

---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



**Casa abierta al tiempo**

**DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS MCF-7 DE  
CÁNCER DE MAMA PARA BIOTRANSFORMAR  
GESTODENO A METABOLITOS NO FENÓLICOS  
CAPACES DE INDUCIR LA PROLIFERACIÓN CELULAR**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A**

**M. B. E. LETICIA GONZÁLEZ NÚÑEZ**

**DIRECTORA:**

**DRA. ANA ELENA LEMUS BRAVO**

**ASESORES:**

**DRA. MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN**

**DR. PABLO G. DAMIÁN MATZUMURA**

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA**

México, D. F., 30 de noviembre de 2015.

---

---

*ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS CÉLULAS MCF-7 DE CÁNCER DE MAMA PARA BIOTRANSFORMAR  
GESTODENO A METABOLITOS NO FENÓLICOS CAPACES DE INDUCIR LA PROLIFERACIÓN  
CELULAR.*

---

---

**El trabajo experimental de esta Tesis se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y en el Departamento de Biología de la Reproducción “Dr. Carlos Gual Castro” del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán**

**El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT- 2003IDPTNNN0020.**

**La realización de los estudios de Doctorado en Biología Experimental estuvo apoyada por la Beca, Registro 176192, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, durante el período 2005-2009**

---

---

## COMITÉ TUTORAL

### Directora

**Dra. Ana Elena Lemus Bravo**

Profesora Titular "C"

Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
anaelenalemus@prodigy.net.mx

### Asesores

**Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Profesora Titular "C"

Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
mkf@xanum.uam.mx

**Dr. Pablo G. Damián Matzumura**

Profesor Titular "C"

Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
pgdm@xanum.uam.mx

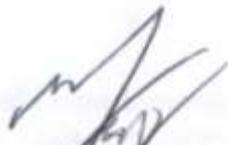
**Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

Jefe de la Unidad de Bioquímica "Dr. Guillermo Soberón Acevedo"  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán  
Investigador Titular Categoría "B"  
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
azentell@biomedicas.unam.mx

---

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: "Actividad enzimática de las células MCF-7 de cáncer de mama para biotransformar gestodeno a metabolitos no fenólicos capaces de inducir la proliferación celular".

**JURADO DE EXAMEN**



Presidenta

**Dra. Mina Königsberg Fainstein**  
Profesora Titular "C"

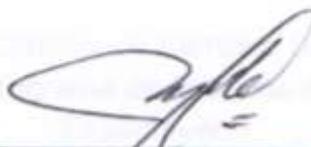
Departamento de Ciencias de la Salud  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I



Secretaria

**Dra. Gabriela Morali de la Brena**  
Investigador Titular "B"

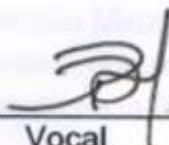
Unidad de Investigación Médica en Farmacología  
Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS



Vocal

**Dra. Marcela Arteaga Silva**  
Profesora Titular "C"

Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I



Vocal

**Dr. Pablo G. Damián Matzumura**  
Profesor Titular "C"

Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I

---

---

## AGRADECIMIENTOS

Con especial agradecimiento a los Doctores:

María del Carmen Navarro Maldonado, Jefa del Departamento de Biología de la Reproducción, División de CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

y

Fernando Larrea Gallo, Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción  
“Dr. Carlos Gual Castro”  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán  
por brindarme su apoyo para la realización de mi trabajo de Tesis.

Un sincero agradecimiento a los miembros del Comité Tutorial:  
Dra. Ana Elena Lemus Bravo, Dra. Mina Königsberg Fainstein,  
Dr. Pablo G. Damián Matzumura y Dr. Alejandro Zentella Dehesa  
por el tiempo que dedicaron a la supervisión del trabajo desarrollado.

Agradezco al Honorable Consejo de Ciencias Biológicas y de la Salud por  
permitirme terminar el Programa de Estudios de Doctorado en Biología  
Experimental.

Gracias a los Doctores:  
Mina Königsberg Fainstein, Gabriela Morali de la Brena, Marcela Arteaga Silva y  
Pablo Damián Matzumura  
por sus acertadas recomendaciones, que enriquecieron el contenido del  
documento de la tesis.

---

---

A la Dra. Ana Elena Lemus por su apoyo, por las enseñanzas, por el tiempo  
brindado, por su paciencia, por su sinceridad y por sus consejos.  
¡GRACIAS POR TODO!

Mi reconocimiento a Rene Santillán Ballesteros por su interés y apoyo para la  
realización de este trabajo.

A la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruíz y al Dr. Francisco J. Alarcón Aguilar,  
por apoyarme para finalizar este ciclo.

A los colegas del Área de Reproducción Animal Asistida por su apoyo.

Al Dr. José Luis Contreras Montiel por sus sabios consejos y apoyo.

A Gabriel Contreras Ferrat por su amistad, confianza y apoyo en todo momento.  
¡Mil Gracias por todo!

A los colegas del laboratorio: Gabriela López, Carlos M. Romero Ramírez.  
Gracias por su apoyo y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias.

---

---

Con amor a mis padres, Lorenza Núñez Zavaleta y José Guillermo González Ramírez, quienes con su cariño, apoyo y consejos me han guiado y procurado lo mejor para mí y por animarme a salir adelante ante cualquier adversidad.  
¡Muchas Gracias!

A toda la familia: Guillermo, Irma, Rodrigo, Daniel, Chavita, Salvador, Eli, Eli Naz, Luis, Héctor, Sergio, Reyna, Nicolás, Julia, Efraín y Susana por mostrarme siempre su cariño incondicional. ¡Los quiero!

A mi amiga de siempre: Angelitos, por escucharme y darme consejos, por apoyarme incondicionalmente. ¡Gracias!

A mis amigos y colegas Juan Manuel Villa, Armando Luna López por sus consejos.

Mi cariño y agradecimiento a Andrea Gómez y a Daniel Maturano por su apoyo incondicional y por sus valiosas enseñanzas que recibo de ellos.

---

---

## Síndrome del Investigador

El sujeto en estudio es un individuo agresivo en el sentido más constructivo del término, es decir muy activo y de personalidad competitiva. Necesariamente es obsesivo compulsivo y adicionalmente masoquista particularmente si consideramos la relación trabajo/ingreso. Al principio presenta rasgos de crisis agudas pero con el tiempo aprende a tolerarlos y se convierte en su nuevo y particular estilo de vida. Otro rasgo distintivo es el desinterés que muestra por la fortuna material y los objetos suntuarios que poseen amigos no investigadores. A pesar de ello, nuestro investigador tiene el talento para captar fondos y recursos que apoyen sus tareas de investigación. Esta habilidad la adquirió muy tempranamente en los institutos, ya que desde el inicio de sus actividades aprendió, instruido por sus mayores, que la investigación requiere de un alto presupuesto y que su creatividad debe estar asociada a un buen nivel de producción y a una adecuada mercadotecnia.

**Dr. Gregorio Pérez Palacios**

---



---

**ÍNDICE**

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	4
<b>1. Introducción</b> .....	6
<b>2. Antecedentes</b> .....	11
<b>3. Justificación</b> .....	16
<b>4. Objetivos</b> .....	17
4.1. Objetivo General.....	17
4.2. Objetivos Particulares.....	17
<b>5. Hipótesis</b> .....	18
<b>6. Materiales y Métodos</b> .....	19
6.1. Material biológico.....	19
6.2. Medio de cultivo.....	19
6.3. Cultivo celular.....	20
6.4. Material Radiactivo.....	21
6.5. Esteroides radioinertes.....	21
6.6. Antagonistas de hormonas esteroides.....	23
6.7. Reactivos y disolventes.....	23
6.8. Metabolismo <i>in vitro</i> de GSD-[ <sup>14</sup> C] en células MCF-7.....	24
6.8.1. Incubaciones.....	24
6.8.2. Extracción de los metabolitos formados durante las incubaciones.....	25
6.8.3. Dilución isotópica inversa.....	26
6.8.4. Separación, purificación e identificación de los metabolitos formados en las incubaciones con GSD-[ <sup>14</sup> C].....	26
6.9. Efecto de GSD y de sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos sobre la proliferación de las células MCF-7.....	28
6.9.1. Determinación de la proliferación celular. Cuantificación de DNA.....	29

6.9.2. Efecto de antagonistas de hormonas esteroides sobre la proliferación de las células MCF-7 inducida por GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos.....	30
6.9.2.1. Efecto de ICI 182,780 (ICI), sobre la proliferación celular inducido por GSD, 5 $\alpha$ -GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD.....	30
6.9.2.2. Efecto de RU 486 (RU) y Flutamida (FLU) sobre la proliferación celular inducida por 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD.....	31
<b>7. Análisis estadístico.....</b>	<b>32</b>
<b>8. Resultados.....</b>	<b>33</b>
8.1. Formación <i>in vitro</i> de metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de Gestodeno-[ <sup>14</sup> C] en células MCF-7.....	33
8.2. Determinación de la identidad de los metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de Gestodeno-[ <sup>14</sup> C] formados en las incubaciones con células MCF-7....	35
8.3. Formación, en función de tiempo, de los metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de Gestodeno-[ <sup>14</sup> C] en las células MCF-7.....	37
8.4. Efecto de GSD y su derivado 5 $\alpha$ -GSD sobre la proliferación de las células MCF-7.....	39
8.5. Efecto de los derivados 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD sobre la proliferación de las células MCF-7.....	40
8.6. Efecto de los antagonistas de esteroides ICI 182,780, RU 486 y Flutamida, sobre la proliferación de las células MCF-7 inducida por GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos.....	43
8.6.1. Efecto del antiestrógeno ICI 182,780.....	43
8.6.2. Efecto de la antiprogestina RU 486 y del antiandrógeno Flutamida...	44
<b>9. Discusión.....</b>	<b>46</b>
<b>10. Conclusiones.....</b>	<b>55</b>
<b>11. Bibliografía.....</b>	<b>56</b>

## Resumen

El gestodeno (GSD) es una progestina sintética derivada de la 19-nortestosterona, que en diversas formulaciones farmacéuticas, ha sido utilizado por millones de mujeres como agente regulador de la fertilidad. A partir de los estudios epidemiológicos realizados por la Organización Mundial de la Salud, en los que se sugiere que existe una relación entre el uso de formulaciones anticonceptivas que contienen estrógenos y progestágenos con el incremento en el riesgo de cáncer de mama, aparecieron en la literatura un importante número de reportes contradictorios, ya que mientras algunos autores consideran que es el estrógeno el responsable del incremento de ese riesgo, otros se lo atribuyen a las progestinas. Aun cuando los efectos de los estrógenos sobre el inicio y la progresión del cáncer de mama han sido bien estudiados, se desconoce el riesgo al que pueden estar expuestas las mujeres bajo tratamiento anticonceptivo o de reemplazo hormonal con progestinas sintéticas. Existe una serie de estudios que han demostrado que las progestinas sintéticas, incluido el GSD, fueron capaces de inducir *in vitro* la proliferación de las células MCF-7 de cáncer de mama. Este efecto de tipo estrogénico, sobre la proliferación celular, es difícil de explicar debido a que el GSD y otras progestinas como la Noretisterona y el Levonorgestrel no interactúan con los receptores intracelulares de estrógenos; además de que por impedimentos estéricos en su molécula, no es posible su aromatización. Los estudios previos del grupo de investigación con el cual se realizó el presente trabajo, han demostrado que en diferentes órganos blanco a la acción de hormonas esteroides como hipotálamo, hipófisis y próstata ventral de

roedores, las progestinas sintéticas 19-nor se biotransforman en metabolitos no-fenólicos  $5\alpha$ -dihidro y  $3\alpha,5\alpha$ - y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidros. Un hallazgo importante fue que los tetrahidros de las progestinas estudiadas interactúan, aunque con baja afinidad, con los receptores intracelulares de estrógenos y que además, son capaces de inducir efectos de tipo estrogénico en diferentes modelos experimentales. El objetivo del presente trabajo fue investigar tanto la capacidad enzimática de las células de cáncer de mama MCF-7 para biotransformar GSD en sus metabolitos reducidos en el anillo A, como explorar el efecto de GSD y sus derivados  $5\alpha$ -reducidos sobre la proliferación de las células MCF-7 mantenidas en cultivo. Para estudiar el metabolismo del GSD, se empleó la técnica de dilución isotópica inversa, utilizando como sustrato al GSD- $[^{14}\text{C}]$ . Esta técnica incluye cromatografía en placa fina en sistemas de disolventes de diferente polaridad y la recristalización de los metabolitos isotópicamente marcados, hasta la obtención de actividad específica constante. Los resultados de estos estudios demostraron que las células MCF-7 biotransformaron eficientemente al GSD- $[^{14}\text{C}]$  en los metabolitos no-fenólicos  $5\alpha$ -dihidroGSD y los tetrahidros  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y  $3\beta,5\alpha$ -GSD. El efecto del GSD y de sus derivados dihidro y tetrahidros sobre la proliferación de las células MCF-7 se evaluó mediante la determinación del contenido del DNA. Los resultados obtenidos demostraron que los derivados tetrahidro reducidos, producto de la conversión metabólica del GSD incrementaron la proliferación de las células MCF-7, de manera similar, aunque con menor eficiencia a como lo hizo el estradiol, empleado como control positivo, mientras que la molécula original de GSD así como el derivado  $5\alpha$ -reducido, indujeron la proliferación celular sólo a las más altas concentraciones (100 nM y

1000 nM) y en los tiempos más prolongados de tratamiento (48 y 72 h). En experimentos adicionales dirigidos a comprender el mecanismo por el cual GSD y sus metabolitos inducen la proliferación de las células MCF-7, estos se incubaron en presencia o ausencia de los siguientes antagonistas de hormonas esteroides: ICI 182,780 (antiestrógenos), Flutamida (antiandrógenos) y RU 486 (antiprogesterona). Los resultados mostraron que el antiestrógeno inhibió eficientemente la proliferación de las células MCF-7 inducida por los dos tetrahidros de GSD mientras que, ni la antiprogestina ni el antiandrógeno inhibieron la proliferación celular inducida por estas moléculas. Los resultados en su conjunto, mostraron que las células MCF-7 tienen la capacidad enzimática para biotransformar GSD en sus tetrahidros, siendo el  $3\beta,5\alpha$ , y el  $3\alpha,5\alpha$  los responsables de la proliferación de las células MCF-7 de cáncer de mama y no GSD. Asimismo, sugieren fuertemente que el efecto de los tetrahidros sobre la proliferación de las células MCF-7 es mediado a través del receptor de estrógenos.

## Abstract

Gestodene, a synthetic 19-norprogesterin has been used as contraceptive agent for millions of women. Epidemiological studies have raised concern over the relationship between contraceptive therapy with 19-norprogestins and a risk to develop breast cancer. Results from several studies have demonstrated that gestodene stimulates proliferation of estrogen-dependent MCF-7 breast cancer cells, effect that was inhibited by the presence of an antiestrogen, but not by an antiprogestin. A question arises because gestodene does not interact with estrogen receptors nor is able to be aromatized. Previous reports from our laboratory have shown that radiolabelled 19-norprogestins norethisterone and levonorgestrel, incubated with steroid target organs, undergo extensive enzymatic reductions on A-ring of their molecule, to form dihydro and tetrahydro metabolites which bind to estrogen receptor and were able to induce estrogen-like effects, in experimental models. The aim of the present study was to investigate the capacity of MCF-7 cells to metabolize [<sup>14</sup>C]-Gestodene, using an isotope dilution technique, as well as to determine the effect of gestodene and its reduced derivatives, to induce MCF-7 cell proliferation, in the presence or absence of steroid antagonists. Cell proliferation was determined by fluorometric quantitation of cell DNA content. Our results demonstrated that MCF-7 cells were able to biotransform gestodene into 5 $\alpha$ -dihydro, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro metabolites, which efficiently induced MCF-7 cell proliferation that was inhibited by an antiestrogen ICI 182,780, but neither by an antiprogestin RU 486 nor antiandrogen Flutamide.

Our findings can contribute to understand the mode of action of gestodene in order to induce estrogen-like effects, such as MCF-7 cell proliferation.

## 1. Introducción

El cáncer es uno de los principales padecimientos que causan un gran número de defunciones a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha pronosticado que aumentarían las muertes por cáncer de 8.2 millones al año a 13 millones por año (OMS, 2014)

De acuerdo a estimaciones de la OMS, en 2012, en la población femenina, el carcinoma mamario representó el 4.65 % del total de las neoplasias malignas, con 536,429 defunciones, seguido por el cáncer cérvico-uterino con 264,149 defunciones. Aun cuando el cáncer de mama está considerado como un padecimiento propio de poblaciones desarrolladas, la mayoría de las defunciones se registran en países en vías de desarrollo debido a la falta de atención médica para la detección oportuna del padecimiento (OMS, 2015).

El incremento en el desarrollo del carcinoma de mama se ha atribuido a múltiples factores de riesgo, algunos de los cuales se indican en el cuadro 1 (Campagnoli *et al.*, 2005; Lacey *et al.*, 2009; Brown y Hankinson, 2015; Kamińska *et al.*, 2015).

---

---

## Cuadro 1. Factores que pueden contribuir a incrementar el riesgo a padecer cáncer de mama

- Menarca temprana (antes de los 12 años de edad)
- Menopausia tardía (posterior a los 50 años)
- Nuliparidad
- Primer embarazo tardío (posterior a los 30 años)
- Obesidad pre y posmenopáusica
- Terapia prolongada a base de estrógenos
  - Terapia anticonceptiva para las mujeres en etapa reproductiva
  - Terapia de reemplazo hormonal para las mujeres en posmenopausia
- Antecedentes familiares directos (abuela, madre y hermanas)
- Presencia de genes de susceptibilidad al cáncer de mama, como el BRCA-1 y BRCA-2

### 1.1. Cáncer de Mama en México

En México, los tumores malignos son una de las mayores causas de mortalidad, tan solo superada por los padecimientos cardíacos y la diabetes mellitus. El cáncer de mama es, en la mujer mexicana, la principal causa de muerte por neoplasias malignas y se presenta con mayor frecuencia a partir de los 40 años de edad (INEGI, 2015). En el año 2004, el cáncer cérvico-uterino, en mujeres de 25 años y más, fue la principal causa de muerte por padecimientos malignos, pero a partir de 2005 y hasta la fecha, el cáncer mamario ocupa el primer sitio (INEGI, 2015); así, en 2014 se registraron 38,000 defunciones causadas por tumores malignos, de las cuales 6,004 fueron debidas al cáncer de mama (INEGI, 2015).

La terapia anticonceptiva combinada de estrógenos y progestinas es utilizada en México por un gran número de mujeres en edad reproductiva, como un método reversible de control de la fertilidad, por lo que su uso prolongado, que puede ser hasta de más de 10 años, ha sido considerado como un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama (Fournier *et al.*, 2005; Amadou *et al.*, 2013; Kamińska *et al.*, 2015; Navarro-Ibarra *et al.*, 2015).

Por otra parte, la esperanza de vida al nacimiento de la mujer, es actualmente de 75 años, sin embargo, el rango de edad en el cual suele presentarse la menopausia (45 a 50 años), no ha cambiado, por lo que una gran parte de su vida transcurrirá dentro de esta etapa. Durante la posmenopausia, la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos es requerida para prevenir o aminorar problemas importantes de salud, como la osteoporosis. Como se indica en el Cuadro 1, la exposición a estrógenos y progestinas, por periodos de tiempo prolongados es otro de los factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de mama (Fournier *et al.*, 2005; Amadou *et al.*, 2013; Kamińska *et al.*, 2015; Navarro-Ibarra *et al.*, 2015).

## **1.2. Progestinas sintéticas**

En la actualidad, las progestinas sintéticas más empleadas en terapia de reemplazo hormonal y como agentes anticonceptivos son aquellas derivadas de la 19-nortestosterona, llamada así por carecer del grupo metilo del carbono 13 de la molécula esteroide. En virtud de que la principal vía de administración de estas

progestinas es la oral, fue necesario introducir en el carbón 17 de la molécula, un grupo etinilo para evitar su degradación en el ambiente ácido del estómago (Düstenberg *et al.*, 1987; Stanczyk y Archer, 2014).

En 1954, en los Laboratorios Farmacéuticos Syntex de México, el grupo de químicos mexicanos encabezado por el Dr. George Rosenkranz sintetizó la Noretisterona (NET) que fue la primera progestina de la serie 19-nor que se utilizó en terapia anticonceptiva (Djerassi *et al.*, 1954). La síntesis de esta progestina constituyó un gran aporte al mundo, ya que su estructura fue la base para el desarrollo de un gran número de progestinas, y su importancia ha sido reconocida al incluir los nombres de Carl Djerassi, Luis E. Miramontes y George Rosenkranz en el Salón de la Fama de Inventores en los Estados Unidos de Norteamérica, compartiendo honores con inventores notables tales como Marconi, Pasteur, Bell, Edison y los hermanos Wright, entre otros.

En 1963 se desarrollaron nuevas y más potentes moléculas con actividad progestacional, que vinieron a constituir la segunda generación de progestinas sintéticas de la serie 19-nor, como el Levonorgestrel (LNG) (Smith *et al.*, 1963).

En la búsqueda de progestinas con mayor potencia biológica, a partir de 1987 se sintetizó la tercera generación de progestinas sintéticas a la cual pertenece el Gestodeno (GSD) (Stickland *et al.*, 1987; Fotherby y Caldwell, 1994; Wilde y Balfour, 1995), el cual se ha utilizado ampliamente en anticoncepción hormonal

debido a su alta efectividad, seguridad y aceptabilidad (Junge *et al.*, 2013; Stanczyk *et al.*, 2013; Hofmann *et al.*, 2014; Stanczyk y Archer, 2014).

## 2. Antecedentes

El Gestodeno (GSD;  $17\alpha$ -etinil- $13\beta$ -etil- $17\beta$ -hidroxi-4,15-gonadien-3-ona) (Fig. 1) es una potente progestina sintética derivada de la 19-nortestosterona que se utiliza en mujeres en edad reproductiva como terapia oral anticonceptiva para la regulación de la fertilidad, así como en la posmenopausia en terapia de reemplazo hormonal (Junge *et al.*, 2013, Stanckzyk *et al.*, 2013; Hofmann *et al.*, 2014).

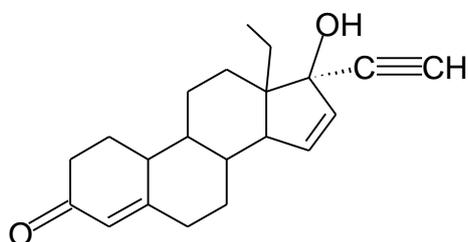


Figura 1. Estructura química de Gestodeno

Las diversas formulaciones anticonceptivas que contienen GSD (dosis de 60 a 75  $\mu$ g) combinado con un estrógeno, principalmente etinil estradiol (dosis de 15 a 30  $\mu$ g), se ofrecen bajo diferentes nombres comerciales tales como Gynovin<sup>®</sup>, Harmonet<sup>®</sup> y Melodene<sup>®</sup>, entre otros.

En los anticonceptivos hormonales combinados, tanto el estrógeno como la progestina, bloquean, a nivel hipotalámico, la síntesis y liberación de la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnRH) (Jung-Hoffman *et al.*, 1988; Wilde y Balfour, 1995; Kuhl, 1996) y a nivel hipofisario, la síntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimulante del folículo (FSH) (Sonalkar *et al.*, 2014; Evans y Sutton, 2015), lo cual impide el desarrollo y

maduración del folículo ovárico y consecuentemente la ovulación (Stickland *et al.*, 1987; Jung-Hoffman *et al.*, 1988; Wilde y Balfour, 1995; Kuhl, 1996; Stanczyk y Archer, 2014). En cambio, en la terapia de reemplazo hormonal, utilizada particularmente en la etapa de la posmenopausia, las formulaciones anticonceptivas combinadas que contienen estrógenos y progestinas sintéticas como el GSD, se utilizan para eliminar o aminorar, los signos y síntomas ocasionados por la deficiencia de estrógenos y progesterona (Stanczyk *et al.*, 2013; Bassuk y Manson, 2015).

La presencia del doble enlace en el anillo D del GSD le confiere a esta molécula características especiales en su interacción con los receptores de hormonas esteroides, así como en sus efectos endocrinológicos y farmacológicos (Fotherby y Caldwell, 1994). Así, los informes en la literatura derivados de numerosas observaciones, muestran que el uso de anticonceptivos hormonales orales combinados que contienen GSD se ha asociado a patologías cardiovasculares importantes, entre las que se menciona un incremento en la producción de los factores de coagulación VII, VIII, X y XII, lo cual podría atribuirse al estrógeno, sin embargo, una serie de estudios epidemiológicos ha señalado que los anticonceptivos hormonales que contienen GSD y etinil estradiol, a diferencia de los que contienen LNG y etinil estradiol, inducen un incremento de 1.5 a 2 veces del riesgo de tromboembolismo venoso profundo e infarto pulmonar (Poulter *et al.*, 1995; Farley *et al.*, 1998; Vinogradova *et al.*, 2015; van Vlijmen *et al.*, 2015), por lo cual, algunas agencias nacionales e internacionales de regulación de medicamentos han emitido recomendaciones de precaución en el uso del GSD.

Recientemente, varios grupos de investigadores publicaron datos que sugieren una relación entre el uso de las progestinas sintéticas 19-nor, como tratamiento de reemplazo hormonal en mujeres posmenopáusicas, con un mayor riesgo de cáncer de mama (Farhat *et al.*, 2013; Munsell *et al.*, 2014; Bassuk y Manson, 2015). Estos hallazgos indican que las progestinas 19-nor como el GSD inducen, además de su efecto progestacional, efectos de tipo estrogénico, lo cual ha originado una gran controversia debido a que las moléculas de estas progestinas no interactúan con el receptor intracelular de estrógenos (Düsterberg *et al.*, 1987; Pollow *et al.*, 1990; Africander *et al.*, 2011) y por la ausencia del metilo angular del carbono 10, no pueden aromatizarse (Gual *et al.*, 1962; Jeng *et al.*, 1992; Attardi *et al.*, 2008).

En los últimos años, el grupo de investigación con el cual se desarrolló este trabajo de tesis, ha realizado estudios orientados a dilucidar los mecanismos por los cuales las progestinas sintéticas de la serie 19-nor, como NET, LNG y GSD ejercen múltiples efectos de tipo hormonal. Los resultados obtenidos demostraron que estas progestinas, en órganos blanco a la acción de hormonas esteroides, se biotransforman a compuestos reducidos en el anillo A de la molécula, 5 $\alpha$ -dihidro 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro (Lemus *et al.*, 2000; Larrea *et al.*, 2001; Lemus *et al.*, 2001; García-Becerra *et al.*, 2002; García-Becerra *et al.*, 2006) los cuales al interactuar en forma específica, con diferentes receptores intracelulares para hormonas esteroides, expresan efectos hormonales agonistas o antagonistas. Estos hallazgos permitieron esclarecer que los efectos de tipo estrogénico

observados después de la administración de las progestinas sintéticas 19-nor, son inducidos por los metabolitos  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro y  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro, aunque este último con menor potencia, los cuales se unen al receptor intracelular de estrógenos y son capaces de inducir, en diferentes modelos biológicos experimentales, efectos típicamente estrogénicos (Pérez-Palacios *et al.*, 1981; Vilchis *et al.*, 1986; Larrea *et al.*, 1987; Morali *et al.*, 1990; Pérez-Palacios *et al.*, 1992; Oropeza *et al.*, 1994, Lemus *et al.*, 2000; Santillán *et al.*, 2001; Morali *et al.*, 2002; Enríquez *et al.*, 2007; Lemus *et al.*, 2009). Esta serie de estudios ha puesto de manifiesto la importancia del metabolismo periférico de las progestinas sintéticas 19-nor, en la modulación de la expresión de sus efectos biológicos.

Una serie de estudios experimentales informados en la literatura, demostró que la adición de dosis elevadas de GSD a cultivos de células MCF-7 de cáncer de mama dependiente de estrógenos, fue capaz de inducir la proliferación de estas células, y el hecho de que tanto el crecimiento como la proliferación de las células MCF-7, inducidos por GSD, pudieron ser bloqueados con un antiestrógeno como el ICI 164,384, pero no por una antiprogestina como el RU 486, sugiere fuertemente una acción de tipo estrogénico ejercida por el GSD (van der Burg *et al.*, 1992; Catherino *et al.*, 1993; Schoonen *et al.*, 1995; Seeger *et al.*, 2003). Sin embargo, no se tiene información de la capacidad de las células MCF-7 para metabolizar *in situ* al GSD para formar los compuestos dihidro y tetrahidro reducidos, ni del papel que estos metabolitos podrían jugar en la expresión de los efectos estrogénicos inducidos por GSD.

### 3. Justificación

La información existente en la literatura de observaciones derivadas de un número importante de estudios epidemiológicos, muestra que el uso de formulaciones que contienen progestinas sintéticas 19-nor asociadas a estrógenos, utilizadas en terapia anticonceptiva y de reemplazo hormonal, incrementan el desarrollo de patologías cardiovasculares como tromboembolismo venoso profundo e inclusive infarto pulmonar, así como también podrían incrementar el riesgo a cáncer de mama. Sin embargo, el uso de GSD como componente de esas formulaciones y su relación con el cáncer de mama ha sido muy poco estudiado. Por otra parte, varios grupos de investigadores han reportado que el GSD fue capaz de inducir eficientemente la proliferación de células MCF-7 de cáncer de mama dependiente de estrógenos, mantenidas en cultivo. Estas observaciones que sugieren efectos de tipo estrogénico inducidas por el GSD, han causado gran controversia en virtud de que la molécula de GSD no se une a los receptores de estrógenos ni es posible su aromatización, por lo que se ha sugerido, pero no se ha demostrado, que podrían ser los productos de su metabolismo los causantes de los efectos estrogénicos inducidos por el GSD después de su administración.

El incremento en los últimos 50 años, de la esperanza de vida al nacimiento de la mujer y el uso, por periodos de tiempo cada vez más prolongados, de tratamientos de reemplazo hormonal con progestinas sintéticas como el GSD, ha

alertado a las instituciones de salud por los riesgos que puede implicar el uso de esta progestina, por lo que un mejor conocimiento del origen de los efectos de tipo estrogenico del GSD, contribuirá a tomar las precauciones debidas para su uso.

Al ser el cáncer de mama la principal causa de muerte por padecimientos malignos en la mujer, los estudios que aporten mayor conocimiento sobre el mecanismo por el cual el GSD podría ejercer efectos dañinos a la salud de las usuarias, estarán plenamente justificados.

## 4. Objetivos

### 4.1. Objetivo General

Determinar la capacidad de las células MCF-7 para biotransformar enzimáticamente GSD marcado isotópicamente con [ $^{14}\text{C}$ ], así como evaluar el efecto de gestodeno y sus derivados  $5\alpha$ -dihidroGSD,  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroGSD y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahydroGSD sobre la proliferación *in vitro* de las células MCF-7.

### 4.2. Objetivos Particulares

4.2.1. Estudiar el metabolismo de GSD isotópicamente marcado con [ $^{14}\text{C}$ ] en las células MCF-7.

4.2.2. Investigar el efecto de GSD y de los productos de su conversión metabólica  $5\alpha$ -dihidroGSD,  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroGSD y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahydroGSD, sobre la inducción *in vitro* de la proliferación de las células MCF-7.

4.2.3. Determinar la interacción de GSD y de sus derivados  $5\alpha$ -dihidroGSD,  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroGSD y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahydroGSD con los receptores intracelulares de esteroides.

## 5. Hipótesis

Las células MCF-7 de carcinoma mamario humano dependiente de estrógenos, tienen la capacidad de biotransformar enzimáticamente GSD a los metabolitos no fenólicos,  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroGSD y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahydroGSD, los cuales, a través de su interacción con el receptor intracelular de estrógenos, son capaces de inducir *in vitro* la proliferación de las células MCF-7.

## 6. Material y Métodos

### 6.1. Material Biológico

La línea celular MCF-7 de carcinoma mamario humano dependiente de estrógenos, fue donada amablemente por el Dr. Alejandro Zentella Dehesa, Jefe de la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Las células se mantuvieron, hasta su utilización, en un criotubo con suero de feto de bovino (SFB) al 95 % (Invitrogen, Londres, Reino Unido) y dimetilsulfóxido (5 %) en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-195^{\circ}$  C. El SFB se inactivó previamente por calentamiento a  $55^{\circ}$  C durante 30 min para desnaturalizar las proteínas del complemento que pudieran ocasionar lisis celular.

### 6.2. Medio de Cultivo

Para el cultivo de las células MCF-7 se utilizó el Medio Eagle (Life Technologies, Nueva York, EUA) modificado por Dulbecco (DMEM), con alto contenido de glucosa (4.5 g/l), libre de rojo de fenol y con 10 % de SFB inactivado. Al medio se le adicionaron: 1 % de aminoácidos no esenciales Gibco 100 X (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, EUA), piruvato sódico 1 mM, 3.7 g de bicarbonato de sodio/l y una solución de antibióticos-antimicótico (Gibco) constituida por penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 mg/ml) y anfotericina-B (250 ng/ml). En virtud de que las células MCF-7 son dependientes de estrógenos, para facilitar el mantenimiento y crecimiento celular, al cultivo se le agregó  $E_2$  a una

concentración de 100 pM. Se verificó el pH a 7.4 y el medio se esterilizó a través de un filtro de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Corning, Nueva York, EUA).

### 6.3. Cultivo celular

Las células MCF-7, que habían permanecido en nitrógeno líquido, se sometieron a descongelación rápida en baño de agua a 37° C, se transfirieron a un tubo estéril que contenía 9 ml del medio de cultivo DMEM y se centrifugaron a 800 X g a 4° C, decantando cuidadosamente el sobrenadante para evitar la remoción del botón celular, el cual se resuspendió en 10 ml del mismo DMEM. La suspensión celular se transfirió a una botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> de superficie (T75) y se observó al Microscopio óptico invertido ZEISS Modelo ID03 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) para verificar la viabilidad celular. Las botellas de cultivo se mantuvieron a 37° C en un incubador Steri-Cult, Modelo 3310 (Termo Electron Co. Mariete, Ohio, EUA) en atmósfera húmeda de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire, hasta la confluencia celular, la cual se alcanzó aproximadamente en cinco días. El conteo de las células se realizó mediante una Cámara de Neubauer.

Las células así cultivadas se utilizaron tanto para los estudios del metabolismo *in vitro* de GSD-[<sup>14</sup>C] como para los estudios del efecto de GSD y de sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos sobre la proliferación celular.

#### 6.4. Material Radiactivo

El gestodeno (GSD; 13 $\beta$ -etil-17 $\alpha$ -etinil-17 $\beta$ -hidroxi-4,15-gonadien-3-ona), marcado isotópicamente con [ $^{14}\text{C}$ ] en el grupo etinilo (GSD- $^{14}\text{C}$ ), con actividad específica (a.e.) de 43.75 mCi/mmola, fue donado gentilmente por Schering AG de Berlín, Alemania. La testosterona-4- $^{14}\text{C}$  (T- $^{14}\text{C}$ ), con a.e. de 57 mCi/mmola se adquirió en American Radiolabeled Chemicals, Inc. (San Luis, Missouri, EUA). La pureza radioquímica de los esteroides marcados isotópicamente, se comprobó por cromatografía en capa fina en dos sistemas de diferente polaridad: cloroformo:acetona (9:1) y benceno:acetato de etilo (2:1) (Lemus *et al.*, 2001; Pérez-Palacios *et al.*, 2006; Lemus *et al.*, 2009).

#### 6.5. Esteroides Radioinertes

El GSD se obtuvo por la amable donación de Schering Mexicana, S. A. de C. V. (México, D.F., México). Los esteroides testosterona (T), 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DHT), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -androstadiol (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -diol), 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -androstadiol (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol)  $\Delta^4$ -androstendiona ( $\Delta^4\text{A}$ ) y estradiol (E<sub>2</sub>), se adquirieron en Sigma-Aldrich Co. (San Luis, Missouri, EUA) y su pureza química se estableció por cristalizaciones sucesivas empleando solventes de diferente polaridad y por la determinación de los puntos de fusión de los cristales obtenidos. Los derivados 5 $\alpha$ -reducidos del GSD no están disponibles en forma comercial por lo que fue necesario sintetizarlos en el laboratorio. El 5 $\alpha$ -dihidrogestodeno (5 $\alpha$ -GSD) se sintetizó por reducción de la molécula de GSD con un reactivo de litio en amonio (Lemus *et al.*,

2000). El  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro de GSD ( $3\alpha,5\alpha$ -GSD) se preparó mediante la reducción de  $5\alpha$ -GSD con L-Selectride, en condiciones anhidras, mientras que el  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidrogestodeno ( $3\beta,5\alpha$ -GSD) se obtuvo al reducir  $5\alpha$ -GSD con borohidruro de sodio (Lemus *et al.*, 2000). La naturaleza química así como la pureza de los derivados de GSD se confirmó por su comportamiento en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), espectro de absorción de infrarrojo, por resonancia magnética nuclear- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y por la verificación de sus puntos de fusión. Las constantes físicas y espectroscópicas de los derivados reducidos de GSD sintetizados son:

#### $5\alpha$ -dihidro GSD

- Punto de fusión (PF): 168-170° C
- Espectro de Infrarrojo en KBr (IR): 3362, 3258, 3047, 2948, 2924, 2857, 2086, 1697  $\text{cm}^{-1}$
- Resonancia Magnética Nuclear (RMN)- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.92 (dd,  $J = 5.7$  y 1.5 Hz, 1H), 5.67 (dd,  $J=5.7$  y 3.6 Hz, 1H), 2.60 (s, 1H), 0.867 (t,  $J=7.5$  Hz, 3H)
- RMN- $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.11, 20.36, 25.60, 29.51, 30.30, 30.37, 33.70, 38.74, 41.21, 43.67, 45.59, 47.91, 48.53, 55.80, 56.50, 74.89, 83.06, 83.82, 132.01, 135.56, 211.51
- Espectrometría de Masas de Bombardeo Atómico Rápido (EMBAR): 313

#### $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro GSD

- PF: 178-181° C
- IR (KBr): 3567, 3392, 3252, 3051, 2929, 2089  $\text{cm}^{-1}$

- RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.93 (dd, *J* = 5.7 y 1.52 Hz, 1H), 5.65 (dd, *J*=5.7 y 3.6 Hz, 1H), 4.09 (m, 1H), 2.60 (s, 1H) 0.85 (t, *J*=7.5 Hz, 3H)
- RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 11.10, 20.38, 23.56, 25.18, 29.60, 30.74, 32.90, 33.45, 36.15, 39.05, 40.54, 46.96, 48.33, 55.87, 56.81, 66.33, 74.68, 83.31, 83.33, 132.30, 135.33.
- EMBAR: 315

### 3β,5α-tetrahidro GSD

- PF: 139-141° C
- IR (KBr): 3373, 3281, 2919, 2859 cm<sup>-1</sup>
- RMN -<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.84 (dd, *J* = 5.5 y 1.2 Hz, 1H), 5.57 (dd, *J*=5.5 y 3.6 Hz, 1H), 3.47 (m, 1H), 2.53 (s, 1H), 0.768 (t, *J*=7.2 Hz, 3H).
- RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 10.83, 20.21, 25.37, 28.12, 29.42, 30.60, 33.22, 35.27, 38.86, 41.17, 42.86, 45.95, 48.11, 55.68, 56.60, 70.05, 74.18, 83.32, 131.99, 135.25.
- EMBAR: 315

## 6.6. Antagonistas de hormonas esteroides

El antiestrógeno ICI 182,780 (ICI) se adquirió en Zeneca Pharma de Mexico, S.A. de C.V. (México, D.F., México). La antiprogestina RU 486 (RU) y el antiandrógeno Flutamida (FLU) se obtuvieron en Sigma Aldrich Co.

## 6.7. Reactivos y disolventes

Todos los reactivos y disolventes utilizados en el estudio fueron de grado analítico.

## 6.8. Metabolismo *in vitro* de GSD-[<sup>14</sup>C] en células MCF-7

### 6.8.1. Incubaciones

Para estudiar la capacidad de las células MCF-7 para bioconvertir *in situ* GSD a sus derivados reducidos en el anillo A, se sembraron 2, 000, 000 de células MCF-7 en cajas de Petri de 10 cm de diámetro con 5 ml de DMEM desprovisto de E<sub>2</sub> y suplementado solo con 5 % de SFB, el cual había sido tratado previamente con una suspensión de carbón activado y Dextran T-70<sup>®</sup> en proporción de 10:1 para eliminar los esteroides endógenos. Las células se incubaron a 37° C en atmósfera húmeda de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire hasta que estuvieron adheridas a la superficie de las cajas. Una vez comprobada la adhesión celular, se retiró el medio de incubación reemplazándolo con 5 ml del DMEM sin E<sub>2</sub> con 5 % de SFB libre de esteroides y 0.1 % de etanol que contenía 100,000 dpm en una concentración 2 μM de GSD-[<sup>14</sup>C] y se incubaron a 37° C durante 15, 30, 45, 60 y 120 min. La concentración del sustrato GSD, para obtener la máxima formación de metabolitos 5α-reducidos, se eligió con base en la K<sub>M</sub> de la enzima 5α-esteroide reductasa (1-5 μM) y en la experiencia del grupo de investigación en la realización de múltiples estudios de metabolismo *in vitro* de progestinas sintéticas, incluido el GSD, en tejidos blanco a hormonas esteroides (Larrea *et al.*, 1987; Lemus *et al.*, 1992; Lemus *et al.*, 2001; Lemus *et al.*, 2009).

Como controles se realizaron incubaciones simultáneas de células, en condiciones experimentales idénticas, con T-[<sup>14</sup>C] a una concentración de 2 μM y 100,000 dpm, así como incubaciones con GSD-[<sup>14</sup>C] o T-[<sup>14</sup>C] sin células o con

células inactivadas en un baño de agua a 60° C durante 30 min y con agitación constante. El volumen final de todas las incubaciones fue de 5 ml.

Al término de los diferentes periodos de incubación, las cajas de Petri se colocaron sobre hielo (4° C), las células se desprendieron con la ayuda de un “gendarme” y se transfirieron junto con el medio de cultivo a tubos cónicos de centrífuga de 50 ml. Las cajas se lavaron varias veces con agua para asegurar la total transferencia al tubo y se realizó la extracción de los metabolitos formados.

El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976), en incubaciones paralelas de 2 millones de células MCF-7, en ausencia de sustrato radiactivo. Para la construcción de la curva patrón se utilizó albúmina de suero de bovino (BSA).

#### **6.8.2. Extracción de los metabolitos formados durante las incubaciones**

A los tubos que contenían las células en el medio acuoso, se les agregaron 3 volúmenes de acetato de etilo saturado con agua (30 ml) y se agitaron vigorosamente en un agitador de la marca Vortex durante 1 min para romper la estructura celular y liberar los metabolitos isotópicamente marcados, los cuales se extrajeron del medio acuoso con el acetato de etilo. La perfecta separación de las fases acuosa y orgánica se consiguió después de centrifugar los tubos a 800 X g a 4° C durante 10 min.

Esta operación se repitió por tres veces para lograr la máxima extracción del material radiactivo. El acetato de etilo o fase orgánica, que contenía los esteroides extraídos se colectó en un matraz de fondo redondo y se evaporó a sequedad en un rotavapor Büchi con vacío (Laboratory-techniques, Flaawil, Suiza). Los extractos orgánicos se disolvieron en metanol y se tomaron alícuotas representativas de cada uno para cuantificar el contenido de  $^{14}\text{C}$  en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tricarb<sup>®</sup> Modelo 1900TR (Packard Downers Grove, Illinois, EUA). La eficiencia del espectrómetro para detectar y cuantificar  $^{14}\text{C}$  fue de 80 % y en todas las muestras se corrigió el “quenching” por el método de estandarización externa.

### **6.8.3. Dilución Isotópica inversa**

Los extractos orgánicos de las incubaciones se transfirieron cuantitativamente a tubos cónicos de 10 ml y se les agregaron como “carriers”, 2.5  $\mu\text{g}$  de cada uno de los siguientes esteroides radioinertes: 1) GSD, 5 $\alpha$ -GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD a los extractos de las incubaciones en las que se utilizó GSD- $^{14}\text{C}$  como sustrato y 2) T, 5 $\alpha$ -DHT, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -diol, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol y  $\Delta^4\text{A}$  a las incubaciones con T- $^{14}\text{C}$ .

### **6.8.4. Separación, purificación e identificación de los metabolitos formados en las incubaciones con GSD- $^{14}\text{C}$**

El método de dilución isotópica inversa se utilizó para separar, identificar y determinar la pureza radioquímica de los metabolitos formados a partir del sustrato marcado isotópicamente e incluyó: cromatografía en placa fina en los

sistemas: cloroformo:acetona 9:1 y benceno:acetato de etilo 2:1 y la recristalización repetida de los metabolitos aislados, hasta que la actividad específica permaneció constante en por lo menos dos cristalizaciones sucesivas y fue idéntica a la de las aguas madres (Lemus *et al.*, 2001; Pérez-Palacios *et al.*, 2006; Lemus *et al.*, 2009).

Los metabolitos marcados con [ $^{14}\text{C}$ ] se localizaron en las placas cromatográficas mediante un detector Packard InstantImager, Modelo A-2420 (Downers Grove, Illinois, USA). Los esteroides no radiactivos se ubicaron en los cromatogramas mediante un reactivo constituido por *p*-anisaldehído:ácido sulfúrico:ácido acético (100:1:1 v/v). La movilidad cromatográfica de los diferentes metabolitos se expresa en términos de  $R_F$  que es el cociente que resulta de dividir la distancia en cm recorrida por el esteroide en la placa cromatográfica, entre la distancia en cm recorrida por la fase móvil.

Las zonas radiactivas localizadas en las placas después de las cromatografías y que coincidieron con los diferentes “carriers” se cortaron y se eluyeron con metanol en tubos de vidrio con bajo contenido de  $^{40}\text{K}$  a los que se les adicionó una solución de centelleo para muestras no acuosas constituida por 4 g de PPO (2,5 -difeniloxazol) y 100 mg de dimetil POPOP (1,4-bis-2-(4-metil-5 fenil-oxazolil) benceno) por litro de tolueno de grado de centelleo y se contaron en el espectrómetro de centelleo líquido como ya se describió anteriormente. La bioconversión de los sustratos radiactivos a los diferentes metabolitos reducidos

en el anillo A, se expresa como picomolas por miligramo de proteína. Todos los experimentos se realizaron por lo menos tres veces, en triplicado.

### **6.9. Efecto de GSD y de sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos sobre la proliferación de las células MCF-7**

La proliferación de las células MCF-7 se determinó por el contenido del DNA celular. En placas de cultivo de 96 pozos se sembraron 10,000 células MCF-7/pozo con 200  $\mu$ l de DMEM libre de rojo de fenol, sin E<sub>2</sub> y con 5 % de SFB libre de esteroides y se incubaron a 37° C por aproximadamente 24 h que es el tiempo promedio en que las células se adhieren a la superficie de los pozos, lo cual se comprobó por observación al microscopio invertido. Una vez que las células estuvieron adheridas, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por 200  $\mu$ l del mismo DMEM que contenía concentraciones crecientes de 1, 10, 100 y 1000 nM de GSD, 5 $\alpha$ -GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, incorporados al medio en 0.5 % de etanol y se incubaron durante 24, 48 y 72 h a 37° C en un incubador Steri-Cult, en atmósfera húmeda de 5 % de CO<sub>2</sub> en aire. Al finalizar cada uno de los tiempos de incubación se cuantificó el contenido celular de DNA. Como controles se realizaron simultáneamente y bajo las mismas condiciones experimentales, incubaciones de células MCF-7 con E<sub>2</sub> a las concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 pM y otras solo con DMEM con 0.5 % de etanol, que fue el vehículo utilizado para la incorporación de los esteroides al medio de cultivo.

### **6.9.1. Determinación de la proliferación celular. Cuantificación de DNA**

El efecto de GSD y sus derivados reducidos, 5 $\alpha$ -GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD sobre la proliferación de las células MCF-7 se determinó por la cuantificación del contenido de DNA celular por un método fluorométrico utilizando el kit comercial CyQUANT<sup>®</sup> Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen Life Technologies, California, EUA). Al finalizar los periodos de incubación de las células tratadas con GSD y sus derivados reducidos, se retiró el medio de los pozos y se lavó cada uno con 200  $\mu$ l de buffer salino de fosfatos 10 mM (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) a pH de 7.4 y se colocaron en un ultracongelador Revco<sup>®</sup> UxF (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) a -70<sup>o</sup> C durante 30 min. Este periodo de congelamiento es importante porque favorece la lisis celular. Las células se descongelaron a temperatura ambiente y se les agregaron 150  $\mu$ l/pozo de una mezcla (preparada inmediatamente antes de su uso) que contiene el buffer de lisis y 50  $\mu$ l del colorante verde GR (incluido en el kit). La placa con las células y el reactivo CyQuant se dejó a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 2 a 5 min agitándola suavemente. La fluorescencia generada por la interacción del colorante GR con las bases nitrogenadas del DNA, se midió en un fluorómetro Synergy HT (Biotek, Utha, EUA) a longitudes de onda de excitación y emisión de 480 y 530 nm, respectivamente. Se utilizó DNA de timo de salmón para construir la curva patrón y el contenido de DNA celular se expresa en nanogramos por 10,000 células. Se realizaron cuando menos tres experimentos en triplicado.

### **6.9.2. Efecto de los antagonistas de hormonas esteroides sobre la proliferación de las células MCF-7, inducida por GSD y sus derivados**

Para determinar la interacción de GSD y de sus derivados 5 $\alpha$ -dihidroGSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidroGSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidroGSD con los receptores intracelulares de esteroides e inducir la proliferación de las células MCF-7, se realizaron experimentos en los cuales se incubaron las células con GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos en presencia o ausencia del antagonista de estrógenos ICI 182,780, del antagonista de progestinas RU 486 (RU) y del antagonista de andrógenos Flutamida (FLU).

#### **6.9.2.1 Efecto de ICI 182,780 (ICI), sobre la proliferación celular inducida por GSD, 5 $\alpha$ -GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD**

Las incubaciones de las células MCF-7 se realizaron durante 72 h en condiciones experimentales con las que se logró la mayor inducción de la proliferación celular. La concentración de GSD y 5 $\alpha$ -GSD empleada fue 1000 nM, mientras que 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD se usaron a la concentración de 10 nM. Las incubaciones de las células MCF-7 con los esteroides se realizaron en presencia o ausencia del antagonista ICI a la concentración de 50 nM. Como controles de los experimentos se hicieron incubaciones de células MCF-7 con DMEM con E<sub>2</sub> (100 pM) o con DMEM solo, o DMEM con vehículo (etanol 0.5 %). La proliferación celular se determinó por el contenido de DNA en las incubaciones de las células tratadas con los esteroides, en presencia o ausencia del antiestrógeno.

### **6.9.2.1. Efecto de RU 486 (RU) y Flutamida (FLU) sobre la proliferación celular inducida por $3\alpha,5\alpha$ -GSD y $3\beta,5\alpha$ -GSD**

Para investigar el efecto de la antiprogestina RU y del antiandrógeno FLU sobre la proliferación de las células MCF-7 inducida por los tetrahedros de GSD,  $3\alpha,5\alpha$  y  $3\beta,5\alpha$ , se realizaron incubaciones en condiciones semejantes a las del experimento anterior. Las células se incubaron con  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y  $3\beta,5\alpha$ -GSD a la concentración de 10 nM en presencia o ausencia de los antagonistas RU y FLU a la concentración de 50 nM. Como controles experimentales se realizaron incubaciones de células MCF-7 con DMEM, DMEM con el vehículo (etanol) y DMEM con RU o con FLU. El contenido de DNA en las incubaciones de las células tratadas con los esteroides, en presencia o ausencia de la antiprogestina RU o del antiandrógeno FLU, se determinó por el método fluorométrico anteriormente descrito.

## 7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente empleando el software NCSS 2007 (Kaysville, UT, EUA) y Sigma Plot de Systat Software, Inc. (San Jose, CA, EUA). Para considerar la existencia de diferencias entre las medias de los grupos, se utilizó el Análisis de Varianza de dos factores, y para encontrar las diferencias de las medias entre dos grupos se usó la  $t$  de Student. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  Desviación Estándar (DE) de tres experimentos en triplicado. Las diferencias de grupo se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## 8. Resultados

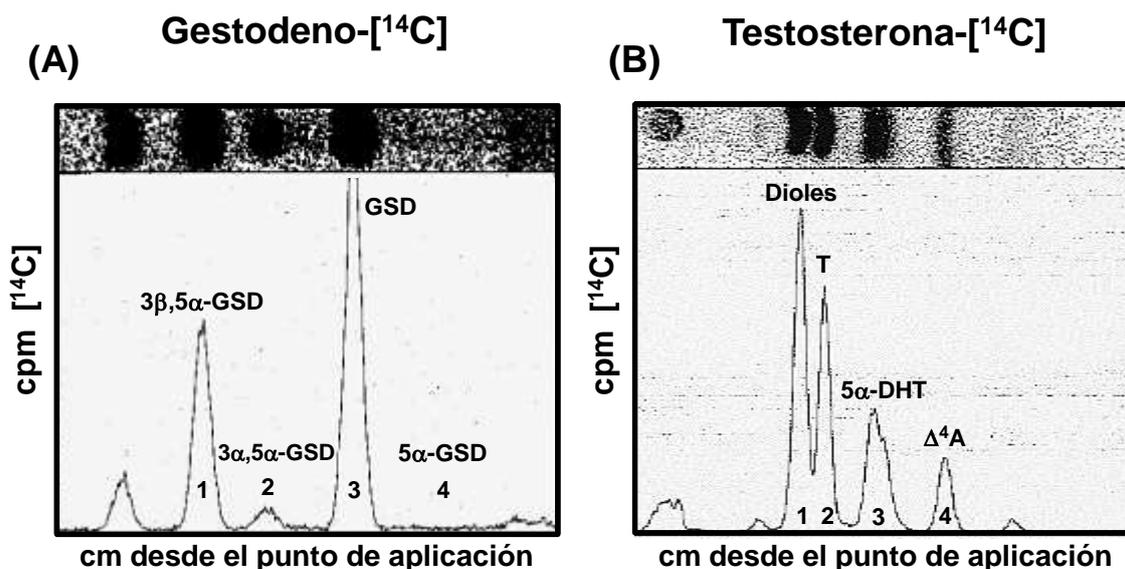
### 8.1. Formación de metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de GSD-[<sup>14</sup>C] en células MCF-7 en cultivo

Después del procedimiento de extracción del medio acuoso de las incubaciones de las células MCF-7 con GSD-[<sup>14</sup>C] o con T-[<sup>14</sup>C], utilizada como control experimental, el 95 % del total del material radiactivo incubado se recuperó en los extractos orgánicos, los cuales se cromatografiaron en placa fina. El análisis de las placas cromatográficas reveló la presencia de cuatro zonas radiactivas de diferente polaridad. La Figura 2 muestra las imágenes representativas de las cromatografías de los extractos orgánicos de las incubaciones con GSD-[<sup>14</sup>C] y T-[<sup>14</sup>C] obtenidas directamente del detector Packard InstantImager, en las que se observa la distribución de las zonas radiactivas detectadas. En el panel (A) se puede observar que la zona más polar, Zona 1, con un  $R_F$  de 0.41 y que constituyó el mayor producto formado en la conversión metabólica del GSD-[<sup>14</sup>C], presentó un comportamiento cromatográfico idéntico al “carrier” de 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD. La Zona 2, con  $R_F$  de 0.52, mostró una movilidad cromatográfica idéntica a la del “carrier” de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD. La Zona 3, con  $R_F$  de 0.61, fue identificada por su comportamiento cromatográfico, como el sustrato GSD-[<sup>14</sup>C] que permaneció sin metabolizarse y la Zona 4, con  $R_F$  de 0.70, y por lo tanto la de menor polaridad, exhibió movilidad cromatográfica idéntica a la del “carrier” de 5 $\alpha$ -GSD.

La imagen obtenida del InstantImager del análisis de las placas de cromatografía de los extractos orgánicos de las incubaciones de células MCF-7 con T-[<sup>14</sup>C],

utilizadas como controles experimentales, también mostró la presencia de cuatro zonas radiactivas, como puede apreciarse en la Figura 2B. La Zona 1 ( $R_F$  0.22), en la que se observa la mayor conversión metabólica de la T-[ $^{14}\text{C}$ ], mostró un comportamiento cromatográfico idéntico al de los “carriers” de  $3\alpha,5\alpha$ -androstadiol y  $3\beta,5\alpha$ -androstadiol (Dioles), los cuales no es posible separar en ningún sistema cromatográfico disponible debido a que en su condición de epímeros, su polaridad es idéntica. La Zona 2 ( $R_F$  0.34) fue identificada como el sustrato no metabolizado T-[ $^{14}\text{C}$ ]. La Zona 3 ( $R_F$  0.46) presentó una movilidad cromatográfica idéntica a la del “carrier” de  $5\alpha$ -DHT y la Zona 4 ( $R_F$  0.55) mostró un comportamiento cromatográfico igual al del “carrier” de  $\Delta^4\text{A}$ .

El análisis de los cromatogramas de los extractos orgánicos de las incubaciones sin células o con células inactivadas por calor, que sirvieron como controles, mostró una sola zona radiactiva que correspondió a los sustratos sin modificar GSD-[ $^{14}\text{C}$ ] o T-[ $^{14}\text{C}$ ] (no se muestran los datos).



**Figura 2.** Perfil representativo de la distribución de las zonas radiactivas en la cromatografía de los extractos orgánicos de las incubaciones de 24 h, de células MCF-7 con GSD- $[^{14}\text{C}]$  o T- $[^{14}\text{C}]$ . Las zonas radiactivas detectadas se numeraron de acuerdo a su movilidad cromatográfica: **(A)** El mayor producto en la conversión metabólica de GSD- $[^{14}\text{C}]$  fue el  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidroGSD ( $3\beta,5\alpha$ -GSD), mientras que el  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroGSD ( $3\alpha,5\alpha$ -GSD) se formó en menor proporción. Solamente se observaron trazas del  $5\alpha$ -dihidroGSD ( $5\alpha$ -GSD). **(B)** La T- $[^{14}\text{C}]$  se convirtió eficientemente en  $3\alpha,5\alpha$ -androstano-3,5-diol y  $3\beta,5\alpha$ -androstano-3,5-diol (Dioles). Las zonas correspondientes a  $5\alpha$ -dihidrotestosterona ( $5\alpha$ -DHT) y  $\Delta^4$ -androstendiona ( $\Delta^4\text{A}$ ) fueron las que contuvieron la menor cantidad de radiactividad.

## 8.2. Determinación de la identidad de los metabolitos $5\alpha$ -reducidos de Gestodeno- $[^{14}\text{C}]$ y de Testosterona- $[^{14}\text{C}]$ formados en las incubaciones con células MCF-7

Para establecer la identidad de los metabolitos formados, las diferentes zonas radiactivas detectadas en la cromatografía de los extractos orgánicos de las incubaciones de las células MCF-7 con GSD- $[^{14}\text{C}]$  o con T- $[^{14}\text{C}]$  se eluyeron con metanol, se determinó su contenido radiactivo, se les agregaron a cada una, 10 mg de los esteroides radioinertes correspondientes ( $5\alpha$ -GSD,  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y  $3\beta,5\alpha$ -GSD, o bien  $5\alpha$ -DHT,  $3\alpha,5\alpha$ -diol y  $3\beta,5\alpha$ -diol) y se recrystalizaron

sucesivamente hasta que la actividad específica (dpm/mg) en los cristales permaneció constante, criterio que sirvió para confirmar la identidad de los productos de la conversión metabólica de GSD-[<sup>14</sup>C] y T-[<sup>14</sup>C]. En virtud de que los derivados tetrahidros de la T-[<sup>14</sup>C] 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -diol y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol no se lograron separar cromatográficamente, el eluado de la zona correspondiente a los Dioles se dividió en dos partes iguales y se agregaron a una de ellas 10 mg de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -diol y 10 mg de 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol a la otra, para así cristalizarlos y demostrar su identidad. Los resultados representativos de la cristalización de los metabolitos formados en las incubaciones, se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Cristalizaciones representativas de los metabolitos aislados de las incubaciones de células MCF-7 con Gestodeno-[<sup>14</sup>C] y Testosterona-[<sup>14</sup>C]**

Metabolitos aislados de las incubaciones con GSD-[ <sup>14</sup> C]	Cristalizaciones sucesivas	Actividad específica (dpm/mg)	Metabolitos aislados de las incubaciones con T-[ <sup>14</sup> C]	Cristalizaciones sucesivas	Actividad específica (dpm/mg)
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD	C <sub>1</sub> <sup>a</sup>	1069	3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -diol	C <sub>1</sub> <sup>a</sup>	634
	C <sub>2</sub>	1001		C <sub>2</sub>	581
	C <sub>3</sub>	931		C <sub>3</sub>	473
	AM <sub>3</sub> <sup>b</sup>	786		AM <sub>3</sub> <sup>b</sup>	385
3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD	C <sub>1</sub>	660	3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol	C <sub>1</sub>	370
	C <sub>2</sub>	492		C <sub>2</sub>	351
	C <sub>3</sub>	442		C <sub>3</sub>	319
	AM <sub>3</sub>	472		AM <sub>3</sub>	334
5 $\alpha$ -GSD	C <sub>1</sub>	1424	5 $\alpha$ -DHT	C <sub>1</sub>	580
	C <sub>2</sub>	1252		C <sub>2</sub>	529
	C <sub>3</sub>	1073		C <sub>3</sub>	516
	AM <sub>3</sub>	1101		AM <sub>3</sub>	580

<sup>a</sup>Cristales

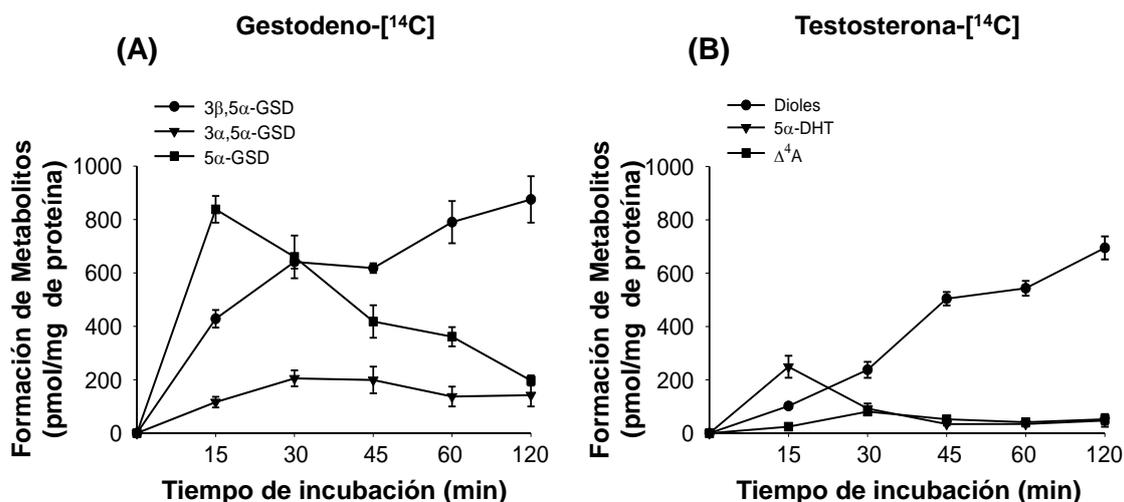
<sup>b</sup>Aguas madres

### 8.3. Formación, en función de tiempo, de los metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de GSD-[ $^{14}$ C] en las células MCF-7

La expresión de forma cuantitativa de la formación de los metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos del GSD, en función de tiempo, se muestra en la Figura 3. Como lo muestra la Figura 3A, la formación de los metabolitos de GSD-[ $^{14}$ C] ocurrió a todos los tiempos de incubación. En los primeros 15 min se puede notar una rápida y elevada formación de 5 $\alpha$ -GSD que representó el 8.8 % del sustrato original, con un valor en picomolas/mg de proteína de  $838 \pm 50$ , seguida de un sostenido descenso a lo largo de los tiempos subsecuentes de incubación. El mayor producto de la bioconversión de GSD-[ $^{14}$ C], fue el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, con una máxima conversión de 9.62 % a 120 min, que correspondió a  $875 \pm 87$  picomolas/mg de proteína. La bioconversión de GSD-[ $^{14}$ C] a 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD, fue similar a la del epímero 3 $\beta$ , pero en mucha menor proporción. La máxima formación de este metabolito se observó a 30 y 45 min de incubación y representó el 2.49 % del sustrato incubado con  $199 \pm 50$  picomolas/mg de proteína.

La formación de los metabolitos de T-[ $^{14}$ C] se muestra en la figura 3B. La bioconversión del sustrato a 5 $\alpha$ -DHT, se presentó a los primeros 15 min de incubación, así como una posterior disminución a lo largo de los demás tiempos, en forma semejante a lo observado en el metabolismo del GSD. La máxima formación de 5 $\alpha$ -DHT fue de  $249 \pm 41$  picomolas/mg de proteína, que representa el 2.9 % de conversión de la T-[ $^{14}$ C] a este metabolito 5 $\alpha$ -reducido. Los mayores productos de la biotransformación de T-[ $^{14}$ C] fueron los Dioles (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -diol y

3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol) con una máxima formación a los 120 min, que representó el 7.37 % (694  $\pm$  43 picomolas/mg de proteína) de la T incubada. Una muy escasa formación de  $\Delta^4$ A se observó en todos los tiempos de incubación.



**Figura 3. Bioconversión de GSD-[<sup>14</sup>C] y T-[<sup>14</sup>C] a metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos en células MCF-7 en función de tiempo. (A)** Se observa en los primeros minutos, una rápida bioconversión de GSD a 5 $\alpha$ -dihidroGSD (5 $\alpha$ -GSD), mientras que la mayor formación de 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroGSD (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD) fue más tardía. La formación de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroGSD (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD) fue notoriamente menor que la de su epímero 3 $\beta$ . **(B)** En las incubaciones con T, la conversión a 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DHT) ocurrió en los primeros 15 minutos, a diferencia de los Diones (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -androstano-3 $\beta$ -diol y el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -androstano-3 $\beta$ -diol) cuya mayor formación fue a los 120 min. El metabolito que se formó en menor cantidad fue la  $\Delta^4$ -androstendiona ( $\Delta^4$ A). Cada punto representa el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos cada uno en triplicado.

En la Tabla 2 se muestran los datos de la formación, en términos cuantitativos, de los productos del metabolismo de GSD-[<sup>14</sup>C] y de T-[<sup>14</sup>C] en las células MCF-7 a los diferentes tiempos de incubación.

**Tabla 2. Formación, en función de tiempo, de metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de Gestodeno-[ $^{14}$ C] y de Testosterona-[ $^{14}$ C] en células MCF-7**

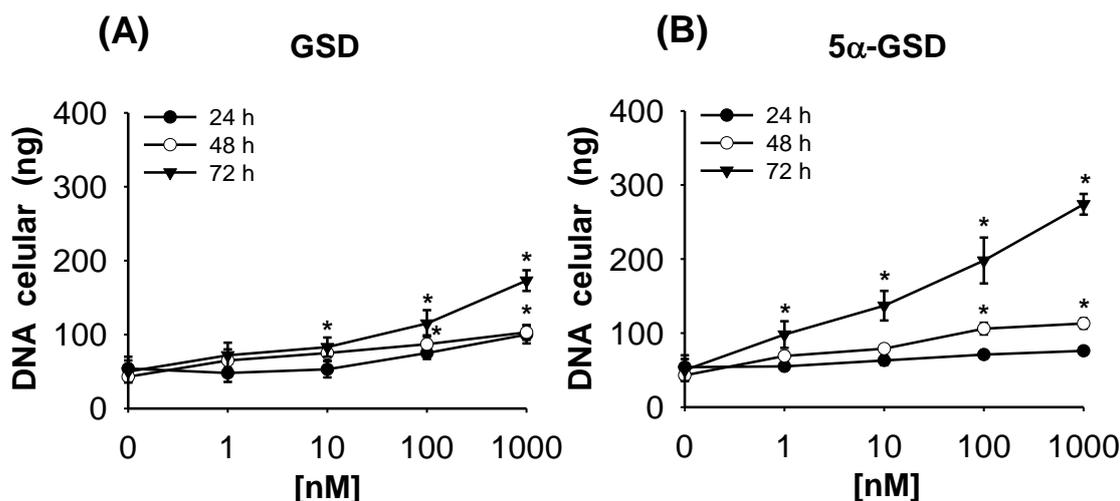
Tiempo (min)	Metabolitos de GSD-[ $^{14}$ C]			Metabolitos de T-[ $^{14}$ C]	
	5 $\alpha$ -GSD	3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD	3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD	5 $\alpha$ -DHT	Dioles
	(pmolas/mg de proteína) promedio $\pm$ DE			(pmolas/mg de proteína) promedio $\pm$ DE	
15	838 $\pm$ 50	116 $\pm$ 20	428 $\pm$ 33	249 $\pm$ 41	101 $\pm$ 8
30	660 $\pm$ 80	205 $\pm$ 30	641 $\pm$ 25	92 $\pm$ 18	237 $\pm$ 30
45	418 $\pm$ 61	199 $\pm$ 50	618 $\pm$ 18	34 $\pm$ 5	504 $\pm$ 25
60	361 $\pm$ 36	137 $\pm$ 37	790 $\pm$ 79	34 $\pm$ 9	543 $\pm$ 27
120	197 $\pm$ 19	142 $\pm$ 42	875 $\pm$ 87	47 $\pm$ 23	694 $\pm$ 43

DE = Desviación estándar

#### 8.4. Efecto de GSD y su derivado 5 $\alpha$ -GSD sobre la proliferación de las células MCF-7

Los resultados del efecto de concentraciones crecientes de GSD y 5 $\alpha$ -GSD, en diferentes tiempos de incubación, sobre la proliferación de células MCF-7 se muestran en la Figura 4. En la Figura 4A se observa que GSD a las concentraciones de 1 a 100 nM y en todos los tiempos de incubación, tuvo poco efecto sobre la proliferación celular ya que solamente la concentración de 1000 nM (la más alta estudiada) y en el tiempo más prolongado de incubación, indujo la proliferación celular en forma discreta pero significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al contenido de DNA de las células incubadas únicamente con el vehículo. La Figura 4B muestra que el derivado 5 $\alpha$ -GSD a las concentraciones más bajas,

aunque solo a las 48 y 72 horas de incubación, fue capaz de inducir un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de la proliferación celular, en comparación con el DNA de las células incubadas únicamente con el vehículo.



**Figura 4. Efecto de Gestodeno (GSD) y 5 $\alpha$ -dihydrogestodeno (5 $\alpha$ -GSD) sobre la proliferación de las células MCF-7.** Las células se incubaron por diferentes periodos de tiempo con concentraciones crecientes de GSD (A) y de 5 $\alpha$ -GSD (B). El DNA basal de las células MCF-7 incubadas solo con vehículo fue de  $49 \pm 12.6$  ng. Cada punto representa el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos cada uno en triplicado. \* $p < 0.05$  vs. el DNA de las células incubadas solo con vehículo.

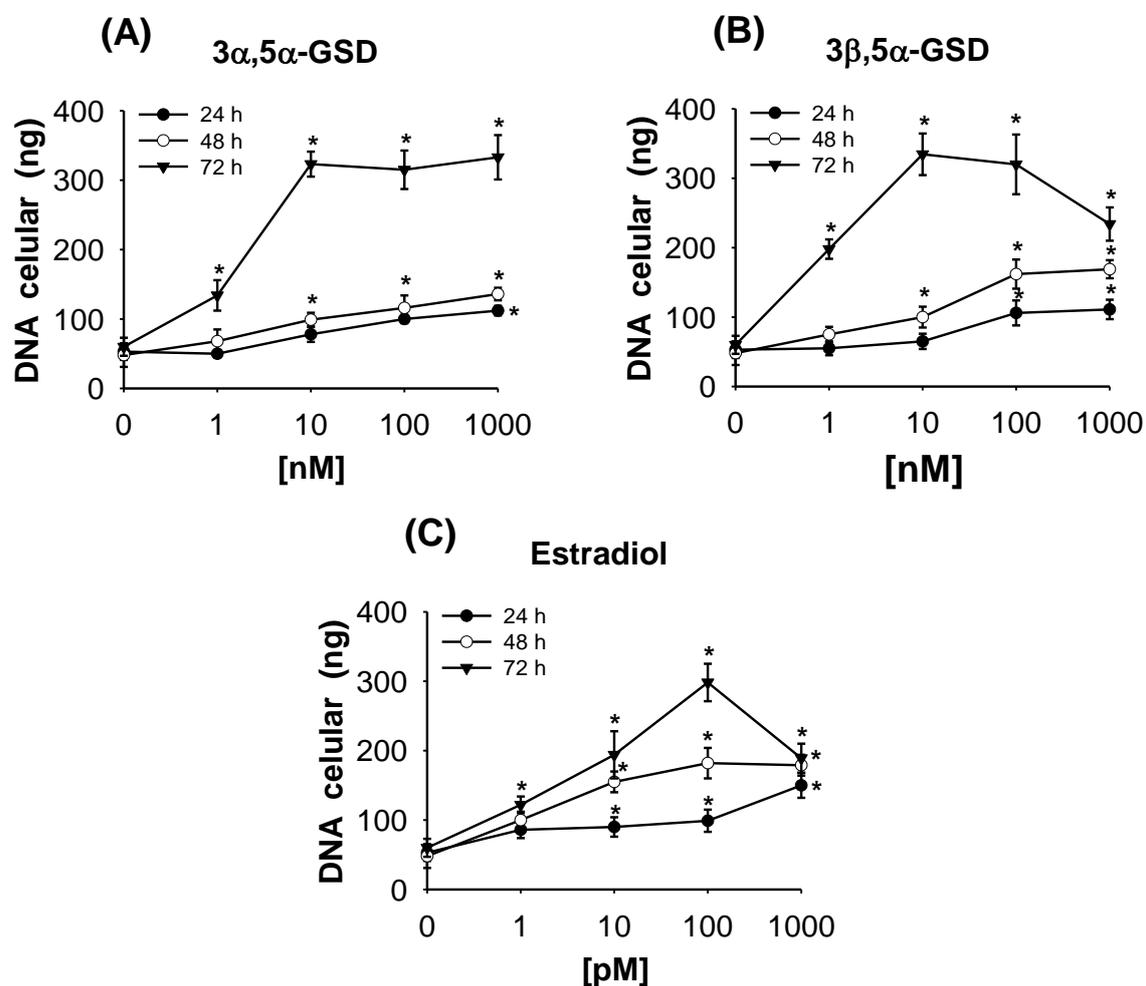
### 8.5. Efecto de los derivados 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD sobre la proliferación de las células MCF-7

El efecto de concentraciones crecientes de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y de 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD sobre la proliferación de las células MCF-7, incubadas a diferentes tiempos, se muestra en la Figura 5. El efecto de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD sobre la proliferación de las células MCF-7 fue dependiente del tiempo y de la concentración del tetrahidro, como se

observa en la Figura 5A. Aun cuando el efecto fue notorio desde las concentraciones más bajas y en todos los tiempos, la mayor y significativa ( $p < 0.05$ ) proliferación se indujo cuando las células se incubaron por 72 h aún con la concentración de 1 nM, comparado con el DNA de las células incubadas con vehículo.

El efecto del derivado  $3\beta,5\alpha$ -GSD sobre la proliferación de las células MCF-7 se muestra en la Figura 5B. El incremento de la proliferación celular, expresado en términos de DNA, fue significativo ( $p < 0.05$ ) a partir de la concentración 10 nM y 24 h de incubación, mientras que con 72 h de incubación se observó proliferación aún a la más baja concentración de 1 nM. En forma inesperada, la mayor concentración de  $3\beta,5\alpha$ -GSD (1000 nM), incubada con las células durante 72 h, mostró una disminución en los valores de DNA, en comparación con el efecto inducido con la concentración previa (100 nM).

La proliferación de las células MCF-7 incubadas con  $E_2$ , utilizado como control positivo, se muestra en la Figura 5C. Como era de esperarse, el estrógeno incrementó eficientemente la proliferación celular con concentraciones mil veces menores que las que se utilizaron para los derivados de GSD. Sin embargo, igual a como se observó con el  $3\beta,5\alpha$ -GSD, la concentración más alta (1000 pM) incubada por 72 h, exhibió una notoria disminución de la proliferación.



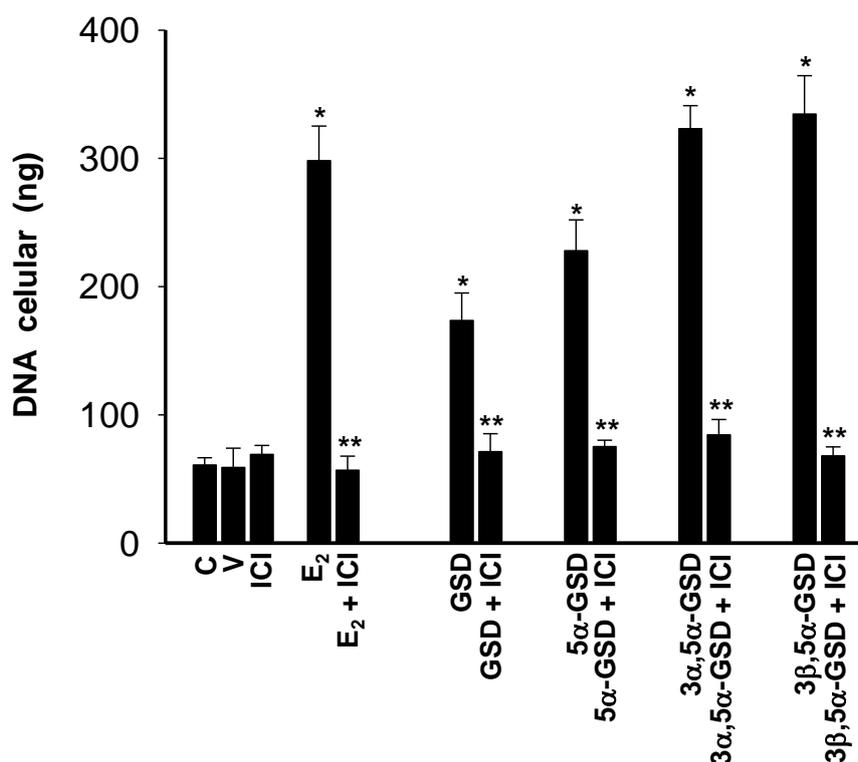
**Figura 5. Efectos de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroGSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroGSD sobre la proliferación de las células MCF-7.** Las células se incubaron por diferentes periodos de tiempo con concentraciones crecientes de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroGSD (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD) **(A)** y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroGSD (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD) **(B)**. Como control positivo se utilizó Estradiol **(C)**. El DNA de las células incubadas solo con vehículo fue  $53.6 \pm 14$  ng. Cada punto representa el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos cada uno en triplicado.

\* $p < 0.05$  vs. el DNA de las células incubadas solo con vehículo.

## **8.6. Efecto de los antagonistas de esteroides ICI 182,780, RU 486 y Flutamida, sobre la proliferación de las células MCF-7 inducida por GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos**

### **8.6.1. Efecto del antiestrógeno ICI 182,780**

El efecto del antiestrógeno ICI sobre la proliferación de las células MCF-7 inducida por GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD se muestra en la Figura 6 en donde se puede observar que la presencia de ICI inhibió significativamente ( $p < 0.05$ ) el incremento de la proliferación celular inducida por GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos, de una forma similar al efecto de ICI para inhibir el efecto de E<sub>2</sub> utilizado como control positivo. En las incubaciones de control experimental de células MCF-7 incubadas con medio de cultivo con vehículo y medio con ICI, no se observó cambio en la proliferación celular ya que los valores del DNA fueron idénticos a los valores determinados para las células incubadas solo con medio de cultivo.

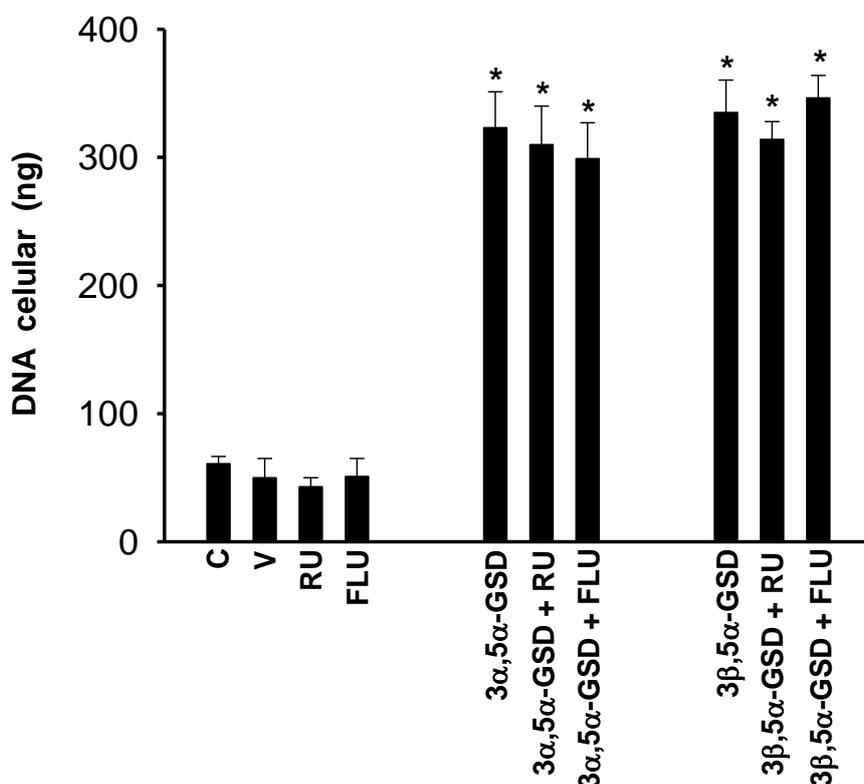


**Figura 6. Efecto del antagonista de estrógenos ICI 182,780 (ICI) sobre la proliferación de las células MCF-7 inducida por GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos.** Las células se incubaron por 72 h con gestodeno (GSD), 5 $\alpha$ -dihydrogestodeno (5 $\alpha$ -GSD) a una concentración de 1000 nM y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrogestodeno (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD) o 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrogestodeno (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD) a la concentración de 10 nM, en presencia de ICI a 50 nM. Las incubaciones de células MCF-7 solo con medio de cultivo (C), medio de cultivo con vehículo (V), con ICI o con E<sub>2</sub> (100 pM) se utilizaron como controles experimentales. Cada punto representa el promedio  $\pm$  DE de tres experimentos cada uno en triplicado. \* $p$ <0.05 vs. el DNA de las células incubadas solo con vehículo. \*\* $p$ <0.05 vs. DNA de células incubadas con GSD y sus derivados reducidos en ausencia de ICI.

### 8.6.2. Efecto de la antiprogesterina RU 486 y del antiandrógeno Flutamida

La presencia de la antiprogesterina RU o del antiandrógeno FLU no inhibió la proliferación de las células MCF-7 inducida por 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y por 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, como se observa en la Figura 7. En las incubaciones de células solamente con RU o FLU, o con medio de cultivo con vehículo, utilizadas como controles, no se

observó diferencia, en términos de DNA de las células incubadas solo con el medio de cultivo.



**Figura 7. Efecto de la antiprogesterina RU 486 (RU) y del antiandrógeno Flutamida (FLU) sobre la proliferación de las células MCF-7 inducida por 3α,5α-tetrahydroGSD y 3β,5α-tetrahydroGSD.** Las células se incubaron durante 72 h con 3α,5α-tetrahydroGSD (3α,5α-GSD) o con 3β,5α-tetrahydroGSD (3β,5α-GSD) a la concentración de 10 nM, en presencia de RU o FLU a concentración de 50 nM. Como controles experimentales, se realizaron incubaciones de células MCF-7 solo con medio de cultivo (C), medio de cultivo con vehículo (V), medio de cultivo con RU o medio con FLU. Cada punto representa el promedio ± DE de tres experimentos cada uno en triplicado.

\* $p < 0.05$  vs. DNA de las células incubadas solo con vehículo.

## 9. Discusión

Los resultados de este estudio demostraron claramente que las células de cáncer de mama MCF-7 dependientes de estrógenos, poseen la capacidad de biotransformar eficientemente al GSD en metabolitos no fenólicos 5 $\alpha$ -reducidos, mostrando un perfil metabólico similar al que exhibieron otras progestinas sintéticas 19-nor como NET y LNG incubadas con órganos blanco a hormonas esteroides como hipotálamo, hipófisis y próstata ventral (Vilchis *et al.*, 1986, Larrea *et al.*, 1987; Santillán *et al.*, 2001, Lemus *et al.*, 2009).

En efecto, las incubaciones de células MCF-7 con GSD marcado isotópicamente con [ $^{14}\text{C}$ ] mostraron una gran eficiencia de las células de cáncer de mama para reducir el doble enlace del anillo A de la molécula del GSD que resultó en una importante formación del metabolito 5 $\alpha$ -dihidroGSD, lo cual implica la presencia y actividad de la enzima 5 $\alpha$ -esteroide reductasa Tipo 1, cuyo pH óptimo es de 7.4, mismo en que se realizaron todas las incubaciones de GSD con las células MCF-7. Estos resultados confirman los reportes de varios investigadores quienes en una serie de estudios demostraron que en el cáncer de mama existe sobre-expresión del gen de la 5 $\alpha$ -esteroide reductasa (Suzuki *et al.*, 2000, Suzuki *et al.*, 2001; Wiebe y Lewis 2003, Pérez-Palacios *et al.*, 2006). La formación de los metabolitos 3 $\alpha$ -tetrahydroGSD y 3 $\beta$ -tetrahydroGSD, plenamente identificados por medio de la cristalización, sugirió fuertemente la actividad de dos enzimas de la familia de las aldo-ceto reductasas, la 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que redujeron el grupo cetónico del anillo A

de la molécula del metabolito 5 $\alpha$ -GSD, y que se ha reportado están presentes en la glándula mamaria (Wiebe y Lewis, 2003; Lewis *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 2004; Pau *et al.*, 2010; Rižner y Penning, 2014, Pening, 2015). Los resultados obtenidos también demostraron que el GSD es un sustrato adecuado para la enzima 5 $\alpha$ -esteroide reductasa, y que a su vez, el producto de la 5 $\alpha$ -reducción, 5 $\alpha$ -GSD es un sustrato para las enzimas 3 $\alpha$  y 3 $\beta$  aldo-ceto reductasas.

La pronta (15 min) y abundante formación del metabolito 5 $\alpha$ -GSD, seguida de un descenso muy marcado a través de los subsecuentes tiempos de incubación y, en forma concomitante, el incremento en la formación de 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD y de su epímero 3 $\alpha$ , aunque en menor proporción, es acorde con el concepto de que en esteroides naturales como la testosterona, la molécula 5 $\alpha$ -reducida es un intermediario obligatorio en la biosíntesis de los tetrahidros 3 $\alpha$  y 3 $\beta$  (Pérez-Palacios *et al.*, 2006; Enríquez *et al.*, 2013). De acuerdo a los resultados obtenidos, en la Figura 8 se representa el destino metabólico de la molécula de GSD en las células MCF-7 de cáncer de mama.

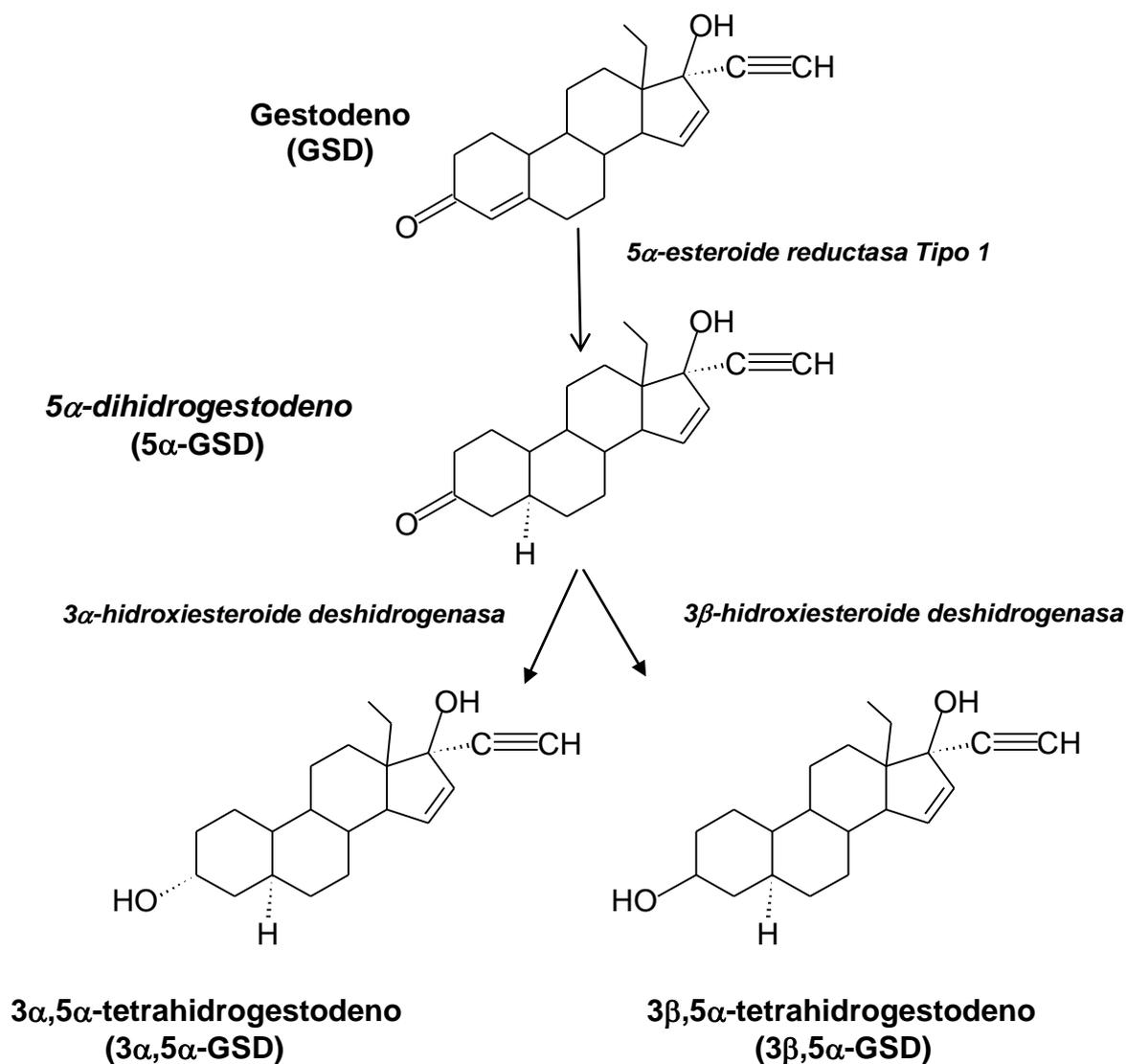


Figura 8. Destino metabólico de GSD-[<sup>14</sup>C], sugerido por los resultados obtenidos en las incubaciones con las células MCF-7 de cáncer de mama

Las incubaciones de las células MCF-7 con T-[<sup>14</sup>C], utilizadas como control experimental, mostraron un perfil metabólico igual al del GSD, con una eficiente biotransformación del andrógeno para la formación de 5 $\alpha$ -DHT en los primeros 15 min de incubación, un notorio descenso en los tiempos más prolongados y la consecuente formación de los Dioles 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ , para los que el proceso de cristalización fue fundamental para su separación e identificación debido a que este procedimiento es altamente selectivo y se utiliza ampliamente para separar e identificar compuestos con estructuras químicas semejantes. La formación de  $\Delta^4$ A, aunque en muy pequeña proporción, nos sugiere también la presencia de actividad de la enzima 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa en las células MCF-7. El análisis de las cromatografías correspondientes a las incubaciones de GSD-[<sup>14</sup>C] en ausencia de células y con células inactivadas, mostró la presencia de una sola zona radiactiva que correspondió a los sustratos radiactivos no modificados. Los resultados obtenidos en las incubaciones de control, validan las condiciones experimentales utilizadas en los experimentos del metabolismo de GSD.

Para tratar de comprender el mecanismo por el cual GSD es capaz de inducir eficientemente la proliferación de células MCF-7 mantenidas en cultivo, lo cual indudablemente sugiere un efecto de tipo estrogénico ejercido por el GSD, se realizaron incubaciones de células MCF-7 con GSD y con sus derivados reducidos 5 $\alpha$ -GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD. Como se observa en la Figura 4, GSD y 5 $\alpha$ -GSD exhibieron un efecto muy débil sobre la proliferación de las células

MCF-7, determinado en función del incremento de DNA, la cual con GSD solo fue significativa a las concentraciones más altas y en los tiempos más prolongados de incubación (72 h), mientras que con 5 $\alpha$ -GSD el efecto se observó a menores concentraciones pero solo cuando las células se incubaron por 72 h. Estos hallazgos sugieren que el efecto sobre la proliferación no debe atribuirse a GSD ni a 5 $\alpha$ -GSD, ya que como se ha mencionado, estos derivados no interactúan con los receptores de estrógenos (Dusterberg *et al.*, 1987, Pollow *et al.*, 1990; Larrea *et al.*, 2001; Africander *et al.*, 2011) y sus moléculas tienen impedimentos estéricos para aromatizarse. En virtud de que los estudios de metabolismo mostraron que a los 15 min de incubación de las células MCF-7 con GSD se observó una importante biotransformación de GSD a 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD, y particularmente a 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, teniendo como metabolito intermediario al 5 $\alpha$ -GSD, es posible sugerir que la inducción de la proliferación observada en las incubaciones con GSD o con 5 $\alpha$ -GSD, que sólo se observó a las más altas concentraciones usadas y a las 72 h de incubación, es en realidad un efecto inducido por los productos finales del metabolismo de GSD, los tetrahidros 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, los cuales, como se ha demostrado en estudios previos, no solamente interactúan con el subtipo alfa de los receptores de estrógenos (Lemus *et al.*, 2000; Larrea *et al.*, 2001, García-Becerra, 2006) sino que son capaces de inducir efectos de tipo estrogénico en diferentes modelos experimentales (Lemus *et al.*, 2000; Lemus *et al.*, 2001).

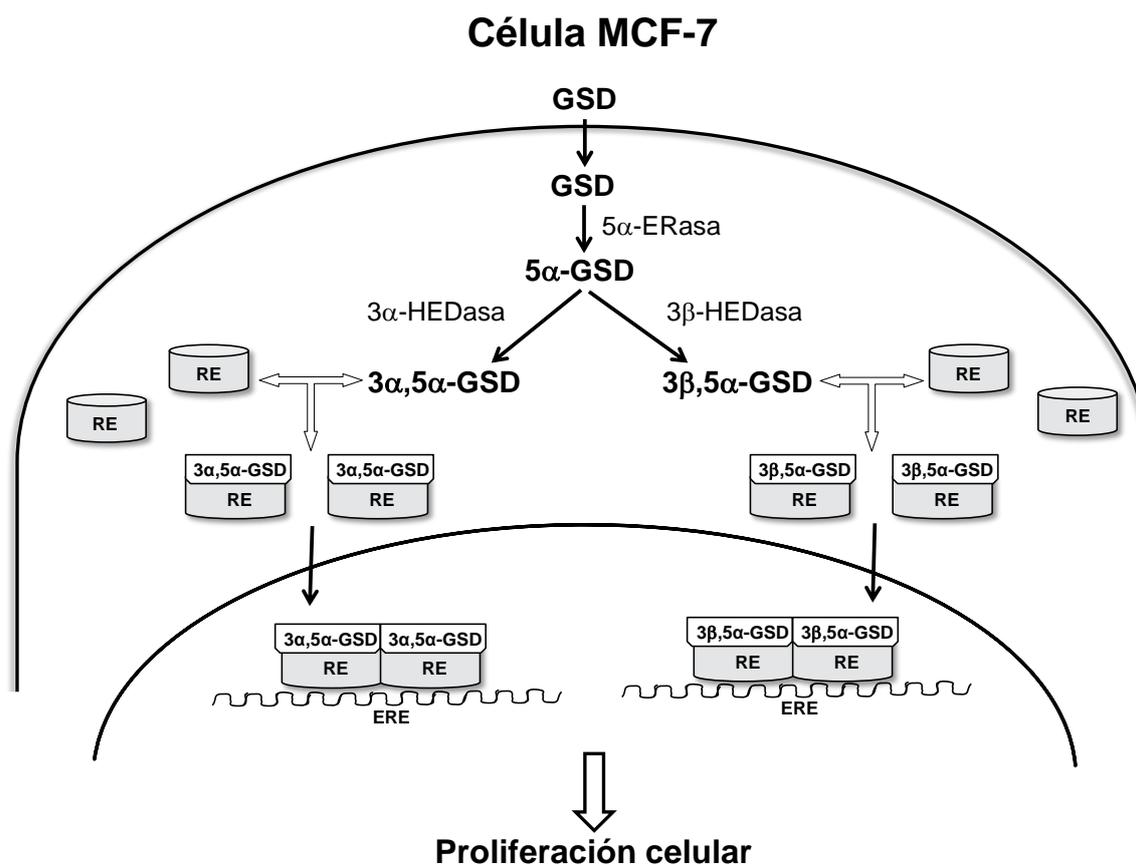
Los resultados de las incubaciones con los derivados tetrahidro de GSD confirmaron lo planteado anteriormente. En efecto, en las incubaciones de células

MCF-7 con  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y con  $3\beta,5\alpha$ -GSD, se pudo observar incremento en la proliferación celular aún con las concentraciones más pequeñas de los tetrahidros y prácticamente en todos los tiempos de incubación, lográndose la máxima respuesta cuando las células se incubaron durante 72 h. El efecto ejercido por el derivado  $3\alpha,5\alpha$ -GSD fue idéntico al inducido por el  $3\beta,5\alpha$ -GSD, cuando el tiempo de incubación para ambos fue de 72 h. La administración de  $E_2$ , utilizado como control, y como era de esperarse, fue la que indujo la mayor proliferación de las células MCF-7, considerando que las concentraciones administradas fueron mil veces menores que las de GSD y de sus derivados reducidos en el anillo A. Estos resultados nos confirman que la proliferación, aparentemente inducida por el GSD, si es una respuesta a efectos de tipo estrogénico, ejercida por los productos de su conversión metabólica, los derivados  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y  $3\beta,5\alpha$ -GSD, característica que expresan también los tetrahidros de otras progestinas sintéticas de la serie 19-nor como NET y LNG y que han sido bien documentadas en la literatura (Vilchis *et al.*, 1986; Larrea *et al.*, 1987; Oropeza *et al.*, 1994; Santillan *et al.*, 2001; Morali *et al.*, 2002; Enríquez *et al.*, 2007; Lemus *et al.*, 2009). Una evidencia mayor del efecto estrogénico, mostrado particularmente por el  $3\beta,5\alpha$ -GSD es la notoria disminución de la proliferación que se observó con la dosis más alta y en el tiempo más prolongado de incubación, respuesta que se observó también en las incubaciones control con  $E_2$  y que es el conocido efecto dual de los estrógenos, que dosis bajas tienen efectos estimulantes, mientras que dosis altas pueden ejercer efectos inhibitorios (Lewis *et al.*, 2005a; Lewis *et al.*, 2005b; Altioik *et al.*, 2007; Lewis y Jordan, 2009; Hanamura *et al.*, 2013; Hanamura *et al.*, 2014).

Los resultados de los experimentos diseñados para determinar la interacción de GSD y de sus derivados 5 $\alpha$ -GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD con los diferentes receptores intracelulares de hormonas esteroideas, se observan en las Figuras 6 y 7. La presencia del antiestrógeno ICI inhibió completamente la capacidad del 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y del 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD para inducir la proliferación de las células MCF-7, en forma similar a como lo hizo con el E<sub>2</sub>, lo cual es una evidencia más a favor de que los inductores de los efectos de tipo estrogénico, como la proliferación celular, observados después de la administración de GSD a cultivos de células MCF-7 son los tetrahidros de GSD. El hecho de que en estos experimentos, se haya observado efecto inhibitorio del ICI sobre la proliferación inducida por GSD y por 5 $\alpha$ -GSD, tiene la misma explicación que ya se expresó anteriormente y que considera que a los tiempos en que se realizaron los experimentos, tanto GSD como 5 $\alpha$ -GSD ya fueron bioconvertidos a los derivados tetrahidros quienes son los responsables de los efectos de tipo estrogénico observados en esos experimentos. La presencia de los antagonistas de los receptores de progesterona y andrógenos RU y FLU respectivamente, no tuvo efecto inhibitorio sobre la proliferación celular inducida por 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y por 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, lo cual es otra evidencia que apoya el efecto de que el GSD y sus derivados, es mediado por su interacción solo con los receptores intracelulares de estrógenos.

En su conjunto, todos los resultados obtenidos fortalecen la hipótesis planteada, que los responsables de los efectos de tipo estrogénico inducidos por GSD son sus derivados reducidos 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD lo cual además, ofrece una explicación plausible a la interrogante de algunos investigadores sobre el origen

de los efectos estrogénicos de la progestina sintética GSD, que no interactúa con los receptores de estrógenos y que debido a su estructura molecular, no puede aromatizarse para formar estrógenos, pero que es bioconvertida eficientemente en las células MCF-7 a los metabolitos  $5\alpha$ -GSD,  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y  $3\beta,5\alpha$ -GSD, los cuales inducen efectos de tipo estrogénico a través de su interacción con el receptor de estrógenos a través de un modelo intracrino, como se describe en la Figura 9.



**Figura 9. Modelo intracrina sugerido por los resultados obtenidos que representa el mecanismo de acción de Gestodeno (GSD) para inducir la proliferación de las células MCF-7.** Los resultados del trabajo de Tesis demostraron en las células de cáncer de mama MCF-7, la bioconversión eficiente de GSD en los metabolitos 5α-reducidos, 5α-GSD, como intermediario obligatorio y 3α,5α-GSD y 3β,5α-GSD, los cuales a través de su unión con los receptores intracelulares de estrógenos (RE) (García-Becerra *et al.*, 2006), ejercen efectos de tipo estrogénico. Este sistema intracrina propuesto permite explicar el origen de los efectos observados después de la administración de GSD a cultivos de células MCF-7.

## 10. Conclusiones

- Las células MCF-7 de cáncer de mama, tuvieron la capacidad de biotransformar eficientemente al GSD, una potente progestina sintética 19-nor, a los metabolitos reducidos en el anillo A,  $5\alpha$ -GSD,  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y  $3\beta,5\alpha$ -GSD, lo cual indica que la molécula del GSD es sustrato adecuado de la  $5\alpha$ -esteroide reductasa, y que el  $5\alpha$ -GSD formado es un buen sustrato para las enzimas de la familia de las aldo-ceto reductasas  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.
- Los derivados de gestodeno,  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y  $3\beta,5\alpha$ -GSD fueron capaces de inducir, de forma dependiente de dosis y de tiempo, la proliferación de las células MCF-7 de carcinoma mamario. La molécula original de GSD, así como  $5\alpha$ -GSD, no indujeron *per se* la proliferación de las células MCF-7.
- La proliferación de las células MCF-7 inducida por el  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y por el  $3\beta,5\alpha$ -GSD se bloqueó por la presencia del antiestrógeno ICI 182,780, lo cual indicó la participación del receptor de estrógenos.
- Ni la antiprogestina RU 486, ni el antiandrógeno Flutamida tuvieron efecto sobre la proliferación celular inducida por los derivados de GSD,  $3\alpha,5\alpha$ -GSD y  $3\beta,5\alpha$ -GSD, sugiriendo que el efecto no es mediado ni por el receptor de progesterona ni por el receptor de andrógenos.
- Los resultados de este trabajo de Tesis demuestran la importancia del metabolismo de GSD, en las células de cáncer de mama MCF-7, para la modulación de sus diferentes efectos hormonales.

## 11. Bibliografía

Africander D, Verhoog N, Hapgood JP. 2011. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception. *Steroids* 76: 636-652.

Altıok N, Koyuturk M, Altıok S. 2007. JNK pathway regulates estradiol-induced apoptosis in hormone-dependent human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 105: 247-254.

Amadou A, Fabre A, Torres-Mejía G, Ortega-Olvera C, Angeles-Llerenas A, McKenzie F, Biessy C, Hainaut P, Romieu I. 2013. Hormonal therapy and risk of breast cancer in mexican women. *PLoS One* 8: e79695.

Attardi BJ, Pham TC, Radler LM, Burgenson J, Hild SA, Reel JR. 2008. Dimethandrolone ( $7\alpha,11\beta$ -dimethyl-19-nortestosterone) and  $11\beta$ -methyl-19-nortestosterone are not converted to aromatic A-ring products in the presence of recombinant human aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110: 214-222.

Bassuk SS, Manson JE. 2015. Oral contraceptives and menopausal hormone therapy: relative and attributable risks of cardiovascular disease, cancer, and other health outcomes. *Ann Epidemiol* 25: 193-200.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brown SB, Hankinson SE. 2015. Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers. *Steroids* 99: 8-10.

Campagnoli C, Abbà C, Ambroggio S, Peris C. 2005. Pregnancy, progesterone and progestins in relation to breast cancer risk. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97: 441-450.

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

Djerassi C, Miramontes L, Rosenkranz G, Sondheimer F, Longo LD. 1954. Steroids LIV. Synthesis of 19-nor-17alpha-ethynyltestosterone and 19-nor-17alpha-methyltestosterone. *Am J Obstet Gynecol* 194: 289-290.

Düstenberg B, Tack JW, Jrause W, Humpel M. 1987. Pharmacokinetics and biotransformation of gestodene in man. In: *Gestodene. Development of a new gestodene-containing low dose oral contraceptive*, pp 35-44. Ed M. Elstein. Carnforth: Parthenon Publishing Group Ltd.

Enríquez J, Lemus AE, Chimal-Monroy J, Arzate H, García GA, Herrero B, Larrea F, Pérez-Palacios G. 2007. The effects of synthetic 19-norprogestins on osteoblastic cell function are mediated by their non-phenolic reduced metabolites. *J Endocrinol* 193: 493-504.

Enríquez J, Larrea F, Santillán R, Hernández Á, Herrero B, Pérez-Palacios G, Lemus AE. 2013. Neonatal rat osteoblasts bioconvert testosterone to non-phenolic metabolites with estrogen-like effects on bone cell proliferation and differentiation. *Horm Mol Biol Clin Investig* 13: 41-49.

Evans G, Sutton EL. 2015. Oral contraception. *Med Clin North Am* 99:479-503.

Farhat GN, Parimi N, Chlebowski RT, Manson JE, Anderson G, Huang AJ, Vittinghoff E, Lee JS, Lacroix AZ, Cauley JA, Jackson R, Grady D, Lane DS,

Phillips L, Simon MS, Cummings SR. 2013. Sex hormone levels and risk of breast cancer with estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst* 105: 1496-1503.

Farley TMM, Collins J, Schlesselman JJ. 1998. Hormonal contraception and risk of cardiovascular disease. *Contraception* 57: 211-230.

Fotherby K, Caldwell ADS. 1994. New progestogens in oral contraception. *Contraception* 49: 1-32.

Fournier A, Berrino F, Riboli E, Avenel V, Clavel-Chapelon F. 2005. Breast cancer risk in relation to different types of hormone replacement therapy in the E3N-EPICcohort. *Int J Cancer* 114: 448-454.

García-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Pérez-Palacios G, Larrea F. 2002. The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- $\alpha$ . *J Steroid Biochem Mol Biol* 82: 333-341.

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 estrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 99: 108-114.

Gual C, Morato T, Hayano M, Gut M, Dorfman RI. 1962. Biosynthesis of estrogens. *Endocrinology* 71: 920-925.

Hanamura T, Niwa T, Nishikawa S, Konno H, Gohno T, Tazawa C, Kobayashi Y, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S. 2013. Androgen metabolite-dependent growth of hormone receptor-positive breast cancer as a possible aromatase inhibitor-resistance mechanism. *Breast Cancer Res Treat* 139: 731-740.

Hanamura T, Niwa T, Gohno T, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Ito K, Hayashi S. 2014. Possible role of the aromatase-independent steroid metabolism pathways in hormone responsive primary breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 143: 69-80.

Hofmann B, Reinecke I, Schuett B, Merz M, Zurth C. 2014. Pharmacokinetic overview of ethinyl estradiol dose and bioavailability using two transdermal contraceptive systems and a standard combined oral contraceptive. *Int J Clin Pharmacol Ther* 52: 1059-1070.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2015. Estadísticas de Mortalidad. Base de datos.

Jeng MH, Parker CJ, Jordan VC. 1992. Estrogenic potential of progestins in oral contraceptives to stimulate human breast cancer cell proliferation. *Cancer Res* 52: 6539-6546.

Ji Q, Aoyama C, Nien YD, Liu PI, Chen PK, Chang L, Stanczyk FZ, Stolz A. 2004. Selective loss of AKR1C1 and AKR1C2 in breast cancer and their potential effect on progesterone signaling. *Cancer Res* 64:7610-7617.

Junge W, Heger-Mahn D, Trummer D, Merz M. 2013. Investigation of the hemostatic effect of a transdermal patch containing 0.55 mg ethinyl estradiol and 2.1 mg gestodene compared with a monophasic oral contraceptive containing 0.03 mg ethinyl estradiol and 0.15 mg levonorgestrel: an open-label, randomized, crossover study. *Drugs R D* 13: 223-233.

Jung-Hoffmann C, Heidt F, Kuhl H. 1988. Effect of two oral contraceptives containing 30 micrograms ethinylestradiol and 75 micrograms gestodene or 150 micrograms desogestrel upon various hormonal parameters. *Contraception* 38: 593-603.

Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. 2015. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* 14: 196-202.

Kuhl H. 1996. Comparative pharmacology of newer progestogens. *Drugs* 51: 188-215.

Lacey JV Jr, Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF, Hoover RN, Prorok PC, Berg CD, Hartge P; Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Project Team. 2009. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer* 9: 1-8.

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-nor synthetic progestins as subtype selective agonists for ER $\alpha$ . *Endocrinology* 142: 3791-3799.

Larrea F, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G. 1987. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J Steroid Biochem* 27: 657-663.

Lemus AE, Vilchis F, Damsky B, Chávez BA, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 1992. Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41: 881-890.

Lemus AE, Zaga V, Santillán R, García GA, Grillasca I, Damián-Matsumura P, Jackson KJ, Cooney AJ, Larrea F, Pérez-Palacios G. 2000. The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites. *J Endocrinol* 165: 693-702.

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: 249-256.

Lemus AE, Enríquez J, Hernández A, Santillán R, Pérez-Palacios G. 2009. Bioconversion of norethisterone, a progesterone receptor agonist into estrogen receptor agonists in osteoblastic cells. *J Endocrinol* 200: 199-206.

Lewis JS, Meeke K, Osipo C, Ross EA, Kidawi N, Li T, Bell E, Chandel NS, Jordan VC. 2005a. Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J Natl Cancer Inst* 97: 1746-1759.

Lewis JS, Osipo C, Meeke K, Jordan VC. 2005b. Estrogen-induced apoptosis in a breast cancer model resistant to long-term estrogen withdrawal. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94: 131-141.

Lewis MJ, Wiebe JP, Heathcote JG. 2004. Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer* 4:1-12.

Lewis-Wambi JS, Jordan VC. 2009. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit?. *Breast Cancer Res* 11: 206-217.

Moralí G, Lemus AE, Oropeza MV, García GA, Pérez-Palacios G. 1990. Induction of male sexual behavior by norethisterone: Role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacol Biochem Behav* 37: 477-484.

Moralí G, Lemus AE, Munguía R, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 2002. Hormone-like behavioral effects of levonorgestrel and its metabolites in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav* 73: 951-961.

Munsell MF, Sprague BL, Berry DA, Chisholm G, Trentham-Dietz A. 2014. Body mass index and breast cancer risk according to postmenopausal estrogen-progestin use and hormone receptor status. *Epidemiol Rev* 36: 114-136.

Navarro-Ibarra MJ, Caire-Juvera G, Ortega-Vélez MI, Bolaños-Villar AV, Saucedo-Tamayo M del S. 2015. Influence of reproductive factors, breastfeeding and obesity on the risk of breast cancer in Mexican women. *Nutr Hosp* 32: 291-298.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2014. Reporte Mundial de Cáncer. Nota descriptiva N° 224. Disponible en: [http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2014/pdfs/pr224\\_E.pdf](http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2014/pdfs/pr224_E.pdf)

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Disponible en: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.PROJNUMWORLD?lang=en>

Oropeza MV, Campos MG, Lemus AE, García GA, Pérez-Palacios G, Ponce-Monter H. 1994. Estrogenic actions of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. Induction of in vitro uterine sensitivity to serotonin. *Arch Med Res* 25: 307-310.

Pau Ni IB, Zakaria Z, Muhammad R, Abdullah N, Ibrahim N, Aina Emran N, Hisham Abdullah N, Syed Hussain SN. 2010. Gene expression patterns distinguish breast carcinomas from normal breast tissues: the Malaysian context. *Pathol Res Pract* 206: 223-228.

Penning TM. 2015. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Chem Biol Interact* 234: 236-246.

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-Palacios G, Cerbón MA, Pasapera AM, Castro JI, Enríquez J, Vilchis F, García GA, Morali G, Lemus AE. 1992. Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41: 479-485.

Pérez-Palacios G, Santillán R, García-Becerra R, Borja-Cacho E, Larrea F, Damián-Matsumura P, González L, Lemus AE. 2006. Enhanced formation of non-phenolic androgen metabolites with intrinsic oestrogen-like gene transactivation potency in human breast cancer cells. A distinctive metabolic pattern. *J Endocrinol* 190: 805-818.

Pollow K, Juchem M, Grill HJ, Elger W, Beier S, Schmidt-Gollwitzer K, Manz B. 1990. Lack of binding of gestodene to estrogen receptor in human breast cancer tissue. *Eur J Cancer* 26: 608-610.

Poulter NR, Chang CL, Farley TMM, Meirik O, Marmot MG. 1995. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *Lancet* 346: 1575-1582.

Rižner TL, Penning TM. 2014. Role of aldo-keto reductase family 1 (AKR1) enzymes in human steroid metabolism. *Steroids* 79: 49-63.

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* 27: 167-174.

Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ. 1995. Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: I. MCF-7 cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55: 423-437.

Seeger H, Wallwiener D, Mueck AO. 2003. The effect of progesterone and synthetic progestins on serum- and estradiol-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Horm Metab Res* 35: 76-80.

Smith H, Hughes GA, Douglas GH, Hartley D, Mcloughlin BJ, Siddall JB, Wendt GR, Buzby GC JR, Herbst DR, Ledig KW, Mcmenamin JR, Pattison TW, Suida J, Tokolics J, Edgren RA, Jansen AB, Gadsby B, Watson DH, Phillips PC. 1963. Totally synthetic -13-alkyl-3-hydroxy and methoxy-gona-1,3,5(10)-trien-17-ones and related compounds. *Experientia* 15: 394-396.

Sonalkar S, Schreiber CA, Barnhart KT. 2000 - 2014. Contraception. En: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDtext.com, Inc.

Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279148/>

Stanczyk FZ, Hapgood JP, Winer S, Mishell DR Jr. 2013. Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects. *Endocr Rev* 34: 171-208.

Stanczyk FZ, Archer DF. 2014. Gestodene: a review of its pharmacology, potency and tolerability in combined contraceptive preparations. *Contraception* 89: 242-252.

Stickland J, Tolowinska IY, Anthonng F, Dennis KJ. 1987. The suppression of ovarian function by the new oral contraceptive Femodene. *Contraception* 35: 447-456.

Suzuki T, Moriya T, Ariga N, Kaneko C, Kanazawa M, Sasano H. 2000. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: A correlation to clinicopathological parameters. *Br J Cancer* 82: 518-523.

Suzuki T, Darnel AD, Akahira J-I, Ariga N, Ogawa S, Kaneko C, Takeyama J, Moriya T, Sasano H. 2001.  $5\alpha$ -Reductases in human breast carcinoma: Possible modulator of in situ androgenic actions. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2250-2257.

van der Burg B, Kalkhoven E, Isbrücker 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.

van Vlijmen EFW, Mäkelburg ABU, Knol HM, Tichelaar VIGV, Kluin-Nelemans HC, Veeger NJGM, Meijer K. 2015. Clinical profile and recurrence rate in women with venous thromboembolism during combined hormonal contraceptive use: a prospective cohort study. *Br J Haematol* 24: 1-3.

Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, 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: 525-5231.

Vinogradova Y, Coupland C, Hippisley-Cox J. 2015. Use of combined oral contraceptives and risk of venous thromboembolism: nested case-control studies using the QResearch and CPRD databases. *BMJ* 26: 1-15.

Wiebe JP, Muzia D, Hu J, Szwajcer D, Hill SA, Seachrist JL. 2000. The 4-pregnene and  $5\alpha$ -pregnane progesterone metabolites formed in non tumorous and tumorous breast tissue have opposite effects on breast cell proliferation and adhesion. *Cancer Res* 60: 936-943.

Wiebe JP, Lewis MJ. 2003. Activity and expression of progesterone metabolizing  $5\alpha$ -reductase,  $20\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreductase and  $3\alpha$ ( $\beta$ )-hydroxysteroid oxidoreductases in tumorigenic (MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) and nontumorigenic (MCF-10A) human breast cancer cells. *BMC Cancer* 3: 1-15.

Wiebe JP, Rivas MA, Mercogliano MF, Elizalde PV, Schillaci R. 2015. Progesterone-induced stimulation of mammary tumorigenesis is due to the progesterone metabolite, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterone (5 $\alpha$ P) and can be suppressed by the 5 $\alpha$ -reductase inhibitor, finasteride. *J Steroid Biochem Mol Biol* 149: 27-34.

Wilde MI, Balfour AJ. 1995. Gestodene: a review of its pharmacology, efficacy and tolerability in combined contraceptive preparations. *Drugs* 59: 364-395.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAMA* 288: 321-333.