de cultivo de las células y se lavaron dos veces con PBS 1X, se aspiró a sequedad el PBS y se agregaron 100 µl de solución de lisis por pozo (PLB-5X, Promega-Madison, USA)

7.5.5 Ensayo Enzimático de Luciferasas

Para evaluar el efecto androgénico de las progestinas sobre la actividad del gen reportero, se determinaron los niveles de las enzimas de luciferasa de luciérnaga y de renila, mediante la reacción de oxidación del sustrato luciferina, dependiente de ATP (Boletín Técnico de Promega, Madison, USA).

Para normalizar la transfección se determinaron los niveles de la enzima renila con el mismo tipo de ensayo de luciferasa o β-galactosidasa con su ensayo correspondiente.

7.5.6 Ensayo de β-galactosidasa

Para evaluar la eficiencia de la transfección se cuantificó la actividad de β-galactosidasa. Se preparo una reacción estándar de 200 µl, que contiene 40 µl de extracto celular, 80 mM de buffer de fosfato de sodio, pH 7.3, 102 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co. St. Louis MO), 9.0 mM de MgCl₂ (Sigma Chemical Co. St. Louis MO) y 8.0 mM de rojo de clorofenol β-D-galactopiranosida (CPRG) (Boehringer Mannheim GmbH, Germany) como sustrato. Posteriormente, se incubó a 30 °C durante una hora. Al finalizar la incubación se cuantificó por espectrofotometría a la longitud de onda de 560 nm.

7.5.7 Análisis Estadístico

Los programas que se emplearon para graficar y hacer el análisis estadístico fueron SigmaPlot versión 9 (SYSTAT Software, 2004).

Los resultados se expresaron como medias \pm D. E. para cada experimento y se analizaron mediante la prueba de varianza ANOVA de una sola vía. Posteriormente, para las múltiples comparaciones del control con los diferentes tratamientos de las progestinas, se utilizó la prueba de DUNET.

7.5.8 Sistema del vector reportero MMTV-LUC y el RA inducido por las progestinas sintéticas y sus metabolitos en la línea celular CV-1.

Para evaluar el efecto androgénico de las progestinas sintéticas y sus metabolitos (figura 12 y 13) se llevaron a cabo ensayos de transfección transitoria utilizando el receptor de andrógenos y un gen reportero de luciferasa dependiente de RA.

Las transfecciones se realizaron en la línea celular CV-1 la cual carece de receptores endógenos de hormonas esteroides, lo que permite evaluar de manera individual y sin interferencias al receptor transfectado. Las células fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM-H Gibco BRL, Inc., Gaithersburg, MD, USA) (alto en glucosa), con rojo de fenol suplementado con 10 % (v/v) suero fetal bovino (Hyclone), 2mM L-glutamina (GibcoBRL), y una dilución 1:100 de penicilina/estreptomicina (GibcoBRL), mantenidas a 37°C en una atmósfera de humedad y 5 % de CO₂. La transfección se realizó con un kit comercial de lipofectamina™ reagent (Invitrogen Life Technologies).

Para determinar la eficiencia de la transfección se cotransfectó con el control de expresión de luciferasa de renilla pCMV-renilla o β-galactosidasa, los cuales se expresan de forma constitutiva, lo que permite la normalización de la transfección.

En breve se describe el protocolo de transfección:

Las células de la línea celular CV-1 fueron sembradas un día antes de la transfección, a una densidad de 6×10^4 por pozo, en cajas de 12 pozos.. Al día siguiente, las células se observaron al microscopio para verificar su confluencia celular (del 50% al 80%). Las transfecciones se realizaron por triplicado para cada transfección del receptor.

Para realizar la transfección transitoria se empleo *lipofectamina™ reagent* (Invitrogen Life Technologies). Esta lipofectamina viene acompañada de un reactivo, *PLUS reagent*, que forma complejos con el ADN aumentando la eficiencia de unión de este ADN a la lipofectamina. El proceso a seguir es el siguiente:

El día previo a la transfección, se sembraron las células y se dejaron crecer en medio sin antibiótico. Cuando las células habían alcanzado entre un 50-80% de confluencia, fue sustituido el medio de cultivo, por medio sin suero y sin antibiótico. El ADN (1 y 2 μg de ADN total), compuesto por ADN plasmídico del reportero MMTV-Luc (0.25-0.5 μg), el vector de expresión de hRA (pCMVhRA) (0.05 μg), renila (pCMVrenila) o ADN del vector β -Gal (0.05 μg), se diluyeron en medio sin suero y se le añadió *Plus reagent*, se mezcló y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido el periodo de tiempo, el ADN se mezcló con la lipofectamina, se diluyó en medio sin suero y se incubó por otros 15 minutos. El complejo fue añadido a las células. Después de cinco horas de incubación, el medio de las células fue cambiado por medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal de bovino. Las células se procesaron entre 24 y 48 horas después de la transfección.

Posterior a la transfección, las células se lavaron con PBS 1X dos veces y se realizó el estímulo hormonal a diferentes concentraciones (1×10^{-6} hasta 1×10^{-11}). Las progestinas y sus metabolitos fueron disueltas en etanol y diluidas en DMEM-H sin rojo de fenol, suplementado con suero de cabra pretratado con una mezcla de carbón-dextran, para quitar los esteroides que pudiera contener y poder afectar al experimento. El estímulo de cada hormona se realizó por triplicado durante 24 horas.

Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X, se recolectaron y se lisaron con el amortiguador de lisis pasivo 1X, que contenía el estuche comercial de lectura de la actividad de luciferasas (PLB-5X, Promega-Madison, USA).

Finalmente, se recolectó el extracto celular y se almacenó a -70°C en tubos eppendorf y posteriormente se tomó lectura en el luminómetro. Todos los experimentos fueron registrados por triplicado y con repeticiones para su lectura en el luminómetro.

Los datos fueron normalizados con la actividad de la luciferasa de renila o β -galactosidasa para determinar la eficiencia de la transfección.

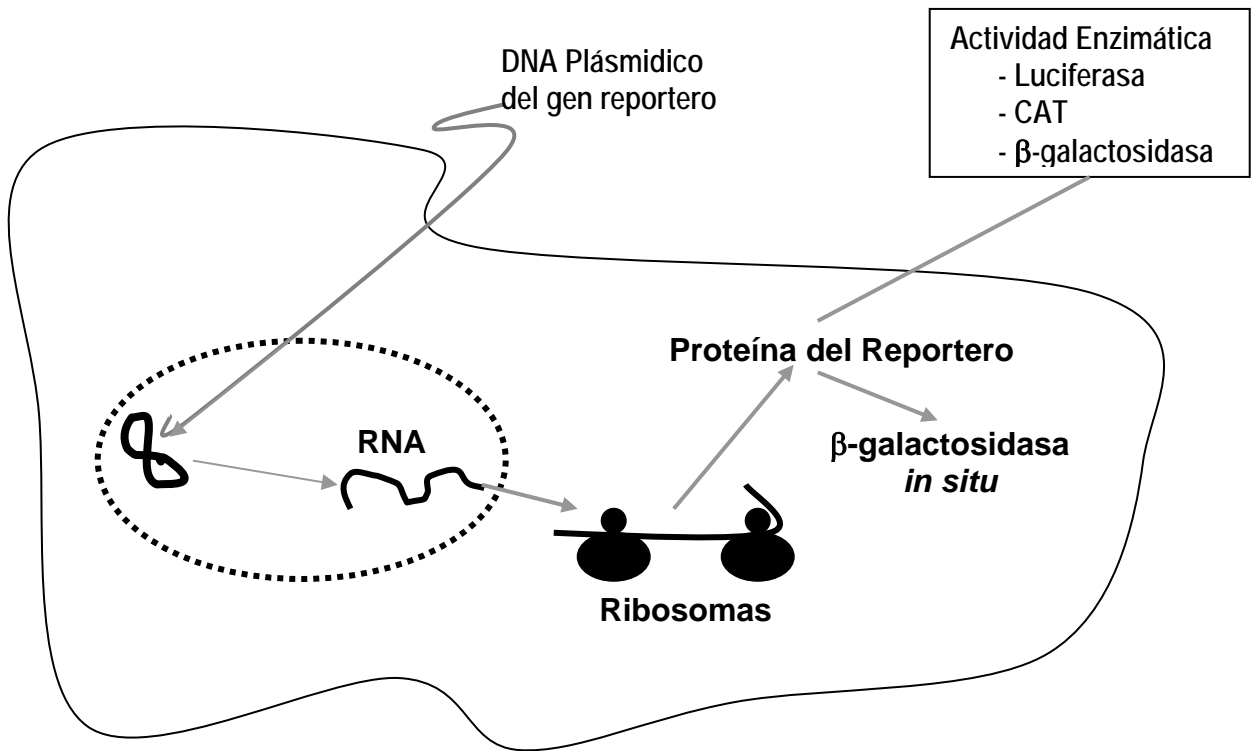


Figura 13. El Sistema de Vectores Reporteros en líneas celulares permite estudiar la regulación que ejercen los receptores a hormonas esteroides a nivel molecular, permitiendo hacer estudios a varios niveles desde la activación del receptor hasta la regulación de la transcripción de proteínas específicas. Los genes de los vectores reporteros junto con los del vector de expresión del receptor de hormonas esteroides se integran de forma transitoria en el genoma de la célula eucarionte con la alta capacidad de replicarse, transcribirse y traducirse en una proteína con actividad enzimática (Brasier y Ron, 1992; Olesen *et al.*, 2000; Mueller, 2002).

7.5.9 Interacción del Sistema del doble-híbrido del receptor de andrógenos inducido por las progestinas sintéticas.

Con la finalidad de conocer la interacción de los diferentes ligandos con el receptor de andrógenos, se llevo a cabo la técnica del doble híbrido en células de mamífero. Dicha técnica permite detectar *in vivo* las interacciones proteína-proteína.

Este sistema se basa en la presencia de dominios modulares que se encuentran en algunos factores de transcripción: un dominio de unión al DNA, el cual se une a una secuencia específica de DNA y un dominio de activación transcripcional, el cual interacciona con la maquinaria general de transcripción (Fields y Song, 1989; Crieckinge y Beyaert, 1999).

Para llevar a cabo nuestro objetivo, se tiene como antecedente que existe una interacción de los dominios amino terminal y carboxilo terminal de la proteína del receptor de andrógenos humano (figura 14), y esta interacción requiere para su ensamble la unión de alta afinidad de ligandos agonistas (Kempainen *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2003; Cillewaert *et al.*, 2006).

Se empleó la línea celular HeLa cultivadas en un medio esencial con sales Earle's y L-glutamina (MEM GibcoBRL) suplementado con 10 % (v/v) de suero fetal de bovino (Hyclone), 2 mM de L-glutamina (GibcoBRL), a una dilución 1:100 de penicilina/estreptomicina (GibcoBRL). Estas fueron mantenidas en cultivo a 37°C en un ambiente húmedo y 5 % de CO₂. Se sembraron 2 x 10⁵ células por pozo en cajas de seis pozos y se mantuvieron en dichas condiciones, hasta alcanzar una confluencia del 60 al 80%.

Al alcanzar la confluencia, los plásmidos que se emplearon para la transfección en la línea celular HeLa fueron los siguientes: GAL-LBD (0.1 µg), VP-ABC (0.1 µg) y G5-E1b-LUC (0.2µg) (Figura 14).

Se transfectaron empleando el estuche comercial Effectene (QIAGEN Inc., CA), que presenta una gran eficiencia de transfección, baja citotoxicidad y requiere de bajas concentraciones de ADN. Este requiere de dos pasos: el primero, se mezcló el ADN de los vectores con el enhancer y un buffer que contenía el estuche, esto permitió obtener una condensación eficiente del DNA y concentraciones de sales óptimas; se requiere de 2 a 5 minutos. Al transcurrir este tiempo, se adiciono 1µl del reactivo Effectene a la mezcla, se mezcló con vortex por 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente de 5-10 minutos para formar el complejo ADN-Effectene. Posteriormente, el complejo se mezcló con 0.4 ml medio de cultivo con suero y antibiótico. Finalmente, se añadió a cada pozo 0.4 ml de este complejo y 0.8 ml de medio, se incubó durante toda la noche a 37°C con 5 % de CO₂.

Al siguiente día se aspiró el medio de la transfección y se lavó con 2 ml de PBS 1X (buffer salino de fosfatos). Se reestableció con 2 ml de medio sin rojo de fenol, sin suero fetal de bovino. Las hormonas que fueron previamente disueltas en etanol absoluto (vehículo), se adicionaron al medio durante 24 horas a una concentración final de 1 y 100 nM.

Después de 24 horas las células se lavaron con 2 ml PBS 1X. La solución salina se aspira y se adicionaron 0.2 ml de buffer de lisis pasivo 1X que contiene el estuche para lisarlas y cuantificar su actividad enzimática.

Para su análisis de la actividad de la enzima reportera se tomaron 3 μ l de cada muestra y se analizan con 10 μ l de sustrato de luciferasa de luciérnaga según, el protocolo de Promega. Las unidades relativas de luciferasa fueron determinadas usando un luminómetro Monolight 3010 (Pharmingen).

Todos los experimentos fueron registrados por triplicado y con repeticiones para su lectura en el luminómetro. Los datos fueron normalizados para determinar la eficiencia de la transfección con la actividad de β -galactosidasa.

RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

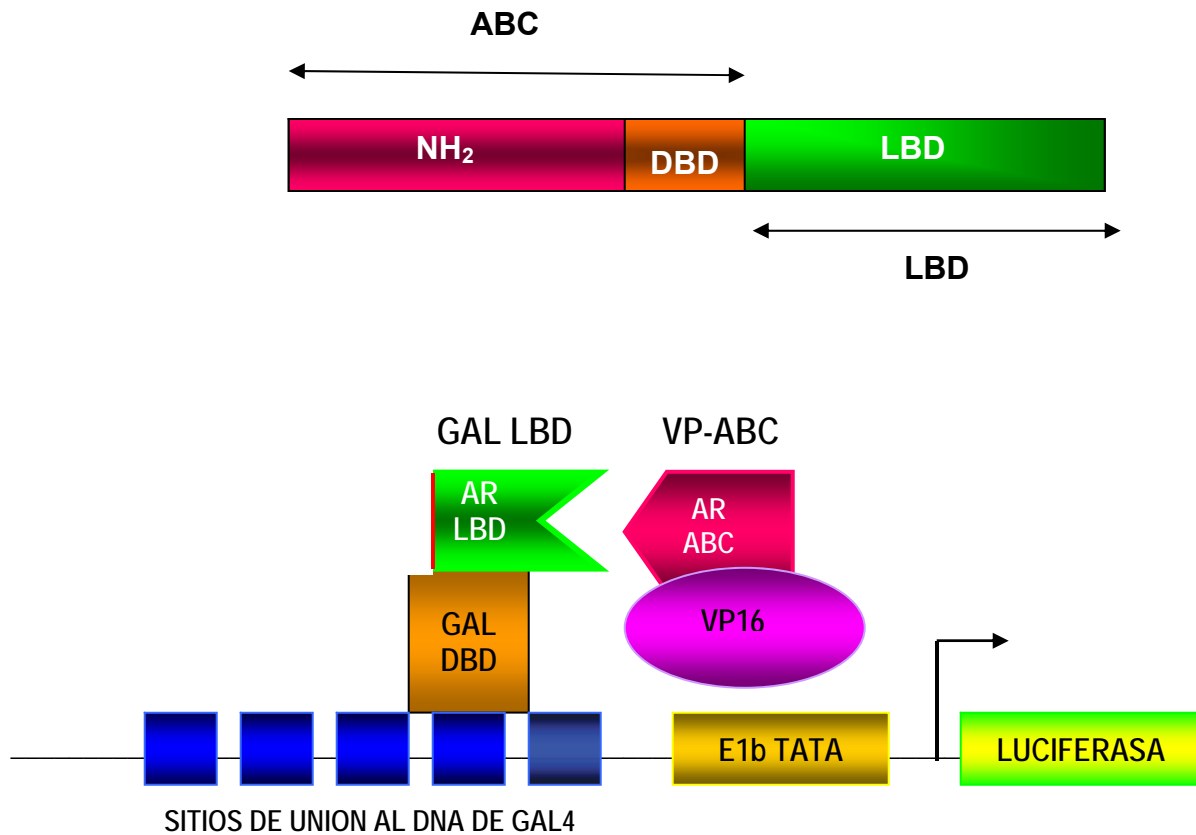


Figura 14. Representación esquemática de vectores quiméricos GAL-LBD (624-919 aa), VP-ABC (1-660) y 5XGAL-Luc. En la figura se señalan los plásmidos que se emplearon en el sistema del doble híbrido para promover el ensamblaje del receptor de andrógenos que a su vez puede ser inducido por las hormonas sintéticas y sus metabolitos. La transactivación del RA se expresa con el vector reportero de Luciferasa en la línea celular HeLa.

8. RESULTADOS

8.1 Actividad Androgénica inducida por NET, LNG, GSD y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A.

La estrategia que se utilizó para evaluar la actividad androgénica de las progestinas derivadas de la 19-nortestosterona, así como a sus metabolitos dihidro y tetrahidro reducidas en el anillo A, a nivel de la transcripción, es aquella derivada de la transfección de un vector reportero que contiene en su secuencia promotora elementos de regulación positiva, reconocidos por el RA cuando es activado por su ligando (Figura 13). Este tipo de metodologías han demostrado ser eficientes y adecuadas para evaluar la actividad transcripcional de varios receptores nucleares (Alam y Cook, 1990; Mueller, 2002; Simon y Mueller, 2006).

El vector reportero que se empleó consta del cDNA que codifica para la luciferasa de luciérnaga, regulado por el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el cual es regulado de manera positiva por dos sitios (ARE) en su secuencia promotora. La evaluación de la actividad de la luciferasa en los extractos celulares transfectados con estos vectores son considerados de manera proporcional al RNAm de la transcripción (Meighen, 1991; Belikov *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2002; Mueller, 2006).

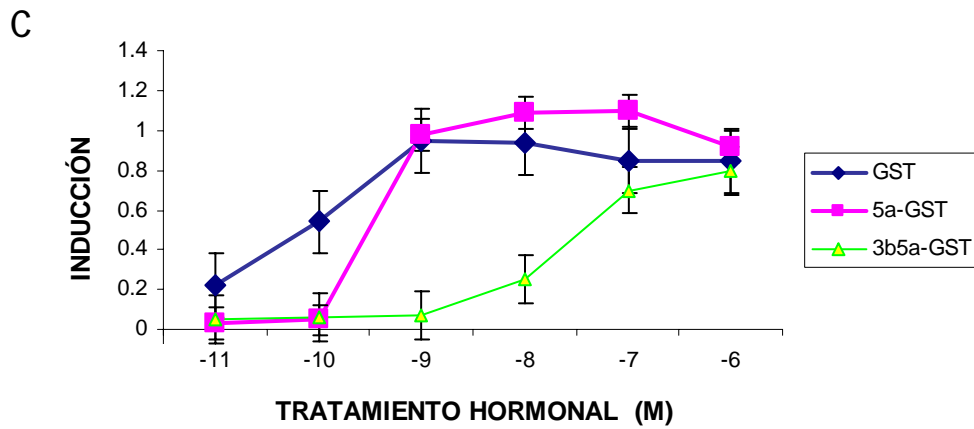
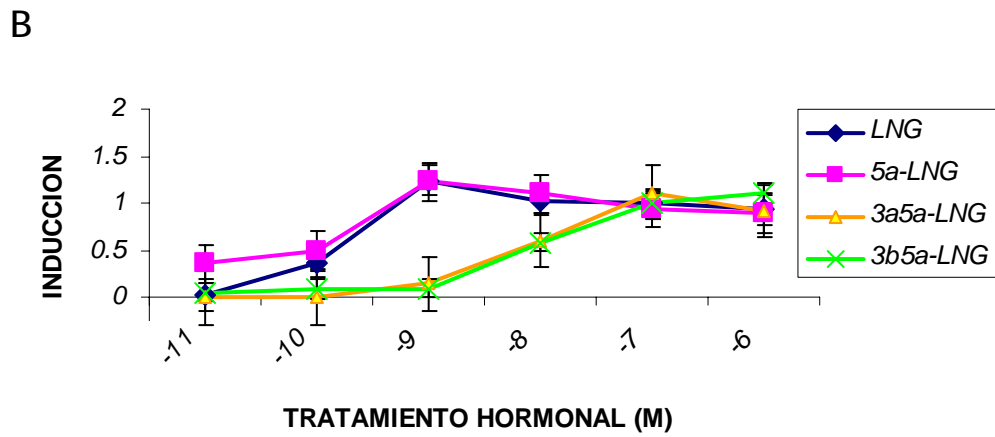
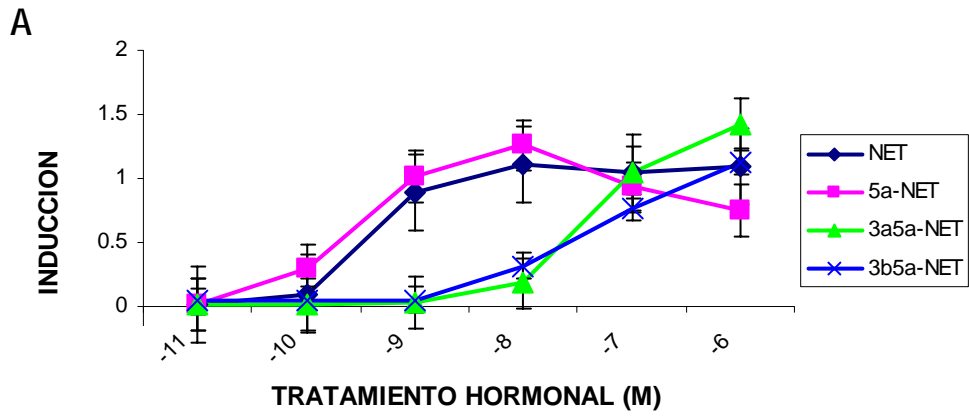
El plásmido MMTV-LUC se cotransfectó con el vector de expresión del RA humano y luciferasa de renilla (control de transfección) en la línea celular CV-1 que no expresa el receptores de andrógenos. Posterior a la transfección, las células fueron estimuladas con los ligandos a diferentes dosis. Se construyó una curva dosis-respuesta de las progestinas NET, LNG, GSD y sus metabolitos reducidos en el anillo A para determinar la dosis óptima de transactivación del receptor de andrógenos humano, utilizando como controles positivos de transactivación del RA, T y DHT, y el control negativo del vehículo (etanol absoluto), en cual estaban disueltas las hormonas. Las dosis usadas eran crecientes de 1×10^{-11} a 1×10^{-6} .

En la gráfica 1, se observa que la 5α -NET y NET (1A) fueron las progestinas que presentaron mayor actividad agonista para el receptor de andrógenos comparadas con los metabolitos tetrahidro-reducidos, ya que aquellos muestran una débil interacción con el RA. Esto confirma los experimentos reportados de afinidad de unión al ligando de esta progestina y sus metabolitos correspondientes por el RA.

La progestina LNG (1B) sigue el mismo comportamiento que NET, ya que la 5α LNG y el LNG presentan propiedades agonistas para el RA, lo que confirma los estudios reportados de afinidad por el RA. En cuanto

a los metabolitos tetrahidro-reducidos muestran que al tetrahidro-reducirse se debilita su interacción con el RA, reduciendo su respuesta hormonal.

Se observa claramente que la progestina GSD (1C), a pesar de ser una progestina sintética de tercera generación y que se ha reportado presenta mayor afinidad por el RE, en este caso con esta metodología se muestra que GSD y su metabolito 5α -GSD poseen la capacidad de interactuar con el RA desencadenando efectos androgénicos, y aunque en este experimento no se contaba con el tetra-epímero $3\alpha,5\alpha$, se observa como su epímero $3\beta,5\alpha$ muestra el mismo comportamiento, que los metabolitos tetrahidro-reducidos de las progestinas sintéticas NET y LNG. Adicionalmente, este experimento sirvió para obtener la concentración máxima para activar al receptor de andrógenos e inducir la transcripción que correspondió a 1×10^{-8} y 1×10^{-9} M para NET, LNG, GSD y los metabolitos dihidro-reducidos, a diferencia de los metabolitos tetrahidro-reducidos que presentaban una inducción máxima a la concentración 1×10^{-8} M, esta actividad fue la mayor actividad inducida que se presentó en todas las progestinas y sus metabolitos. El empleo de las hormonas Testosterona y DHT se nota claramente una curva dosis-respuesta que aumenta con la concentración de la hormona llegando a una saturación a la dosis de 10^{-8} M o 10 nM. La DHT fue la hormona más potente, ya que induce la transactivación del RA a menor concentración.



Gráfica 1. Curva de Transactivación del RA inducido por A) NET, B) LNG y C) GSD y sus metabolitos correspondientes. reducidos en el anillo A de la molécula, a diferentes concentraciones molares (10^{-11} a 10^{-6} M), cotransfectado con el vector de expresión del receptor de andrógenos humano (pCMVhRA), el vector reportero MMTV-LUC y renila en la línea celular CV-1. (Cada punto representa la media de tres experimentos \pm D. E), independientes y los valores son presentados con la inducción de LUC por los esteroides sintéticos y sus metabolitos.

Con los resultados obtenidos en este estudio las progestinas derivadas de la 19-nortestosterona utilizadas fueron capaces de activar el receptor de andrógenos desencadenando la transcripción del vector reportero sensible a andrógenos.

8.2 Evaluación Androgénica de NET, LNG, GSD y sus correspondientes metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A de la molécula 19-nortestosterona.

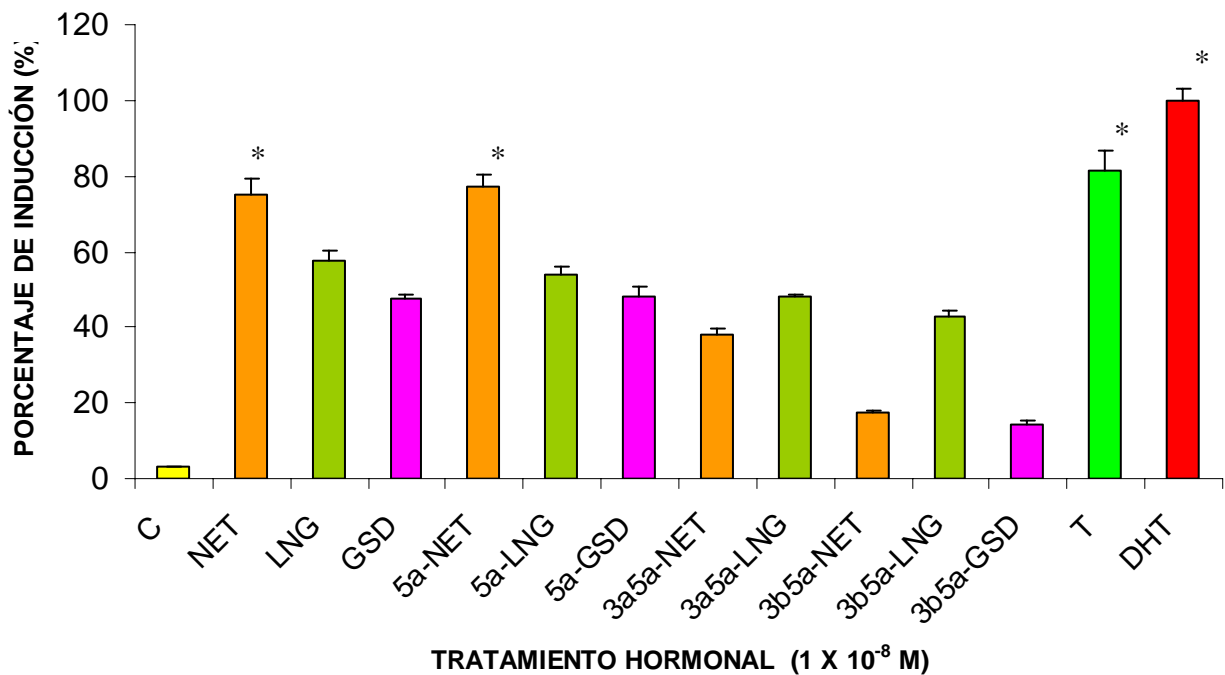
Para evaluar la actividad androgénica de las progestinas y sus metabolitos correspondientes se empleó la concentración óptima de transactivación del receptor de andrógenos humano, en el sistema de reporteros empleando Luciferasa y el promotor MMTV en la línea celular CV-1 no blanco de hormonas esteroides.

En la gráfica 2 se observan los porcentajes de inducción de las progestinas y sus metabolitos en experimentos individuales por triplicado.

Se utilizó como control el vehículo en el cual se disolvieron las progestinas y sus metabolitos, este no presentó ninguna inducción para activar el vector reportero como se puede observar en las gráficas.

La potencia que presentaron las progestinas y sus metabolitos fue la siguiente: 5α -NET > , NET > LNG > , 5α -LNG > , 5α -GSD > , $3\alpha,5\alpha$ -LNG > , GSD > , $3\alpha,5\alpha$ - NET > , $3\beta,5\alpha$ -NET > , $3\alpha,5\alpha$,-GSD.

Como se esperaba, por informes previos de afinidad de unión relativa del RA (Chávez *et al.*, 1985), la reducción de la molécula resultó en la ganancia significativa de la potencia transcripcional de NET LNG y GSD, así como de algunos de sus metabolitos dihidro-reducidos. Los compuestos 5α -NET y NET activaron la transcripción de la enzima LUC con mayor potencia en relación a las progestinas LNG, GSD y sus metabolitos. Los de menor potencia fueron los metabolitos tetrahidro-reducidos ocasionando menor transactivación del RA en relación a los otros compuestos.



Gráfica 2. Se presentan todas las progestinas sintéticas junto con sus metabolitos dihidro-reducidos y tetrahidro-reducidos, evaluadas a la concentración (10^{-8} M). Cada barra representa la media de tres experimentos por separado + D.E). Los asteriscos indican las diferencias estadísticas significativas (* $P \leq 0.005$)

8.3 Interacción amino y carboxilo terminal de receptor de andrógenos estimulado con las progestinas NET, GSD, LNG y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A.

Para determinar la formación del complejo amino y carboxilo terminal del receptor de andrógenos inducido por NET, GSD, LNG y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A derivados de la 19-nortestosterona, se utilizó el ensayo del doble híbrido en mamíferos, en células de la línea epitelial de carcinoma de cervix humano (HeLa) (Asselin *et al.*, 1979; Langley *et al.*, 1995) las cuales no presentan receptores a esteroides. Se les cotransfectó con los vectores de RA pVP-ABC que corresponde a la región amino-terminal y de unión al DNA, pGAL-LBD correspondiente a la región carboxilo-terminal de la proteína (RA), pG5-E1b-LUC el vector reportero de luciferasa y vector β -gal para normalizar la eficiencia de la transfección (Figura 12 y 14).

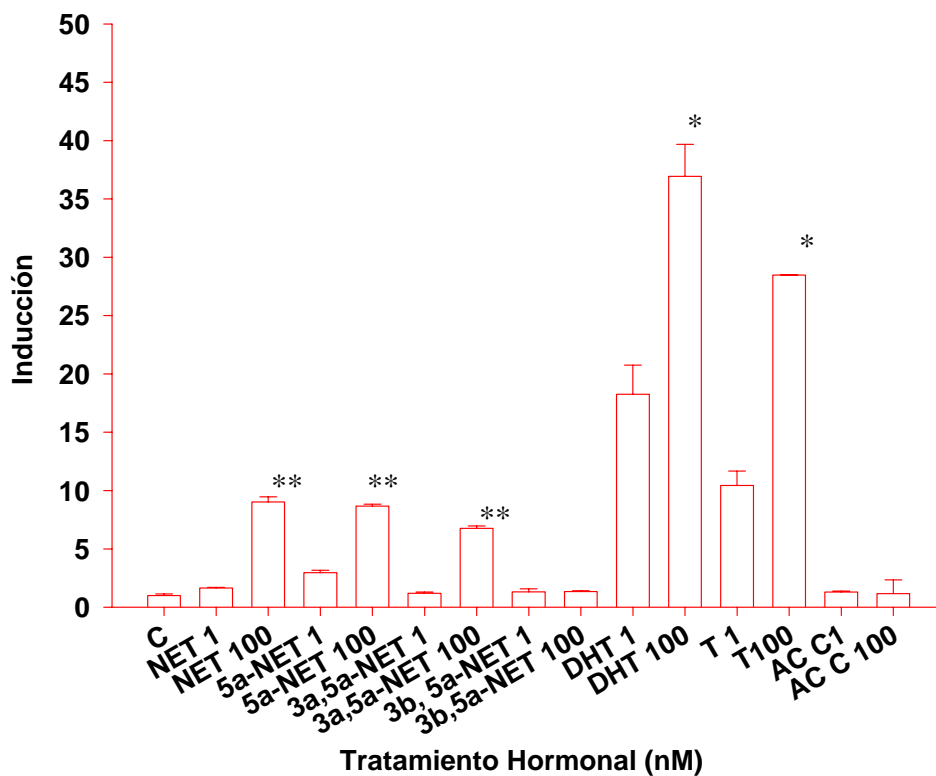
Se emplearon dos concentraciones 1 y 100 nM para todas las progestinas y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A comparada con los controles positivos naturales como testosterona, DHT, y un antagonista, acetato de ciproterona. Como control negativo, el vehículo (alcohol absoluto) en el cual se disolvieron dichos esteroides de hormonas.

Se puede observar en las gráficas 2-4, el control negativo no presenta ninguna interacción entre las regiones amino y carboxilo del receptor de andrógenos medida a través de la activación de LUC.

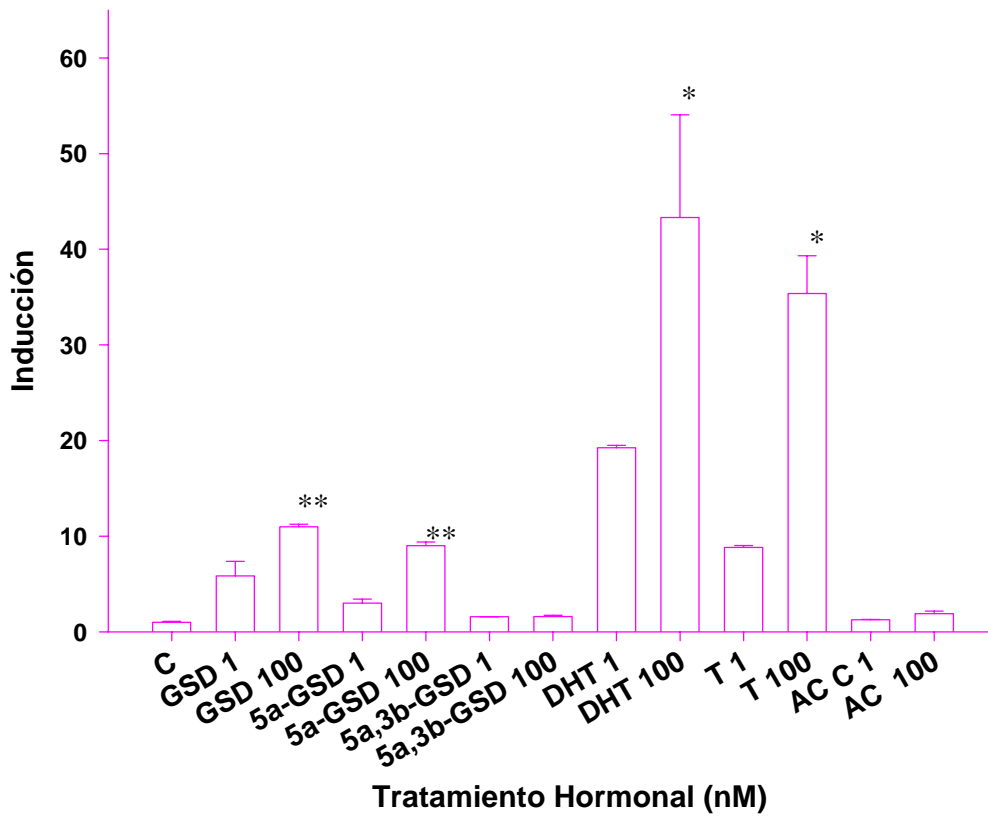
Los controles positivos Testosterona y DHT, son ligandos específicos para el receptor de andrógenos mostraron interacción, mientras el acetato de ciproterona que es un antagonista no hubo interacción. En cambio NET, 5α -NET y $3\alpha,5\alpha$ -NET presentan una débil interacción de la proteína a concentraciones altas (100 nM), en cambio a dosis bajas (1nM) no hay ningún reconocimiento por parte de los dos integrantes de la proteína, el metabolito $3\beta,5\alpha$ -NET se observa claramente que no hay interacción de la proteína, por lo tanto ningún efecto.

Para GSD y sus metabolitos al ser tratados con dicho modelo experimental se observó que GSD y 5α -GSD son las únicas progestinas que tanto, a 1-100 nM logran presentar una débil interacción, lo que no se observó con el metabolito tetrahidro-reducido.

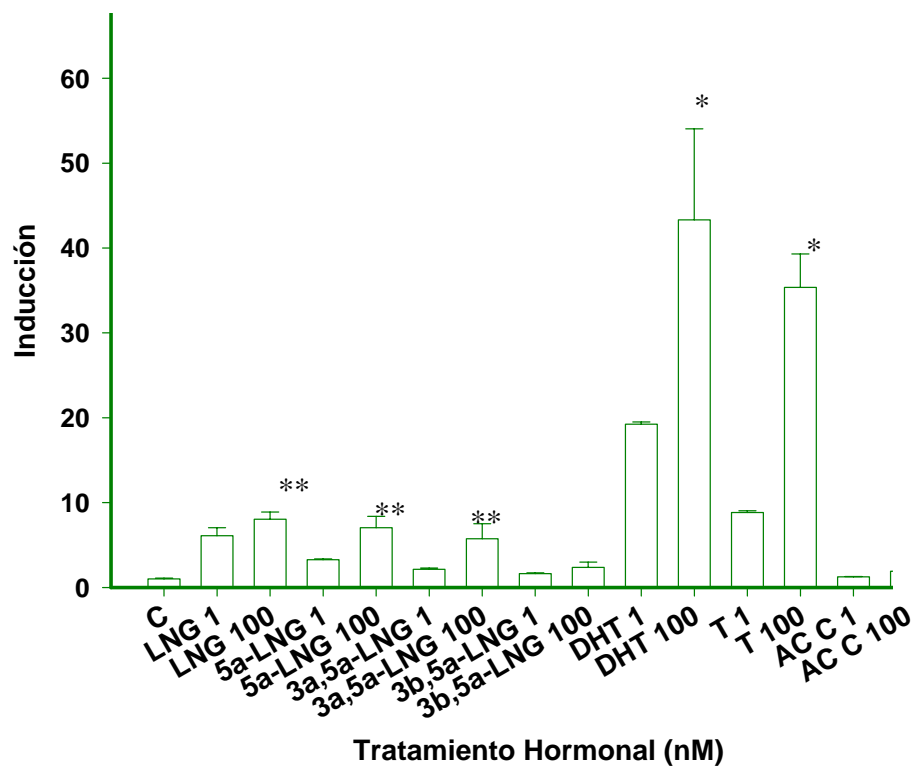
Finalmente, para LNG con las dosis probadas ya sea 1 o 100 nM, se presenta una débil interacción, lo mismo sucede para 5α -LNG y $3\alpha,5\alpha$ -LNG, claramente se observa que el metabolito tetrahidro-reducido $3\beta,5\alpha$ -LNG no induce ninguna interacción.



Gráfica 2. Transactivación del doble híbrido del receptor de andrógenos inducido por NET y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A, en la línea celular HeLa. (Cada barra representa la media de tres experimentos por separado \pm la D. E. M). Los asteriscos indican las diferencias estadísticas significativas (* $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.05$).



Gráfica 3. Transactivación del doble híbrido del receptor de andrógenos inducido por GSD y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A, en la línea celular HeLa. (Cada barra representa la media de tres experimentos por separado \pm la D. E.). Los asteriscos indican las diferencias estadísticas significativas (* $P \leq 0.001$, ** $P \leq 0.05$).



Gráfica 4. Interacción NH₂-COOH del receptor de andrógenos inducido por LNG y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos en el anillo A, en la línea celular HeLa mediante ensayos de doble híbrido del receptor de andrógenos. (Cada barra representa la media de tres experimentos por separado \pm la D. E. M). Los asteriscos indican las diferencias estadísticas significativas (* P \leq 0.001, **P \leq 0.05).

9. DISCUSIÓN

Las progestinas sintéticas NET, LNG y GSD derivadas de la molécula 19-nortestosterona, son metabolizadas tanto *in vivo* como *in vitro* a compuestos dihidro y tetrahidro-reducidos y presentan una gama de efectos hormonales y antihormonales. La reducción en el anillo A de las progestinas sintéticas de la serie 19-nor como son: NET, LNG y el GSD, a sus metabolitos correspondientes 5 α -dihidro y los tetrahidro-reducidos resultan en la pérdida de su actividad progestacional y adquieren diversas afinidades por otros receptores a hormonas esteroides, desencadenando efectos diferentes a los del producto inicial (Lemus *et al.*, 1992; Schoonen *et al.*, 2000; Larrea *et al.*, 2001; Blom *et al.*, 2001; Lemus *et al.*, 2001; Pasapera *et al.*, 2002).

En este trabajo se decidió evaluar el efecto androgénico de las progestinas y sus metabolitos ya que anteriormente se había reportado que dichas progestinas *per se* presentan efectos androgénicos reflejados en efectos secundarios fisiológicos que se expresan, en el fenotipo de las mujeres que consumen dichas progestinas por largo tiempo (alrededor de cinco años) tales como: acné, hirsutismo, alopecia y alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Adicionalmente, se había reportado que los metabolitos poseen afinidad por los receptores a hormonas esteroides, desencadenando efectos hormonales y antihormonales (Darney, 1995; Raudrant y Rabe, 2003; Kwok *et al.*, 2004; Benagiano *et al.*, 2004; Schindler, 2004; Kuhl, 2005; Koubovec *et al.*, 2005).

El modelo experimental que se utilizó en este trabajo fue un sistema de vectores reporteros que nos permite detectar y cuantificar con mayor eficiencia la actividad transcripcional en respuesta al estímulo hormonal mediado por las progestinas y sus metabolitos correspondientes (Alam y Cook, 1990; White *et al.*, 1994; Mueller, 2002; Hartig *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2002; Mata de Urquiza y Perlmann, 2003; Tomura *et al.*, 2003; Sonneveld *et al.*, 2005).

Adicionalmente, se utilizó el sistema de doble híbrido del receptor de andrógenos, el cual determina si la configuración inducida por algún ligando, en este caso las progestinas y sus metabolitos, promueve la interacción amino-carboxilo de este receptor. Estudios previos han determinado que esta interacción amino-carboxilo es importante para la actividad positiva del RA y se ha utilizado como una medida de agonismo de ligandos. En este caso, la interacción amino-carboxilo induce la expresión de un gen reportero de luciferasa. (Langley *et al.*, 1998; Kemppainen *et al.*, 1999; He y Wilson, 2002; Ghali *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004; Callewaert *et al.*, 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos y confirmados por otros trabajos, se demuestra la actividad androgénica de NET y de su metabolito 5α -NET *in vivo* e *in vitro*, en este trabajo ambos sistemas reportan que las progestinas con mayor potencia androgénica fueron 5α -NET y NET, pero tienen menor potencia en relación a Testosterona y DHT ligandos fisiológicos del RA. Estos resultados demuestran, que la actividad androgénica previamente reportada para NET y 5α -NET, esta relacionada a su interacción con el RA desencadenado de esta forma su actividad transcripcional, lo que permite interpretar que los cambios estructurales que sufre la molécula de NET dan por resultado que la 5α -NET tenga mayor afinidad por el RA y sea mayor su actividad androgénica (Chávez *et al.*, 1985; Lemus *et al.*, 1997; Campos *et al.*, 1999; Kubli *et al.*, 2002; Perusquía *et al.*, 2003; García-Becerra *et al.*, 2006).

Con estos resultados tanto NET como 5α -NET poseen la capacidad de interactuar con el RA induciendo los cambios conformacionales del mismo, para activar la transcripción de manera similar a la Testosterona y a la DHT, aunque con menor afinidad (Martini *et al.*, 2003; Janer *et al.*, 2005; Arlt, 2006). La reducción del anillo A de las progestinas, por efecto, de la 5α -reductasa generan compuestos 5α -reducidos que amplifican la respuesta androgénica tal como sucede en la testosterona.

Recientemente se ha demostrado, mediante el uso de modelos biomatemáticos, que de acuerdo a la similitud de la conjugación de los átomos de carbono C3=C3-C4=C5 y las propiedades estereoelectrónicas de las progestinas se permite que la afinidad por el receptor de progesterona y andrógenos desencadene efectos progestacionales y androgénicos, similares a las propiedades de testosterona y progesterona como también se demuestra por análisis tridimensionales cristalográficos en interacción progestina-receptor (Williams y Sigler, 1998; Sack *et al.*, 2001; Sack *et al.*, 2001; Kubli *et al.*, 2002; Shaffer *et al.*, 2004; D'Ursi *et al.*, 2005; Schaufele *et al.*, 2005; Bohl *et al.*, 2005; Farla *et al.*, 2005).

Otros estudios relacionados a la conformación del receptor de andrógenos, mediante ensayos de digestiones parciales del RA en presencia de las 19 *nor* progestinas y sus correspondientes derivados reducidos en el anillo A, demuestran que la 5α -reducción promueve la capacidad para inducir un cambio conformacional en el RA *in vitro*. De manera similar se observó que NET, LNG y el GSD, así como sus derivados reducidos en el C-5 del anillo A indujeron un cambio en la conformación del receptor similar al obtenido con DHT, pero los metabolitos tetrahydro-reducidos de las progestinas presentan una fragmentación proteolítica similar al obtenido con el tratamiento del receptor con el compuesto antagonista RU486 (García-Becerra *et al.*, 2004).

Estos estudios corroboran los resultados obtenidos a nivel transcripcional en los sistemas de vectores reporteros y del doble híbrido, que indican la naturaleza androgénica-agonista de estos compuestos, subrayando que la interacción del complejo ligando-receptor hace inducir el cambio conformacional,

dimerización e interacción con los elementos de respuesta hormonal para desencadenar una activación transcripcional (Huang *et al.*, 2002). También estos resultados confirman que el promotor empleado, el virus del tumor mamario de ratón ofrece un buen modelo para estudiar la regulación del complejo esteroide-receptor y la interacción con los factores de transcripción (Beato y Eisfel, 1997; Hager, 2000).

En este estudio, se demostró que el metabolito tetrahidro-reducido $3\alpha,5\alpha$ -NET también es capaz de inducir la activación transcripcional del receptor y provocar el ensamblaje del doble híbrido del RA, aunque con menor potencia en comparación con 5α -NET, NET, T y DHT. Este resultado demuestra la sensibilidad de la técnica del doble híbrido para detectar la actividad agonista de ligandos del RA, aún cuando es activado por compuestos con baja afinidad (Kempainen *et al.*, 1999; Van Criekinge y Beyaert, 1999; He y Wilson, 2002). La actividad androgénica de este metabolito se ve influenciada por su estructura espacial, ya que compuestos $3\alpha,5\alpha$ tetrahidro-reducidos, al tener una configuración 5α /trans hidroxilado con 3α les permite producir un compuesto más activo y estable que el $3\beta,5\alpha$ ya que este último parece ser un compuesto inactivo. Es decir, la hidroxilación en la posición 3α le confiere la capacidad de interactuar con el RA ya que la configuración alfa le transmite mayor estabilidad para asociarse al RA y desencadenar un efecto Androgénico. Este resultado está apoyado en estudios de la potencia de vasorelajación y la conformación estructural de los esteroides, como se ha observado en los esteroides naturales 5α -reducidos, estos presentan una alta potencia al adquirir una conformación estructural $3\alpha,5\alpha$ de la progesterona en el útero de diferentes especies, incluyendo al humano (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001; Martini *et al.*, 2003). También se puede observar que los andrógenos $3\alpha,5\alpha$, (androsterona y androstenediol) inducen un marcado efecto útero relajante y en recientes publicaciones se demuestran que NET y $3\alpha,5\alpha$ -NET ejercen efectos vasorelajantes en aorta torácica de manera similar a los andrógenos y probablemente el efecto biológico también se deba a su alta densidad electrónica en el anillo A, cuando es bioconvertido e hidroxilado en la posición alfa como sucede de manera similar en la progesterona (Kubli –Garfias *et al.*, 1998; Perusquia *et al.*, 2003).

Las progestinas Gestodeno y Levonorgestrel y principalmente sus metabolitos 5α -reducidos tienen la capacidad de interactuar con el receptor de andrógenos y el resultado de dicha interacción se traduce en efectos androgénicos aunque su potencia es menor en comparación con la NET. Estas progestinas *per se* presentan una actividad androgénica significativa por derivar de la molécula 19-nortestosterona, pero menos potentes cuando se compara con la actividad transcripcional inducida por DHT, T, 5α -NET, NET, $3\alpha,5\alpha$ -NET. Por otro lado, se observó a los derivados 5α -reducidos de estas dos progestinas (GSD y LNG)

también tienen la capacidad de activar la transcripción a través del RA. Esta observación se confirma con una serie de resultados que indican que la adición de un grupo etilo en el carbono 18 como en el caso de levonorgestrel incrementa su afinidad por el RA y que la presencia de una doble ligadura en el C-15 de la molécula de GSD no tiene efecto alguno. Los metabolitos tetrahidro-reducidos con la configuración $3\alpha,5\alpha$ y $3\beta,5\alpha$ de las progestinas sintéticas LNG, GSD y NET a excepción de $3\beta,5\alpha$ -NET, poseen afinidad por el RE (García-Becerra *et al.*, 2004), pero pierden su capacidad para unirse con el RA, lo que demuestra la especificidad estructural de los receptores para interactuar con diferentes ligandos (Cooney *et al.*, 2000; Lemus *et al.*, 2000; Larrea *et al.*, 2001; Lemus *et al.*, 2002; García-Becerra *et al.*, 2002; Pasapera *et al.*, 2004)

Actualmente, se han realizado estudios de competencia de unión al ligando, transactivación del RE con ambas subtipos transfectados de manera testable y se ha demostrado que los metabolitos $3\beta,5\alpha$ presentan una alta preferencia por el RE α y menor con el RE β de las tres progestinas, a excepción de $3\beta,5\alpha$ -GSD la cual muestra una tendencia similar para interactuar con ambos subtipos del RE (Escande *et al.*, 2006; García-Becerra *et al.*, 2006).

Los resultados del sistema del doble híbrido reflejan una interacción intermolecular entre el amino y carboxilo terminal del RA requeridos para la transactivación completa del receptor inducida por las progestinas NET, LNG y GSD a sus correspondientes metabolitos reducidos en el anillo A.

Con este estudio se demuestra que las progestinas NET, LNG y GSD poseen la capacidad de inducir los cambios conformacionales en el dominio de unión al ligando del RA necesarios para desencadenar actividades androgénicas, así como sus metabolitos 5α -reducidos correspondientes. Mediante esta técnica se corrobora una vez más que estas progestinas sintéticas siguen la misma conducta de biotransformación como que las hormonas naturales: Testosterona y Progesterona y adquieren mayor capacidad de interacción con el RA que las progestinas *per se*.

Los resultados de este estudio pueden explicar ciertos efectos secundarios presentes, en la administración de dichas sustancias que comúnmente se usan en México y en todo el mundo como método anticonceptivo para la planificación familiar y como terapia hormonal en varios padecimientos. Los efectos adversos a los que están expuestas las personas se ven influenciadas por la biotransformación que sufren a compuestos dihidro-reducidos en la posición 5α y las propias progestinas. Estos poseen la capacidad de interactuar con el receptor de andrógenos y desencadenar un efecto biológico dependiente de la potencia.

El mecanismo de acción de las progestinas y su efecto biológico está en función de la estructura química, su afinidad por el receptor a hormonas esteroideas, su biotransformación, los cambios conformacionales que sufre el receptor al interactuar con el ligando y por lo tanto, el reclutamiento de coactivadores o

correpresores, cofactores que respondan a las hormonas esteroides y finalmente la dosis y la tasa metabólica (Cosimo *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 2000; Nirdé *et al.*, 2001; Shields-Botella *et al.*, 2003; Hillish *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2003; Mundana *et al.*, 2004; Bonsái-Machado *et al.*, 2004; Attardi *et al.*, 2004; Prifti *et al.*, 2004; Death *et al.*, 2004;; Dennis y O'Malley, 2005; Geserick *et al.*, 2005; Hashimoto y Miyachi, 2005; Togashi *et al.*, 2005).

Los resultados generados con el uso de vectores reporteros en este trabajo se correlacionan con los resultados previamente publicados sobre los efectos biológicos de los metabolitos 5 α -reducidos de las progestinas (Lemus *et al.*, 1994; Enríquez, 1997).

El sistema de vectores reporteros, que en este estudio se empleo el promotor MMTV que transcrpcionalmente controlado por hormonas estroides y en particular los glucocorticoides y las progestinas (Beato *et al.*, 1996), en este diseño experimental funciona. Sin embargo, hay que mencionar que la complejidad de factores que intervienen en el proceso de activación-transcripción puede dar resultados falsos positivos que pueden alterar los resultados, pero con el sistema del doble híbrido que posee mayor sensibilidad para identificar propiedades agonistas y antagonistas de hormonas sintéticas y naturales, permitió elucidar su actividad biológica. Adicionalmente, de subrayar que es necesario probar promotores sintéticos que respondan a hormonas esteroides (en este caso para andrógenos) en líneas celulares blanco y no blanco. Adicionalmente, es necesario evaluar, el efecto biológico producido por cada progestina y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos nuevamente con metodologías con alta sensibilidad para detectar efectos hormonales, (Colombo *et al.*, 2006), apoyados por estudios de cristalografía de rayos X (Hillisch *et al.*, 2003; D'Ursi *et al.*, 2005), en presencia de ligandos naturales y los sintéticos para poder determinar la selectividad del receptor o la capacidad de la progestina para unirse a cualquier receptor a hormonas esteroides desencadenado efectos hormonales o antihormonales.

En cuanto al sistema del doble híbrido se recomienda probar más concentraciones fisiológicas que provoquen su ensamblaje por la interacción de las progestinas y sus metabolitos correspondientes. Adicionalmente de construir insertos con cofactores que regulen de manera positiva o negativa la transcripción de los genes blanco.

Actualmente, se emplean metodologías más sofisticadas e innovadoras que permiten detectar con alta fidelidad la selectividad de la actividad agonista y/o antagonistas de diferentes ligandos de los receptores nucleares, incluyendo al receptor de andrógenos, una de ellas es la denominada FRET (*fluorescence resonant energy transfer*) que es una técnica que nos permite identificar nuevos ligandos agonistas para receptores esteroides (Zhou *et al.*, 1998; De-Siddartha *et al.*, 2005).

11. CONCLUSIONES

Las progestinas sintéticas NET, GSD, LNG y sus metabolitos dihidro y tetrahidro-reducidos son capaces de activar al receptor de andrógenos, mediante la transactivación del vector reportero MMTV-LUC desencadenando la expresión génica andrógeno regulada.

Noretisterona, Levonorgestrel y Gestodeno presentan efectos androgénicos al reducirse a compuestos 5α -reducidos potenciando su efecto androgénico, siendo estos compuestos más androgénicos que las propias progestinas.

Los efectos androgénicos que presentan estas progestinas y sus metabolitos 5α -reducidos es menor en comparación a DHT y T.

Los metabolitos tetrahidro-reducidos pierden su capacidad para interactuar con el receptor de andrógenos debido a la doble reducción que sufre en el anillo A de la molécula, esto hace que disminuyan o anulen su afinidad por el receptor de andrógenos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acronite MT, Mantzoros CS, Leeach RE. 1999. Androgens in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 180: 60-63.
- Alam J, Cook JL. 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Analytical Biochemistry.* 188: 245-254.
- Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W, Peeters B. 1999. The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Mol Cell Biol.* 19: 6085-6097.
- Altucci L, Gronemeyer H. 2001. Nuclear receptors in cell life and death. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism.* 12(10): 460-468.
- Amero SA, Kretsinger RH, Moncrief ND, Yamamoto KR, Pearson WR. 1992. The origin of nuclear receptor proteins: A single precursor distinct from other transcription factors. *Mol Endocrinol.* 6: 3-7
- Apgar BS, Greenberg G. 2000. Using progestins in clinical practice. *American Family Physician.* 62(8): 1839-1846.
- Arit W. 2006. Androgen therapy in women. *Eur J Endocrinol.* 154: 1-11.
- Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR. 2004. In vitro antiprogestational/antiglucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, and mifepristone. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 88: 277-288.
- Baldazzi L, Baroncini C, Pirazzoli P, Balsamo A, Capelli M, Marchetti G, Bernardi F, Cacciari E. 1994. Two mutations causing complete androgen insensitivity a frame-shift in the steroid binding domain and a Cys-Phe substitution in the second zinc finger of the androgen receptor. *Hum Mol Genet.* 3: 1169-1170.
- Balen A. 1999. Pathogenesis of polycystic ovary syndrome: the enigma unravels? *Lancet.* 354: 966-967.
- Bardin WC, Milgrom E, Mauvair-Jauris Eds. 1983. Progesterone and progestins. Raven Press, NY.
- Baulieu EE, Kelly P. 1991. Hormones from molecules to disease. Ed. Herman, publishers in arts and sciences, NY. Beato M, Chalepakis G, Shauer M, Slater EP. 1989. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem* 32:737-748.
- Beato M, Klug J. 2000. Steroid hormone receptors: an update. *Human Reprod Update.* 6(3): 225-236.
- Beato M, Chalepakis G, Shauer M, Slater EP. 1989. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem.* 32: 737-748.
- Beato M, Eisfield K. 1997. Transcription factor access to chromatin. *Nucleic Acids Res.* 25:3559-3563.
- Beato M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56: 335-344.
- Belikov S, Birgitta G, Wrangle O. 2001. Hormone-induced nucleosome positioning in the MMTV promoter is reversible. *EMBO J.* 20(11): 2802-2811.
- Belikov S, Gelius B, Almouzni G, Wrangle Ö. 2000. Hormone activation induces nucleosome positioning in vivo. *The EMBO J.* 19:1023-1033.
- Benagiano G, Primiero FM, Farris M. 2004. Clinical profile of contraceptive progestins. *Eur J Contraceptive and Reproductive Health Care.* 9: 182-193.

- Berrevoets CA, Doesburg P, Steketee K, Trapman J, Brinkmann AO. 1998. Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor 2). *Mol Endocrinol.* 12.: 1172-1183.
- Bevan CL, Hoare S, Claessens F, Heery DM, Parker MG. 1999. The AF-1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Mol Cell Biol.* 19: 8383-8392.
- Blom MJ, Wassink MG, Van Wijk F, Ederveen AGH, Kloosterboer HJ, Verhoeven CHJ, Lambert JGD, Goos HJTH. 2001. Metabolism of noretisterone and noretisterone derivatives in rat uterus, vagina and aorta. *Drug Metab Disp.* 29(7): 976-82.
- Bonassi RM, Fabrini P, Machado AC, Maia E, da Cunha AB. 2004. Clinical and metabolic aspects of the continuous use of a contraceptive association of ethinyl estradiol (30 µg) and gestodene (75µg). *Contraception.* 70: 365-370.
- Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H. 2000. Nuclear receptor ligand-binding domains three dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *TIPS.* 21: 381-388.
- Bowers A, Ringold HJ, Denot E. 1958. Steroid C19-nor dihydrotestosterone derivatives. *J Am Chem Soc.* 80: 6115-6121.
- Brasier AR, Ron D. 1992. Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. *Methods in Enzymology.* 216: 386-397.
- Braunberg H, Coldham NG, Leake RE, Cowan SK Wong W. 1987. Action of a progestogen on human breast cancer cells: mechanism of growth stimulation and inhibition. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 23: 563-571.
- Brinkmann AC, Trapman J. 2000. Prostate cancer schemes for androgen escape. *Nat Med.* 6: 628-629.
- Brinkmann AO, Blok LJ, De Ruyter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, Trapman J. 1999. Mechanism of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69: 307-313.
- Brinkmann AO, Faber HCJ, Van Rooy HCJ, Kuiper, Ris P, Klaassen JAGM, Van der Kurpur, Voorhost JH, Van Laar JH, Mulder E, Trapman J. 1989. The human androgen receptor: domain, structure, genomic, organization and regulation of expression. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 34: 307-310.
- Bullock LP, Bardin CW, Sherman MR. 1978. Androgenic, antiandrogenic, and synandrogenic actions of progestins: role of steric and allosteric interactions with androgen receptors. *Endocrinol.* 103: 1768-1782.
- Cabeza M, Vilchis F, Lemus AE, Díaz de León L, Pérez-Palacios G. 1995. Molecular interactions of lenonorgestrel and its 5α-reduced derivative with androgen receptors in hamster flanking organs. *Steroids.* 60: 630-635.
- Callewaert L, Tilborgh Claessens F. 2006. Interplay between two hormone-independent activation domain in the androgen receptor. *Cancer Res.* 66(1): 543-553.
- Campagnoli C, Abba C, Ambroggio S, Peris C. 2005. Pregnancy, progesterone and progestins in relation to breast cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 97(5): 441-50.
- Campos GC, Oropeza MV, Lemus AE, García GA, Reynoso ME, Campos P, Ponce-Monter H. The androgenic effect of noretisterone and 5α-norethisterone on the contractile response of the rat vas deferens to methoxamine and serotonin. *Life Sci.* 64(20): 227-33.

Carlson BM., 2000. Human Embriology & Developmental Biology. Ed. Mosby, Inc, Toranto, Canada- 2a edition. 495pp.

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 antimplantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Mol Reprod Dev* 40: 157-162.

Catherino WH, Jeng MH, Jordan VC. 1993. Norgestrel and gestodene stimulate breast cancer cell growth through an estrogen receptor mediated mechanism. *Br J Cancer*. 67: 945- 952.

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. 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.

Chang C, Kokontis J, Lian S. 1988. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*. 240: 324-332.

Chaucherau A, Loosfelt H, Milgrom M. 1991. Phosphorylation of transfected wild type and mutated progesterone receptors. *J Biol Chem*. 266: 18280.

Chávez B, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca, Pérez-Palacios G. 1985. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 22: 121-126.

Chen Q, Chen J, Sun T, Shen J, Shen X, Jiang H. 2004. A yeast two-hybrid technology-based system for the discovery of PPAR- γ agonist and antagonist. *Analytical Biochemistry*. 335: 253-259.

Cheng H, Lin RJ, Schitz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM. 1997. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with p/CAF and CBP/p300. *Cell*. 90: 569-581.

Chouhry MA, McEwan IJ. 2004. In vitro regulation of reporter gene transcription by the androgen receptor AF1 domain. *Research Colloquia*. 1103-1106.

Claessens F, Verrijdt G, Haelens A, Callewaert L, Mehren U, d'Alesio, Tanner T, Schauwaers K, Denayer S, Van Tilborg N. 2005. Molecular biology of the androgen responses. *Andrologia*. 37: 209-210.

Clarke CL, Sutherland RL. 1990. Progesterin regulation of cellular proliferation. *Endoc Rev*. 11(2): 266-290.

Coldham y JamesNG, James VH. 1990. A possible mechanism for increased breast cancer cell proliferation by progestins through increased reductive 17(-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Int J Cancer*. 45: 174-178.

Colombo D, Ferraboschi P, Prestileo P, Toma L. 2006. A comparative molecular modeling study of dydrogesterone with other progestational agents through theoretical calculations and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 98: 56-62.

Coutinho EM. 1993. One year contraception with a single subdermal implant containing nomegestrol acetate (Uniplant). *Contraception*. 47(1): 97-105.

Coutinho EM, de Souza JC, Athayde C. 1996. Multicenter clinical trial on the efficacy and acceptability of a single contraceptive implant of nomegestrol acetate, Uniplant. *Contraception*. 53: 121.

- Couzinet B, Young J, Brailly S, Chanson P, Thomas JL, Schaison G. 1996. The antigonadotropic activity of progestins(19-nortestosterone and 19-norprogesterone derivatives) is not mediated through the androgen receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 4218-23.
- Couzinet B, Young J, Kujas M, Meduri G, Brailly S, Thomas JL, Chanson P, Schaison G. 1999. The antigonadotropic activity of a 19-nor-progesterone derivative is exerted both at the hypothalamic and pituitary levels in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 84,: 4191-96.
- Criekinge WV, Beyaert R. 1999. Yeast two-hybrid: state of the art. *Biological Procedures Online.* 2(1): 1-11. www.biologicalprocedures.com
- Culig Z. 2003. Role of the androgen receptor axis in prostate cancer. *Urol.* 62 (Supplement 5A): 21-26.
- Cunha GR, Donjacour AA, Cooke PS, Mee S, Bigsby RM, Higgins SJ, Sugimura. 1987. The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocr Rev.* 8: 338-362.
- D'Urso P, Salvi E, Fossa P, Milanese L, Rovida E. 2005. Modelling the interaction of steroid receptors with endocrine disrupting chemicals. *BMC Bioinformatics.* 6(Suppl 4): S10-S19.
- Darney PD. 1995. The androgenicity of progestins. *Am J Med.* 98: 1A-104S-1A-110S
- Dauvois S, Simard J, Dumont M, Haegens DE, Labrie F. 1990. Opposite effects of estrogen and progestins R5020 on cell proliferation and GCDFP-15 expression in ZR-75-1 human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 73: 171-178.
- Davis S. 1999. Syndromes of hyperandrogenism in women. *Aust Fam Physician.* 28(5): 47-51.
- Davies TH, Ning YM, Sanchez ER. 2002. *J Biol Chem.* 277: 4597-4600.
- De Franco D, Ramakrishnan C, Tang Y.1988. Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 65 (1-6): 51-58.
- De Franco DB. 2002. Navigating steroid hormone receptors through the nuclear compartment. *Mol Endocrinol.* 16(7): 1449-1455.
- De Vos P, Claessens F, Celis L, Peeters B, Rombauts W, Heyns W, Verhoeven G. 1994. Nuclear extracts enhance the interactions of fusion proteins containing the DNA-binding domain of the androgen and glucocorticoid response elements. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 48: 317-323.
- Death AK, McGrath KCY, Kazilauskas R, Handelsman DJ. 2004. Tetrahydrogestrinone is a potent androgen and progestin. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 2498-2500.
- Deroo BJ, Korach KS. 2006. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 116: 561-570.
- Diamanti-Kandaraki E, Tolis G, Duleba AJ. 1995. Androgen and therapeutic aspects of antiandrogens in women. *J Soc Gynecol Investing.* 2(4): 577-592.
- Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK, Yamamoto KR. 1990. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulators form a single DNA element. *Science.* 249: 1266-1272.

Dijkema R, Schoonen WGEJ, Teuwen R, van der Struik E, de Ries E, van der Kar BAT, Olivje W. 1998. Human progesterone receptor A and B isoforms in CHO cells. I Stable transfection of receptor and receptor responsive genes: Transcription modulation by antiprogestins. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 64: 147-156.

Dursi P, Salvi E, Fossa P, Milanesi L, Rovida E. 2005. Modelling the interaction of steroid receptors with endocrine disrupting chemicals. *BMC Bioinformatics.* 6(Suppl 4): S1-S8.

Edgren RA, Elton RL. 1960. Estrogen atagonism effect of steroidal spironolactones on estrogen induced uterine growth in mice. *Pro Exp Biol Med.* 104: 665.

Edgren RA, Jones RC, Peterson DL. 1967. A biological classification of progestational agents. *Fert Steril* 18: 238-256.

Edgren RA, Stanczyk FZ. 2000. Nomenclature of the gonane progestins. Elsevier Science.

Edgren RA, Stretvant FM. 1976. Potencies of oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol.* 128: 1029-1038.

Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. 1992. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeats loci in four human populations groups. *Genomics.* 12: 241-253.

Enríquez J. 1997. Efecto de la 5(-reducción enzimática de derivados de 10-nor y 17(-etinilo-de la testosterona sobre sus actividades andrógenicas. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM.

Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavallés V, Balanguier P. 2006. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem Pharmacol.* 71: 1459-1464.

Espey LL, Lipner H, Ovulation. In: Knobil E, Neil JD,(eds). *The physiology of reproduction.* Vol. 1. 3rd ed. Rouen PressLtd., New York. Pp. 711. 1994.

Evans BAJ, Jones TR, Hughes IA. 1984. Studies of the androgen receptor in dispensed fibroblast investigation of patients with androgen insensitivity. *Clin Endocrinol (Oxford).* 30: 93-105.

Evans RM. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240: 889-895.

Farla P, Hersmus R, Geverts B, Mar PO, Dubbink BJ, Trapman J, Houtsmuller AB. 2004. The androgen receptor ligand-binding domain stabilizes DNA binding in living cells. *J Struct Biol.* 147: 50-61.

Farla P, Hersmus R, Trapman J, Houtsmuller AB. 2005. Antiandrogens prevent stable DNA-binding of the androgen receptor. *J Cell Sci.* 118(8): 4187-4197.

Fausser y van Exuden, 1997

Fend W, Ribeiro RCJ, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ, West BL. 1998. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Sci.* 280: 1747-1749.

Fields S, Song O.1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* 340(20): 245-246.

Fraser IS. 2000. Forty years of combined oral contraception: the evolution a revolution. *Med J Aust.* 173: 541.

Frederick M, Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith, Struhl. 1987. Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 1 N. Y. (The Red Book Bulletin).

Freedman LP. 1992. Anatomy of the steroid receptor finger region. *Endocr Rev.* 13: 129-145.

Gao W, Bohl CE, Dalton JT. 2005. Chemistry and structural biology of androgen receptor. *Chem Rev.* 105: 3352-3370.

Gao T, MacPhaul MJ. 1998. Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor agonists and antagonists. *Mol Endocrinol.* 12: 654-663.

García -Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Smith CL, Lemus AE, Pérez-Palacios G, Larrea F. 2006. Synthetic 19-nortestosterone derivatives as estrogen receptor alpha subtype-selective ligands induce similar receptor conformational changes and steroid receptor coactivator recruitment than natural estrogen. *J Steroid Biochem Mol Biol.* En prensa.

García-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Pérez-Palacios, Pérez-Palacios G. 2002. The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- α . *J Steroid Biochem Mol Biol.* 82: 333-41.

García-Becerra R, Cooney AJ, Borja-cacho E, Lemus AE, Pérez-Palacios G, Larrea F. 2004. Comparative evaluation of androgen and progesterone receptor transcription selectivity indices of 19-nortestosterone-derived progestins. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 91(1-2): 21-7.

Garden OI, Ross JA, Wigmore SJ. 2006. Firefly luciferase terminally degraded by mild heat exposure: implication for reporter assays. *J Immunological Methods.* 310: 182-185.

Gardner J, Miller L. 2005. Promoting the safety and use of hormonal Contraceptive. *J Women's Health.* 14(1): 53-60.

Garza-Flores J, Menjivar M, Cárdenas M, Reynoso GA, García G, Pérez-Palacios G. 1991. Further studies on the antigonadotropic mechanism of action of norethisterone. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 38: 89-93.

Gelmann EP. 2002. Molecular Biology of the androgen receptor. *J of Clinical Oncology.* 20(13): 3001-3015.

Georget V, Lobaccaro JM, Terouanne B, Mangest P, Nicolas JC, Suijan C. 1997. Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 129: 17-26.

Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, Hug M, Rusconi S, Schaffner W. 1995. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science.* 263: 808-811.

Gerstman BB, Gross TP, Kennedy DL, Bennett RC, Tomita DK, Stadel BV. 1991. Trends in the content and use of OCs in the United States of 1964-1988. *Am J Public Health.* 81: 90-96.

Geserick C, Meyer HA, Haendler B. 2005. The role of DNA response elements as allosteric modulators of steroid receptor function. *Molec Cell Endocrinol.* 236: 1-7.

Ghali SA, Gottlier B, Lumbroso R, Beitel LK, Elhaji Y, Wu J, Pinsky L, Trifiro MA. 2003. The use of androgen receptor amino/carboxyl-terminal interaction assays to investigate androgen receptor gene mutations in subjects with varying degrees of androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 2185-2193.

- Giannoukos G, Szapary C, Smith CL, Meekert EWJ, Simons SS. 2001. New antiprogestins with partial agonist activity: potential selective progesterone receptor modulators (SPRMs) and probes for receptor-and coregulator-induced changes in progesterone receptor induction properties. *Mol Endocrinol*. 15: 255-270.
- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. 1986. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 46: 645-652.
- Gilbert Scott F. 2000. *Developmental biology*. Ed. Sinauer. 6th Edition. Sunderland, Massachusetts. 749 pp.
- Gobinet J, Poujol N, Sultan CH. 2002. Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol*. 198: 15-24.
- Godowski PJ, Picard D, Yamamoto KR. 1988. Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-Lex A fusion proteins. *Science*. 241: 812-816.
- Gooren LJ, Bunck MC. 2004. Androgen replacement therapy. *Drugs*. 64(17): 1861-1891.
- Gooren LJG, Bunck CM. 2004. Androgen replacement therapy (Present and future). *Drugs*. 64: 1861-1891.
- Graham D, Clarck C. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endoc Rev*. 18: 502-519.
- Graham JD, Bain DL, Richer JK, Jackson TA, Tung L, Horwitz KB. 2000. Nuclear receptor conformation, coregulators, and tamoxifen-resistant breast cancer. *Steroids*. 65: 579-584.
- Greer JB, Modugno F, Allen GO, Ness RB. 2005. Androgen progestins in oral contraceptives and the risk of epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 105: 731-740.
- Gregory CH W, Johnson Jr. R, Mohler JL, French FS, Wilson EM. 2001. Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res*. 61(1): 2892-2898.
- Grino PB, Griffin JE, Cusland WG, Wilson JD. 1988. A mutation of the androgen receptor associated with partial androgen resistance, familial gynecomastia and fertility. *J Clin Endocrinol Metab*. 66: 754-761.
- Gris JC, Jamin C, Benifla JL, Quere I, Madelenat P, Mares P. 2001. APC resistance and third-generation oral contraceptives. *Human Reproduction*. 16(1): 3-8.
- Gronemeyer H. 1992. Control of the transcription activation by steroid hormone receptors. *FASEB J*. 6: 2524-2529.
- Guichon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Arger M, Perrot-Applanat M, Milgrom E. 1989. Mechanism of nuclear localization of the progesterone receptor, evidence for interaction between monomers. *Cell*. 57(7): 1147-1154.
- Haendler B. 2005. Androgens and pharmacology. *Andrologia*. 37: 213-215.
- Hager GL, Lim CS, Elbi C, Baumann TCH. 2000. Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 74: 229-54.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Mol Biol*. 166: 557-558.
- Hanahan D. 1985. In: *DNA Cloning*. Vol. 1, Glover D, ed. IFL Press Ltd. 109 pp.
- Hannover-Bjarnason N, Bjarnason K, Haarbo J ETAL. 1997. Tobolene: influence on marker of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 82: 1752-1756.
- Hapgood JP, Koubovec D, Louw A, Africander D. 2004. Not all progestins are the same: implications for usage. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. 25(11): 554-557.

Harrison EM, Hager GL, Lim SC, Elbi C, Baumann CT. 2000. Trafficking of nuclear receptors in living cells. *J Steroids Biochem Molec Biol.* 74: 249-254.

Hartig PC, Bobseine KL, Britt BH, Cardon MC, Lambright CR, Wilson WS, Gray LE Jr. 2002. Development of two androgen receptor assays using adenoviral transduction of MMTV-Luc reporter and/or hRA for endocrine screening. *Toxicol Sciences.* 66: 82-90.

Hashimoto Y, Miyachi H. 2005. Nuclear receptor antagonists designed based on the helix-folding inhibition hypothesis. *Bioorganic Medicinal Chemistry.* 13: 5080-5093.

He B, Lee LW, Mingos JT, Wilson EM. 2002a. Dependence of selective gene activation on the androgen receptor NH₂- and COOH-terminal interaction. *J Biol Chem.* 277(28): 25631-25639.

He B, Mingos JI, Lee WL, Wilson EM. 2002b. The FXXLF motif mediates androgen receptor-specific interactions with coregulators. *J Biol Chem.* 277(12): 10226-10235.

He B, Wilson E. 2002c. The NH₂-terminal and carboxyl-terminal interaction in the human androgen receptor. *Mol Gen Metab.* 75: 293-98.

He Chu S, Warne GL, Zajac ID. 1993. Related individuals with different androgen receptor gene deletions. *J Clin Invest.* 91: 1123-1128.

Hermanson O, Glass CH K, Rosenfeld MG. 2002. Nuclear receptor coregulators: multiple models of modification. *TRENDS in Endocrinology Metabolism.* 13(2): 55-60.

Hilliard J, Croxatto HB, Hayward JN, Sawyer CH. 1966. Norethindrone blockade of LH release to intrapituitary infusion of hypothalamic extract. *Endocrinol.* 79: 411-419.

Hillier SG, Whitelaw PF, Smyth CD. 1994. Follicular oestrogen synthesis: the cell, two gonadotrophin model revised. *Mol Cell Endocrinol.* 100: 51.

Hillisch A, von Langen J, Menzenbach B, Droscher P, Kaufmann G, Schneider B, Elger W. 2003. The significance of the 20-carbonyl group of progesterone in steroid receptor binding: a molecular dynamics and structure-based ligand design study. *Steroids.* 68: 869-878.

Hollenberg SM, Evans RM. 1988. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 55(5): 899-906.

Hotchkiss y Knobil E. 1994. The menstrual cycle and its control. In: Knobil E, Neil JD (Eds). *The physiology of reproductive.* Vol 2. 2nd ed. Raven Press Ltd., New York., pp 711.

Htun H, Barsony J, Renyl L, Goul DL, Hager GL. 1996: Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 93: 4845-50.

Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR, Hager GL. 1999. Direct visualization of the human oestrogen receptor α reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol Biol Cell.* 10: 471-486.

Huang ZO, Li J, Wong J. 2002. AR possesses an intrinsic hormone-independent transcriptional activity. *Endocrinol.* 16: 924-937.

Ikonen T, Palvino JJ, Janne OA. 1997. Interactions between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and its influenced by nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem.* 272: 29821-29828.

Jabbour, 2006.

Janer G, LeBlanc GA, Porte C. 2005. A comparative study on androgen metabolism in three invertebrate species. *General and Comparative Endocrinology*. 143: 211-221.

Jenster G, Trapman J, Brinkmann AO. 1993. Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem J*. 302: 191-197.

Jenster G, Van der Kurput JAGM, Van Vroonhoven c, Van der Kwast, Trapman J, Brinkmann AO. 1991. Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation and subcellular localization. *Mol Endocrinol*. 5: 510-511.

Johansson EDB. 2004. Future developments in hormonal contraception. *AM J Obstet Gynecol*. 190: S69-S71.

Jones SA, Parks DJ, Kliewer SA. 2003. Cell-free ligand binding assays for nuclear receptors. *Methods in Enzymology*. 364: 53-71.

Kafrissen y Adashi, 2002. Fertility control: current approaches and global aspects. 665-708.

Kasper S, Rennie PS, Bruchosvsky N, Sheppard PC, Cheng H, Lin L, Shiu RP, Soeek R, Matusik RJ. 1994. Cooperative binding of androgen receptors to two DNA sequences is required for androgen induction of the probasin gene. *J Biol Chem*. 269: 31763-31769.

Kaul S, Murphy PJM, Chen J, Brown L, Prat WB, Stoney SS. 2002. *J Biol Chem*. 277: 36223-36232.

Kaunitz AM. 2004. Enhancing oral contraceptive success: The potential of new formulations. *Amer J Obstet Gynecol*. 190: S23-9.

Kellio PJ, Palvino JJ, Mehto M, Janne OA. 1994. Analysis of androgen receptor-DNA interactions with receptor proteins produced in insect cells. *J Biol Chem*. 269: 11514-11522.

Kemppainen JA, Wilson E. 1996. Agonist and antagonist activities of hidroxiiflutamide and casodex relate to androgen receptor stabilization. *Urol*. 48:157-163.

Kemppainen JA, Langley E, Choi-oik W, Kelle WR, Wilson EM. 1999. Distinguishing androgen receptor agonists and antagonist: Distint mechanism of activation by medroxiprogesterone acetate and dihydrotestosterone. *Molec Endocrinol*. 13: 440-454.

Kim HJ, Park YI, Dong MS. 2006. Comparison of prostate cancer cell lines for androgen receptor-mediated reporter gene assay. *J Biol Chem*. En prensa.

Knobil E. 1981. Patterns of hypophysiotropic signals and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Biol Reprod*. 24: 44-49.

- Kraus WL, Katzenellenbogen BS. 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus, modulation of two functionally distinct promoters. *Mol Endocrinol.* 7: 1603-1616.
- Kraus WL, Weiss KE, Katzenellenbogen BS. 1995. Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: Differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist and antagonist occupied progesterone receptors. *Mol Cell Biol.* 4: 1847-1857.
- Krishnan RS, Daniel JC. 1967. Blastokinin inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. *Sci.* 158: 490-492.
- Kubli-Garfias C, Vázquez R, Cooney AJ, Larrea F. 2002. Ab initio electronic structure of the progesterone norethisterone and its 5 α -derivatives. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 82: 385-391.
- Kubli-Garfias C. 1998. Ab initio assessment of the electronic structure of 5 α -reduced progestins. *Intr J Quant Chem.* 67: 329-338.
- Kuhl H. 1990. Pharmacology of progestogens. Basic aspects –progesterone derivatives. *Menopause Rev.* 6: 9-16.
- Kuhl H. 1995. Chemie und pharmakologie von chlormadinonacetat. In Loch EG, Schramm G, eds. *Chlormadinonacetat bei Androgenisierungsstörungen.* Stuttgart: Schattauer. 1-24.
- Kuhl H. 1996. Comparative pharmacology of newer progestogens. *Drugs.* 51:188-215.
- Kuhl H. 2005. Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. *Climateric.* 8 (Suppl 1): 3-63.
- Kuhl, H. 2005. Pharmacology of estrogen and progestogens: influence of different routes of administration. *Climateric.* 8(Suppl 1): 3-63.a
- Kuhnz W, Heuner A, Humpel M, Seifert W, Michaelis K. 1997. In vivo conversion of norethisterone and norethisterone acetate to ethinyl estradiol in post-menopause women. *Contraception.* 56: 379-385.
- Kuil CW, Mulder E. 1994. Mechanism of antiandrogen action: conformational changes of the receptor. *Molec Cell Endocrinol.* 102: R1-R5.
- Kuiper GJ, Faber PW, van Rooij HJC, van der Korput JAGM, Ris-Stalpers C, Křassen P, Trapman J, Brinkmann AO. 1989. Structural organization of the human androgen receptors gene. *J Mol Endocrinol.* 2: R1-R4.
- Kumar N, Crozat A, Li F, Caterall JF, Bardin CW, Sundaram. 1999. 7 α -methyl-19-nortestosterone, a synthetic androgen with high potency. Structure-activity comparisons with other androgen. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 71: 213-22.
- Kumar N, Koide SS, Tsong YY, 2000. Nestorane: a progestin with a unique pharmacological profile. *Steroids.* 65: 629.
- Kun Lee D, Chang CH. 2003. Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 84: 41-49.
- Kwok S, Selby PL, McEldu PL, Laing I, Mackness B, Mackness MI, Prais H, Morgan J, Yates AP, Durrington PN, Sci FM. 2004. Progestogens of varying androgenicity and cardiovascular risk factors in postmenopausal women receiving oestrogen replacement therapy. *Clin Endocrinol.* 61: 760-767.
- LaCasse BC, Luchnan HA, Walker P, Lefebvre YA. 1993. Identification of binding proteins for nuclear localization signals of the glucocorticoid and thyroid hormone receptors. *Endocrinology.* 132: 1017-1025.

- Langley E, Kemppainen JA, Wilson E. 1998. Intermolecular NH₂/Carboxil-terminal interactions in androgen receptor dimerization revealed by mutations the cause Androgen insensitivity. *J Biol Chem.* 273: 92-101.
- Langley E, Zhou ZX, Wilson EM. 1995. Evidence for an anti-parallel orientation of the ligand-actived human androgen receptor dimer. *J Biol Chem.* 270: 29983-29990.
- Larrea F, Escobar N, Garza-Flores J, Moctezuma O, Martínez-Campos A, Pérez-Palacios G. 1983. Nuclear translocation of estradiol receptors by the in vitro administration of norethisterone: an alternative mechanism of gonadotropin inhibition. *J Steroid Biochem.* 19: 1747-1752.
- Larrea F, García-Becerra R, Lemus AE, García GA, Pérez-Palacios G, Jackson KJ, Coleman KM, Dace R, Smith CL, Cooney AJ. 2001. A-ring reduced metabolites of 19-norsynthetic progestins as subtypes selective agonists for ER α . *Endocrinol.* 142 (9): 3791-3799.
- Larrea F, Moctezuma O, Pérez-Palacios G. 1984. Estrogen effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. *J Steroid Biochem.* 20: 841-847.
- Larrea F, Pérez-palacios G. 2000. The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by it's a-ring reduced metabolites. *J Endoc.* 165: 693-702.
- Larrea F, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G. 1987. The merabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J Steroid Biochem.* 27: 657-663.
- Lavery DN, McEwan IJ. 2005. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: inducrion of active conformations. *Biochem J.* 391: 449-464.
- Lazar MA. 2003. Mechanism of action of hormones that act on nuclear receptors. *TRENDS Endocrinol Metab.* 11: 6-10.
- Lee HJ, Chang C. 2003. Recent advances in androgen receptor action. *Cell Mol Life Sci.* 60, 1613-1622.
- Lee JW, Ryan F, Swaffield JC, Johnston SA, Moore DD. 1995. Interaction of thyeoid-hormone receptor with a conserverd transcriptional mediator. *Nature.* 374: 91-94.
- Lemon B, Tjian R. 2001. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Dev.* 14: 2551-2569.
- Lemus AE, Enríquez J, García GA, 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 Mol Biol.* 60(1-2): 121-9.
- Lemus AE, Pérez-Palacios. 1998. Progestinas sintñeticas: los aportes de México. In: *Biología de la Reproducción.* Ed. UAM. México, D.F. pp. 459-482.
- Lemus AE, Santillán R, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 2001. In vitro metabolism of gestodene in target organs: formation of A-ring reduced derivatives with oestrogenic activity. *Eur J Pharmacol.* 417: 249-56.
- Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chávez B, García GA, Grillasca I, Pèrez-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.* 4(3-8): 881-890

- Lemus AE, Zaga V, Santillán R, García G, Grillasca I, Damián-Matsumura P, Jackson K, Cooney AJ, Larrea F, Pérez-Palacios G. 2000. The osetrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestins, are mediated by its A-ring reduced metabolites. *J Endocrinol.* 112: 1267-1274.
- Leningher A, Nelson D, Cox MM. 1994. *Principles of Biochemistry.* 2nd. Edition. Worthed.
- LaSpada AR, Roling DB, Harding AE, Warner CL, Spiegel R, Hausmanowa-Petrusewicz I, Yee WC, Fischbeck KH. 1992. Meiotic instability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet.* 2: 301-304.
- Lidegaard O, Milson I. 1996. Oral contraceptive and thrombotic diseases: impact of new epidemiological studies. *Contraception.* 53: 135-139.
- Liegibel UM, Sommer U, Boercsoek I, Hilscher U, Bierhaus A, Schweikert HU, Nawroth P, Kasperk C. 2003. Androgen receptor isoforms AR-A and AR-B display functional differences in cultured human bone cells and genital skin fibroblasts. *Steroids.* 60: 1179-1187.
- Liu JH. 2005. Therapeutic effects of progestins, androgens, and tibolone for menopausal symptoms. *Amer J Med.* 118(128):885-925.
- Li-Xiatio X, Lonard DM, O'Malley BW. 2004. A contemporary understanding of progesterona receptor function. *Mechanism of Ageing and Development.* 125: 669-678.
- Lobo RA. 1987. Absorption and metabolic effects of different types of estrogen and progestogens. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 14: 143-147.
- Lobo RA. 1988. The androgenicity of progestational agents. In *J Fertil.* 33 Suppl: 6-12.
- Lubahn DB, Brown TR, Simenttal JA, Higgs HN, Migeon CJ, Wilson EM, French FS. 1989. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 8151-8155.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS. 1988. The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence, analysis and gene expression in the prostate. *Mol Endocrinol.* 2: 1265-1275.
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. 1993. Alterations of reproductive function but no prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 9045-9049.
- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freeman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature.* 352: 497-505.
- Lumbroso S, Lobaccaro JM, Belon C, Martin D, Chaussainj JL, Sultan C. 1993. Anew mutation within the deoxyribonucleic acid-binding domain of the androgen receptor gene in a family with complete androgen insensitivity syndrome. *Fert Steril* 60: 814-819.
- Luo Z, Rouvinen J, Maenpaa PH. 1994. A peptide C-terminal to the ZN finger of human vitamin D receptor is able to specify nuclear localization. *Eur J Biochem:* 223: 381-387.
- Mangelsdorf DJ, Evans RM. 1995. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell.* 83: 841-850.

Manni A, Badger B, Wright C, Ahmed SR, Demers LM. 1987. Effects of progestins on growth of experimental breast cancer in culture interaction with estradiol and PRL and involvement of the polyamine pathway. *Cancer Res.* 47: 3066-3071.

Margeat E, Bourdoncle A, Margueron R, Poujol N, Cavailles, Royer C. 2003. Ligands differentially modulate the protein interactions of the human estrogen receptors α γ β . *J Mol Biol.* 326: 77-92.

Markiewicks L, Gurside E. 1994. Estrogenic and progestagenic activities coexisting in steroidal drugs: quantitative evaluation by in vitro bioassays with human cells. *J Steroids Biochem Mol Biol.* 48: 89-94.

Markiewicks L, Hochberg RB, Gurside E. 1992. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the mediates. The differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. *J Bio Chem.* 267: 1082-1087.

Marsden J. 2003. The menopause, hormone replacement therapy and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 83: 123-132.

Martini L, Magnaghi V, Melcangi C. 2003. Actions of progesterone and its 5α -reduced metabolites on the major proteins of the myelin of the peripheral nervous system. *Steroids.* 68: 825-829.

Mata De Urquiza A, Perlmann T. 2003. In vivo and in vitro reporter systems for studying nuclear receptor and ligand activities. *Methods in Enzymology.* 364: 463-475.

Matias PM, Donner P, Coelho R, Thomas M, Peizoto C, Macedo S, Otto N, Joschko S, Schiz P, Wegg A, Basler S, Schafer M, Egner U, Carrondo MA. 2000. Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. *Biol Chem.* 275: 26164-71.

McEwan IJ. 2004. Molecular mechanism of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. *Endocrine-Related, Cancer.* 11: 281-296.

McGuire JL, Phillips A, Hahn DW. 1990. Pharmacological and pharmacokinetic: characteristic of norgestimate and its metabolites. *Am J Obstet Gynecol.* 163: 2127.

McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Rev.* 20(3): 321-344.

McKenna TJ. 1991. The use of anti-androgens in the treatment of hirsutism. *Clin Endocrinol (Oxford).* 35: 1-3.

McLean HE, Warne GL, Zajac JD. 1997: Localization of functional domains in the androgen receptor. *J Clin Invest.* 91: 1123-1128.

Meighen EA. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiological Reviews.* 55(1): 123-142.

Meyer HHD, Jewgenow K, Hodges JK. 1997. Binding activity of 5α -reduced gestagens to the progestin receptor from African elephant (*Loxodonia Africana*). *General and Comparative Endocrinology.* 105: 164-167.

- Miolanen A, Rouleau N, Ikonen T, Palvimo JJ, Jane OA. 1997. The presence of a transcriptional activation function in the hormone binding domain and androgen receptor is revealed by studies in yeast cells. *FEBS Lett.* 412: 355-358.
- Mishell DR. 2004. State of the art in hormonal contraception: An overview. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 190: S1-4.
- Misrahi M, Atger M, D'Auriol L, Loosfelt H, Mériel C, Fridlansky F, Guichon.Mantel A, Galibert F, Milgrom E. 1987. Complete aminoacid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 143: 740-748.
- Moorjani S, Dupont A, Labrie F et al. 1991. Changes in plasma lipoprotein and apolipoprotein composition in relation to oral versus percutaneous administration of estrogen alone or in cyclic association with utrgestan in menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 73: 373-379.
- Morali G, Lemus AE, Munguía R, Arteaga M, Pérez-Palacios G, Sundaram K, Kumar N, Bardin WC. 1993. Induction of male sexual behavior in the rat by 7 α -methyl-19-nortestosterone an androgen that does not undergo 5 α -reduction. *Biology of Reproduction.* 49: 577-581.
- Morali G, Lemus AE, Munguia R, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 2002. Hormona-like behavior an effects of levonorgestrel and its metabolites in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 73: 951-961.
- Morali G, Lemus AE, Oropeza MV, García GA, Pérez-Palacios G. 1990. Induction of sexual behavior by norethisterone. role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacol Biochem Behav.* 37: 477-484.
- Muddana SS, Price AM, MacBride MM, Peterson BR. 2004. 11 β -Alkyl- Δ^9 -19-nortestosterone derivates: high-affinity ligands and potent partial agonists of the androgen receptor. *J Med Chem.* 47: 4985-4988.
- Mueller, SO. 2002. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. *J Chromatogr.* 777: 155-165.
- Murphy LC, Dotzlaw H, Alkhalaf M. 1992. Mechanism of growth inhibition by antiestrogens and progestins in human breast and endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 43: 117-121.
- Musgrove EA, Swarbrick A, Lee CS, Cornish AL, Sutherland RL. 1998. Mechanism of cyclin-dependent kinase inactivation by progestins. *Mol Cell Biol.* 18: 1812-1825.
- Nagy L, Schwabe. 2004. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *TRENDS in Biochemical Sciences.* 29(6): 317-324.
- Necela BM, Cidlowski JA. 2003. Crystallization of the human glucocorticoid receptor ligand binding domain: a step towards selective glucocorticoids. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 24(2): 58- 61.
- Nemoto T, Ohara-Nemoto Y, Shimazaki As, Ota M. 1994. Dimerization characteristics of the DNA- and steroid-binding domains of the androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 50: 225-233.
- Neuman F, Von Berswordt-Allrabe R, Elger M, Stein-Beck JD, Kramer M. 1976. Aspects of androgen-dependent events as studied by antiandrogens. *Rec Prog Horm Res.* 26: 337-410.
- Neumann F, Duesterberg B, Laurent H. 1988. Development of progestogens. In: Runnebaum B, Rabe T, Kiesel L, edition. *Female contraception.* Berlin, Heidelberg Springer-Verlag.

- Neumann F. 1994. The antiandrogen cyproterone acetate discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research. *Exp Clin Endocrinol.* 102: 1.
- Nirdé H, P, Térouanne B, Gallais N, Sultan C, Auzou G. 2001. Antimeracocorticoid 11 β -substituted spiroactones exhibit androgen receptor agonistic activity: A structure function study. *Mol Pharmacol.* 59: 1307-12.
- Nobel S, Abrahmsen, Opermann J. 2001. Metabolic conversion as a pre-receptor control mechanism for lipophilic hormones. *Eur J Biochem.* 268: 4113-4125.
- Nugent AG. 2003. Modulation by progestogens of the effects of oestrogen on hepatic endocrine function in postmenopausal women. *Clin Endocrinol.* 59: 690-698.
- Oettel M, Breitbarth H, Graeser T, 1998. The pharmacological profile of dienogest. Proceedings of the 5th Congress of the European Society of Contraception, 17-20 June, Prague. *Eur J Contracept Reproduct Health Care.* 3(Suppl 1): 76.
- Olesen EM, Yan YX, Liu B, Martin D, Déon B, JudwarebR, Martin C, Voyta JC, Bronstein I. 2000. Novel methods for chemiluminescent detection of reporter enzymes. *Methods in Enzymology.* 326: 175-2002.
- Ozanne DM, Gbrady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robson CN. 2000. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the χ -actin cross-linking protein filamin. *Mol Endocrinol.* 14: 1618-1626.
- Pasapera AM, Camacho-Arroyo I, Savouret JF, García GA, Pérez-Palacios G, Pichon Ch, Cerbón M. 1995b. In vitro molecular assessment of the mechanism of action of 19-nor progestins and as contragestional agents. *Arch Med Res.* 26: S203-S207.
- Pasapera AM, Cerbón MA, Castro I, Gutierrez R, Camacho AL, García AG, Pérez-Ppalacios G. 1995^a. Norethistrene metabolites the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. *Biol Reprod.* 52: 426-432.
- Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, García-Becerra R, Ulloa-Aguirre A, Savouret JF. 2001. Transactivation of estrogen and progestin-responsive promoters by 19-nor progestins in African Green Monkey CV1 cells. *Endoc.* 17(1): 1-9.
- Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, Herrera J, Galicia-Canales N, García de la Mora G, Ulloa-Aguirre A. 2002. Norethisterone is bioconverted to oestrogenic compounds that active both the oestrogen receptor α and oestrogen receptor β in vitro. *Eur J Pharmacol.* 452: 347-355.
- Pascualini JR, Paris J, Struck-Ware R, Cherite G and Botella J. 1998. Progestins and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 65: 225-235.
- Pérez-Palacios G, Chávez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M, Pérez AE. 1981. Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. *J Steroid Biochem.* 15: 125-130.
- Pérez-Palcios G, Cerbón MA, Pasapera AM, Castro I, Enriquez J, Vilchis F, GarcíaGA, Moreli G, Lemus AE. 1992. Mechanism of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J Steroid Biochem and Mol Biol.* 41:479-486.
- Perusquia M, Villalón CM, Navarrete E, García GA, Pérez-Palacios G, Lemus AE. 2003. Vasodilating effect of norethisterone and its 5 α metabolites: a novel nongenomic action. *Eur J Pharmacol.* 475: 161-169.
- Perusquia M, Jasso-Kamel J. 2001. Influence of 5 α - and 5 β -reduced progestins on the contractility of isolated human myometrial at term. *Life Sci.* 68: 2933-2944.
- Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT. 1994. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91: 5355-5358.

- Picard D, Yamamoto KR. 1987. Two signals mediate hormona-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *J EMBO*. 6(11): 3333-3340.
- Pike ACW, Brzozowski AM, Hiubbard RE. 2000. Astructural biologist's view of the oestrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 74: 261-268.
- Pike ACW. 2006. Leassons learnt from structural studies of the oestrogen receptor. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 20(1): 1-14.
- Potts M. 2000. The unmet need for family planning. *Sci Am*. 282(1): 69.
- Poujol N, Wurta JM, Tahiri B, Lumbroso S, Nicolas JC, Moras D, Sultan CH. 2000. Specific recognition of androgens by their nuclear receptor. *J Biol Chem*. 275: 24022-31.
- Poulin R, Baker D, Poirier D, Labrie F. 1991. Multiple actions of synthetics progestins on the growth of ZR-75-1 human breast cancer cells an in vitro model for the stimulanous assay of androgen, progestins, estrogen and glucocorticoid agonistic and antagonistic activities of steroids. *Breast Cancer Res Treat*. 17: 197-210.
- Pratt WE, Toft DO. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*. 18: 306-360.
- Prescott J, Coezee G. 2006. Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Letters*. 231: 12-19.
- Prifti S, Lelle L, Strowitzki T, Rabe T. 2004. Induction of androgen receptor activity by norgestimate and norelgestromin in MDA-MB 231 breast cell. *Gynecol Endocrinol*. 19: 18-21.
- Punyadera C, Verboost P, Groothuis. 2003. Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 84: 393-410.
- Quarmby VE, Kempainen JA, Sar M, Lubahn DB, French FS, Wilson EM. 1990. Expression of recombinant androgen receptor in cultured mammalian cells. *Mol Endocrinol*. 4: 1399-1407.
- Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, El-Away MK, Wilson EM, French FS. 1995. Androgen receptor defects historical, clinical and molecular perspectives. *Endoc Rev*. 16: 271-321.
- Quigley CA, Friedman KJ, Jonson A, Lafrienera RG, Silverman LM, Lubahn DB, Brown TR, Wilson BM, Willard HF, French FS. 1992. Complete deletion of the androgen receptor gene definition of the null phenotype of the androgen insensibility syndrome and determination of carrier status. *J Clin Endocrinol Metab*. 74: 927-933.
- Rabe T, Bohlman MK, Rehberger-Shneider S, Prifu S. 2000. Induction of estrogen receptor α and β activities by synthetic progestins. *Gynecol Endocrinol*. 14: 118-129.
- Rabe T, Grunwald K, Runnebaum B. 1994. Hyperandrogenism in women. In: Runnebaun B, Rabe T, edition. *Gynecological endocrinology and reproductive medicine*. Vol.

Rabe T, Kowald A, Ortmann J. 2000. Inhibition of skin 5 α -reductase by oral contraceptive progestins in vitro. *Gynecol Endocrinol.* 24: 223-230.

Raivio T, Palvimo JJ, Dunkel LL, Wickman S, Janne OA. 2001. Novel Assay for determination of androgen bioactivity in human serum. *The J Clinic Endocrinol Metabol.* 86: 1539-1544.

Raudrant D, Rabe T. 2003. Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs.* 63(5): 463-492.

Raudrant D, Rabe T. 2003. Progestogens with antiandrogenic properties. *Drugs.* 63(5): 463-492.

Rebar RW, Zeserson K. 1991. Characteristics of the new progestagens in combination oral contraceptives. *Contraception.* 44: 1-10.

Reid J, Betney R, Watt K, McEwan IJ. 2003. The androgen receptor transactivation domain: the interplay between protein conformation and protein-protein interactions. *Biochemical Society Transactions.* 31(part 5): 1042-1046.

Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. 1995. Crystal structure of the RAR- γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature.* 378: 681-689.
Ribeiro et al., 1995

Rittmaster RS. 1995. Clinical relevance of testosterone and duhydrotestosterone metabolism in women. *Am J Med.* 96: 17S-21S.

Robin-Jagarsxhmidt C, Wurtz JM, Guillot B, Gofflo D, Benhamou B, Vergezac A, Ossart CH, Moras D, Philibert D. 2000. Residues in the ligand binding domain that confer progestin or glucocorticoid specificity and modulate the receptor transactivation capacity. *Mol Endocrinol.* 14: 1028-1037.

Roche P, Hoare S, Parker M. 1992. A consensus DNA-binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 6: 2229-2235.

Rochette-Egly C, Adam S, Rossignol M, EAgly JM, Chambon P. 1997. Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell.* 90: 97-107.

Rochette-Egly C, Gaub MP, Lutz Y, Alí S, Scheuer I, Chambon P. 1992. Retinoic acid receptor-beta immunodetection and phosphorylation on tyrosine residues. *Mol Endocrinol.* 6: 2197-2209.

Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ. 2004. Mineralocorticoid receptor binding structure and function. 2004. *Mol Cell Endocrinol.* 217: 203-212.

Rogerson FM, Yao Y-Z, Smith BJ, Dimopoulos N, Fuller PJ. 2003. Determinants of spironolactone binding specificity in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol.* 31: 573-582.

Rosenberg RS, Grass L, Jenkins DJA, Kendall CWC, Diamandis EP. 1998. Modulation of androgen and progesterone receptors by phytochemicals in breast cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical research communications.* 248: 935-39.

Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS. 1999. Regulation of androgen action. *Vitam Horm.* 55: 309-352.

Sack JS, Kish KF, Wang C, Attar RM, Kiefer SE, An Y, Wu GY, Scheffler JE, Salvati ME, Krystek SR, Weinmann R, Einspahr HM. 2001. Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone. *PNAS.* 98(9): 4904-4909.

Sambrook EF, Frisch T, Maniatis. 2001. *Molecular Cloning. A laboratory Manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sambrook EF, Frisch T, Maniatis. 1990. *Molecular Cloning. A laboratory Manual. Second Edition.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sanger F, Nicklen S, Coulson A. 1977. DNA Sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS. USA.* 74:5463-5467.

Santen RJ, Pinkerton J, McCartney C, Petroni GR. 2001. Risk of Breast Cancer with Progestins in Combination with Estrogen as Hormone Replacement Therapy. *The J Clin Endocrinol and Metabol.* 86(1): 16-23.

Santillán R, Pérez-Palacios G, Reyes M, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I, Lemus AE. 2001. Assessment of the oestrogenic activity of the contraceptive progestin levonorgestrel and its non-phenolic metabolites. *Eur J Pharmacol.* 427: 167-74.

Savouret JF, Bailly A, Rauch C, Redeuilh G, Chaucharau A, Milgrom E. 1991. Characterization of the hormone responsive element involved regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J.* 10:1875-1883.

Schafele F, Carbonell X, Guerbodot M, Borngraeber S, Chapman MS, K Ma AA, Miner J, Diamond MI. 2005. The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *PNAS.* 102(28): 9802-9807.

Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW, Thijssen JHH. 2003. Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas.* 46S1: S7-S16.

Schindler AE. 2004. Antiandrogenic progestins for treatment of signs of androgenisation and hormonal contraception. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 112: 136-41.

Schmitt M, Klinga K, Schnarr, Morfin R, Mayer D. 2001. Dehydroepiandrosterone stimulates proliferation and gene expression in MCF-7 cells after conversion to estradiol. *Mol Cell Endocrinol.* 173: 1-13.

Schoonen WGEJ, Deckers GH, De Gooijer ME, De Ries R, Kloosterboer HJ. 2000. Hormonal properties of norethisterone, 7 α -methyl-norethisterone and their derivatives. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74: 213-222.

Schwingl PJ, Shelton J. 1997. Modeled estimates of myocardial infarction and venous thromboembolic disease in users of second and third generation and contraceptives. *Contraception.* 55: 125-129.

Scott FG. 2000. *Developmental of Biology.* 6ta. Editon. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA. 523-545.

Shaffer PL, Jivan A, Dollins E, Claessens F, Gewirth. 2004. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *PNAS.* 101(14): 4758-63.

Sheldon LA, Becker M, Smith CL. 2001. Steroid hormone receptor-mediated histone deacetylation and transcription at the mouse mammary tumor virus promoter. *J Biol Chem.* 276(35): 32423-32426.

Shen HC, Cottzee GA. 2005. The androgen receptor: unlocking the secrets of its unique transactivation domain. *Vitamines and Hormones.* 71: 301-319.

Shields-Botella J, Duc I, Duranti E, Puccio F, Bonnet P, Delansorne R, Paris J. 2003. An overview of nomegestrol acetate selective receptor binding and lack of esrogenic action on hormone-dependent cancer cells. *J Steroid Biochem Molec Biol.* 87: 111-122.

- Shoonen WGEJ, Deckers G, Gooijer ME, Ries R, Kloosterboer HJ. 2000. Hormonal properties of norethisterone, 7(-methyl-norethisterone and their derivatives. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 74: 213-222.
- Shoonen WGEJ, Dijkema R, Ries RJH, Wagenaars JL, Joosten JWH, Gooyer ME, Deckers G, Kloosterboer HJ. 1998. Human progesterone receptor A and B isoform in CHO cells. II. Comparison of binding, transactivation and ED50, values of several (Anti) progestagens in vitro in CHO and MCF-7 cells and in vivo in rabbits and rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 64: 157-170.
- Shoonen WGEJ, Joosten WH, Kloosterboer HJ, 1995. Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nor-testosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells. II. T47-D cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 55: 439-444.
- Shwingl PJ, 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.
- De-Siddhartha S, Macara IG, Lannigan DA. 2005. Novel biosensors for the detection of estrogen receptor ligando. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 96: 235-244.
- Simental JA, Sar M., Lane MV, French FS, Wilson EM. 1991. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem.* 266: 510-518.
- Simon S, Mueller SO. 2006. Human reporter gene assays: transcriptional activity of the androgen receptor is modulated by cellular environment and promoter context. *Toxicol.* En prensa.
- Sitruk-Ware R, Plu-Bureau G. 2004. Exogenous progestagen and the human breast. *Maturitas.* 49: 58-66.
- Sitruk-Ware R. 2000. Progestins and cardiovascular risk markers. *Steroids.* 65: 651-53.
- Slater EP, Redevivhi G, Theis K, Susje G, Beato M. 1990. The uteroglobin promoter contains a non canonical estrogen responsive element. *Mol Endocrinol.* 4: 604-610.
- Smiith CL, Kreutner W. 1998. In vitro glucocorticoid receptor binding and transcriptional activation by topically active glucocorticoids. *Drug Res.* 48: 956-960.
- Smith SS. 1991. Progesterone administration attenuates axitatory aminoacid responses of cerebellar Purkinge cells. *Neuroscience.* 42: 309-20.
- Sobel NB. Progestins in preventive hormone therapy. Including pharmacology of the new progestins, desogestrel, norgestimate and gestodene are there advanventages? *Obstet Gynecol Clin North Am.* 21: 299-319.
- Song LN, Coghlan M, Gelmann E. 2004. Antiandrogen effects of mifepristone on coactivator and corepressor interactions with the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 18: 70-85.
- Sonneveld E, Jansen JH, Riteco JAC, Brouwer A, Van der Burg B. 2005. Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sciences.* 83: 136-148.
- Spencer CP, Golsland IF, Cooper AJ. 2000. Effects of oral and transdermal 17 β -estradiol with ciclical oral norethindrone acetate on insulin sensitivity, secretion, and elimination in postmenopuasal women. *Meatabolism.* 49: 742-747.
- Stanczyk FZ, Roy S. 1990. Metabolism of levonorgestrel, norethindrone, and structurally related contraceptive. *Contraception.* 42(1): 67-97.
- Stanczyk FZ. 1996. Introduction: Structure –function relationships, metabolism, pharmacokinetics and potency of progestins. *Drugs of Today.* 52: 1-14.

- Stanczyk FZ. 2003. All progestins are not created equal. *Steroids*. 68: 879-90.
- Stanczyk HZ. 2001. Use of the name progestin. *Contraception*. 64: 1-2.
- Sullivan JM, Shala BA, Miller LA, Lerner LA, McBrayer JL. 1995. Progestins enhance vasoconstrictions responses in postmenopausal women receiving estrogen replacement therapy. *Menopause*. 2(4): 193-199.
- Sutherland RL, Lee CS, Feldman RS, Musgrove EA. 1992. Regulation of breast cancer cell cycle progression by growth factors, steroids and steroid antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 41: 315-321.
- Suzuji H, Ueda T, Ichikawa T, Ito H. 2003. International Congress on hormone steroids and hormones and cancer: androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 10 (2): 209-216.
- Suzuki C, Nakajima Y, Akimoto H, Wu C, Ohmiya Y. 2005. A new additional reporter enzyme, dinoflagellate luciferase, for monitoring of gene expression in mammalian cells. *Gene*. 344: 61-66.
- Tamura H, Yoshikawa H, Gaido KW, Ross SM, DeLisie RK, Welsh WJ, Richard AM. 2003. Interaction of organophosphate pesticides and related compounds with the androgen receptor. *Environmental Health Perspectives*. 111(4): 545-562.
- Tetel MJ, Giangrande PH, Leonhard SA, McDonnell DP, Edwards DP. 1999. Hormone-dependent interaction between the amino- and carboxyl- terminal domains of progesterone receptor in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol*. 13: 910-924.
- Térouanne B, Tahiri B, Georgett V, Belon CH, Poujol N, Avances C, Orio F Jr, Balaguer P, Sultan CH. 2000. A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects. *Mol Cell Endocrinol*. 160: 39-49.
- Tindall D, Freach J, Nayfeh FS. 1981. Estradiol-17 β inhibition of androgen uptake, metabolism and binding in epididymis of adult male rats in vivo: a comparison with cyproterone acetate. *Steroids*. 37: 257-268.
- Togashi M, Borngraehner S, Sandler B, Fletterick J, Webb P, Baxter JD. 2005. Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domain to agonist: potential for novel approaches to ligand design. *J Steroid Biochem Molec Biol*. 93: 127-137.
- Tomura A, Goto K, Morinaga H, Nomura M, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R, Nawata H. 2001. The subnuclear three dimensional image analysis of androgen receptor fused to green fluorescence protein. *J Biol. Chem*. 276: 28395-28401.
- 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.
- Tora L, White J, Brou C, Tasset D, Webster N, Scheer E, Chambon P. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*. 59: 477-487.
- Torres JM, Ortega E. 2003. Differential regulation of steroid 5 α -reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J*. 17(11): 1428-1433.
- Trapman J, Klassen P, Kuiner GM, van der Korput JAGM, Faber PW, van Rooj HCJ, Geurts van Kessel A, Voorhorst MM, Mulder E, Brinkmann AO. 1988. Cloning, structure and expression, cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 151: 241-248.
- Trapman J. 2001. Molecular mechanism of prostate cancer. *Eur J Cancer*. 37: S119-S125.

- Truss M, Beato M. 1993. Steroid hormone receptors: interaction with desoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endoc Rev.* 14: 1459-1479.
- Tsai MJ, O'Malley. 1994. Molecular mechanism of action steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem.* 63: 451-460.
- Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. 2000. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol.* 14: 1162-1174.
- Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP. 1994. Human estrogen receptor transcriptional capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol.* 8:21-30.
- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, Lockshon D, Narayan v, Srinivasan M, Pochart P, Qureshi-Emili A, Li Y, Godwin B, Conovr D, Kalbfleisch T, Vijayadamodar G, Yang M, Jonhston M, Fields S, Rothberg JM. 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Scaccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 403(10): 623.
- Umesoto K, Evans RM. 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell.* 57: 1139-1146.
- Van Criekinge W, Beyaert R. 1999. Yeast two-hybrid state of the art. *Biological Procedures.* 2(1): 1-40.
- Van der Burg Kalkhoven E, Isbrucker L, de Laat SW. 1992. Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells under growth factor –defined conditions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 42: 457-465.
- Vanaja DK, Mitchell SH, Toft DC, Young CY. 2002. Effect of geldanamycin on androgen receptor function and stability. *Cell Stress CHaperones.* 7: 55-64.
- Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Gustavo A, García GA, Angeles A, Pérez-Palacios G. 1986. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J Steroid Biochem.* 24(2): 525-30.
- Vingaard AM, Bonefeld Joergensen EC, Larsen JCG. 1999. Rapid and sensitive reporter gene assays for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 155: 150-160.
- Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. 1996. TIF2, a 160kDa transcription mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15: 3667-3675.
- Weatheran VR, Fletterick Jr, Scanlan ST. 1999. Nuclear receptors ligand-binding domains. *Annu Rev Biochem.* 68: 559-581.
- White JA, McCuaig KA, Mader S. 1994. A simple and sensitive high-throughput assay for steroid agonists and antagonists. *Biotechnology.* 12: 1003-1007.
- Wiegant I, Kuhl H. 2004. Progestogen therapies: differences in clinical effects?. *TREDS in Endocrinology and Metabolism.* 15(6): 277-285.
- Williams SP, Sigler PB. 1998. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature.* 393: 392-396.
- Williams JK, Cline JM, Honore EK. 1998. Coadministration of norgestrel acetate does not diminish the beneficial effects of estradiol on coronary artery dilator response in nonhuman primates (*Macaca fascicularis*). *Am J Obstet Gynecol.* 179(5): 1288-1294.

- Wilson EM, He B, Langley E. 2004. Methods for detecting domain interactions in nuclear receptors. *Methods in Enzymology*. 364: 142-152.
- Wilson VS, Bobseine K, Lambright CR, Gray LE, Jr. 2002. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen-and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicol Sciences*. 66: 69-81.
- Wilson RC, Kesner JS, Kaufman JM, Uemura T, Akema T, Knobil E. 1984. Central electrophysiologic correlates of pulsatile luteinizing hormone secretion in the rhesus monkey. *Neuroendocrinol*. 39: 256-260.
- Wong MSJ, Murphy LC. 1991. Differential regulation of c-myc by progestins and anti-estrogens in T-47D human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 39: 39-44.
- Yen SCC. The human menstrual cycle. In: Yen SCC, Jaffe RB (eds). *Reproductive Endocrinology*. 3rd ed. WB Saunders. Eds. Philadelphia. 1991.
- Yin D, He Y, Perera MA, Hong SS, Marhefka C, Stourman N, Kipkovsky L, Miller DD, Dalton JT. 2003. Key structural features of nonsteroidal ligands for binding and activation of the androgen receptor. *Mol Pharmacol*. 63: 211-223.
- Yin W, Xiang P, Li Q. 2005. Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system. *Analytical Biochemistry*. 346: 289-294.
- Yun C, Oh S, Zizak M, Steplock D, Tse CW, Donowitz M. 1997. Camp-mediated inhibition of the epithelial brush border Na⁺/H⁺ exchanger, NH3, requires an associated regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 3010-3015.
- Zelevnik AJ, Fairchild-Benyo D. 1994. Control of follicular development, corpus luteum function and the recognition of pregnancy in higher primates. In: Vol 2. 2nd ed. Raven Press Ltd., New York., pp 711.
- Zeng Z, Allan GF, Thaller C, Coobey AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai M. 1994. Detection of potential ligands for nuclear receptors in cellular extracts. *Endocrinol*. 135: 248-52.
- Zhang J, Guenther MG, Carthew RW, Lazar MA. 1998. Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev*. 1998. 12: 1775-1780.
- Zhang ZR, Xu SO, Sun X, Xu YJ, Cai XK, Liu ZW, Tan XL, Zhou YK, Zhang JY, Yan H. 2003. Characteristics and application of established luciferase hepatoma cell line that responds to dioxin-like chemicals. *World J Gastroenterol*. 9(7): 1460-1464.
- Zhou G, Cummings R, Li Y, Mitra S, Wilkinson HA, Elbrecht A, Hermes JD, Schaeffer JM, Smith RG, Moller DE. 1998. Nuclear receptors have distinct affinities for coactivators: characterization by fluorescence resonance energy transfer. *Mol Endocrinol*. 12: 1594-1604.
- Zhuo Z, Lane MV, Kempainen JA, French FS, Wilson EM. 1995. Specificity of ligand-dependent androgen receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol*. 9: 208-218.