TRABAJO DE TESIS RECEPCIONAL

Efectos de la Hormona Gonadotrópica Coriónica y de Esteroides Anticonceptivos en la Biosíntesis de la Progesterona en Cuerpo Lúteo Humano In Vitro.

Que presente el Alumno:

Alberto Kawano Nakamura

Para optar al título de

Especialista en Biología de la Reproducción Humana.

División de Estudios Superiores
de la Escuela de Medicina
de la Universidad Nacional Autónoma
de México.

1 9 7 0

Vo. Bo.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

INTRODUCCION:

Entre las diferentes terapéuticas utilizadas para el control de la fertilidad en la mujer, las que emplean estrógenos y progestágenos han demostrado ser los de mayor eficacia clínica, debido fundamentalmente a sus propiedades anti-ovulatorias. Los diferentes esquemas terapéuticas ensayados ponen de manifiesto que los estrógenos son los responsables de la inhibición de la ovulación observada en los numerosos casos estudiados.

La administración de estrógenos durante varios días cursan con disminución en los niveles plasmáticos tanto de FSH como de LH en la mujer menopáusica (Odell, y Col. (1). Este efecto ha sido demostrado recientemente en la mujer menstruante normal bajo tratamiento combinado de noretinodrel y mestranol (Abraham, y Col. (2). La administración de progestágenos, como el acetato de clormadinona a pequeñas dosis no inhibe la ovulación (Larson-Cohn, y Col. (3) y si se suprime dicho fenómeno con grandes dosis de progestágeno como fué demostrado por Jaffe, y Col. (4) con el uso de didrogesterona.

Trabajos previos han sugerido que las hormonas esteroides utilizados como antiovulatorios, interfieren a nivel ovárico, la acción de la gonadotropina coriónica humana (Lunenfeld, y Col. (5). Las observaciones de Gual, y Col. (6) 1968 apoyan esta posibilidad. Más recientemente se ha demostrado que la utilización de 0.5 mg. de acetato de clormadinona disminuye la producción de progesterona plasmática, sugiriendo así una acción directa sobre el

cuerpo lúteo (Larson-Cohn y Col. (3).

Con objeto de precisar algún efecto de tipo inhibitorio sobre la biosíntesis de progesterona, se realizaron experimentos in vitro con cuerpo lúteo humano y se estudió la influencia de mestranol y acetato de clormadinona sobre la biosíntesis de progesterona. Los efectos de la gonadotropina coriónica humana (HCG) sobre la utilización de los precursores pregnenolona y el sulfato de pregnenolona fueron así mismo analizados.

MATERIAL Y METODOS:

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Los solventes fueron redestilados antes de su uso. Los esteroides no radiactivos usados como referencia o acarreadores fueron obtenidos de Syntex, S.A. y se recristalizaron previamente. Su pureza fué verificada por cromatografía en papel, verificando su punto de fusión y por los análisis de luz ultravioleta (UV) e infrarroja. La pregnenolona 4-^{14}C con actividad específica (a.e.) de 55.7 mCi/mM y la pregnenolona 7 -^{3}H (a.e.) 2.5 Ci/mM fueron adquiridas de la Radiochemical Centre, Amersham, England. Su purificación por cromatografía en papel en el sistema Bush A. El sulfato de pregnenolona 7 -^{3}H fué preparado de pregnenolona 7-^{3}H, por el método de Calvin, y Col. (7) y se purificó por cromatografía de partición en columna de Celita 545 usando el sistema (T. Butanol, Isoctano NH_4OH) y por cromatografía de papel en el sistema Lewbart Schneider. Su a.e. final fué de 368 Ci/mM con la adición de esteroide no radiactivo.

Su pureza radioquímica fué verificada al mezclarla con esteroide auténtico y analizar su movilidad cromatográfica en el sistema mencionado y por cristalización repetida hasta alcanzar una a.e. constante.

La gonadotropina coriónica humana utilizada, fué una preparación comercial de los Laboratorios Organon.

La detección de los esteroides no radiactivos usados como acarreadores o estandares en los cromatogramas, se hizo siguiendo técnicas convencionales que incluyen reacciones de color sobre papel. Los esteroides radiactivos fueron detectados en tiras estrechas de cromatogramas cortados en fragmentos de 1.5 cms. colocados en frascos de conteo con bajo contenido en 40 k, disueltos con 5 ml de una solución de conteo compuesta por 4 gr. de 2,5-Dipeniloxazol (PPO) y 100 mg de (2,4-metil-feniloxazolil) benceno ($2CH_3$-POPOP) por litro de tolueno y contados en un centellador líquido Packard ajustado para análisis simultáneo para ^3H y ^{14}C.

Los cálculos de recuperación para progesterona fueron calculadas por análisis de absorción de luz ultravioleta a 240 mu y los de pregnenolona por la reacción de Oertel-Eik-Nes, en alícuotas de los "acarreadores" purificados. El análisis cuantitativo de los esteroides radiactivos se hizo en alícuotas por duplicado o triplicado las cuales se evaporaron y disolvieron en 10 ml. de la solución Tolueno PPO-$2CH_3$-POPOP. Los esteroides sulfoconjugados fueron disueltos en 0.2 ml de metanol antes de agregar la solución de

conteo mencionada. Los conteos fueron corregidos para radiactividad ambiental asi como para fenómenos de "apagamiento" (Quenching) mediante una técnica de estandarización interna empleando tolueno tritiado o marcado con ^{14}C, de a.e. conocida,

La identidad de los metabolitos radiactivos fué establecida por métodos de dilución isotópica inversa que incluyen movilidad cromatográfica idéntica a la de los portadores auténticos asi como radio-homogeneidad después de cristalizaciones repetidas hasta obtener una actividad específica constante. La radiactividad en los cristales se expresa en desintegraciones por minuto, (DPM). Las actividades enzimáticas fueron calculadas de la a.e. final encontrada en los cristales y se expresa como milimicromolas de metabolito formado por miligramo de tejido.

Tejido.- El cuerpo lúteo humano usado fué obtenido por laparatomía de una paciente de 22 años de edad con embarazo ectópico de 6 semanas de edad. Después de eliminar la grasa circundante fué rebanado mediante el microtomo manual Stadie Riggs e incubado antes de 2 horas de su remoción.

Incubaciones.- Las rebanadas de tejido se pesaron y distribuyeron en 4 frascos Erlenmeyer de 50 ml. los cuales contenían 15.0 Ci de sulfato de pregnenolona 7 -^{3}H (16.8 g) y 1.86 Ci de pregnenolona 4-^{14}C (10.5 g) en 0.1 ml de propileneglicol. El frasco 1 fué utilizado como Control; al frasco 2,3 y 4 se agregaron 1000 UI de HCG disueltas en Krebs Ringer bicarbonato de pH 7.4. El fras-

co 3 contenía 1 mg de acetato de clormadinona; agregado previamente y el frasco 4 contenía 100 g de mestranol. El frasco 5 contenía los sustratos radiactivos. No se agregó el tejido. El volumen final de las incubaciones fué de 5 ml las incubaciones se realizaron en un incubador metabólico Dufnoff a 37 °C usando una mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2 como fase gaseosa. La reacción fué suspendida al cabo de 3 horas con la adición de diclorometano seguida por enfriamiento rápido en mezcla hielo seco-acetona.

EXTRACCION Y PURIFICACION:

Antes de la extracción se agregaron a los medios de incubación de cada frasco 330 g de pregnenolona, 330 g de progesterona y 1 mg de sulfato de pregnenolona. Se hizo una extracción con diclorometano por centrifugación. La fase acuosa fue transferida a un tubo de centrífuga de 50 ml con tapón esmerilado. El tejido residual fue suspendido en agua, homogenizado en un dispositivo de vidrio, potter elvehjem y finalmente centrifugado. El agua sobrenadante fue colectada con el medio de incubación y se le hicieron 4 extracciones con diclorometano, separando las fases por centrifugación. El diclorometano colectado fue evaporado a sequedad y su extracto seco denominado "Fracción Orgánica". La colección acuosa fué extraída 4 veces con n-butanol; y el butanólico denominado "Fracción Acuosa".

La fracción orgánica fue purificada por cromatografía en papel en el sistema ligroin propilenglicol y los acarreadores

aislados se purificaron por cromatografía de papel en sistema Bush A. La fracción acuosa no fué procesada.

RESULTADOS:

Casi todo el ^{14}C incubado fue extraído con el diclorometano (94.1 a 96.6%) quedando solo una pequeña cantidad en la fracción acuosa. El ^{3}H fue extraído de la fracción acuosa con el n-Butanol recuperando 59.8 a 72.9% de la cantidad incubada en los experimentos 1 a 4. Solamente 5.4% del ^{3}H se recuperó de esta fracción en el experimento 5. Las recuperaciones totales de este isótopo variaron de 92.7 a 97.1%.

En las fracciones orgánicas purificadas en el sistema de ligroin propilenglicol se detectaron tres zonas radiactivas conteniendo tanto ^{3}H como ^{14}C denominándoseles A, B y C.

La zona A.- Permaneció en el origen y no fué procesada más.

Zona B.- Tenía movilidad idéntica a aquella del acarreador de pregnenolona (Rf= 0.29). Este fué aislado y repurificado por cromatografía de papel en sistema Bush A. Solamente una área radiactiva doblemente marcada fue detectada, cuyo Rf fue idéntico al de la pregnenolona (Rf= 0.44) siendo identificada como tal después de agregar pregnenolona auténtica a una alícuota de dicho material purificado, por cristalización repetida a actividad específica constante (Tabla 1).

Zona C.- Este material radiactivo tuvo movilidad cromatográfica similar a la del acarreador de progesterona (Rf= 0.51) fué puri-

ficado por cromatografía de papel en el sistema Bush A detectándose una área radiactiva que correspondió con la distribución del acarreador de progesterona (Rf=0.58). Su identidad fué establecida al demostrar su pureza radioquímica (Tabla 2).

La transformación de pregnenolona 4-^{14}C a progesterona asi como la conversión del sulfato de pregnenolona 7 -^{3}H a pregnenolona y progesterona se dan en la tabla 3.

Las relaciones $^{3}H/^{14}C$ encontradas en estos metabolitos aparecen en la misma Tabla 3.

DISCUSION:

De los resultados obtenidos se puede apreciar que la formación de progesterona aumentó a 83.2, casi al doble a partir del sulfato de pregnenolona ^{3}H por acción de la HCG agregada en comparación con el experimento control. No se observó ningún incremento a partir de la pregnenolona ^{14}C (Tabla 3).

La relación $^{3}H/^{14}C$ en la progesterona fué de 2.55, dicha relación en la pregnenolona fué de 18.94 indicando un acúmulo de ^{3}H en la pregnenolona formada del substrato sulfoconjugado.

Las relaciones $^{3}H/^{14}C$ para progesterona en los experimentos III y IV fueron mayores que la del control y comparables a la del experimento II. Sin embargo, la formación de progesterona en los experimentos III yIV no se encontró aumentada a pesa de la presencia de HCG en los frascos de incubación. Estos resultados

sugieren un efecto inhibitorio causado por el acetato de clormadinona y el mestranol, respectivamente. Por el contrario, se observó una disminución en la síntesis de progesterona tanto de la S-pregn-^{3}H como a partir de la pregnenolona 4-^{14}C cuando se agregaron 2.47×10^{-6} M de acetato de clormadinona.

A pesar de que la síntesis de progesterona a partir de substrato sulfoconjugado disminuyó a 48.4 mμM/mg en comparación con la del experimento II (83.2 mμM/mg) resultó aun mayor que la del control y ya que se observa acumulo notable de ^{3}H en la pregnenolona según se puede apreciar de su relación $^{3}H/^{14}C$ que resultó de 32, parece permisible inferir que la limitación en la síntesis de progesterona ocurrió a nivel de la enzima 3β-ol-deshidrogenasa causada por el progestágeno.

La adición de mestranol (3.33×10^{-7} M) produjo una disminución en un 44% en la síntesis de progesterona a partir de la pregnenolona ^{14}C y solamente un 5% a partir del sulfato de pregnenolona ^{3}H. Cuando se compara con el experimento control dado que también se observa una disminución en la formación de pregnenolona a partir del substrato sulfoconjufado, siendo la relación $^{3}H/^{14}C$ en la pregnenolona de 8.53, menor que la del experimento control, parece posible una doble influencia inhibitoria que puede estar localizada, no sólo en el sistema 3β-ol-deshidrogenasa sinó también a nivel de la sulfatasa. La falta de acumulación de ^{3}H en la pregnenolona apoya fuertemente esta posiblidad.

La biosíntesis de progesterona in vitro a partir de acetato resultó incrementada en el cuerpo lúteo bovino (Mason, y Col. (8) y en el humano Rice, y Col. (9) por la adición de HCG. La actividad de 20α-reductasa ha sido considerada como el factor limitante en la ruptura de la cadena lateral del colesterol para la formación de pregnenolona durante la síntesis de progesterona (Ichii, y Col. (10). Sin embargo, la secreción de progesterona a partir de pregnenolona después de su administración in vivo por acción de la HCG, ha sido demostrada en la perra, sugiriendo asi que la hormona gonadotrópica puede actuar también después de la ruptura de la cadena lateral del colesterol (De Paoli, y Col. (11). En la biosíntesis de progesterona su sitio de acción no ha sido precisado.

Los resultados del presente estudio señalan un incremento franco de la síntesis de progesterona a partir del sulfato de pregnenolona con la adición de HCG; este aumento parece ser resultado de la activación de la sulfatasa presente en el cuerpo lúteo humano. Ya que los esteroides sulfoconjugados participan en los procesos de biosíntesis de hormonas, como ha sido demostrado recientemente en varios tejidos que elaboran hormonas esteroides; el efecto de las gonadotropinas sobre la sulfatasa ovárica podría ser factor importante en la biosíntesis esteroidea y particularmente en la formación de progesterona y por cuerpo lúteo humano, ya que el sulfato de pregnenolona y otros precursores sulfatados son disponibles

al tejido ovárico y la producción de hormona luteinizante se eleva considerablemente durante la ovulación, a la cual sigue consecuentemente la presencia de un cuerpo lúteo funcionante.

Por otro lado, los resultados de los estudios in vitro muestran que el acetato de clormadinona y el mestranol disminuyeron la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo humano. de estos, el mestranol causó una mayor disminución aún a concentraciones más bajas (3.33×10^{-7}M) cuando se compara con aquella del acetato de clormadinona (2.47×10^{-6}M) resultando así un inhibidor más potente para la síntesis de preogesterona que el progestágeno bajo las condiciones ensayadas. A este respecto cabe señalar que otros esteroides sintéticos usados como antiovulatorios en el humano tales como el Linestrenol y el MK 665 produjeron inhibición en la síntesis de testosterona a partir de progesterona en testículo humano in vitro en concentraciones molares de 4.6×10^{-7}M a 1.7×10^{-5}M (Balatti, y Col. (12) semejantes a las usadas en nuestro estudio estas concentraciones son probablemente mayores que la sangre que irrigaría las gónadas en pacientes bajo terapia oral o parenteral y aunque sería difícil predecir algún efecto inhibitorio de concentraciones aún menores in vivo, es pertinente señalar que la producción de progesterona es reducida por la administración de pequeñas dosis de progestágenos como el megestrol (Ostergard y Starup (13) y los niveles sanguíneos de progesterona disminuyen con dosis comparables de acetato de clormadinona. Estas observacio-

nes pueden ser explicados, basados en nuestros hallazgos, a la inhibición que ejercen los progestágenos quizá a nivel de la 3β-ol-deshidrogenasa del cuerpo lúteo.

Nuestros resultados confirman aquellos de Aakvaag (14) realizados en cuerpo lúteo de puerco que indican una inhibición de 3β-ol-deshidrogenasa por acción de clormadinona.

Sin embargo, existe la posibilidad de que ocurran otras influencias metabólicas no observadas y previstas en el presente estudio es necesario investigar otras áreas de actividad enzimática en el tejido analizado con objeto de precisar mejor el sitio y significación del efecto hormonal hasta ahora parcialmente observado.

T A B L A 1

PUREZA RADIOQUIMICA DE PREGNENOLONA
a.e. dpm/mg

CRISTALIZACION No.	SOLVENTE	EXPERIMENTO							
		I		II		III		IV	
		^{3}H	^{14}C	^{3}H	^{14}C	^{3}H	^{14}C	^{3}H	^{14}C
1	Metanol	5995	634	6021	329	7426	244	6721	757
2	"	6349	637	5580	292	7401	214	6270	733
3	"	6568	640	5851	307	7484	236	6313	756
4	"	6478	623	5954	310	7388	234	6201	675
5	"	—	—	5956	313	—	—	6071	728
AM*		6458	630	6020	322	7522	213	6378	744

* Ultimas aguas madres

T A B L A 2

PUREZA RADIOQUIMICA DE PROGESTERONA
a.e. dpm/mg

CRISTALIZACION No.	SOLVENTE	EXPERIMENTO							
		I		II		III		IV	
		^{3}H	^{14}C	^{3}H	^{14}C	^{3}H	^{14}C	^{3}H	^{14}C
1	Metanol	2666	1973	5998	2358	5583	2388	2774	1185
2	"	2670	1909	5964	2343	5221	2299	2730	1172
3	"	2550	1960	6126	2322	5116	2289	2615	1171
4	"	——	——	5715	2313	5022	2254	2628	1111
AM*		2681	1974	5860	2379	5303	2276	2899	1182

* Ultimas aguas madres

TABLA 3

FORMACION DE PROGESTERONA Y PREGNENOLONA
POR CUERPO LUTEO HUMANO (IN VITRO)
m M (x 10^{-3}) / mg de tejido

EXPERIMENTO	PROGESTERONA			PREGNENOLONA	
	A partir de:		Relación $^{3}H/^{14}C$ en cristales	A partir de:	Relación $^{3}H/^{14}C$ en cristales
	S-Pregn-^{3}H	Pregn-^{14}C		S-Pregn-^{3}H	
I	42.3	203.9	1.35	68.8	10.02
II	83.2	215.7	2.55	69.8	18.94
III	48.4	141.0	2.67	69.7	32.00
IV	40.1	114.4	2.32	59.3	8.53

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1.- Odell, W.D., Parlow, A.F., Cargille, C.M., and Ross, G.T. Radioimmunoassay for Human Follicle-Stimulating Hormone: Physiological Studies. J. Clin. Invest. 47:2551,1968.

2.- Abraham, G.E., Klaiber, E.L., and Broverman, D. Effect of a Combination of Norethynodrel and Mestranol on Plasma Luteinizing Hormone in Normal Women. Amer. J. Obstet. Gynec. 104:1038,1969.

3.- Larson-Cohn, U., Johansson, E.D.B., Wide, L., and Gemzell, C. Effects of continuous daily administration of 0.5 mg of Chlormadinone acetate on the Plasma Levels of Progesterone and the Urinary excretion of Luteinizing Hormone and Total Oestrogens. Acta Endocrinol 63:705, 1970.

4.- Jaffe, R.B., Midgley, A.R., and Goebelsmann, U. Regulation of Human Gonadotropins. Amer. J. Obstet. Gynec. 104:1031, 1969.

5.- Lunenfeld, B., Sulimovici, S., and Rabau, E. Mechanism of Action of Anti-ovulatory Compounds. J. Clin. Endocrinol. Metab. 23: 391,1963.

6.- Gual, C., Bermudez, J.A., and Diaz-Infante, A. Effect of Antiovulatory compounds on the Ovarian Response to HMG and HCG Luteotrophic Hormones in the Human. In Gonadotropins 1968 Ed. By Eugenia Rosemberg Geron. X. Box 1108, Los Altos, Calif. pag. 429.

7.- Calvin, H.I., Vande Wiele, R.L., and Lieberman, S. Evidence that Steroid Sulfates Serve as Biosynthetic Intermediates: In vivo Conversion of Pregnenolone Sulfate-S^{35} to Dehydroisoandrosterone Sulfate-S^{35}. Biochemistry 2:648,1963.

8.- Mason, N.R., Marsh, J.M., and Savard, K. An action of gonadotropin in vitro. J. Biol Chem. 237:1801,1962.

9.- Rice, B.F., Hammerstein, J., and Savard, K. Steroid Hormone Formation in the Human Ovary: II Action of Gonadotropins in vitro in the corpus luteum. J. Clin. Endocrinol. Metab. 24: 606,1964.

10.- Ichii, S., Forchielli, E., and Dorfman, In vitro effect of Gonadotropin on the Soluble Cholesterol Side-Chain Cleaving Enzyme System of Bovine Corpus Luteum. Steroids 2:631, 1963.

11.- De Paoli, J., and Eik-Nes, K.B. Metabolism in vivo of 7α-^{3}H Pregnenolone by the Dog Ovary. Biochim. Biophys Acta 78:457, 1963.

12.- Balatti, J.J., Claret, A., and Rosner, J.M. A Direct Effect of Antiovulatory Compounds on Human Testicular Biosynthesis in vitro. Fert. Steril. 18:367, 1967.

13.- Ostergaard, E., and Starup, J. Ocurrence and Function of Corpora Lutea During Different Forms of Oral Contraception. Acta Endocrinol. 57:386, 1968.

14.- Aakvaag, A. Steroid Formation in porcine ovarian tissue in vitro. Kinetic Studies on the 3β-Hydroxysteroid Dehydrogenase. Acta Endocrinol. 65:261, 1970.