

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

CBS

**MECANISMOS ALTERNOS DE EXPRESIÓN  
DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DEL GESTODENO,  
UNA PROGESTINA SINTÉTICA DE TERCERA GENERACIÓN**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Biológicas**

**PRESENTA**

**QFB. ANA ELENA LEMUS BRAVO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER VELÁZQUEZ MOCTEZUMA**

**JUNIO DE 2002**

---

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y cuenta con apoyo del mismo Consejo por el Convenio PFP-20-93”

---



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA—IZTAPALAPA  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco  
aprobó la tesis que presentó

**ANA ELENA LEMUS BRAVO**

El día 22 de Mayo del año de 2002

Comité Tutorial:

Tutor: Dr. Javier Velázquez Moctezuma

Asesor: Dr. José Cortés Zorrilla

Asesor: Dr. Gustavo A. García de la Mora

Sinodal: Dra. Gabriela Morali de la Brena

Sinodal: Dr. Pablo A. Damián Matzumura

Five horizontal lines with handwritten signatures above them, corresponding to the names in the list to the left.

Los trabajos de investigación que constituyen esta Tesis se realizaron en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, con apoyo del Programa Especial en Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza; el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México; Contraceptive Research Development (CONRAD) MF6-99-46, Arlington, VA, EUA y de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (CBS) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.

---

Con especial agradecimiento a los Doctores:

Javier Velázquez Moctezuma, Profesor Titular "C" 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, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

por brindarme su apoyo incondicional para la realización de mi trabajo de Tesis.

Un sincero agradecimiento a los miembros del Comité Tutorial: Dr. José Cortés Zorrilla y Dr. Gustavo A. García de la Mora por el valioso tiempo que dedicaron a la supervisión del trabajo desarrollado.

Con gran afecto a la Dra. Gabriela Morali de la Brena y al Dr. Pablo Damián Matzumura por sus acertadas recomendaciones, que enriquecieron el contenido del documento de la tesis.

---

Agradezco al Dr. Gregorio Pérez-Palacios sus valiosos comentarios y sugerencias, así como sus aportaciones científicas que fueron de gran utilidad para la elaboración del trabajo de Tesis.

Mi reconocimiento a la M. en C. Verónica Zaga Clavellina, al Biol. Exp. René Santillán Ballesteros y a la M. en C. Rocío García Becerra, quienes con su interés, dedicación y gran capacidad para la realización de su trabajo, contribuyeron al logro de los objetivos de esta Tesis.

---

Con cariño y respeto, agradezco a todos mis Maestros y Maestras su generosidad al compartir conmigo sus experiencias y conocimientos.

Con eterna gratitud y cariño al Dr. Carlos Gual Castro mi querido y respetado Maestro, quien con sus enseñanzas y ejemplo me introdujo en el fascinante mundo de la investigación científica

Mi cariño y agradecimiento a alumnos y alumnas por el afecto que siempre me han manifestado, y por las valiosas enseñanzas que recibo de ellos y ellas, día con día.

---

Con todo mi amor a Goyo, mi compañero insustituible en la ciencia y en la vida.

Con inmenso amor a mis hijos Ana Elena y Eduardo por su cariño, ternura,  
compañía y apoyo sin límite.

Ana Cristina, ilusión hecha realidad.

A la adorada memoria de mi Madre

---



# ÍNDICE

	PÁGINA
<b>1. RESUMEN</b>	<b>11</b>
<b>2. SUMMARY</b>	<b>16</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>21</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b>	<b>29</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>35</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>36</b>
<b>7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>36</b>
<b>8. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>38</b>
<b>9. MATERIALES</b>	<b>39</b>
<b>9.1. Material Biológico</b>	<b>39</b>
<b>9.2. Material Radiactivo</b>	<b>40</b>
<b>9.3. Esteroides Radioinertes</b>	<b>41</b>
<b>9.4. Reactivos y Disolventes</b>	<b>41</b>
<b>10. MÉTODOS</b>	<b>42</b>
<b>10.1. PROCESOS EXPERIMENTALES</b>	<b>42</b>
<b>10.1.1. Síntesis de derivados 5<math>\alpha</math>-reducidos de Gestodeno (GSD)</b>	<b>42</b>
<b>10.1.2. Metabolismo in vitro de GSD-[<sup>3</sup>H] y GSD-[<sup>14</sup>C] en órganos blanco a la acción hormonal</b>	<b>43</b>
<b>10.1.3. Interacción de GSD y de sus metabolitos 5<math>\alpha</math>-reducidos, con los receptores intracelulares de estrógenos</b>	<b>47</b>

---

10.1.4. Determinación de la actividad estrogénica del GSD y sus metabolitos reducidos en el anillo A, en un sistema de expresión en células HeLa	51
10.1.5. Inducción del receptor intracelular estrógeno-dependiente de progesterona, en la hipófisis anterior de la rata hembra adulta castrada	60
<b>11. RESULTADOS</b>	<b>63</b>
11.1. Síntesis de 5 $\alpha$ -dihidro GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro GSD	63
11.2. Formación enzimática de metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de GSD	65
11.3. Características de la unión al equilibrio del receptor intracelular de estrógenos	73
11.4. Estereoespecificidad de la unión del GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos al receptor de estrógenos	75
11.5. Transactivación del sistema de expresión en células HeLa, por los tetrahidros 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ del GSD	77
11.6. Características de la unión del receptor estrógeno-dependiente de progesterona, inducido por el tetrahydro 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD	80
<b>12. DISCUSIÓN</b>	<b>83</b>
<b>13. CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>97</b>
<b>15. PUBLICACIONES</b>	<b>109</b>

---

## 1. RESUMEN

El Gestodeno (GSD;  $13\beta$ -etil- $17\alpha$ -etínil- $17\beta$ -hidroxi-4,15-gonadien-3-ona) es la progestina sintética mas potente disponible actualmente y se utiliza en diversas formulaciones farmacéuticas como agente regulador de la fertilidad debido a su gran efectividad, seguridad y aceptabilidad entre las usuarias. Las observaciones clínicas y experimentales de que el GSD puede ejercer efectos hormonales de tipo estrogénico, además de su efecto progestacional, motivaron la realización del presente estudio de investigación, orientado a esclarecer el o los mecanismos por los cuales el GSD induce efectos estrogénicos después de su administración, aun cuando esta molécula esteroide sintética es incapaz de interactuar con los receptores intracelulares de estrógenos y tiene impedimentos estéricos para bioconvertirse *in vivo* a estrógenos, a través de aromatización enzimática.

La hipótesis de trabajo que sustenta los estudios experimentales de esta investigación, establece que los efectos de tipo estrogénico observados después de la administración de grandes dosis de GSD son mediados a través de sus metabolitos reducidos en el anillo A, los cuales son formados en órganos hormono-sensibles e interactúan específicamente y con una alta afinidad de unión relativa, con los receptores intracelulares de estrógenos a través de los cuales se activan genes estrógeno-dependientes.

Con el objeto de establecer si el GSD, al igual que otras progestinas de la serie 19-nor, se biotransforma, a nivel de órganos blanco, a diversos metabolitos reducidos en el anillo A, se incubaron homogeneizados de hipotálamo e hipófisis anterior de ratas hembras adultas castradas y de próstata de ratas machos castrados, con diferentes concentraciones de GSD- $^3\text{H}$  y GSD- $^{14}\text{C}$ , a diferentes pH, en presencia y ausencia de NADPH. La separación, purificación e identificación de los metabolitos de GSD formados durante las incubaciones, se realizó por el método de dilución isotópica inversa, que incluye cromatografía en placa fina en dos sistemas de disolventes de diferente polaridad y cristalizaciones repetidas de los productos aislados, hasta la obtención de actividad específica constante. Una serie de incubaciones bajo las mismas condiciones experimentales, empleando testosterona- $^3\text{H}$  como sustrato radiactivo, se utilizó como control positivo, mientras que incubaciones en ausencia de tejido fueron los controles negativos. Los resultados obtenidos demostraron que el GSD se biotransformó a los derivados  $5\alpha$ -dihidroGSD ( $5\alpha\text{GSD}$ ),  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroGSD ( $3\alpha,5\alpha\text{GSD}$ ) y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahydroGSD ( $3\beta,5\alpha\text{GSD}$ ), mostrando la actividad de las enzimas  $5\alpha$ -esteroide reductasas y  $3\alpha$ - y  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas en los tejidos estudiados. La biotransformación del GSD a  $5\alpha\text{GSD}$  se observó en las incubaciones de las hipófisis e hipotálamos de rata, únicamente a pH de 7.4, demostrando la actividad de la  $5\alpha$ -reductasa tipo 1. En contraste, en las incubaciones de próstata el derivado  $5\alpha$ -reducido del GSD se formó tanto a pH de 4.8 como de 7.4, lo cual demostró la actividad de las  $5\alpha$ -esteroide reductasas tipo 1 y tipo 2. En todos los tejidos estudiados la actividad de la  $5\alpha$ -esteroide reductasa fue

dependiente del cofactor NADPH. El hallazgo más importante en estos experimentos fue la formación de  $3\alpha,5\alpha$ GSD y  $3\beta,5\alpha$ GSD, lo cual concuerda con la demostración previa de que otras progestinas sintéticas anticonceptivas de la serie 19-nor, como la Noretisterona y el Levonorgestrel, estructuralmente semejantes al GSD, exhiben un patrón metabólico similar.

La estereoespecificidad de la unión del GSD y sus derivados reducidos en el anillo A, con el receptor intracelular de estrógenos (RE) se estudió por medio de un análisis de competencia, incubando el citosol del útero de ratas hembras prepúberes, como fuente de receptores de estrógenos, con estradiol- $^3\text{H}$  ( $\text{E}_2$ - $^3\text{H}$ ) como radioligando específico, en presencia de concentraciones crecientes de los esteroides competidores radioinertes: estradiol ( $\text{E}_2$ ), GSD,  $5\alpha$ GSD,  $3\alpha,5\alpha$ GSD y  $3\beta,5\alpha$ GSD. La afinidad de unión relativa y la constante de inhibición de los esteroides estudiados, confirmaron que el GSD no se une al RE y demostraron que el derivado reducido  $3\beta,5\alpha$  y, en menor proporción, su epímero  $3\alpha,5\alpha$  interactúan con el RE, aunque con una afinidad de unión significativamente menor que la del  $\text{E}_2$ .

La capacidad de diferentes concentraciones de GSD y de sus derivados dihidro y tetrahidro reducidos para inducir actividades biológicas de tipo estrogénico, se estudió en un sistema de expresión en células HeLa co-transfectadas transitoriamente con los genes de los receptores humanos de estrógenos tipo  $\alpha$  ó tipo  $\beta$ , como vectores de expresión, y como vector reportero al gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) fusionado con elementos que responden a estrógenos. Los

resultados demostraron que el  $3\beta,5\alpha$ GSD y en menor proporción el  $3\alpha,5\alpha$ GSD, activaron en forma dosis-respuesta la transcripción de los genes reporteros de CAT en las células HeLa, a través del receptor humano de estrógenos tipo  $\alpha$  ( $R\alpha E$ ), mientras que el GSD y el  $5\alpha$ GSD fueron completamente inactivos. En forma por demás interesante, los metabolitos  $3\beta,5\alpha$  y  $3\alpha,5\alpha$  del GSD fueron incapaces de inducir la transactivación de CAT a través del receptor de estrógenos humano tipo  $\beta$  ( $R\beta E$ ).

La potencia estrogénica del  $3\beta,5\alpha$ GSD para inducir *in vivo* el receptor de progesterona dependiente de estrógenos (RP) en la hipófisis anterior de la rata hembra adulta castrada, se determinó después de administrar a los animales, durante seis días consecutivos, tres diferentes dosis (0.5, 1.0 y 1.5 mg/día) del metabolito reducido del GSD. Las características del RP, inducido por la administración de las dosis más altas del  $3\beta,5\alpha$ GSD, se determinaron empleando un gradiente lineal de sacarosa. El coeficiente de sedimentación (7-9 S) de los complejos formados después de la incubación de alícuotas del citosol de las hipófisis anteriores con ORG 2058- $^3$ H], fue idéntico al inducido con el tratamiento con benzoato de estradiol ( $BE_2$ ), utilizado como control experimental positivo. Los resultados demostraron un incremento significativo, dosis-respuesta, del RP en la hipófisis anterior de las ratas tratadas con el derivado  $3\beta, 5\alpha$ GSD, en comparación con los obtenidos en los animales utilizados como controles negativos a los cuales se

les administró únicamente el vehículo. Sin embargo, el incremento inducido por el  $3\beta,5\alpha$ GSD fue significativamente menor al inducido con el  $BE_2$ .

El análisis integral de los resultados obtenidos en este estudio, confirmó la hipótesis de trabajo propuesta al demostrar la relevancia del metabolismo periférico del GSD como modulador de sus efectos de tipo estrogénico. Los hallazgos experimentales claramente revelaron que la bioconversión de GSD a sus metabolitos reducidos  $3\beta,5\alpha$  y  $3\alpha,5\alpha$  es esencial para inducir la transactivación de genes dependientes de estrógenos, a través de su unión al  $R\alpha E$ . El estudio también demostró que la potencia de los metabolitos del GSD para inducir efectos estrogénicos, fue significativamente menor que la observada con el  $E_2$ . En conjunto, los resultados obtenidos en la serie de experimentos realizados, permitieron dar cumplimiento a los objetivos general y específicos planteados al inicio del estudio, ampliando el conocimiento de los mecanismos de acción hormonal de la progestina anticonceptiva Gestodeno.

## 2. SUMMARY

Gestodene (GSD;  $13\beta$ -ethyl- $17\alpha$ -ethynyl- $17\beta$ -hydroxy-4,15-gonadien-3-one) is the most potent synthetic progestin currently available and it is widely used as a fertility regulating agent in a number of contraceptive formulations because of its high effectiveness, safety and acceptability. The observations that this contraceptive synthetic progestin exerts estrogen-like effects besides that of its progestational activity, prompted the conduction of the present investigation to understand the underlying mechanisms through which GSD administration induces estrogenic effects, even though this synthetic steroid molecule neither interacts with intracellular estrogen receptors (ER) nor undergoes *in vivo* aromatization.

The research hypothesis behind the rationale and experimental studies of this work establishes that the slight estrogen-like effects observed after GSD administration are exerted by its enzyme-formed A-ring reduced derivatives, at peripheral organs, which specifically bind with a high relative affinity to the active site of the ER, and are able to transactivate estrogen-regulated genes at hormone sensitive tissues.

To assess whether GSD, like other 19-nor synthetic progestins, could be biotransformed to non-phenolic metabolites with intrinsic estrogenic potency, at the target organ level, homogenates of castrated female rat anterior pituitaries and hypothalami, as well as castrated male rat ventral prostates were incubated *in vitro* with different concentrations of [ $^3\text{H}$ ]- and [ $^{14}\text{C}$ ]-labeled GSD at different pH, in the



presence or absence of the cofactor NADPH. The isolation, purification and identification of GSD metabolites were done by a reverse isotope dilution technique which included thin layer chromatography in, at least, two different systems and repeated crystallizations to obtain constant specific activity. Incubations of rat anterior pituitaries, hypothalami and ventral prostates homogenates with [<sup>3</sup>H]-testosterone, under identical experimental conditions, were used as positive controls, while tissue-free incubations served as negative controls. The results provided evidence that GSD was extensively metabolized to A-ring reduced derivatives in the steroid hormone-sensitive tissues studied. The formation of radioactive 5 $\alpha$ -dihydroGSD (5 $\alpha$ GSD), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroGSD (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD) and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydroGSD (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD) was demonstrated, thus indicating that GSD is an adequate substrate for 5 $\alpha$ -steroid reductases and 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. The bioconversion of GSD to 5 $\alpha$ GSD in the rat pituitary and hypothalamus occurred only at pH 7.4, whereas a lack of biotransformation of GSD was observed when incubations were performed at pH 4.8, thus indicating the activity of 5 $\alpha$  reductase type 1 only. In contrast, 5 $\alpha$ GSD was the major product obtained in rat ventral prostate incubations at both pH 7.4 and 4.8, indicating the presence of 5 $\alpha$ -steroid reductase type1 and 5 $\alpha$ -steroid reductase type 2, respectively. In all tissue incubations the activity of 5 $\alpha$ -steroid reductase was NADPH dependent.

The most important finding in these studies was the isolation and identification of 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD in the three target organs, which is in line with previous

reports indicating that other synthetic 19-nor contraceptive progestins, exhibit a similar metabolic conversion pattern.

To investigate whether the estrogen-like effects of GSD are mediated by some of its A-ring reduced metabolites, a series of experimental studies were undertaken using different biochemical and molecular approaches. First of all, the stereospecificity of the binding of GSD and its 5 $\alpha$ -reduced metabolites to the intracellular ER was assessed by competition analysis. The relative binding affinity and the inhibition constant of GSD and its derivatives to ER were determined in aliquots of immature rat uterine cytosol, incubated with [<sup>3</sup>H]-estradiol as radioligand, in the presence of increasing concentrations of radioinert GSD, 5 $\alpha$ GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD and estradiol (E<sub>2</sub>). The results confirmed that indeed GSD does not bind to the ER and demonstrated that its tetrahydro 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  derivative and, to a lesser extent, its 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  epimer interacted with a high relative affinity with the ER, though with a significantly lower binding affinity than naturally occurring E<sub>2</sub>.

The ability of increasing concentrations of GSD and its A-ring reduced derivatives to induce estrogenic activities were evaluated in HeLa cells transiently transfected with an expression vector, for either human ER $\alpha$  (hER $\alpha$ ) or human ER $\beta$  (hER $\beta$ ) genes and estrogen responsive elements fused to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene. The results demonstrated that 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD were able to activate, in a dose dependent manner, the hER $\alpha$ -mediated but not the hER $\beta$ -mediated transcription of the CAT reporter gene in the HeLa cells expression system. The 3 $\beta$

derivative of GSD exhibited a significantly higher estrogenic effect than its 3 $\alpha$  isomer, while unchanged GSD and 5 $\alpha$ GSD were completely ineffective. However, It must be stressed that the potency of the GSD reduced metabolites to transactivate the CAT reporter gene was significantly lower than that of naturally occurring E<sub>2</sub>

The *in vivo* estrogenic potency of 3 $\beta$ GSD was also assessed by its capability to induce estrogen-dependent progesterin receptors (PR) in the anterior pituitary of castrated female rats, after administration of three different doses (0.5, 1.0 and 1.5 mg/day) for 6 consecutive days. The characteristics of PR induced by the highest doses of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD were determined using a sucrose gradient labeling technique. The sedimentation coefficient (7-9 S) of the complexes formed after incubation of aliquots of anterior pituitaries cytosol with [<sup>3</sup>H]-ORG 2058 were identical to that induced by estradiol benzoate (E<sub>2</sub>B) used as experimental control. The results showed a significant dose-dependent increase of PR in the anterior pituitaries of castrated rats, as compared to vehicle treated animals, though with significantly lower potency than that observed after administration of E<sub>2</sub>B.

The overall results confirmed the proposed hypothesis that peripheral metabolism of Gestodene modulates its hormone-like effects and pointed out the relevance of the biotransformation of GSD to 3 $\beta$ GSD and its 3 $\alpha$  isomeric alcohol, which specifically bind to the ER and possess a weak intrinsic estrogenic activity. The data also contribute to a better understanding of the GSD mechanisms of action and allow to

conclude that the slight estrogen-like effects attributable to GSD are indeed mediated by its non phenolic, tetrahydro reduced metabolites.

### 3. INTRODUCCIÓN

La incorporación de la terapia anticonceptiva hormonal oral a la práctica médica en el siglo XX constituyó un parteaguas en la historia de la humanidad, ya que permitió implementar, a partir de 1960, programas de planificación familiar en países en desarrollo para enfrentar con éxito el acelerado crecimiento de la población mundial, al tiempo que contribuyó a mejorar la salud reproductiva y a incrementar la calidad de vida de las mujeres (Boongarts, 1986).

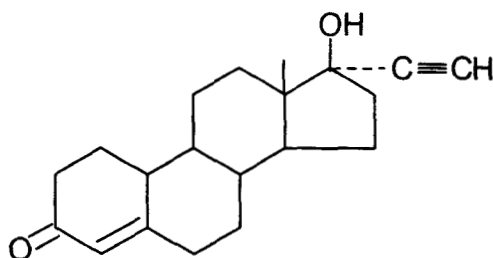
La interesante historia del origen de la denominada “píldora anticonceptiva” se inició a finales del siglo XIX con las observaciones de Beard (1897) en Escocia y un año más tarde las de Prenant (1898) en Francia, de que durante el embarazo no ocurrían ovulaciones. En ese mismo año en Suiza, el Profesor Zschokke (1898), realizó otra aportación importante al conocimiento de los mecanismos que regulan la ovulación al informar una práctica ejercida por los veterinarios de su país quienes, para restablecer los ciclos estrales y la fecundidad post-parto en el ganado bovino, trituraban manualmente a través del recto, los cuerpos lúteos persistentes.

Aún cuando en Austria, durante la primera guerra mundial, Herrmann y Stein (1916) informaron la supresión de la ovulación en ratas a las que les administraban extractos lipídicos, obtenidos de cuerpos lúteos, fue sin duda el Profesor Haberlandt, en Alemania quien, basado en observaciones clínicas y experimentales en animales, adelantó el concepto de la regulación hormonal de la fertilidad, al señalar explícitamente que las hormonas del cuerpo lúteo y de la placenta ofrecían una

excelente opción para inducir un estado de esterilización temporal (Haberlandt, 1924).

La contribución de Corner y Allen (1929) al desarrollar un método bioanalítico para cuantificar actividad progestacional, fue fundamental para el aislamiento y caracterización de la progesterona, hormona producida por el cuerpo lúteo (Butenandt y Westphal 1934; Hartman y Wettstein, 1934, Slota y cols., 1934; Wintersteiner y Allen, 1934). Tres años más tarde, Makepeace y sus colaboradores (1937) demostraron que esta hormona esteroide natural inhibía la ovulación en conejas. Posteriormente, se dio evidencia de que la progesterona al administrarse por vía oral, era rápidamente metabolizada a nivel hepático, lo cual obligaba a utilizar concentraciones supra-farmacológicas para producir efectos hormonales, por lo que era necesario disponer de moléculas esteroides con actividad progestacional y que fueran activas por vía oral. Esta demanda dio paso a la siguiente etapa en la historia de la píldora anticonceptiva, que fue el desarrollo de la investigación química en esteroides, en busca de una progestina sintética que no estuviera expuesta a la degradación catabólica, como ocurría con la hormona natural. Esta etapa se inicia en 1938 con el grupo de Inhoffen, en Alemania, quienes observaron que la incorporación de un grupo etinilo en el carbono 17, en orientación  $\alpha$ , a las moléculas de estradiol ( $E_2$ ) o de testosterona (T), las convertía en hormonas activas por vía oral (Inhoffen y cols., 1938). En 1944 Ehrenstein y Allen, en la Universidad de Pensilvania, demostraron que la administración oral de un estereoisómero de la 19-norprogesterona (14-iso-17-iso-19-norprogesterona) exhibía una potente actividad

progestacional por vía oral. Con estos antecedentes, el grupo de investigación de Syntex de México, dirigido por el Dr. George Rosenkranz, tomó la recta final en la carrera por la búsqueda de una progestina sintética activa por vía oral. En octubre de 1951 los químicos Carl Djerassi, Luis E. Miramontes y George Rosenkranz, al reducir con el método de Birch (1950) a la 3-metoxi estrona y la introducción posterior de un grupo etinilo, lograron con éxito la síntesis de la 17 $\alpha$ -etinil-19-nortestosterona, conocida genéricamente como Noretisterona o Noretindrona (NET) (Djerassi y cols., 1952; Djerassi y cols., 1954), que fue la primera progestina sintética activa por vía oral (Fig. 1) y un componente fundamental de los anticonceptivos hormonales orales (Pérez-Palacios y Garza-Flores, 1994), escribiendo así una de las páginas más brillantes de la historia científica contemporánea (Diczfalusy, 1997), con la que dio inicio la primera revolución en tecnología anticonceptiva.



**Figura 1.**

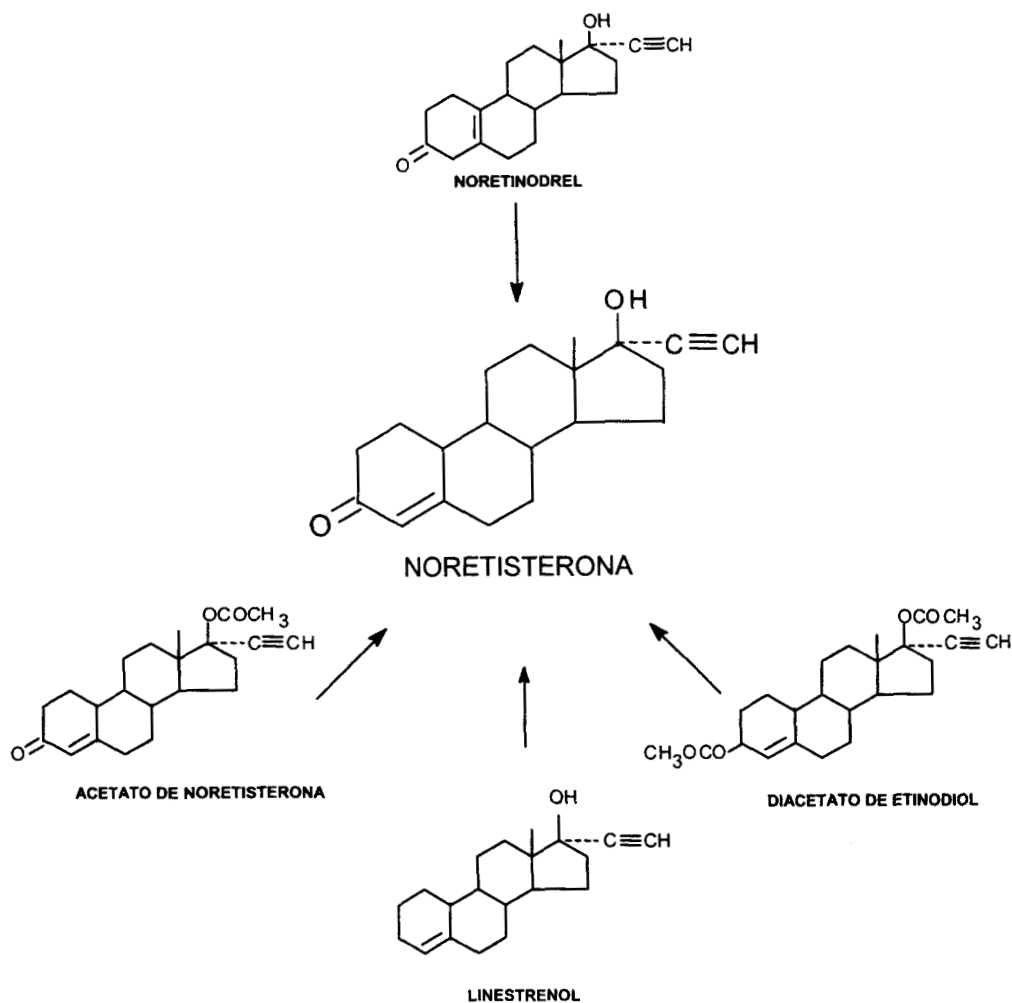
Estructura química de Noretisterona, primera progestina sintética activa por vía oral, con la que se inicia la era de la anticoncepción hormonal.

Años más tarde, F.B. Colton (1955), en los laboratorios Searle, en los Estados Unidos de Norteamérica, sintetizó otro compuesto de la serie 19-nor, el Noretinodrel, el cual es un isómero estructural de la NET, con la diferencia en que el doble enlace, en lugar de estar entre los carbonos 4 y 5, está entre los carbonos 5 y 10 (Fig. 2). Sin embargo, es importante señalar que el Noretinodrel requiere convertirse a NET para ejercer su actividad progestacional.

Hacia finales de la década de los años 50 se sintetizaron otras tres progestinas, también de la serie 19-nor: la primera, fue el Acetato de Noretisterona (Fig. 2) producida por los Laboratorios Schering de Berlín; la segunda, sintetizada en los laboratorios Organon en Holanda, fue el Linestrenol, cuya molécula carece del átomo de oxígeno en el carbono 3 (Fig. 2) y la tercera, el Diacetato de Etinodiol, producida en los laboratorios Searle en los Estados Unidos de Norteamérica (Fig. 2). Todos estos compuestos 19-nor integran la primera generación de progestinas sintéticas y es interesante señalar que al igual que el Noretinodrel, para ejercer sus efectos biológicos requieren, bioconvertirse a NET. después de su administración.

En esos mismos años se sintetizaron otras progestinas, derivadas de la 17-hidroxiprogesterona, como el Acetato de Medroxiprogesterona, el Acetato de Clormadinona y el Acetato de Megestrol (Fig. 3), que también se utilizaron en formulaciones anticonceptivas. El Acetato de Medroxiprogesterona permitió el desarrollo



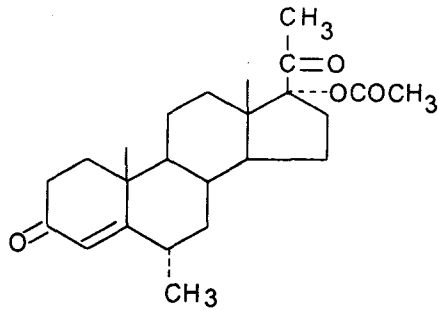


**Figura 2.**

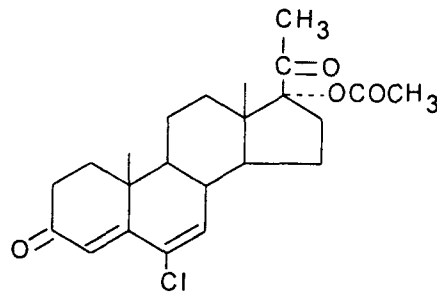
Progestinas sintéticas derivadas de la 19-nortestosterona utilizadas en la primera generación de formulaciones anticonceptivas hormonales orales. Las progestinas Noretinodrel, Acetato de Noretisterona, Diacetato de Etinodiol y Linestrenol, requieren bioconvertirse a Noretisterona, después de su administración, para ejercer sus efectos biológicos.

de métodos inyectables para la regulación de la fertilidad (Depoprovera) (Coutinho, 1966; Garza-Flores y cols., 1992), mientras que el Acetato de Clormadinona sirvió de base para el desarrollo de la "minipíldora" (Martínez-Manaoutou, 1967), una estrategia innovadora que empleaba minidosis de la progestina. Este mismo

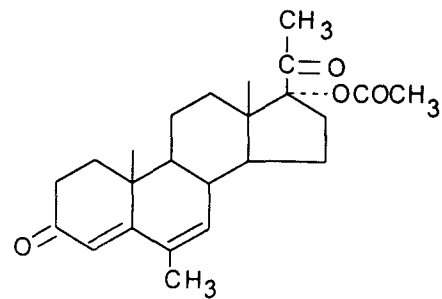
concepto ha sido utilizado recientemente en el desarrollo de los implantes subdérmicos anticonceptivos.



ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA



ACETATO DE CLORMADINONA

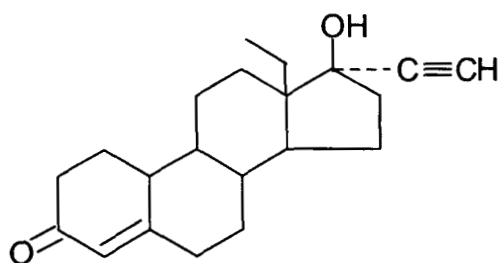


ACETATO DE MEGESTROL

Figura 3.

Progestinas sintéticas derivadas del Acetato de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona, empleadas en formulaciones anticonceptivas hormonales orales. El Acetato de Medroxiprogesterona se utiliza actualmente en formulaciones anticonceptivas inyectables de larga acción.

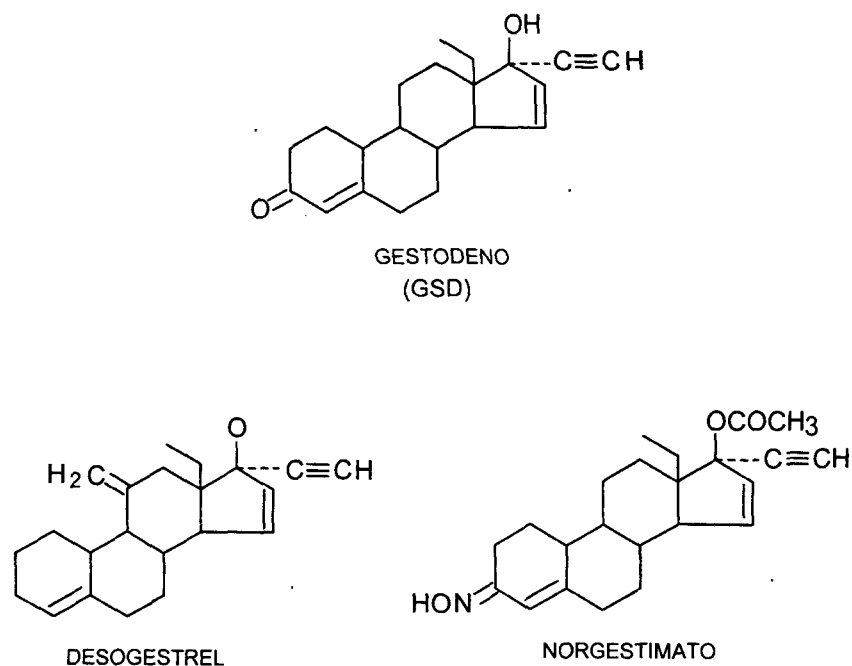
Los avances posteriores en el desarrollo de nuevas moléculas de progestinas de la serie 19-nor, condujeron a la síntesis total del D(l)-norgestrel, conocido como Levonorgestrel (LNG) (Fig. 4) (Smith y cols., 1963), que es una progestina muy potente que se ha utilizado ampliamente en diversas formulaciones farmacéuticas (Crabbé y cols., 1983; Ball y cols., 1991; Johannisson y cols., 1991; Sivin y Stern, 1994; Cravioto y cols., 1997) y forma parte de la segunda generación de progestinas sintéticas de la serie 19-nor.



**Figura 4.**

Estructura molecular de Levonorgestrel (LNG), progestina 19-nor de síntesis total utilizada en formulaciones de la segunda generación de anticonceptivos hormonales orales. Actualmente el LNG se utiliza en implantes subdérmicos anticonceptivos y en anticoncepción de emergencia.

En años recientes, se ha sintetizado otro grupo de esteroides 19-nor, con potente actividad progestacional como el Gestodeno (GSD), el Desogestrel y el Norgestimato (Fig. 5), que constituyen la tercera generación de progestinas sintéticas 19-nor, entre las que destaca el Gestodeno, por ser actualmente la molécula disponible con mayor actividad progestacional (Fotherby y Caldwell, 1994; Wilde y Balfour, 1995).



**Figura 5.**

Fórmulas estructurales de progestinas sintéticas 19-nor utilizadas en la formulación de anticonceptivos hormonales orales de la tercera generación. El Desogestrel, después de su administración, requiere bioconvertirse a su metabolito activo 3-ceto Desogestrel. El derivado 3-ceto Desogestrel se utiliza actualmente en implantes subdérmicos anticonceptivos.

El advenimiento de las progestinas sintéticas permitió el desarrollo de una amplia variedad de métodos y estrategias para la regulación de la fertilidad, como la anticoncepción oral o inyectable, dispositivos intrauterinos, anillos vaginales medicados, implantes anticonceptivos subdérmicos y, recientemente, la anticoncepción de emergencia.

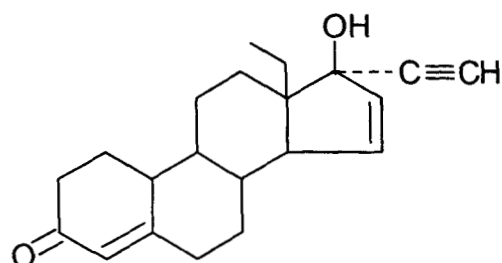
#### 4. ANTECEDENTES

En la actualidad, las progestinas sintéticas derivadas de la 19 nor-testosterona (19-norT), son las más usadas en terapia anticonceptiva. Las modificaciones químicas a la molécula de la 19-norT, han dado origen a diversos compuestos con actividad progestacional cada vez más potente y con menores efectos colaterales. Los cambios químicos han modificado de tal forma la actividad biológica de la molécula original, que la administración de las diferentes progestinas sintéticas es capaz de inducir, además del efecto biológico de tipo progestacional, efectos hormonales muy diversos que incluyen: actividades androgénicas, estrogénicas, glucocorticoides e incluso antihormonales (Zarrow y cols., 1958; Hilliard y cols., 1966; Bullock y Bardin 1977; Bullock y cols., 1978; Larrea y cols., 1983; Pérez-Palacios y cols., 1992).

Una serie de estudios realizados por nuestro grupo de investigación, orientados a esclarecer los mecanismos de acción responsables de la expresión de los múltiples efectos de tipo hormonal de NET, demostraron que esta progestina, a nivel periférico, se biotransforma a compuestos reducidos en el anillo-A de la molécula, como la 5 $\alpha$ -dihidro NET y los tetrahidros 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  NET, y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  NET (Larrea y cols., 1987). El estudio de la interacción de NET y de sus productos 5 $\alpha$ -reducidos, con los receptores intracelulares para hormonas esteroides (Chávez y cols., 1985) demostró que la diversidad de efectos biológicos observados después de la administración de NET, es debida a la capacidad de esta progestina y de cada uno de sus metabolitos para unirse en forma específica con los diferentes receptores intracelulares de hormonas

esteroides y expresar efectos hormonales agonistas o antagonistas (Larrea y cols., 1984 ; Vilchis y cols., 1986). Estos hallazgos permitieron esclarecer que el efecto estrogénico potente observado después de la administración de NET, la cual no es capaz de unirse a los receptores intracelulares de estrógenos ni de aromatizarse enzimáticamente, es inducido por el metabolito  $3\beta,5\alpha$ -reducido que se une con una afinidad relativamente alta al receptor intracelular de estrógenos y es capaz de producir efectos típicamente estrogénicos (Chávez y cols., 1985; Vilchis y cols., 1986; Larrea y cols., 1984; Morali y cols., 1990).

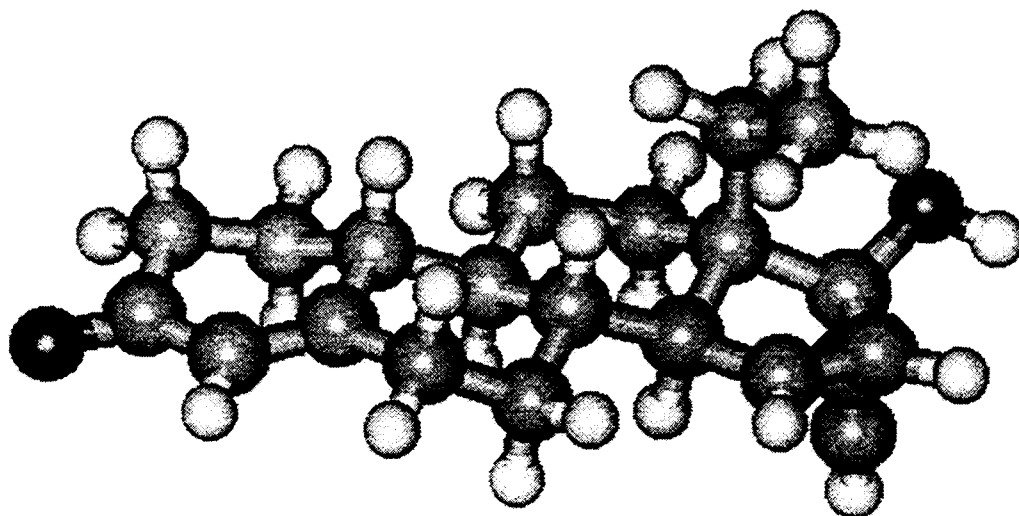
Resultados similares se obtuvieron al estudiar el mecanismo de acción de Levonorgestrel (LNG), una progestina sintética de “segunda generación” (Smith y cols., 1963) que exhibe mayor potencia progestacional que la NET pero induce efectos de tipo estrogénico muy débiles (Edgren y cols., 1963). El metabolismo de LNG a nivel de órganos blanco fue similar al de NET en cuanto a la formación de los derivados reducidos  $5\alpha$ -dihidro LNG y  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro LNG y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro LNG (Lemus y cols., 1992). La diferencia más significativa de los metabolitos de LNG con respecto a los de NET fue la baja afinidad de unión relativa de sus derivados tetrahidro-reducidos con el receptor de estrógenos (Lemus y cols., 1992), lo cual permitió explicar el débil efecto de tipo estrogénico observado después de la administración de LNG (Santillán y cols., 2001). Esta serie de estudios experimentales pone de manifiesto la importancia del metabolismo periférico de las progestinas en la modulación de la expresión de sus efectos biológicos.



**Figura 6.**

Estructura química del Gestodeno, la progestina sintética más potente actualmente empleada en formulaciones anticonceptivas orales de tercera generación.

Las progestinas de “tercera generación” como el derivado  $\Delta^{15}$  del LNG (13 $\beta$ -etil-17 $\alpha$ -etnil,17 $\beta$ -hidroxi-4,15-gonadieno-3-ona), denominado Gestodeno (GSD) (Fig. 6) (Hofmeister y cols., 1986), son las que exhiben la mayor potencia progestacional. La actividad antigonadotrófica y la efectividad del GSD para inhibir la ovulación se han demostrado en una diversidad de estudios (Stickland y cols., 1987; Jung-Hoffmann y cols., 1988; Wilde y Balfour, 1995; Kuhl 1996). Sin embargo, la presencia del doble enlace en el anillo D del GSD (Fig. 7) le confiere a la molécula características especiales en su interacción con los receptores de hormonas esteroideas, así como en sus efectos endocrinológicos y farmacológicos (Fotherby y Caldwell, 1994).



**Figura 7.**

Estructura espacial de la molécula de Gestodeno

El informe en la literatura de los resultados de diversos estudios experimentales en los que se demostró que la adición de dosis altas de GSD a cultivos de células MCF-7, derivadas de cáncer mamario estrógeno-dependiente (Catherino y cols., 1993; Schoonen y cols., 1995a) y T47D de carcinoma mamario ductal (Schoonen y cols., 1995b), fue capaz de inducir el crecimiento y la proliferación de las células mantenidas en cultivo y el hecho de que tanto el crecimiento como la proliferación de las células MCF-7, inducidos por el GSD pudieron ser bloqueados con antiestrógenos como el ICI 164,384, pero no con una antiprogestina como el RU-486 (Catherino y



cols., 1993), sugiere fuertemente una actividad de tipo estrogénico ejercida por el GSD.

Estudios epidemiológicos recientes han señalado que los anticonceptivos hormonales orales que contienen GSD, a diferencia de los que contienen LNG, inducen un incremento de 1.5 a 2 veces en el riesgo de tromboembolismo venoso profundo, incluyendo infarto pulmonar (Poulter y cols., 1995; Farley y cols., 1995), por lo que algunas agencias nacionales de regulación de medicamentos han emitido recomendaciones de precaución en su uso. Estos hallazgos epidemiológicos han originado una gran controversia debido a que se conoce que el GSD es incapaz de interactuar con el receptor intracelular de estrógenos para expresar efectos de tipo estrogénico (Düsterberg y cols., 1987) y que la ausencia del metilo angular del carbono 10, impide su aromatización enzimática (Gual y cols., 1962).

Algunos estudios de biotransformación y eliminación del GSD en humanos han demostrado que esta progestina es bioconvertida a un gran número de metabolitos de gran polaridad, producidos por procesos de oxidación y reducción, sin embargo, la naturaleza de estos metabolitos, incluyendo los reducidos en el anillo-A, solo ha sido parcialmente establecida (Düsterberg y cols., 1987).

Es importante destacar que aun se desconoce el destino metabólico del GSD al nivel de órganos blanco y el papel que sus productos de conversión metabólica pueden

jugar en la expresión de los diferentes efectos hormonales inducidos por la administración de GSD.

Tomando ventaja de mi experiencia de más de 15 años de trabajo en el estudio del metabolismo y los mecanismos íntimos de acción de las progestinas sintéticas, y con base en la información proporcionada por los estudios epidemiológicos, resultó interesante realizar una serie de estudios experimentales que permitieran, por una parte, aclarar la controversia actual en la expresión de los efectos hormonales no progestacionales de las progestinas sintéticas, particularmente los de tipo estrogénico del GSD y, por otra, ampliar nuestro conocimiento del mecanismo de acción de esta potente progestina anticonceptiva.

## 5. JUSTIFICACIÓN

En los últimos 5 años, los resultados de estudios clínicos y epidemiológicos sobre los efectos del Gestodeno, progestina sintética de tercera generación utilizada en formulaciones anticonceptivas por millones de mujeres en el mundo, han sugerido que existe un incremento en el riesgo de trombosis venosa profunda en usuarias de esta progestina, lo cual se ha interpretado como una actividad de tipo estrogénico inducida por este esteroide sintético de la serie 19-nor. En apoyo a estos estudios, recientemente se ha demostrado que el Gestodeno, a muy altas concentraciones, es capaz de incrementar la proliferación de células derivadas de cáncer mamario humano estrógeno-dependiente, mantenidas en cultivo, efecto que es inhibido por antiestrógenos pero no por antiprogestinas. Estas observaciones han creado una gran controversia debido a que se ha demostrado que la molécula del Gestodeno no es capaz de interactuar con el receptor intracelular de estrógenos y que la ausencia del metilo angular C-19 le impide bioconvertirse a estrógenos. La ausencia de estudios bioquímicos y moleculares que permitan conocer el destino metabólico del Gestodeno a nivel de órganos blanco, así como los mecanismos por los cuales es capaz de inducir, después de su administración, efectos de tipo estrogénico, que podrían poner en riesgo la salud de las usuarias de esta progestina sintética, es la justificación para la realización de esta investigación, ya que los resultados que se obtengan podrán ayudar a esclarecer la controversia existente sobre los mecanismos alternos de expresión hormonal del Gestodeno.

## 6. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el metabolismo, a nivel de órgano blanco, del Gestodeno marcado isotópicamente y esclarecer el papel de los productos de su conversión metabólica sobre los efectos hormonales de tipo estrogénico, empleando diferentes marcadores bioquímicos y moleculares.

## 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 7.1 Estudiar el metabolismo *in vitro* de Gestodeno marcado isotópicamente, en la hipófisis y el hipotálamo de ratas hembras, adultas, castradas, en condiciones variables de concentración de sustrato, pH, tiempo de incubación y en presencia o ausencia del cofactor NADPH.
  
- 7.2 Determinar la interacción *in vitro* de Gestodeno y de sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos, particularmente de los tetrahidros 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ , y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ , con los sitios activos de los receptores intracelulares de estrógenos del útero de ratas prepúberes.

7.3 Determinar los efectos biológicos de tipo estrogénico inducidos por los derivados reducidos en el anillo A del Gestodeno, empleando como marcadores moleculares: la inducción de la actividad de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en un sistema de expresión en células HeLa y la inducción *in vivo* de receptores intracelulares de progesterona estrógeno-dependientes, en la hipófisis anterior de ratas hembras adultas castradas.

## 8. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El Gestodeno, la progestina sintética más potente que actualmente se utiliza en formulaciones hormonales anticonceptivas, se biotransforma a nivel de órganos blanco a los compuestos reducidos en el anillo A,  $5\alpha$ -dihidro GSD,  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro GSD y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro GSD, los cuales al unirse a los sitios activos de los receptores intracelulares de estrógenos y activar genes estrógeno-dependientes, son los responsables de los efectos biológicos de tipo estrogénico, inducidos después de la administración de dosis altas de Gestodeno.

## **9. MATERIALES**

### **9.1. Material Biológico**

#### **9.1.1. Animales de Laboratorio**

Las ratas de la cepa Wistar, hembras prepúberes, de 100 a 120 g de peso corporal y las ratas hembras adultas castradas de 250 g de peso, utilizadas en los estudios, fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en donde permanecieron alojadas hasta el término de los experimentos, bajo un régimen de ciclos controlados de 14 h de luz/10 de obscuridad y con libre acceso a agua y alimento.

Todos los procedimientos en los que se utilizaron animales de laboratorio, se realizaron siguiendo estrictamente los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (1999).

#### **9.1.2. Sistema Celular de Expresión**

Las células HeLa derivadas de carcinoma epitelioide de cervix uterino fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Austin J. Cooney de la Universidad de Baylor, en Houston, TX, EUA. Los plásmidos pCMV<sub>5</sub>-RhE $\alpha$  y pCMV<sub>5</sub>-RhE $\beta$ , que contienen los vectores de expresión, contruidos con las secuencias completas

que codifican para el subtipo  $\alpha$  del receptor de estrógenos humano (Rh $\alpha$ E) o para el subtipo  $\beta$  del receptor de estrógenos humano (Rh $\beta$ E), fueron gentilmente proporcionados por la Dra. B. Katzenellenbogen de la Universidad de Illinois en Urbana, ILL. EUA y por el Dr. J.- A. Gustafsson del Instituto Karolinska en Estocolmo, Suecia, respectivamente. El vector reportero (CAT-E1b-ERE) contiene el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) fusionado a elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (Smith y cols.,1993) y como promotor un fragmento del gen A2 de vitelogenina en la posición -331 a -87 (corriente arriba), de la caja TATA del adenovirus E1b.

## 9.2. Material Radiactivo

El Gestodeno-[9,11- $^3\text{H}$ ] (GSD-[ $^3\text{H}$ ]), con actividad específica (a.e.) de 30.54 Ci/mmola, así como el Gestodeno-[etinilo- $^{14}\text{C}$ ] (GSD-[ $^{14}\text{C}$ ]), a.e. 43.75 mCi/mmola, fueron donados gentilmente por Schering, AG (Berlín, Alemania). La Testosterona-[1,2,6,7- $^3\text{H}$ ] (T-[ $^3\text{H}$ ]), a.e. 85 Ci/mmola y el Cloranfenicol-[3,5- $^3\text{H}$ ], a.e. 38.9 Ci/mmola, se adquirieron en NEN<sup>®</sup> Research Products (Boston, MA, EUA). El estradiol-[2,4,6,7- $^3\text{H}$ ] (E<sub>2</sub>-[ $^3\text{H}$ ]), a.e. 97 Ci/mmola, así como el ORG 2058-[ $^3\text{H}$ ] a.e. 45 Ci/mmola, se adquirieron en Amersham International (Buckinghamshire, Inglaterra). La pureza radioquímica de todos los esteroides radiactivos empleados se estableció por cromatografía de partición en papel en dos sistemas diferentes y cristalizaciones sucesivas de alícuotas, adicionadas



del correspondiente esteroide radioinerte, hasta la obtención de actividad específica constante (Pérez y cols., 1977).

### **9.3. Esteroides Radioinertes**

Los esteroides radioinertes se adquirieron en Sigma Chemical Co. (San Luis Missouri, EUA), con excepción del GSD que fue proporcionado amablemente por Schering Mexicana, S.A. La pureza química de cada uno de los compuestos se estableció, después de cristalizaciones sucesivas en metanol, por medio de cromatografías en el Sistema I, que contiene cloroformo:acetona en una proporción de 9:1 y en el Sistema II, constituido por benceno:acetato de etilo 2:1, así como por la determinación del punto de fusión y el análisis del espectro de infrarrojo.

### **9.4. Reactivos y Disolventes**

El NADPH se adquirió en Sigma Chemical Co. El estuche QIAGEN-tip 500® para la obtención y purificación de los plásmidos y el reactivo Superfect®, utilizado para la transfección, se adquirieron comercialmente en QIAGEN Inc, (Valencia, CA, EUA). Todos los compuestos y disolventes orgánicos empleados en los procesos experimentales fueron de grado analítico.

## 10. MÉTODOS

### 10.1. PROCESOS EXPERIMENTALES

#### 10.1.1. Síntesis de derivados 5 $\alpha$ -reducidos de Gestodeno (GSD)

Los derivados 5 $\alpha$ -reducidos del GSD no se encuentran disponibles en forma comercial por lo que fue necesario sintetizarlos en el laboratorio empleando diferentes procedimientos:

El 5 $\alpha$ -dihidro Gestodeno (5 $\alpha$ GSD) se sintetizó por reducción del GSD con litio en amoníaco líquido, por un procedimiento similar al descrito por Bowers y cols. (1958), modificado por García de la Mora.

El 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro Gestodeno (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD) se preparó por reducción del 5 $\alpha$ GSD con tri-sec-butil-borohidruro de litio (L-selectride) en condiciones anhidras (Brown y Krifhnamurthy, 1972), mientras que el tetrahidro 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  del Gestodeno se obtuvo al reducir 5 $\alpha$ GSD con borohidruro de sodio (Bowers y cols., 1958).

Los derivados reducidos del GSD se purificaron por cromatografía "flash" (Still y cols., 1978) y cristalización en acetona-hexano o acetato de etilo-hexano. Los criterios de pureza se establecieron con base en sus constantes físicas y

espectroscópicas como punto de fusión, cromatografía líquida de alta resolución, espectro de infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

#### **10.1.2. Metabolismo *in vitro* de GSD-[<sup>3</sup>H] y GSD-[<sup>14</sup>C] en órganos blanco a la acción hormonal.**

El metabolismo *in vitro* del GSD marcado indistintamente con [<sup>3</sup>H] ó [<sup>14</sup>C], se estudió en órganos blanco a la acción de hormonas esteroides sexuales, como son el hipotálamo y la hipófisis anterior de ratas hembras adultas y la próstata ventral de ratas machos adultos. Los animales (6 a 8 por experimento) se gonadectomizaron quirúrgicamente bajo anestesia con éter etílico, para eliminar la fuente de esteroides endógenos, que son substratos naturales de las enzimas requeridas para metabolizar al GSD radiactivo. El tiempo transcurrido entre la gonadectomía y la realización de los experimentos fue de 21 días para las ratas hembras, mientras que para los machos fue únicamente de 8 días, debido a que en periodos más largos de tiempo la glándula prostática se atrofia considerablemente. El día del experimento, los animales se decapitaron e inmediatamente se disecaron los diferentes tejidos que se lavaron con solución salina isotónica a 4° C, se secaron y se pesaron en una balanza analítica. Las hipófisis e hipotálamos se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio con pistilo de Teflón y las próstatas se homogeneizaron con un Politron (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA), utilizando en todos los casos una solución

amortiguadora de Krebs-Ringer-fosfatos, en una relación de peso:volumen de 1:6. Del homogeneizado de cada tejido se tomó una alícuota para determinar proteínas por el método de Bradford (1976), empleando albúmina sérica de bovino como referencia.

Las preparaciones de las hipófisis anteriores (2 mg de proteína), hipotálamos (4 mg de proteína) y próstatas ventrales (8 mg de proteína) se incubaron independientemente, por triplicado, en un incubador metabólico Dubnoff a 37.5° C, con agitación constante y aire como fase gaseosa, con concentraciones crecientes (1, 2 y 4  $\mu$ M) de GSD marcado isotópicamente con [ $^3$ H] o con [ $^{14}$ C], en ausencia y presencia de concentraciones de 0.5, 1 y 2 mM del cofactor NADPH, a diferentes tiempos de incubación de 15, 30 ó 60 minutos. El volumen final de las preparaciones incubadas fue de 1 ml.

Con el objeto de determinar la capacidad del GSD para servir como sustrato de las isoenzimas tipo 1 y tipo 2 de la 5 $\alpha$ -reductasa (Russell y Wilson, 1994), las incubaciones se realizaron a pH de 7.4 y 4.8, que son los óptimos para la actividad de las dos isoenzimas de la 5 $\alpha$ -reductasa. Como control positivo de los experimentos se incubó T- $^3$ H], sustrato natural de las enzimas existentes en los tejidos estudiados, en condiciones experimentales idénticas a las de las incubaciones con GSD. La incubación de los sustratos radiactivos en ausencia de tejido sirvió como control negativo.

Al término de los tiempos de incubación, se agregó acetato de etilo para detener la actividad enzimática y los esteroides radiactivos formados se extrajeron del medio acuoso con ese mismo disolvente. Los extractos orgánicos se evaporaron a sequedad y los contaminantes de baja polaridad se eliminaron por un proceso de partición entre éter de petróleo y metanol acuoso al 10%.

La separación e identificación de los metabolitos radiactivos formados durante la incubación, así como el establecimiento de su pureza radioquímica, se realizó por medio de la técnica de dilución isotópica inversa (Lemus y cols., 1992), que incluye cromatografía en placa fina de sílica gel, en por lo menos dos sistemas de disolventes de diferente polaridad, y cristalizaciones sucesivas con distintos disolventes orgánicos hasta la obtención de actividad específica constante, como se describe a continuación.

Después de la partición de los extractos crudos de los homogeneizados de los tejidos, los extractos metanólicos se evaporaron a sequedad y la dilución isotópica se realizó al adicionar una mezcla de 2.5 µg de cada uno de los siguientes esteroides radioinertes o "carriers" : GSD, 5αGSD, 3α,5αGSD y 3β,5αGSD, Testosterona y 5α-dihidrotestosterona (DHT). Los extractos se cromatografiaron en placa fina, en los sistemas I y II, previamente descritos. La detección del [<sup>3</sup>H] en las placas cromatográficas se realizó por medio de un radiocromatógrafo Packard (Downers Grove, IL, EUA), mientras que para detectar el [<sup>14</sup>C] se utilizó un analizador de imágenes Packard Instant Imager

(Packard Downers Grove, IL, EUA). Los esteroides radioinertes se localizaron en la placa cromatográfica al revelarse con un reactivo compuesto por 100 ml de ácido acético glacial, 2 ml de ácido sulfúrico y 1 ml de *p*-anisaldehído y calentamiento a 150° C durante 3 minutos.

La pureza radioquímica de los productos de la conversión metabólica del GSD, se estableció con la adición de una cantidad conocida del mismo esteroide radioinerte y cristalizaciones en diversos disolventes orgánicos, hasta que la actividad específica se mantuvo constante y fue idéntica en cristales y aguas madre en tres cristalizaciones sucesivas. El contenido de radiactividad en las muestras se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb (Modelo 1900TR) empleando como solución de centelleo una mezcla de 4 g de 2,5-difenil oxazol, como soluto primario, y como soluto secundario 100 mg de 1,4-bis-2(4-metil-5-fenil-oxazolil) benceno, por cada litro de tolueno de grado de centelleo. La eficiencia del espectrómetro fue de 86 % para el [<sup>14</sup>C] y de 67% para el [<sup>3</sup>H]. El "quenching" se corrigió en todas las muestras por medio del método de estandarización externa.

### **10.1.3. Interacción de GSD y de sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos, con los receptores intracelulares de estrógenos**

#### **10.1.3.1. Obtención de citosol**

Para la obtención de la fracción celular soluble o citosol se emplearon grupos de 8 ratas hembras, inmaduras e intactas con pesos entre 100 y 200 g. Los animales se decapitaron y se disecaron inmediatamente los úteros, se lavaron en solución salina isotónica fría y se secaron entre dos hojas de papel filtro. Los tejidos se fragmentaron finamente con tijera y sus pesos se determinaron en una balanza analítica. Todos los procedimientos subsecuentes se realizaron a una temperatura de 4° C. Los tejidos se homogeneizaron por medio de un Politrón Brikmann PT 10/35 (Brikmann Instruments Co. Houston, TX, EUA), en una proporción de peso a volumen de 1:6, con una solución denominada TEDLM, constituida por buffer Tris-HCl a la concentración de 20 mM y pH de 7.4, al que se le adicionó EDTA 1.5 mM, ditiotreitól 0.25 mM, molibdato de sodio 10 mM y 10 mg/ml de leupeptina. El homogeneizado se centrifugó a 180,000 g durante 1 hora a 2° C, en un rotor Beckman SW 50.1. El citosol (sobrenadante) obtenido después de la ultracentrifugación contiene los receptores de estrógenos con los que se realizaron los estudios de competencia. Se tomaron alícuotas del citosol para determinar el contenido de proteínas por el método de Bradford, utilizando una curva patrón de albúmina de suero de bovino (Bradford, 1976).

### 10.1.3.2. Curva de saturación

Las características de la unión al equilibrio de los receptores intracelulares de estrógenos del citosol de útero de ratas prepúberes con  $E_2$ - $[^3H]$  como radioligando específico, se determinaron por medio de una curva de saturación. Se tomaron alícuotas del citosol equivalentes a una concentración de proteínas de 2 mg/ml y se incubaron durante 18 horas a 4° C, con una concentración de 1 nM de  $E_2$ - $[^3H]$  y la cantidad adecuada de  $E_2$  radioinerte para obtener una concentración de 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 10 y 15 nM, en un volumen final de incubación de 1 ml. Al término de la incubación, el  $E_2$  radiactivo que no se unió al receptor se separó del complejo estradiol-receptor de estrógenos ( $E_2$ -RE), por adsorción con una suspensión de 12.5 mg de carbón activado recubierto con 0.125 mg de Dextran T-70 en buffer TEDLM, durante 5 minutos, a 4°C y con agitación continua. Transcurrido ese tiempo, los tubos se centrifugaron a 800 g por 15 minutos a 4°C, se tomaron alícuotas por triplicado del sobrenadante que contiene el complejo  $E_2$ -RE y se determinó el contenido de  $[^3H]$  en un espectrómetro de centelleo líquido, empleando Insta-Gel Plus® como solución de centelleo. La corrección del factor de "quenching" se realizó automáticamente con un estándar externo. La unión total del  $E_2$ - $[^3H]$  unido al receptor, expresada en pmolas/ml, se calculó con base a la actividad específica del radioligando. La unión inespecífica se determinó, bajo las mismas condiciones de incubación, en presencia de un exceso de 100 veces de  $E_2$  radioinerte. La unión específica se obtuvo al substrair los valores de la unión



inespecífica de los valores de la unión total. Cada experimento de saturación se realizó por triplicado, por lo menos tres veces.

#### **10.1.3.3. Determinación de la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) y del número de sitios de unión (NSU) del receptor intracelular de estrógenos**

Las características de unión al equilibrio para los receptores intracelulares de estrógenos, en términos de la constante aparente de disociación ( $K_d$ ) y del número de sitios de unión (NSU), se determinaron mediante la gráfica descrita por Scatchard (1949) a partir de los datos obtenidos de la curva de saturación. El procedimiento descrito por Scatchard se aplica a un sistema saturable de interacción entre proteínas y ligandos específicos, que en este caso serían los receptores intracelulares de estrógenos y las moléculas de  $E_2$ - $[^3H]$ , respectivamente. Si se toma en consideración que en este sistema también existen otras proteínas que pueden unir en forma no específica grandes concentraciones del ligando, la manera de calcular la concentración real del esteroide capaz de saturar al sistema, es a través de la determinación del NSU que se obtiene al graficar la relación de la concentración molar del radioligando unido al receptor (U) entre la concentración molar del esteroide libre (L) contra la concentración molar del esteroide unido al receptor (U). El valor obtenido del intercepto de la recta con el eje de las abscisas, multiplicado por el número de Avogadro ( $6.02 \times 10^{23}$  moléculas /mol), representa el número de sitios de unión, el cual se expresa en molas/ml/mg de proteína presente en las preparaciones

de citosol del útero de la rata prepúber, que se empleó como fuente de receptores de estrógenos.

El cociente que se obtiene al dividir el valor del intercepto de la recta con el eje de las ordenadas, entre el valor del intercepto con el eje de las abscisas, corresponde a la constante de asociación ( $K_a$ ) y su recíproca ( $1/K_a$ ) es la constante de disociación ( $K_d$ ), la cual se expresa en concentración molar.

#### ***10.1.3.4. Análisis de competencia entre GSD y sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos, por los sitios activos de unión del receptor de estrógenos***

La capacidad de unión al receptor de estrógenos, del GSD y de sus metabolitos 5 $\alpha$ GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD se determinó mediante un análisis de competencia por los sitios activos del receptor de estrógenos del citosol de útero de ratas hembras prepúberes, utilizando E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] como radioligando específico (Chávez y cols., 1985).

Se incubaron alícuotas del citosol de útero, con un contenido de proteína de 2.0 a 3.4 mg/ml con E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] a la concentración de 1 nM, a 4°C durante 18 horas, en ausencia o presencia de los esteroides radioinertes E<sub>2</sub>, GSD, 5 $\alpha$ GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD, a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 y 500 nM. Al término del tiempo de incubación, la separación de los esteroides unidos a los receptores de estrógenos, de aquellos que no se unieron, se realizó por adsorción con una suspensión de carbón/dextran, en forma idéntica a la

utilizada en la curva de saturación. El contenido de [ $^3\text{H}$ ] en las muestras se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido (Packard Tri-carb) con una eficiencia de conteo de 65%, utilizando solución de centelleo Insta-Gel Plus®. La corrección de “quenching”, se realizó por estandarización externa. Las dpm de [ $^3\text{H}$ ] del  $\text{E}_2$  radiactivo unido al RE, en ausencia de  $\text{E}_2$  radioinerte, se consideraron como el 100 % de la unión.

La capacidad de los esteroides radioinertes  $\text{E}_2$ , GSD,  $5\alpha\text{GSD}$ ,  $3\alpha,5\alpha\text{GSD}$  y  $3\beta,5\alpha\text{GSD}$  para competir con el  $\text{E}_2$ -[ $^3\text{H}$ ] por los sitios activos del receptor de estrógenos, se estableció por la afinidad de unión relativa (AUR) y la constante de inhibición ( $\text{K}_i$ ) al 50% de cada uno de los competidores estudiados, de acuerdo a los métodos descritos por Reel y cols. (1979) y por Cheng y Prusoff (1973), respectivamente.

#### **10.1.4. Determinación de la actividad estrogénica del GSD y sus metabolitos reducidos en el anillo A, en un sistema de expresión en células HeLa.**

La posibilidad de analizar las propiedades de transcripción de secuencias de ADN genómico clonadas en plásmidos, mediante su introducción en células apropiadas, ha permitido comprender mejor la regulación de la transcripción génica en los mamíferos. Por otra parte, el uso de genes que actúan como vectores reporteros que codifican la síntesis de enzimas que poseen una actividad catalítica única, ha permitido desarrollar modelos experimentales altamente específicos que han simplificado los estudios de transcripción.

El estudio del mecanismo de acción de hormonas esteroideas naturales y sintéticas se ha enriquecido con el diseño de sistemas de expresión en células mantenidas en cultivo, transfectadas con vectores que contienen los genes que específicamente codifican la síntesis de los diferentes tipos de receptores nucleares a los que se unen hormonas esteroideas naturales o sintéticas, y vectores reporteros capaces de expresar diferentes efectos hormonales.

Entre los sistemas de expresión para el análisis de actividades enzimáticas, uno de los más empleados es el que utiliza como vector reportero al gen que codifica a la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), enzima que cataliza la transferencia de los grupos acetilo de la acetil coenzima-A a la molécula del cloranfenicol

La actividad de tipo estrogénica del GSD y de sus derivados  $5\alpha$ -dihidro y los tetrahidros  $3\alpha,5\alpha$  y  $3\beta,5\alpha$ , se estableció en dos sistemas de expresión en células HeLa derivadas de carcinoma epitelioide de cervix, transfectadas transitoriamente con el gen del receptor humano de estrógenos tipo  $\alpha$  (Rh $\alpha$ E) y con el gen del receptor humano de estrógenos tipo  $\beta$  (Rh $\beta$ E), como vectores de expresión. Ambos sistemas fueron co-transfectados con el gen de CAT, como vector reportero, fusionado a elementos de respuesta a estrógenos (ERE).

#### **10.1.4.1. Preparación y purificación de plásmidos.**

La preparación y purificación de los plásmidos se realizó por medio de un estuche QIAGEN-tip 500 (Maxi Kit) que permite aislar el ADN de manera fácil y rápida. La técnica consistió en una lisis alcalina modificada, seguida de la unión del ADN del plásmido a una resina de intercambio aniónico, en condiciones adecuadas de pH y concentraciones de sal bajas. Las impurezas de peso molecular bajo así como el ARN y algunas proteínas y colorantes, se remueven de la resina al lavar con una solución de concentración media de sal. La secuencia de procedimientos para la obtención y purificación del ADN de los plásmidos, se describe a continuación.

Mantenidos en glicerol a  $-80^{\circ}$  C hasta el momento de utilizarse, los plásmidos con el vector de expresión del Rh $\alpha$ E ó del Rh $\beta$ E y el vector reportero que contiene los elementos de respuesta a estrógenos (*CAT-E1b-ERE* ) se inocularon a bacterias de *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>, a una concentración aproximada de  $1 \times 10^9$  bacterias/ml, suspendidas en medio de Luria Bertani a pH de 7.0 (LB; 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl/litro de agua destilada). Para evitar el crecimiento de otras bacterias contaminantes, se utilizó ampicilina en solución acuosa (50  $\mu$ g/ml), que no afecta a las bacterias de *E. coli* las cuales son resistentes al antibiótico ya que contienen el gen *bla* que codifica la  $\beta$ -lactamasa, enzima capaz de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico de la ampicilina. La preparación bacteriana se incubó durante 18 horas a 37  $^{\circ}$ C,

con agitación constante a 3000 rpm, con los ADN de los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor de estrógenos humano y del CAT. Transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión de bacterias se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos a 4° C. Los sobrenadantes se descartaron, previa inactivación con hipoclorito de sodio y el precipitado del fondo del tubo se resuspendió en 10 ml del buffer Tris-HCl 50 mM, EDTA 10mM, pH 8.0 con 100  $\mu$ g/ml de RNasa A. Inmediatamente después, se agregaron 10 ml del buffer de lisis que contiene: NaOH 200 mM y la sal de sodio del sulfato de dodecilo frío (SDS) al 1%, mezclando suavemente por inversión repetida del tubo e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos para lograr la ruptura de las bacterias. Posteriormente se agregaron 10 ml de un buffer neutralizador frío (4 °C) de acetato de potasio 3 M a pH de 5.5, mezclando nuevamente por inversión del tubo, obteniéndose inmediatamente un precipitado viscoso que contenía el ADN genómico, proteínas y restos celulares.

El lisado bacteriano se transfirió al filtro que contiene la resina de intercambio aniónico (QIAGEN-tip 500), previamente equilibrada con solución buffer de NaCl 750 mM, MOPS 50 mM a pH de 7, isopropanol al 15 % y Triton® X-100 al 0.15 %, en donde se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, se introdujo el émbolo del filtro, presionando ligeramente para facilitar el paso del lisado a través de la resina de intercambio. Para eliminar todos los contaminantes, el filtro se lavó dos veces con 10 ml de un buffer de NaCl 1 mM, MOPS 50 mM a pH de 7 e isopropanol al 15 %. El ADN se eluyó

con 5 ml de una solución que contiene NaCl 1.25 M, Tris 50 mM, Tris-HCl pH de 8.5 e isopropanol al 15 %. El rendimiento del proceso, en términos de concentración de ADN, se determinó por absorción de ultravioleta en un espectrofotómetro.

#### **10.1. 4.2. Transfección de los vectores de expresión y reporteros**

La transfección es una técnica ampliamente utilizada en el análisis de la expresión génica, por medio de la cual se introducen moléculas de ADN en células eucarióticas. Las transfecciones que se utilizaron en este estudio fueron de tipo transitorio, en las cuales los ADN que se introducen en el núcleo de las células HeLa, aún cuando no se integran a los cromosomas, generan un gran número de copias de los genes humanos de los receptores  $\alpha$  ó  $\beta$  de estrógenos, que en presencia de estímulos de tipo estrogénico inducen la formación y activación del vector reportero cloranfenicol acetiltransferasa. Por otro lado, este tipo de transfección transitoria tiene como ventajas, que la enzima sintetizada (cloranfenicol acetiltransferasa), además de que no interfiere con los procesos fisiológicos de la célula transfectada, puede ser analizada fácilmente.

Las transfecciones se realizaron con un procedimiento que utiliza el reactivo Superfect™ (QIAGEN Inc. Valencia, CA, EUA) que ofrece ciertas ventajas sobre otros métodos, como el de ser fácil y rápido, tener buena reproducibilidad, no utilizar sustancias citotóxicas como el fenol o bromuro de etidio y el poder emplearse en una gran variedad de células (Cooney y cols., 1992; Cooney y cols., 1993). El día anterior a la realización de las transfecciones, las células HeLa se transfirieron a placas de cultivo de 6 pozos, colocando en cada pozo aproximadamente 300,000 células, en un volumen final de 3 ml de medio



esencial modificado Dulbecco (DMEM), desprovisto de rojo de fenol y suplementado con suero de bovino fetal (FBS) libre de esteroides, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina e incubado durante 18 h a 37.5 °C, en una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación, se verificó al microscopio que por lo menos el 40% del total de las células estuvieran confluentes. El volumen requerido de la mezcla de reactivos se preparó en tubos Falcon, de modo que por cada 100 µl del medio, libre de suero de bovino fetal y antibiótico, se agregaron 1.0 µg de ADN del plásmido que contiene el gen reportero ERE-E1b-CAT, 0.025 µg de ADN del vector de expresión pCMV<sub>5</sub>-RhE<sub>α</sub> ó pCMV<sub>5</sub>-RhE<sub>β</sub> y 10 µl del reactivo Superfect. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para lograr la formación del complejo. De cada pozo se aspiró el medio de crecimiento y se agregaron a cada muestra, 600 µl del DMEM suplementado con suero de bovino fetal y antibióticos, libre de rojo de fenol, y 100 µl del medio con los complejos de transfección. Las placas se incubaron a 37° C durante 3 horas, en una atmósfera de 95 % de O<sub>2</sub> y 5 % de CO<sub>2</sub>. Al finalizar el tiempo de la incubación, se verificó la integridad de las células y se retiró de los pozos el medio que contenía los complejos de transfección remanentes.

#### **10.1.4.3. Inducción de la actividad de Cloranfenicol acetiltransferasa, por GSD y sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos**

A las células co-transfectadas se les agregaron 3 ml/pozo del medio suplementado, libre de rojo de fenol, y se incubaron a 37.5° C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio se reemplazó por medio de cultivo que contenía una concentración de 10<sup>-8</sup> M del GSD o de sus metabolitos reducidos en el anillo A, 5 $\alpha$ GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD ó 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD ó bien cantidades crecientes (10<sup>-12</sup> M a 10<sup>-6</sup> M) del derivado 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD, disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) o etanol y se incubaron durante 24 horas en las mismas condiciones, para obtener los máximos niveles de expresión génica. En las mismas condiciones experimentales, se incubó E<sub>2</sub> como control positivo, mientras que la incubación de los vehículos (DMSO y EtOH) sin esteroides sirvió como control negativo de los experimentos. Cada muestra se incubó por triplicado y los experimentos se repitieron por lo menos tres veces.

#### **10.1.4.4. Determinación de la actividad de cloranfenicol acetiltransferasa**

Al finalizar el período de incubación de las células HeLa con GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos, así como con los controles experimentales, se descartó el medio y las células se lavaron con 2 ml de solución de Hanks para eliminar los restos del medio que contenía los esteroides. Se agregó a cada pozo 1 ml de solución de TEN (Tris-HCl 40 mM, pH 8, EDTA 1mM, pH 8 y NaCl 150 mM) a 4° C y con la ayuda de un "gendarme" se desprendieron las células que se

transfirieron a tubos Eppendorf, se centrifugaron a 13,200 rpm, a 4° C, durante 5 min. El sobrenadante se removió y el precipitado que contiene las células se resuspendió en 80 µl de Tris-HCl 0.25 M, pH de 7.5. La ruptura de las células se logró al exponerlas a tres ciclos alternos de congelación con nitrógeno líquido y descongelación en baño de agua a 37.5 °C. El lisado celular se centrifugó a 13,200 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se tomó una alícuota del sobrenadante para determinar proteínas por el método de Bradford. Del sobrenadante restante se tomó una alícuota equivalente a 5 µg de proteína y se ajustó a un volumen de 70 µl con Tris-HCl 250 mM y pH de 7.5, se agregaron 10 µl Tris-HCl, pH de 8, que contenían 25 µg de Butiril coenzima-A y 200,000 cpm del Cloranfenicol marcado isotópicamente con [<sup>3</sup>H]. El volumen final de la mezcla para la reacción se ajustó a 100 µl y se incubó a 37° C durante 1 hora. Posteriormente, se agregaron 200 µl de tetrametil pentadecano (TMP) y xilenos en una proporción de 2:1 y se agitó para lograr una partición diferencial del cloranfenicol butirilado y el cloranfenicol libre, entre la fase orgánica y la fase acuosa (Seed and Sheen,1988). Se centrifugó a temperatura ambiente y de la fase orgánica se tomaron 120 µl para determinar la cantidad de [<sup>3</sup>H]. El índice de actividad biológica estrogénica del E<sub>2</sub> y del 3β,5αGSD se determinó en función de la dosis efectiva al 50% (DE<sub>50</sub>), obtenida de las curvas dosis/respuesta de transactivación del vector reportero inducido por los esteroides naturales y sintéticos.

#### **10.1.5. Inducción del receptor intracelular estrógeno-dependiente de progesterona, en la hipófisis anterior de la rata hembra adulta castrada**

En la hipófisis anterior de la rata hembra adulta, los receptores intracelulares para progesterona (RP) son específicamente dependientes de estrógenos, por lo que después de la castración de los animales, la presencia de estos receptores ya no puede ser detectada. El hecho de que el efecto inducido por la castración, puede ser revertido con la administración exógena de estrógenos o de compuestos que tengan la capacidad de ejercer efectos de tipo estrogénico ha sido bien documentado (Kato y cols., 1978; Evans y cols., 1978; Vilchis y cols., 1986, Santillán y cols., 2001 ) por lo que este modelo experimental puede ser empleado como un marcador biológico de actividad estrogénica.

La capacidad del  $3\beta,5\alpha$ GSD para inducir, en la hipófisis anterior de las ratas hembras adultas castradas, la presencia de RP, se determinó al administrar el derivado reducido del GSD por vía subcutánea a las dosis de 0.5, 1.0 y 1.5 mg/día durante 6 días consecutivos, a grupos de 20 animales que habían sido castrados por lo menos 20 días antes de iniciar el tratamiento. Como controles del experimento se utilizaron grupos de ratas a las que se les administraron  $5\mu\text{g}/\text{día}/6\text{días}$  de Benzoato de estradiol ó  $100\ \mu\text{l}$  de propilenglicol, que fue el vehículo en que se disolvieron los esteroides. Al finalizar el tratamiento, los animales se decapitaron y se disecaron las hipófisis anteriores. Los tejidos se lavaron con solución salina isotónica fría, se secaron entre dos papeles filtro, se

fraccionaron finamente con tijera y su peso se registró en una balanza analítica. Los fragmentos de hipófisis se homogeneizaron en una relación peso/volumen de 1:6, con la solución buffer de TEDLM, a la que se le adicionó glicerol al 10%. Los tejidos homogeneizados se centrifugaron a 180,000 g, durante 1 hora a 2° C, para obtener la fracción de citosol. La concentración de proteínas se determinó en alícuotas del sobrenadante (citosol), por medio de la técnica de Bradford (1976), empleando albúmina de suero de bovino para construir una curva estandar. El citosol se incubó con una concentración 2 nM de ORG 2058-<sup>3</sup>H], un radioligando específico para el receptor de progesterona, durante 18 horas a 4° C. Al término de la incubación, se tomaron alícuotas de 300-400 µl del citosol (9 mg de proteína/ml), se depositaron sobre la superficie de gradientes lineales de sacarosa de 20-35% y se centrifugaron en un rotor vertical a 400,000 g durante 2 horas y media a la temperatura de 2 °C. El fondo del tubo que contenía a cada gradiente se puncionó y se colectaron fracciones de 85 µl en tubos de vidrio de bajo contenido de [<sup>40</sup>K]. El contenido de [<sup>3</sup>H] de cada fracción del gradiente se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido, empleando Insta Gel Plus® como líquido de centelleo. El coeficiente de sedimentación del complejo ORG 2058-RP se calculó utilizando como referencia el coeficiente de sedimentación de la albúmina de suero de bovino, depositada en la superficie de un gradiente paralelo a los experimentales. El marcaje inespecífico del RP se determinó por

la adición al gradiente, de un exceso de 100 veces de ORG 2058 radioinerte.  
Cada experimento se realizó tres veces.

## 11. RESULTADOS

### 11.1. Síntesis de 5 $\alpha$ -dihidro GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro GSD

El rendimiento de la síntesis del 5 $\alpha$ -dihidro GSD (5 $\alpha$ GSD), a través de la reducción del doble enlace en el anillo A de la molécula del GSD, fue de 60 %. El 5 $\alpha$ GSD obtenido con un alto grado de pureza, se utilizó para la síntesis química de los tetrahidros de GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ . El rendimiento de la síntesis del 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro GSD fue de 95 %, mientras que el rendimiento de la síntesis del 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro GSD fue de 70 %. Los resultados obtenidos de los análisis físico y espectroscópico de los metabolitos de GSD sintetizados, se muestran a continuación.

#### 11.1.1. Constantes físicas y espectroscópicas del 5 $\alpha$ -dihidro GSD

- Punto de fusión: 168 –170° C
- Espectro de Infrarrojo (KBr): 3362, 3258, 3047, 2948, 2924, 2857, 2086, 1697 cm<sup>-1</sup>
- Resonancia Magnética Nuclear-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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)
- Resonancia Magnética Nuclear-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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 FAB (Bombardeo Atómico Rápido): 313

### **11.1.2. Constantes físicas y espectroscópicas del 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro GSD**

- Punto de fusión: 178 –181° C
- Espectro de Infrarrojo (KBr): 3567, 3392, 3252, 3051, 2929, 2089 cm<sup>-1</sup>
- Resonancia Magnética Nuclear-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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)
- Resonancia Magnética Nuclear-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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, 83.83, 132.30, 135.33.
- Espectrometría de Masas FAB (Bombardeo Atómico Rápido): 315

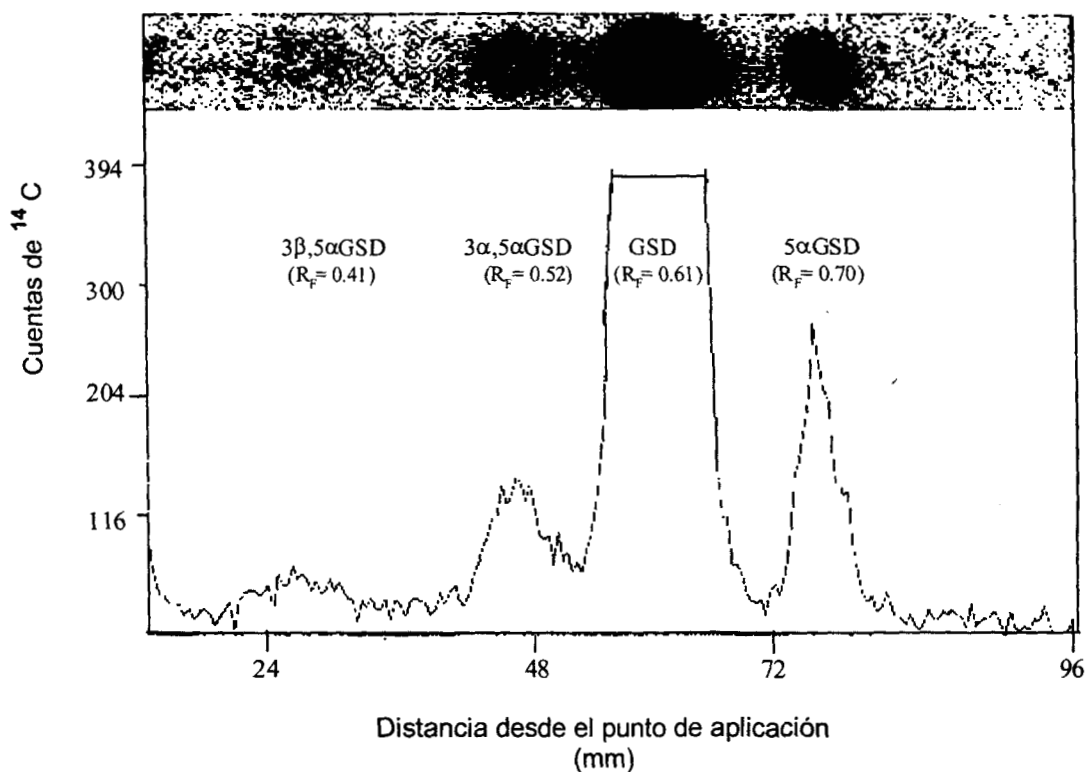
### **11.1.3. Constantes físicas y espectroscópicas del 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro GSD**

- Punto de fusión: 139 –141° C
- Espectro de Infrarrojo (KBr): 3373, 3281, 2919, 2859 cm<sup>-1</sup>
- Resonancia Magnética Nuclear-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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, 3 H).
- Resonancia Magnética Nuclear-<sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  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.
- Espectrometría de Masas FAB (Bombardeo Atómico Rápido): 315



## 11.2. Formación enzimática de metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de GSD

Después de la partición de los extractos crudos de los homogeneizados de hipófisis anteriores e hipotálamos, el 95 % del [ $^{14}\text{C}$ ] ó [ $^3\text{H}$ ] iniciales, se recuperó en la fracción metanólica. La cromatografía en placa fina en los sistemas I y II, de alícuotas de los extractos metanólicos obtenidos de las incubaciones realizadas a pH de 7.4, demostró la presencia de cuatro zonas radiactivas de diferente polaridad (Fig. 8).



**Figura 8.**

Perfil representativo de la cromatografía en placas de sílica gel, de los extractos metanólicos de los homogeneizados de hipotálamos, hipófisis y próstatas ventrales de ratas, incubados con Gestodeno- $^{14}\text{C}$ .

La zona menos polar (Zona 1), con un  $R_F$  de 0.70, exhibió una movilidad cromatográfica idéntica a la del "carrier" de  $5\alpha$ GSD. Esta zona fue eluida con metanol, se determinó su contenido de [ $^{14}\text{C}$ ] ó [ $^3\text{H}$ ] y después de adicionarle una cantidad extra de  $5\alpha$ GSD radioinerte, se cristalizó repetidamente hasta la obtención de una actividad específica constante (dpm/mg), como se muestra en la Tabla 1. Cuantitativamente, el  $5\alpha$  GSD radiactivo representó el mayor producto de conversión del GSD incubado.

La zona 2 (Fig. 8), con un  $R_F$  de 0.61, que correspondió al GSD no metabolizado, se eluyó y únicamente se determinó su contenido de [ $^3\text{H}$ ] ó [ $^{14}\text{C}$ ].

La zona 3, con un  $R_F$  de 0.52 idéntico al del "carrier" de  $3\alpha,5\alpha$ GSD (Fig. 8), se recristalizó con  $3\alpha,5\alpha$ GSD radioinerte, hasta que su actividad específica permaneció constante (Tabla 1).

La pureza radioquímica de la zona 4, cuya movilidad cromatográfica ( $R_F = 0.41$ ) fue idéntica a la del "carrier" de  $3\beta,5\alpha$ GSD, se estableció por cristalizaciones sucesivas hasta la obtención de una actividad específica constante (Tabla 1).

**Tabla 1.**

Pureza radioquímica de los metabolitos aislados de las incubaciones de hipófisis anterior, hipotálamo y próstata ventral de rata con Gestodeno isotópicamente marcado con [ $^3\text{H}$ ] o [ $^{14}\text{C}$ ]

Metabolitos formados	Cristalizaciones sucesivas	Actividad específica		
		Hipófisis (dpm [ $^3\text{H}$ ]/mg)	Hipotálamo (dpm [ $^3\text{H}$ ]/mg)	Próstata (dpm [ $^{14}\text{C}$ ]/mg)
5 $\alpha$ GSD	C <sub>1</sub> <sup>a</sup>	1424	696	1217
	C <sub>2</sub>	1252	524	1186
	C <sub>3</sub>	1073	434	1140
	AM <sub>3</sub> <sup>b</sup>	1101	487	1164
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD	C <sub>1</sub>	1069	1208	517
	C <sub>2</sub>	1001	1133	381
	C <sub>3</sub>	931	980	327
	AM <sub>3</sub>	886	1020	358
3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD	C <sub>1</sub>	660	523	274
	C <sub>2</sub>	492	417	176
	C <sub>3</sub>	442	344	147
	AM <sub>3</sub>	472	413	154

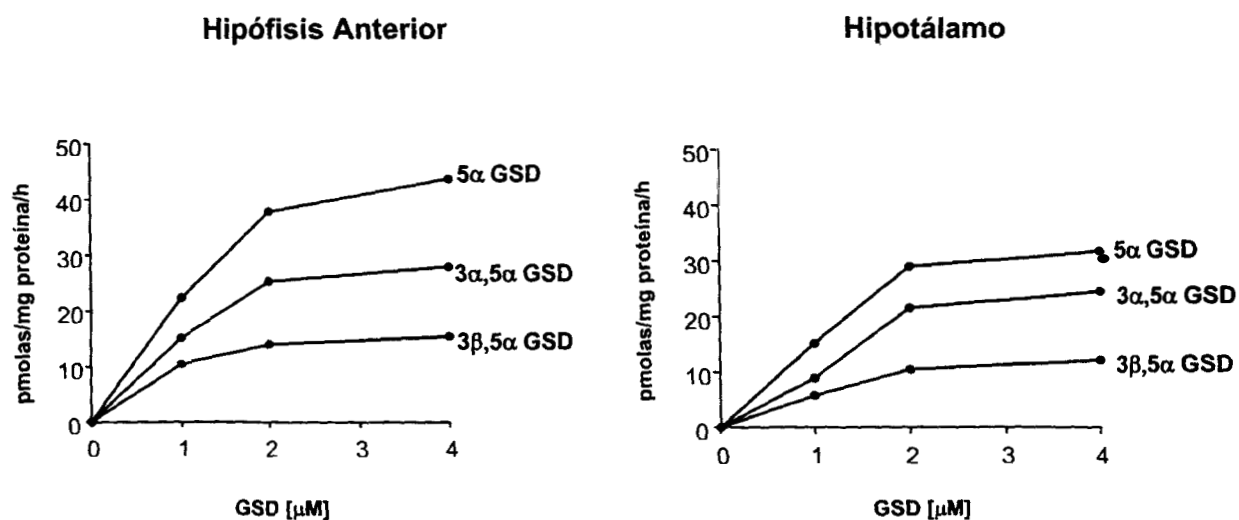
<sup>a</sup> Cristales

<sup>b</sup> Aguas Madre

En contraste a estos resultados, el análisis de las placas cromatográficas de los extractos de las incubaciones de hipófisis anteriores e hipotálamos de la rata hembra castrada, realizadas a pH de 4.8, únicamente mostraron la presencia de material radiactivo en la zona correspondiente al GSD.

Los resultados de las incubaciones del GSD marcado con [ $^3\text{H}$ ] ó [ $^{14}\text{C}$ ] con hipófisis anteriores e hipotálamos de rata, mostraron que en todas las concentraciones de substrato empleadas, los metabolitos 5 $\alpha$ GSD y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD,

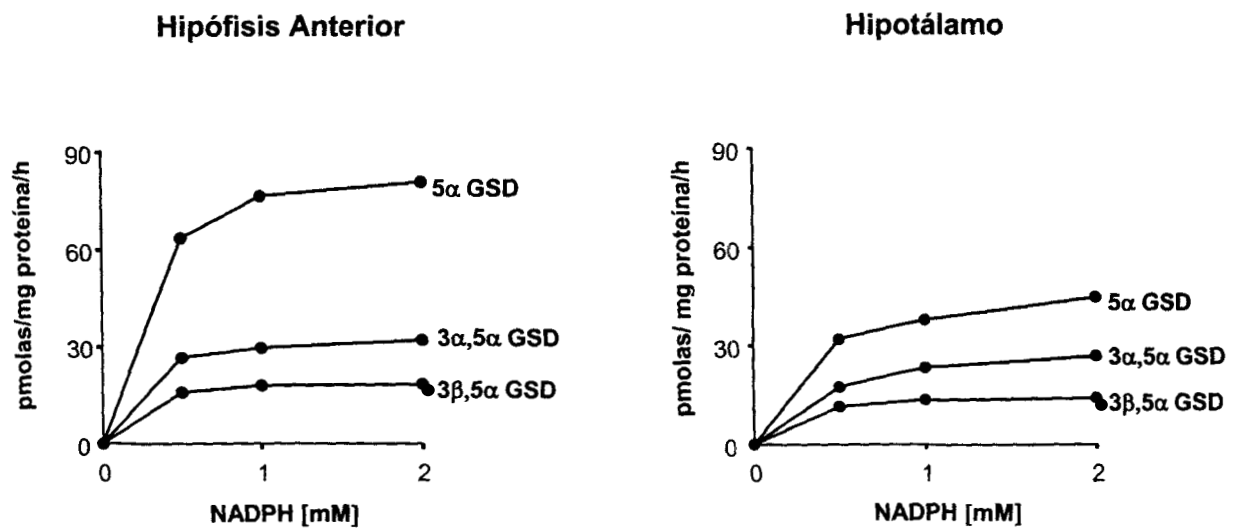
se formaron en mayor proporción que el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD (Fig. 9) . Aun cuando el patrón de bioconversión del GSD radiactivo fue igual en los dos tejidos estudiados, la formación de los metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos fue mayor en la hipófisis anterior que en el hipotálamo. Los mayores niveles de conversión del substrato se observaron a la concentración de 2  $\mu$ M (Fig. 9). En cuanto a la bioconversión del substrato en función del tiempo, los resultados óptimos se obtuvieron en las incubaciones de 1 hora, por lo que para todos los estudios subsecuentes se seleccionó la concentración de 2 nM y un tiempo de incubación de 1 hora.



**Figura 9.**

Metabolismo *in vitro* de GSD marcado isotópicamente con [ $^3$ H] o con [ $^{14}$ C] en hipófisis anteriores e hipotálamos de ratas castradas, en función de la concentración del substrato. El 5 $\alpha$ GSD fue cuantitativamente el principal producto de la bioconversión metabólica, mientras que los tetrahydro derivados 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD se formaron en menor proporción. La mayor biotransformación del substrato se observó a la concentración de 2 nM. Cada punto representa el promedio de tres experimentos, realizados por triplicado.

La conversión enzimática de GSD a sus metabolitos  $5\alpha$ GSD,  $3\alpha,5\alpha$ GSD y  $3\beta,5\alpha$ GSD fue dependiente de NADPH, ya que en las incubaciones con hipófisis anteriores e hipotálamos, en ausencia de este cofactor, no se observó la formación de los derivados  $5\alpha$ -reducidos (Fig. 10). La conversión óptima de GSD, marcado radiactivamente, a metabolitos reducidos en el anillo A de la molécula, se observó con una concentración de 1 mM de NADPH (Fig. 10).



**Figura 10.**

Bioconversión de GSD marcado isotópicamente con  $[^3\text{H}]$  o con  $[^{14}\text{C}]$  en homogeneizados de hipófisis anteriores e hipotálamos de ratas castradas, en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de NADPH. La formación de los derivados  $5\alpha$ -reducidos del GSD fue totalmente dependiente de NADPH, ya que en ausencia de este cofactor no se observó la formación de los metabolitos  $5\alpha$ GSD,  $3\alpha,5\alpha$ GSD y  $3\beta,5\alpha$ GSD. La concentración óptima de NADPH en ambos tejidos fue de 1.0 mM. Cada punto representa el promedio de tres experimentos, por triplicado.

La tasa de formación de 5 $\alpha$ GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD, en los homogeneizados de hipófisis anteriores e hipotálamos de rata, incubados a pH de 7.4, se presenta en la Tabla 2. Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  para la bioconversión de GSD a 5 $\alpha$ GSD, que se determinaron mediante gráficas de Lineweaver-Burk, se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 2.**

Tasa de formación de metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de Gestodeno-[ $^3$ H] o Gestodeno-[ $^{14}$ C] en tejidos de rata, hormono-sensibles

Tejidos Incubados	pH de Incubación	5 $\alpha$ GSD	3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD	3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD	DHT <sup>a</sup>
		pmolas/mg proteína/h			
Hipófisis Anterior	7.4	37.7	25.3	14.0	165.0
	4.8	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND
Hipotálamo	7.4	29.0	21.5	10.5	111.0
	4.8	ND	ND	ND	ND
Próstata Ventral	7.4	55.0	16.3	13.5	222.0
	4.8	69.0	19.8	17.8	318.0

<sup>a</sup> La tasa de formación de 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) se obtuvo de las incubaciones con testosterona-[ $^3$ H] que se utilizaron como controles de los experimentos.

<sup>b</sup>ND = No detectados.

Los resultados de las incubaciones control de los homogeneizados de hipófisis anteriores e hipotálamos, con T-[<sup>3</sup>H], a pH de 7.4, mostraron una eficiente bioconversión a DHT, mientras que en las incubaciones a pH de 4.8, no se observó actividad de 5 $\alpha$ -reductasa (Tablas 2 y 3).

Tabla 3.

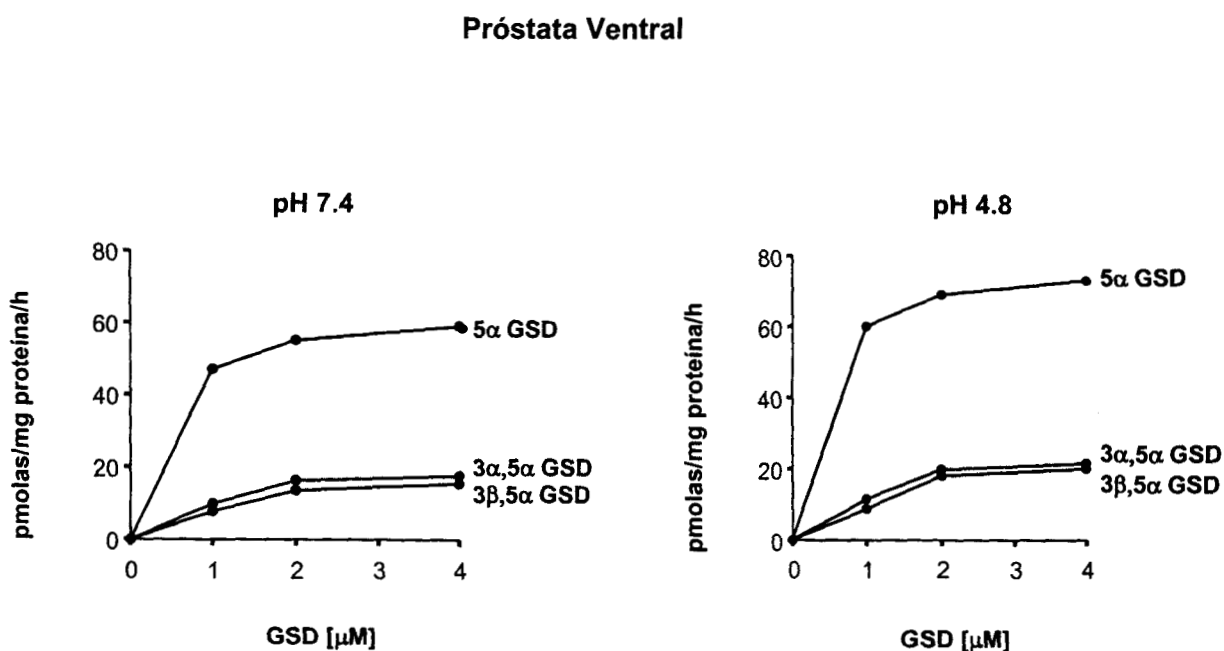
Actividad de 5 $\alpha$ -esteroide reductasa en tejidos de rata incubados a pH 4.8 y 7.4 con Gestodeno (GSD) o Testosterona (T) isotópicamente marcados

Tejidos Incubados	Incubaciones a pH 7.4 (5 $\alpha$ -reductasa tipo 1)				Incubaciones a pH 4.8 (5 $\alpha$ -reductasa tipo 2)			
	K <sub>m</sub> [nM]		V <sub>max</sub> pmolas/mg proteína/h		K <sub>m</sub> [nM]		V <sub>max</sub> pmolas/mg proteína/h	
	Substrato		Substrato		Substrato		Substrato	
	GSD	T	GSD	T	GSD	T	GSD	T
Hipófisis Anterior	2.16	0.78	72.46	217.39	ND <sup>a</sup>	ND	ND	ND
Hipotálamo	3.06	1.50	63.29	188.67	ND	ND	ND	ND
Próstata Ventral	0.59	0.65	70.86	289.3	0.58	0.65	88.62	387.1

<sup>a</sup>No detectados

El GSD radiactivo, incubado a concentraciones crecientes y a pHs de 4.8 y 7.4, con los homogeneizados de próstatas ventrales, se biotransformó

eficientemente a los derivados reducidos en el anillo A,  $5\alpha$ GSD,  $3\alpha,5\alpha$ GSD y  $3\beta,5\alpha$ GSD. La concentración del sustrato con la que se obtuvo la mayor bioconversión a los derivados  $5\alpha$ -reducidos fue de  $2\ \mu\text{M}$  (Fig. 11). La actividad de las  $5\alpha$ -reductasas tipo 1 y tipo 2 en la próstata ventral, también fue dependiente de NADPH obteniéndose la máxima actividad de las enzimas a la concentración de  $2\ \mu\text{M}$  del cofactor (Fig. 12).



**Figura 11.**

$5\alpha$ -reducción enzimática del GSD marcado isotópicamente con  $[^3\text{H}]$  o con  $[^{14}\text{C}]$  en homogeneizados de próstatas ventrales de ratas castradas, en función de la concentración del sustrato, a pH de 7.4 y 4.8. La mayor conversión del GSD al derivado  $5\alpha$ GSD ocurrió a la concentración  $2\ \mu\text{M}$  del sustrato y a pH de 4.8. Cada punto representa el promedio de tres experimentos realizados por triplicado.



## Próstata Ventral

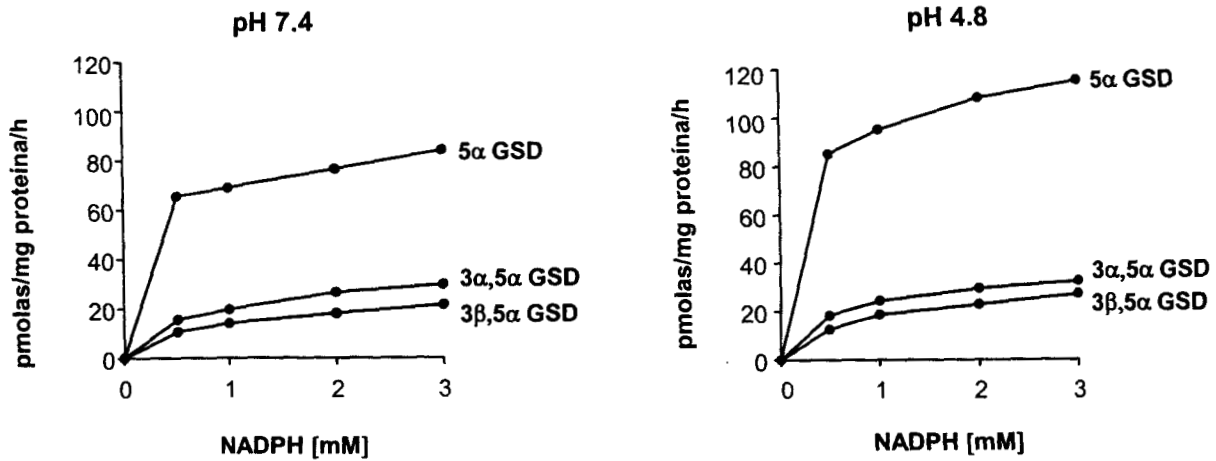


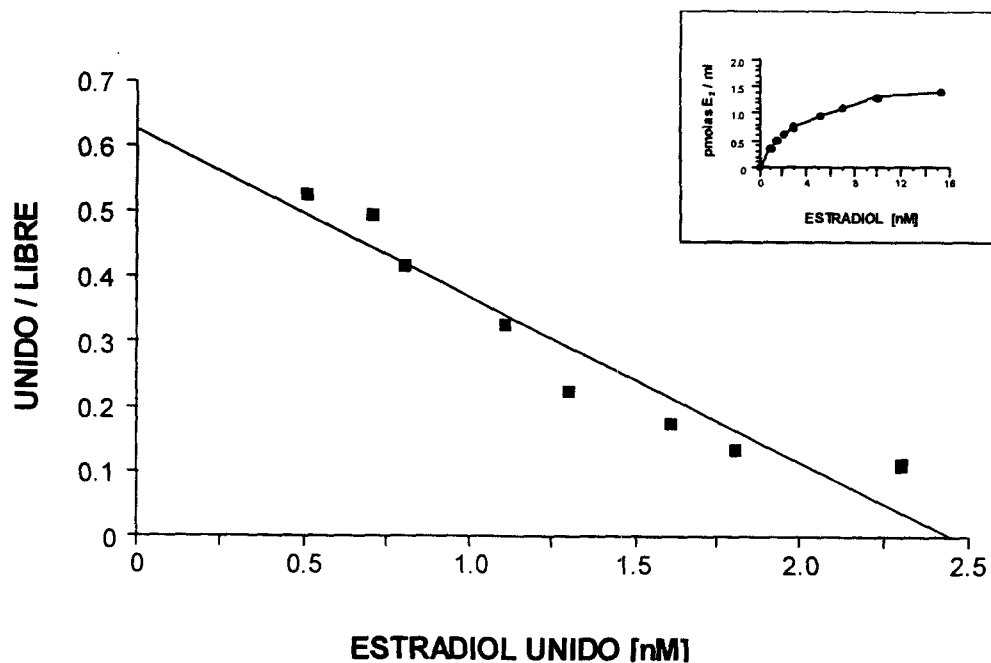
Figura 12.

La actividad de las 5 $\alpha$ -esteroide reductasas tipo 1 (pH 7.4) y tipo 2 (pH 4.8) sobre la molécula del GSD en las incubaciones de homogeneizados de próstatas ventrales de ratas, fue totalmente dependiente de NADPH. La máxima actividad enzimática ocurrió a la concentración 2 mM del cofactor. La mayor bioconversión de GSD a sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos se observó a pH de 4.8. Cada punto de la curva representa el promedio de tres experimentos realizados por triplicado.

### 11.3. Características de la unión al equilibrio del receptor intracelular de estrógenos

La curva de saturación del receptor de estradiol de citosol del útero de ratas prepúberes (2.0 mg de proteína/ml) se muestra en el recuadro de la Figura 13 y representa la unión específica de concentraciones crecientes de E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H], utilizado como radioligando. Como puede observarse en la gráfica, la saturación de los sitios activos del receptor de estrógenos en la preparación de citosol, se logró a partir de la concentración 4 nM del radioligando específico. Las constantes de unión al equilibrio del E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] con el receptor de estrógenos,

se obtuvieron al graficar, a la manera de Scatchard, los valores obtenidos de la gráfica de saturación. La constante aparente de disociación fue de  $3.94 \times 10^{-9}$  M, mientras que el número de sitios de unión fue de 2.47 nmolas/mg de proteína, valores similares a los descritos previamente en la literatura para el RE (Chávez y cols., 1985), indicando que el sistema era adecuado para investigar la interacción del GSD y sus metabolitos, con el RE.



**Figura 13.**

Unión específica del  $E_2$ - $[^3H]$  con el receptor de estrógenos (RE) en preparaciones de citosol de úteros de ratas prepúberes (Recuadro). Las constantes de la unión al equilibrio del  $E_2$  con el RE, se determinaron al graficar los valores de la curva de saturación a la manera de Scatchard. La constante aparente de disociación fue de  $3.94 \times 10^{-9}$  M y el Número de Sitios de Unión fue de 2.47 nmolas/mg de proteína.

#### 11.4. Estereoespecificidad de la unión del GSD y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos, al receptor intracelular de estrógenos

Los resultados del análisis de competencia de E<sub>2</sub>, GSD y sus metabolitos 5 $\alpha$ GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD, por los sitios activos del RE en el citosol de útero de ratas prepúberes, se muestran en la Figura 14 y en la Tabla 4. El E<sub>2</sub> radioinerte, como era de esperarse, fue el mayor competidor del E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H], por lo que su afinidad de unión, de acuerdo al método descrito por Reel y cols. (1979), se consideró como del 100 %.

El GSD y su derivado 5 $\alpha$ -tetrahidro GSD fueron incapaces de interactuar con el RE, aún a concentraciones altas (Fig. 14, Tabla 4).

Indudablemente que el hallazgo más relevante del estudio fue la demostración de que el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro GSD fue el competidor, que después del E<sub>2</sub>, exhibió la mayor interacción con RE, con una AUR de 1.34 %. El 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD, aunque también interactuó con el RE, su capacidad para competir con el E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] por los sitios activos del RE fue mucho menor que la de su epímero 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  GSD, con una AUR del 0.67 %, (Fig. 14, Tabla 4).

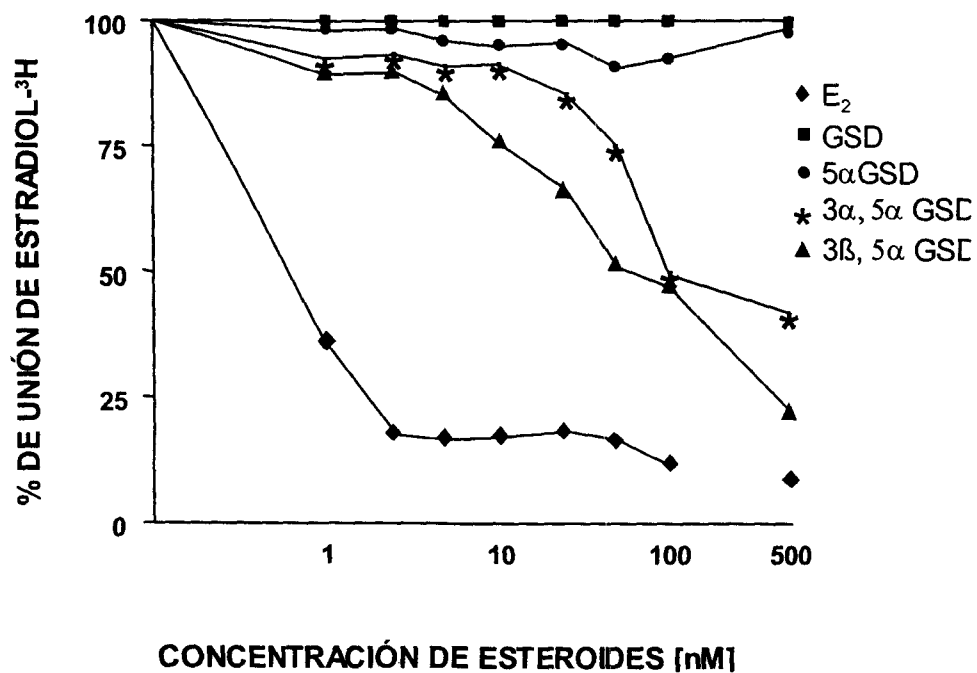


Figura 14

Competencia del GSD y sus metabolitos 5αGSD, 3α,5αGSD y 3β,5αGSD con el E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H], por los sitios activos de los receptores de estrógenos (RE) en el citosol de útero de ratas prepúberes. Los resultados se expresan como el porcentaje de unión del E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H]. El estradiol radioinerte fue el competidor más eficiente del radioligando, cuya unión al RE se consideró como el 100 %, de acuerdo al método descrito por Reel y Cols. (1979). Cada punto representa la media de tres experimentos por triplicado.

Las K<sub>i</sub> de los esteroides competidores estudiados se presentan en la Tabla 4, en donde se puede observar que la concentración de estradiol capaz de inhibir al 50 % la unión del radioligando específico E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] con el RE fue de 0.53 nM. El derivado reducido 3β,5α del GSD, presentó una K<sub>i</sub> de 40 nM, mientras que para el tetrahydro 3α,5α GSD, la K<sub>i</sub> fue de 80 nM (Tabla 4).

**Tabla 4.**

**Afinidad de Unión Relativa (AUR) y Constante de Inhibición ( $K_i$ )**

<b>Esteroides competidores</b>	<b>AUR (%) ②</b>	<b><math>K_i</math> [ nM ] ③</b>
$E_2$ ①	100	0.53
GSD	—	—
$5\alpha$ GSD	—	—
$3\alpha, 5\alpha$ GSD	0.67	80
$3\beta, 5\alpha$ GSD	1.34	40

① El radioligando empleado fue  $E_2$ - $^3H$

② La AUR se calculó de acuerdo al procedimiento descrito por Reel et al., 1979

③ La  $K_i$  se determinó por el procedimiento descrito por Cheng y Prusoff, 1973

**11.5. Transactivación del sistema de expresión en células HeLa, por los tetrahidros  $3\alpha,5\alpha$  y  $3\beta,5\alpha$  del GSD**

El desarrollo adecuado de los procesos de preparación y purificación de los plásmidos, así como de la transfección en células HeLa del gen del receptor  $\alpha$  ó  $\beta$  de estrógenos ( $R\alpha E$  ó  $R\beta E$ ), como vectores de expresión y del gen de la CAT, fusionado con elementos de respuesta a estrógenos, como vector reportero, nos permitió contar con el sistema de expresión requerido para determinar actividad estrogénica del GSD y de sus metabolitos  $3\alpha,5\alpha$ GSD  $3\beta,5\alpha$ GSD, a través de su interacción con el  $R\alpha E$  ó con el  $R\beta E$ .

Como se muestra en la Figura 15, el  $3\beta,5\alpha$ GSD y en menor proporción, el  $3\alpha,5\alpha$ GSD, administrados a los cultivos celulares a la concentración única de  $10^{-8}$  M, fueron los compuestos sintéticos que mostraron la mayor actividad sobre la inducción de la transcripción del gen de la CAT, mediada por el R $\alpha$ E. El E<sub>2</sub> utilizado como control experimental, fue el que indujo la mayor actividad, la cual se consideró como el 100 % para normalizar la expresión de la actividad de los esteroides sintéticos. Por el contrario, la misma concentración de los derivados tetrahidro reducidos  $3\alpha,5\alpha$  y  $3\beta,5\alpha$  del GSD, no fue capaz de estimular la transcripción del gen reportero a través del R $\beta$ E (Fig. 15). El derivado  $5\alpha$ GSD exhibió una actividad baja para el R $\alpha$ E, pero fue incapaz de estimular la transactivación del gen reportero, mediada por el R $\beta$ E (Fig. 15). El GSD no estimuló la actividad transcripcional del gen de la CAT a través de los receptores  $\alpha$  ó  $\beta$  de estrógenos (Fig. 15).

El efecto hormonal agonista ejercido por dosis crecientes ( $1 \times 10^{-12}$  a  $1 \times 10^{-6}$  M) del  $3\beta,5\alpha$ GSD, sobre la transactivación del gen reportero de CAT, mediada por los receptores de estrógenos, se muestra en la Figura 16. Como puede observarse, el derivado  $3\beta,5\alpha$ -reducido del GSD fue capaz de activar selectivamente la expresión del gen reportero de CAT a través del R $\alpha$ E a partir de la concentración de  $1 \times 10^{-9}$  M, sin embargo, el  $3\beta,5\alpha$ GSD, aún a la concentración

## TRANSACTIVACIÓN GÉNICA MEDIADA POR RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

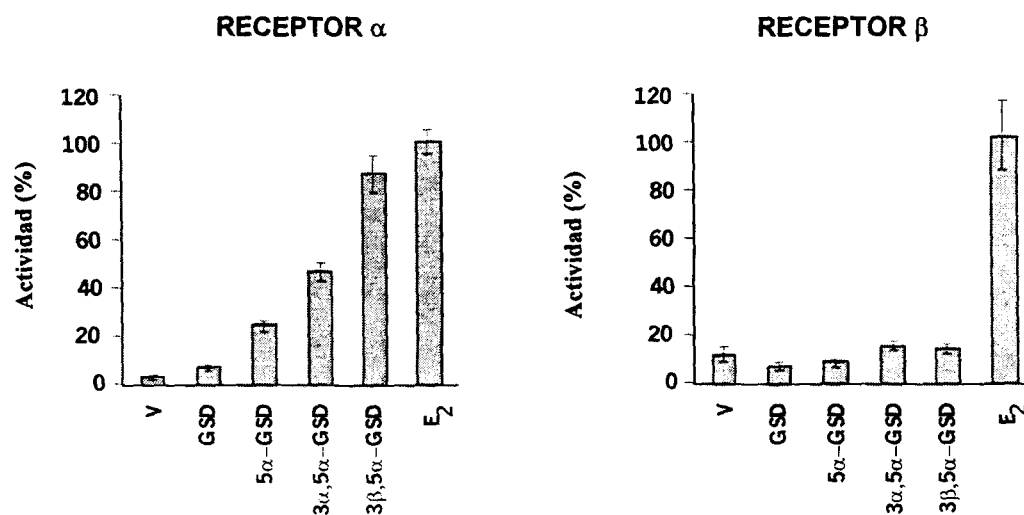
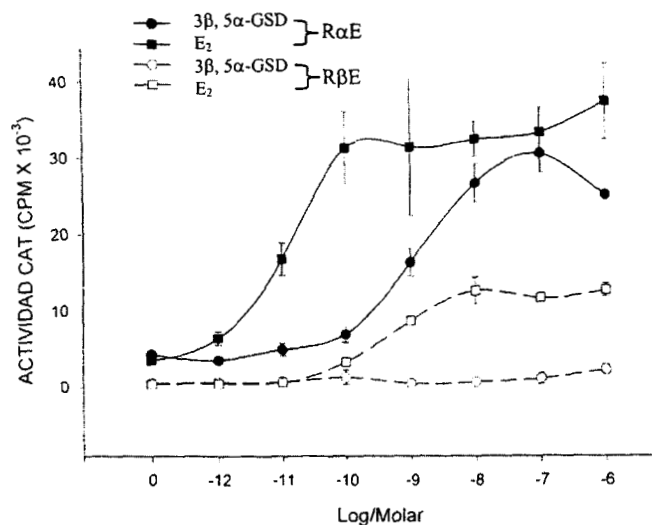


Figura 15

Actividad del GSD y de sus metabolitos 5 $\alpha$ GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD, a la concentración de  $1 \times 10^{-8}$  M en cultivos de células Hela co-transfectadas, sobre la inducción de la transcripción del gen de la CAT, mediada por el receptor  $\alpha$  o el receptor  $\beta$  de estrógenos. La actividad inducida por el E<sub>2</sub>, utilizado como control experimental, se consideró de 100 % y sirvió para normalizar la actividad de los esteroides sintéticos estudiados. El 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD y en menor proporción el 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD indujeron la transactivación del gen reportero mediada por el receptor  $\alpha$  de estrógenos, pero no a través del receptor  $\beta$  de estrógenos. Los valores en la gráfica representan la media  $\pm$  D.E. de tres experimentos realizados en triplicado.

más alta ( $1 \times 10^{-6}$  M), no activó la transcripción génica a través del R $\beta$ E. Por el contrario, el E<sub>2</sub> utilizado como control experimental, indujo la activación del gen reportero de la CAT a través de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de estrógenos a partir de concentraciones de  $1 \times 10^{-11}$  M y  $1 \times 10^{-9}$  M, respectivamente.

La dosis media efectiva ( $EC_{50}$ ) del  $3\beta,5\alpha$ GSD requerida para transactivar el gen de CAT, mediada por el  $R\alpha E$  fue de  $9.12 \times 10^{-10}$  M, mientras que la  $EC_{50}$  del  $E_2$  fue de  $1.34 \times 10^{-11}$  M. La dosis media efectiva de  $E_2$  para inducir la transactivación génica mediada a través del  $R\beta E$  fue mayor ( $3.7 \times 10^{-10}$  M).



**Figura 16**

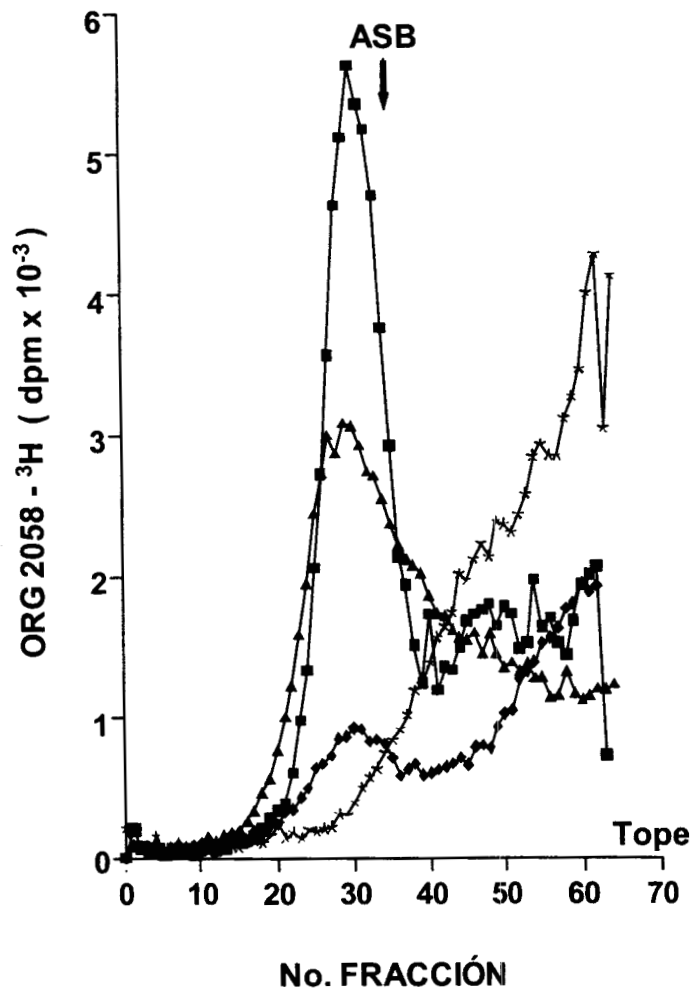
Efecto estrogénico de dosis crecientes de  $3\beta,5\alpha$ GSD y de estradiol, sobre la transactivación del gen reportero de CAT, a través de los receptores  $\alpha$  ó  $\beta$  de estrógenos ( $R\alpha E$  ó  $R\beta E$ ). La  $EC_{50}$  del  $3\beta,5\alpha$ GSD requerida para transactivar el gen de la CAT a través del  $R\alpha E$  fue de  $9.12 \times 10^{-10}$  M, mientras que la  $EC_{50}$  del  $E_2$  fue de  $1.34 \times 10^{-11}$  M. El  $3\beta,5\alpha$ GSD fue totalmente inactivo para inducir la transcripción génica a través del  $R\beta E$ . Los valores representan la media de tres experimentos realizados por triplicado.

### 11.6. Características de la unión del receptor estrógeno-dependiente de progesterona, inducido por el $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro GSD

La administración diaria, durante 6 días consecutivos, de dosis de 1 y 1.5 mg de  $3\beta,5\alpha$ GSD, a las ratas castradas, restableció en forma dosis-respuesta, la presencia de RP en las hipófisis anteriores de los animales tratados, como se muestra en el análisis de los gradientes de sacarosa (Fig. 17). El tratamiento



con la dosis de 0.5 mg del derivado reducido del GSD, fue insuficiente para inducir la presencia del RP. La administración de BE<sub>2</sub> (5 µg/día/6días), empleado como control positivo de los experimentos, reestableció completamente la presencia de los RP en la adenohipófisis de las ratas ovariectomizadas (Fig. 17), mientras que el tratamiento con propilenglicol, vehículo en que se administraron los compuestos esteroides, no mostró la presencia de RP (Fig. 17). El exceso de 100 X de ORG 2058 radioinerte, inhibió totalmente la unión del ORG 2058-[<sup>3</sup>H] a los RP. El coeficiente de sedimentación, obtenido de los gradientes de sacarosa, fue de 7 a 9 S para los RP inducidos por el 3β,5αGSD e idéntico al de los RP inducidos por el BE<sub>2</sub>.



**Figura 17**

Inducción del receptor estrógeno-dependiente de progesterona (RP), en las hipófisis anteriores de ratas adultas castradas, después de la administración diaria durante 6 días consecutivos, de 1.0 (◆) y 1,5 (▲) mg de 3β,5αGSD, evaluada por medio de gradientes lineales de sacarosa. Los RP se marcaron radiactivamente con ORG 2058-[<sup>3</sup>H] y se utilizó albúmina de suero de bovino (ASB ↓) como marcador externo. Un grupo de ratas tratadas con 5 µg de BE<sub>2</sub> (■), sirvió como control positivo. El coeficiente de sedimentación del RP inducido por el 3β,5αGSD (7-9 S) fue idéntico al inducido por el BE<sub>2</sub>. Un grupo de animales tratados con vehículo (★) sirvió como control negativo.

## 12. DISCUSIÓN

La síntesis química de los derivados  $5\alpha$ GSD,  $3\alpha,5\alpha$ GSD y  $3\beta,5\alpha$ GSD, con un alto grado de pureza química y en cantidad suficiente para la realización de las diferentes fases experimentales del presente estudio de investigación, fue fundamental debido a que estos compuestos no están disponibles comercialmente.

Los resultados de la reducción química del doble enlace del anillo A, así como de la posterior reducción del grupo cetónico del carbono 3 de la molécula del GSD, fueron muy satisfactorios, tanto por el buen rendimiento obtenido, como por el alto grado de pureza de los tres derivados sintetizados, lo cual se hizo evidente por sus constantes físicas y espectroscópicas como: punto de fusión, espectro de absorción de infrarrojo, resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y espectrometría de masas.

Los resultados obtenidos en la serie de experimentos orientados a definir, en órganos blanco, el destino metabólico *in vitro* del GSD, mostraron claramente que esta potente progestina sintética fue biotransformada enzimáticamente a diversos metabolitos reducidos en el anillo A de la molécula. En efecto, las incubaciones *in vitro* de GSD- $^3\text{H}$  y GSD- $^{14}\text{C}$  con homogeneizados de hipófisis anteriores, hipotálamos y próstatas ventrales de rata, resultaron en la formación de  $5\alpha$ GSD,  $3\alpha,5\alpha$ GSD y  $3\beta,5\alpha$ GSD radioquímicamente puros,

demostrándose así que el GSD es un sustrato adecuado para las enzimas  $5\alpha$ -esteroide reductasas tipo 1 y tipo 2,  $3\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, en los tejidos hormono-sensibles estudiados (Fig. 18). El derivado  $5\alpha$ GSD fue el producto de la conversión metabólica que se formó en mayor cantidad, mientras que la bioconversión de GSD a los tetrahidros  $3\alpha,5\alpha$  y  $3\beta,5\alpha$ , ocurrió en menor proporción, como se muestra en las Tablas 2 y 3 y Figuras 9 y 11. La unión "trans" de los anillos A/B de la molécula del derivado  $5\alpha$ -reducido del GSD, fue idéntica a la de la molécula de DHT resultante de la acción catalítica de la  $5\alpha$  esteroide-reductasa sobre la molécula de T, utilizada como control experimental.



La bioconversión de GSD a  $5\alpha$ GSD en los homogeneizados de hipófisis anteriores e hipotálamos, ocurrió únicamente en las incubaciones realizadas a pH de 7.4, de manera idéntica a lo observado en las incubaciones en las que se utilizó testosterona como sustrato (Figura 9, Tabla 3). Este hallazgo demuestra que la  $5\alpha$ -esteroide reductasa tipo 1 es la que específicamente reduce el doble enlace entre los carbonos 4 y 5 de la molécula del GSD en estos tejidos neuroendocrinos, una observación que se sustenta adicionalmente en varios informes de la literatura que demuestran que la isoenzima tipo 1 de la  $5\alpha$ -esteroide reductasa, se encuentra expresada ampliamente en el sistema nervioso central de los mamíferos (Russell y Wilson, 1994; Mahendroo y cols., 1996; Celotti y cols., 1997). Por otra parte, la falta de formación de  $5\alpha$ GSD en las incubaciones de hipófisis anteriores e hipotálamos, a pH de 4.8 (Tabla 3), sugiere fuertemente que la isoenzima tipo 2 de la  $5\alpha$ -reductasa no está presente en estos tejidos, lo cual confirma las observaciones previas de Normington y Russell (1992) y de Thigpen y cols. (1993). Por el contrario, en las incubaciones de GSD con homogeneizados de próstata ventral de la rata, tanto a pH 7.4, como a pH de 4.8, el  $5\alpha$ GSD se identificó como el principal producto de conversión metabólica (Fig. 11), demostrando que la  $5\alpha$ -reducción del GSD (unión A/B "trans") es mediada por las  $5\alpha$ -esteroide reductasas tipo 1 y tipo 2 (Tablas 2 y 3). La presencia y actividad de la  $5\alpha$ -esteroide reductasa tipo 2 en la próstata ventral, ha sido bien documentada (Normington y Russell, 1992;

Russell y Wilson, 1994; Poletti y cols., 1998) sugiriendo que esta isoenzima se expresa selectivamente en los órganos sexuales accesorios dependientes de andrógenos. La actividad de las  $5\alpha$ -esteroide reductasas sobre la molécula de GSD, en los tejidos estudiados, fue en todos los casos dependiente de NADPH (Figs. 10 y 12), ya que en ausencia del cofactor no se observó la reducción del anillo A. La característica de dependencia de la actividad de estas enzimas por el NADPH, cuando se utiliza testosterona como sustrato, ha sido ampliamente informada (Massa y cols. 1972).

El hallazgo experimental más importante en esta serie de experimentos fue la identificación, en los tres tejidos estudiados, del  $3\alpha,5\alpha$ GSD y del  $3\beta,5\alpha$ GSD como productos de bioconversión del GSD. Estudios previos de farmacocinética (Täuber y cols, 1989), habían sugerido la formación de derivados reducidos en el anillo A, después de la administración oral e intravenosa del GSD, algunos de los cuales también fueron parcialmente identificados en incubaciones *in vitro* con tejido hipotalámico (Ward y Back, 1993). Sin embargo, los resultados aquí presentados constituyen la primera caracterización de dos metabolitos neutros, tetrahidro reducidos en el anillo A del GSD, que se sustenta en los criterios estrictos del método de dilución isotópica inversa, que incluye movilidad cromatográfica (Fig. 8) y pureza radioquímica (Tabla 1).

El perfil metabólico del GSD, a nivel de órganos blanco, fue similar al descrito previamente para otras progestinas anticonceptivas como la NET (Larrea y

cols., 1987) y el LNG (Lemus y cols., 1992), demostrándose así que los esteroides sintéticos de la serie 19-nor son biotransformados a diversos compuestos, que indudablemente, contribuyen a la expresión biológica hormonal observada después de su administración.

Habiendo demostrado que el GSD es eficientemente biotransformado a tres metabolitos reducidos en el anillo A y con la disponibilidad de estos derivados del GSD, de un alto grado de pureza, fue factible explorar, de acuerdo a la hipótesis planteada, si alguno o algunos de estos productos de la conversión metabólica, podían mediar los efectos genómicos de tipo estrogénico del GSD, al investigar en una primera fase la capacidad de unión del GSD y sus metabolitos al RE.

Los resultados de los estudios de la estereoespecificidad de unión del GSD y sus derivados no fenólicos, en el citosol del útero de ratas prepúberes, como fuente de RE, y  $E_2$ -[ $^3H$ ] como radioligando específico (Fig.14, Tabla 4), demostraron que el GSD, aun en concentraciones elevadas, fue incapaz de competir con el  $E_2$  isotópicamente marcado, lo cual indicó que esta progestina sintética no es reconocida por el sitio activo del RE, confirmando y ampliando los informes previos de Düsterberg y cols (1987) y de Wilde y Balfour (1995).

La observación experimental de que el  $3\beta,5\alpha$ GSD interactúa específicamente con el RE, con una afinidad de unión significativamente menor que la observada



con el E<sub>2</sub> radioinerte, utilizado como control experimental (Tabla 4) constituyó un hallazgo relevante. El 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD también interactuó en forma específica con el RE, aunque con menor afinidad de unión relativa que su isómero 3 $\beta$  (Fig. 14, Tabla 4). Estos resultados son similares, pero no idénticos, a los previamente informados para los tetrahedros de NET (Chávez y cols., 1985), los cuales se unen con mayor afinidad al RE que los derivados correspondientes del GSD. El 5 $\alpha$ GSD no mostró capacidad de unión con el RE, observación que correlaciona con la demostración previa de que el derivado 5 $\alpha$ -reducido de NET no es reconocido por el sitio activo del RE (Chávez y cols., 1985). El E<sub>2</sub> natural, usado como control experimental, fue el inhibidor más potente de la interacción del ligando con el receptor en estos estudios de competencia (Fig. 14, Tabla 4).

La demostración de que dos de los metabolitos del GSD interactúan con el RE, ofreció apoyo experimental a la hipótesis planteada de que los efectos genómicos de tipo estrogénico del GSD podrían ser mediados a través de sus metabolitos, ya que el GSD no fue reconocido por este receptor. Sin embargo, la sola evidencia que un compuesto se una en forma específica a un receptor hormonal intracelular, no implica que ese compuesto necesariamente induzca un efecto hormonal agonista, por lo que fue necesario investigar la actividad de tipo estrogénica del GSD y sus metabolitos, utilizando marcadores moleculares específicos.

Inicialmente, la potencia estrogénica del GSD y sus derivados se evaluó por su capacidad para inducir la transcripción génica mediada independientemente por el R $\alpha$ E o por el R $\beta$ E en un sistema de expresión en células HeLa, transitoriamente co-transfectadas con elementos de respuesta estrogénica, fusionados al gen reportero de la CAT y vectores de expresión para el R $\alpha$ E y para el R $\beta$ E. Los resultados obtenidos demostraron claramente que el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD, activó selectivamente la expresión del gen reportero (CAT) mediada por el R $\alpha$ E, pero no por el R $\beta$ E, como se muestra en las Figuras 15 y 16. De manera similar, aunque con menor potencia, el 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD transactivó el gen de CAT a través del R $\alpha$ E pero no del R $\beta$ E. La transactivación del gen reportero, por el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD, en el sistema de expresión celular, fue dependiente de la dosis (Fig. 16), observándose que a concentraciones altas ( $10^{-8}$  M), su potencia fue similar a la del E<sub>2</sub>, utilizado como control experimental.

La dosis media efectiva (EC<sub>50</sub>) del 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD requerida para inducir transactivación del gen de CAT a través del R $\alpha$ E, fue significativamente mayor (68 X) que la del E<sub>2</sub>, demostrando una potencia biológica de tipo estrogénica menor que la de la hormona natural. Este hallazgo se correlaciona con los resultados de los estudios de competencia por el RE (Fig. 14, Tabla 4) que demostraron que la Ki para el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD fue significativamente mayor (74.1X) que la del E<sub>2</sub>. Estos datos en conjunto demuestran, que para inducir efectos de

tipo estrogénico mediados por sus metabolitos, se requieren grandes dosis de GSD.

El GSD *per se* no fue capaz de inducir la transactivación génica mediada por el R $\alpha$ E ni por el R $\beta$ E, en las células co-transfectadas, lo cual correlaciona con la observación que el GSD no es reconocido por el sitio activo de los RE. El 5 $\alpha$ GSD exhibió una actividad muy baja, mediada por el R $\alpha$ E, actividad que muy posiblemente se deba a su biotransformación a metabolitos tetrahydro reducidos, ya que las células HeLa poseen enzimas que metabolizan esteroides, incluyendo a las 3 $\alpha$ - y 3 $\beta$ - hidroxisteroide deshidrogenasas (datos aun no publicados). Los estudios de Zaga (2001) en mi laboratorio, que demostraron que los tetrahidros 3 $\alpha$  y 3 $\beta$  del GSD, pero no el 5 $\alpha$ GSD, son capaces de transactivar el gen reportero de la  $\beta$ -galactosidasa, a través del R $\alpha$ E, en un sistema de expresión en levaduras dependiente de estrógenos, confirman este concepto, ya que las levaduras están desprovistas de actividad enzimática para metabolizar esteroides.

La demostración de que los metabolitos de GSD inducen efectos genómicos de tipo estrogénico, selectivamente mediados por el R $\alpha$ E, es de gran importancia biológica en el sentido de que aún cuando se ha identificado y caracterizado un segundo RE (receptor  $\beta$ ), su relevancia tanto fisiológica como en la clínica endocrinológica, no ha sido completamente elucidada (Kiuper y cols., 1996; Mosselman y cols.,1996; Enmark y cols. 1997) . Los metabolitos tetrahydro

reducidos del GSD, particularmente el  $3\beta,5\alpha$ , constituyen las primeras moléculas en las cuales se ha descrito una capacidad selectiva de expresión hormonal a través de solamente uno de los RE, lo que permitirá realizar estudios *in vivo*, selectivos para delinear la función de los diversos RE.

Adicionalmente, los resultados obtenidos nos permiten sugerir, que en los metabolitos  $5\alpha$  reducidos del GSD, la orientación espacial del anillo A con respecto al anillo B, así como la presencia del grupo hidroxilo en el C-3, particularmente en orientación  $\beta$ , podrían ser características estructurales importantes para su reconocimiento como ligandos por el  $R\alpha E$  estrógenos. Estas observaciones experimentales coinciden con los estudios basados en el análisis por computadora de Tong y cols. (1997), de la relación estructura-actividad en las interacciones ligando-receptor. Por otro lado, la ausencia del metilo angular en la molécula del  $3\beta,5\alpha$ GSD, puede incrementar la movilidad y la densidad electrónica del anillo A, permitiendo el alineamiento del grupo hidroxilo en orientación  $\beta$  del C-3 y los átomos de hidrógeno del anillo A, creando un ambiente de tipo “estrogénico”.

Los resultados de nuestros estudios, claramente apoyan la hipótesis planteada de que los efectos estrogénicos del GSD son mediados por sus metabolitos reducidos en el anillo A. Sin embargo, el hecho de que esta evidencia se obtuviera en sistemas celulares de expresión, nos motivó para realizar estudios

que permitieran confirmar, en un modelo *in vivo*, las observaciones obtenidas en los sistemas *in vitro*.

La administración diaria, durante 6 días consecutivos, de dosis altas del  $3\beta,5\alpha$ GSD, a ratas hembras adultas castradas, incrementó en la hipófisis anterior, el contenido de receptores estrógeno-dependientes de progesterona, en una manera dosis-respuesta, como se muestra en la Figura 17. Este incremento en los RP, inducido por el  $3\beta,5\alpha$ GSD, fue sin embargo, significativamente menor que el inducido por dosis pequeñas de benzoato de estradiol, empleado como control experimental. Los RP, inducidos tanto por el metabolito  $3\beta,5\alpha$ GSD como por el  $BE_2$ , presentaron el mismo coeficiente de sedimentación (7-9 Unidades Svedberg) en los gradientes lineales de sacarosa (Fig. 17). Estos resultados demuestran que la actividad estrogénica del  $3\beta,5\alpha$ GSD, manifestada en sistemas celulares de expresión, se confirma en un modelo animal *in vivo*, utilizando un marcador altamente específico de la acción estrogénica, como es la inducción del receptor estrógeno-dependiente de progesterona, en la hipófisis anterior de la rata hembra ovariectomizada.

En conjunto, los datos obtenidos de la serie de estudios experimentales aquí presentados demuestran categóricamente que los efectos genómicos de tipo estrogénico, observados después de la administración de grandes dosis de GSD, una potente progestina sintética, son mediados por dos de sus

metabolitos reducidos en el anillo A de la molécula, el  $3\beta,5\alpha$ GSD y el  $3\alpha,5\alpha$ GSD, quienes al interactuar específicamente con el RE, son capaces de activar genes dependientes de estrógenos. Los resultados obtenidos en sistemas celulares de expresión, se confirmaron en un modelo animal *in vivo*, lo que permitió apoyar con mayor evidencia la hipótesis planteada. Otras contribuciones colaterales de este trabajo de tesis se describen en las Conclusiones.

### 13. CONCLUSIONES

- El GSD, una potente progestina sintética de la serie de esteroides 19-nor, es ampliamente bioconvertida a tres metabolitos neutros reducidos en el anillo A: 5 $\alpha$ GSD, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD, demostrando así que la molécula del GSD es sustrato adecuado de las 5 $\alpha$  esteroide-reductasas, 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa.
- El metabolito 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD y en menor proporción el 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD, interactúan específicamente con el receptor intracelular de estrógenos, con una afinidad de unión relativa significativamente menor que el E<sub>2</sub>. El GSD y su derivado 5 $\alpha$ GSD, no son reconocidos por el receptor de estrógenos.
- Los metabolitos reducidos 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  del GSD son capaces de transactivar el gen de CAT, selectivamente mediado por el receptor humano  $\alpha$  de estrógenos, pero no a través del receptor humano  $\beta$  de estrógenos, en un sistema de expresión de células HeLa co-transfectadas, demostrando que estos derivados del GSD son moduladores selectivos del receptor de estrógenos. La dosis media efectiva (EC<sub>50</sub>) para lograr la transactivación es significativamente mayor (68 veces) que la del E<sub>2</sub>.

- ◆ El metabolito  $3\beta,5\alpha$ GSD, a dosis muy altas, es capaz de inducir el receptor estrógeno-dependiente de progestinas en la hipófisis anterior de ratas castradas, con una potencia significativamente menor que la del  $E_2$ .
- ◆ Los resultados aquí presentados ofrecen una explicación, sustentada en evidencias experimentales, de que los efectos de tipo estrogénico observados después de la administración de grandes dosis de GSD, son mediados a través de un mecanismo de acción alterno ejercido por sus metabolitos reducidos en el anillo A, confirmando la hipótesis planteada en este estudio.
- ◆ Los datos obtenidos permitirán, además del avance del conocimiento, la aplicación del uso del GSD en la clínica y en la investigación endocrinológica, así como en el diseño de nuevas moléculas sintéticas con actividades hormonales selectivas.



## 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, W.M., Ehrenstein, M., 1944. 10-norprogesterone, a physiologically active lower homolog of progesterone. *Science* 100:251-252.

Ball, M.J., Ashwell, E., Gillmer, M.D.G., 1991. Progestagen-only oral contraceptives: comparison of the metabolic effects of levonorgestrel and norethisterone. *Contraception* 44:223-233.

Beard, J., 1897. *The Span of Gestation and the Cause of Birth*. G. Fischer, Jena.

Birch, A.J., 1950. Hydroaromatic steroid hormones. I. 10-nortestosterone. *J Chem Soc* 1:367-368.

Boongarts, J., 1986. The transition in reproductive behaviour in the third world. En: *The Choices Ahead*. Y, Menken (Ed.), W.W. Norton & Co., New York.

Bowers, A, Ringold, H.J., Denot, E., 1958. Steroids C1. 19-nordihydrotestosterone derivatives. *J Am Chem Soc* 80:6115-6121.

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

- Brown, H.C., Krishnamurthy, S., 1972 Lithium tri-sec-butyl borohydride. A new reagent for the reduction of cyclic and bicyclic ketones with superstereo selectivity. A remarkably simple and practical procedure for the conversion of ketones to alcohols in exceptionally high stereochemical purity. *J Am Chem Soc* 94:7159-7161.
- Bullock, L.P., Bardin, C.W., 1977. Androgenic, synandrogenic and antiandrogenic actions of progestins. *Ann NY Acad Sci* 286:321-330.
- Bullock, L.P., Bardin, C.W., Sherman, M.R., 1978. Androgenic, antiandrogenic and synandrogenic actions of progestins: Role of steric and allosteric integrations with androgen receptors. *Endocrinology* 103:1768-1782.
- Butenandt, A., Westphal, O., 1934. Zur isolierung und charakterisierung des corpus-luteum hormones. *Ber Deutsch Chem Gesellsch* 67:1440-1442.
- 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.
- Celotti, F., Negri-Cesi, P., Poletti, A., 1997. Steroid metabolism in the mammalian brain: 5 alpha-reduction and aromatization. *Brain Res Bull* 44:365-375.
- Colton, F.B., 1955. 13-Methyl-17-ethynyl-17-hydroxy-1,2,3,4,6,7,8,9,11,12,13,14,16,17-tetra- decahydro-15H-cyclopenta( $\alpha$ )-phenanthren-3-one and its preparation. U.S. Patent No. 2,725,389.

- Cooney, A.J., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., Tsai, M-J., 1992. COUP-TF dimmers bind to different GGTCA response elements allowing it to repress hormonal induction of VDR,TR and RAR. *Mol Cell Biol* 12:4153-4163.
- Cooney, A.J., Leng, X., Tsai, S.Y., O'Malley, B.W., Tsai, M-J., 1993. Multiple mechanisms of COUP-TF-dependent repression of VDR,TR and RAR transactivation. *J Biol Chem* 268:4152-4160.
- Corner, G.W., Allen, W.M., 1929. Physiology of the corpus luteum. II. Production of a special uterine reaction (progestational proliferation) by extracts of the corpus luteum. *Am J Physiol* 88:326-339.
- Coutinho, E.M., 1966. Reversible sterility induced by medroxyprogesterone injections. *Fertil Steril* 17:261-266.
- Crabbé, P., Archer, S., Benagiano, G., Diczfalusy, E., Djerassi, C., Fried, J., Higuchi, T., 1983. Long-acting contraceptive agents: design of the WHO chemical synthesis programme. *Steroids* 41:243-253.
- Cravioto, M.C., Alvarado, G., Canto-de-Cetina, T., Bassol, S., Oropeza, G., Santos-Yung, R., Valencia, J., Palma, Y., Fusiwara, J.L., Navarrete, T., Garza-Flores, J., Pérez-Palacios, G., 1997. A multicentre comparative study on the efficacy, safety, and acceptability of the contraceptive subdermal implants Norplant<sup>®</sup> and Norplant<sup>®</sup>-II. *Contraception* 55:359-367.
- Chávez, B.A., Vilchis, F., Pérez, A.E., García, G.A., Grillasca, I., Pérez-Palacios, G. 1985. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 22:121-126.

Cheng, Y.-C., Prusoff, W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmac* 22:3099-3108.

Diczfalusy, E., 1997. *The contraceptive Revolution. An Era of Scientific and Social Development.* The Parthenon Publishing Group, New York, London.

Djerassi, C., Miramontes, L., Rosenkranz, G., 1952. Steroids. 19-nor-17-ethynyltestosterone and 19-nor-17-methyltestosterone. Meeting Am Chem Soc. Abstract 18J.

Djerassi, C., Miramontes, L., Rosenkranz, G., Sondheimer, F., 1954. Steroids-LIV. Synthesis of 19-nor-17 $\alpha$ -ethynyltestosterone and 19-nor-17 $\alpha$ -methyltestosterone. *J Am Chem Soc* 76:4092-4094.

Düsterberg, B., Tack, J.-W., Krause, W., Hümpel, M., 1987. Pharmacokinetics and biotransformation of gestodene in man. *En Gestodene. Development of a new gestodene-containing low dose oral contraceptive.* M. Elstein (Ed.). Parthenon Publishing. Carnforth, pp 35-44.

Edgren, R.A., Smith, H., Peterson, D.L., Carter, D.L., 1963. The biological effects of a series of 13-substituted gonanes related to norethisterone (17-ethynyl-19-nortestosterone). *Steroids* 2:319-335.

Ehrenstein, M., 1944. Investigation on steroids. VIII. Lower homologs of the premane series: 10-nor-11-desoxycorticosterone acetate and 10-norprogesterone. *J Org Chem* 9:435-456.

- Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz J., Freid, G., Nordenskjöld, M., Gustafsson, J.-A., 1997. Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocr Metab* 82:4258-4265.
- Evans, R.W., Sholiton, L.J., Leavitt, W.W., 1978. Progesterone receptor in the rat anterior pituitary: effect of estrogen priming and adrenalectomy. *Steroids* 31:69-81.
- Farley, T.M.M., Meirik, O., Chang, C.L., 1995. Marmot, M.G., Poulter N.R. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. *Lancet* 346:1582-1588.
- Fotherby, K., Caldwell, A.D.S., 1994. New progestogens in oral contraception. *Contraception* 49:1-132.
- Garza-Flores, J., Cravioto, M.C., Pérez-Palacios, G., 1992. Steroid injectable contraception: Current concepts and perspectives. En: *Contraception: Newer Pharmacological Agents, Devices and delivery Systems*. R Sitruk-Ware, CW Bardin (Eds.) Marcel Dekker, Inc., New York, pp 41-70.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F., Howard, B.H., 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 2:1044-1051.
- Gual, C., Morato, T., Hayano, M., Gut, M., Dorfman, R.I., 1962. Biosynthesis of estrogens. *Endocrinology* 71:920-925.

- Haberlandt, L., 1924. Über hormonale sterilisierung des weiblichen tierkörpers. Ein beitrage zur lehre von der inneren secretion des eierstockes und der plazenta. En: Abderhaldens Fortschritte der Naturwissenschaftlichen Forschung. Vol. 12. Urban & Schwarzenberg, Viena, Berlin.
- Hartman, M., Wettstein, A., 1934. Ein Krystallisiertes hormone aus corpus luteum. Helv Chim Acta 17:878-882.
- Herrmann, E., Stein, M., 1916. Über die wirkung eines hormones des corpus luteum auf männliche und weibliche keimdrüsen. Wien Klin Wochenschr 29:778-782.
- Hilliard, J. Croxato, H., Hayward, J.N., Sawyer, C.H., 1966. Norethindrone blockade of LH release to intrapituitary infusion of hypothalamic extract. Endocrinology 79:411-419.
- Hofmeister, H., Annen, K., Laurent, H., Petzoldt, K., Wiechert, R., 1986. Synthesen von Gestoden. Drug Res 36:781-783.
- Inhoffen, H.H., Logemann, W., Hohlweg, W., Serini, A., 1938. Untersuchungen in der sexual hormon-reihe. Ber Deutsch Chem Gesellsch 71:1024-1032.
- Johannisson, E., Brosens, I., Cornillie, F., Elder, M., White, J., Sheppard, B., Hourihan, H., d'Arcangues, C., Belsey, E.M., 1991. Morphometric study of the human endometrium following continuous exposure to levonorgestrel released from vaginal rings during 90 days. Contraception 43:361-374.
- Jung-Hoffmann, C., Heidt, F., Kuhl, H., 1988. Effect of two oral contraceptives containing 30 µg ethynylestradiol and 75 µg gestodene or 150 µg desogestrel upon various hormonal parameters. Contraception 38:593-603.

- Kato, J., Onouchi, T., Okinaga, S., 1978. Hypothalamic and hypophysial progesterone receptors: estrogen-priming effects, differential localization,  $5\alpha$ -dihydroprogesterone binding, and nuclear receptors. *J Steroid Biochem* 9:410-427.
- Kuhl, H., 1996. Comparative pharmacology of newer progestogens. *Drugs* 51:188-215.
- Kuiper, G.J.M., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J-A., 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci* 93:5925-5930.
- Larrea, F., Escobar, N., Garza-Flores, J., Moctezuma, O., Martínez-Campos, A., Pérez-Palacios, G., 1983. Nuclear translocation of estradiol receptors by the in vivo administration of norethisterone. An alternate mechanism for gonadotropin inhibition. *J. Steroid Biochem* 19:1747-1752.
- Larrea, F., Moctezuma, O., Pérez-Palacios, G., 1984. Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. *J Steroid Biochem* 20:841-847.
- Larrea, F., Vilchis, F., Chávez, B., Pérez, A.E., Garza-Flores, J., Pérez-Palacios, G., 1987. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J. Steroid Biochem* 27:657-663.
- Lemus, A.E., Vilchis, F., Damsky, R., Chávez, B.A., García, G.A., Grillasca, I., Pérez-Palacios, G., 1992. Mechanism of action of levonorgestrel: In vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J Steroid Biochem Molec Biol* 41:881-890.

- Mahendroo, M.S., Cala, K.M., Rissell, D.W., 1996.  $5\alpha$ -reduced androgens play a key role in murine parturition. *Mol Endocrinol* 10:380-392.
- Makepeace, A.W., Weinstein, G.L., Friedman, M.H., 1937. The effect of progestin and progesterone on ovulation in the rabbit. *A. J Physiol* 119:512-516.
- Martínez-Manautou, J., 1967. Daily progestogen for contraception: A clinical study. *Brit Med J* 2:730-735.
- Massa, R., Stupnicka, E., Kniewald, Z, Martini, L., 1972. The transformation of testosterone into dihydrotestosterone by the brain and the anterior pituitary. *J. Steroid Biochem* 3:385.
- Moralí, G., Lemus, A.E., Oropeza, M.V., García, G.A., Pérez-Palacios, G., 1990. Induction of male sexual behavior by norethisterone: Role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacol Biochem Behav* 37:477-484.
- Mosselman, S., Polman, J., Dijkema, R., 1996. ER $\beta$ : identification and characterization of novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49-53.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, Diciembre 6, 1999. México.
- Normington K., Russell, D.W., 1992. Tissue distribution y characteristics of rat steroid  $5\alpha$ -reductase isozymes. *J Biol Chem* 267:19548-19554.
- Pérez, A.E., Beyer, C., Larsson, K., Pérez-Palacios, G., 1977. In vitro conversión of 5-androstenediol to testosterone by the central nervous system and pituitary of the male rat. *Steroids* 29:627-633.



- Pérez-Palacios, G., Cerbón, M.A., Pasapera, A.M., Castro, J.I., Enriquez, J., Vilchis, F., García, G.A., Morali, G., Lemus, A.E., 1992. Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J. Steroid Biochem Molec Biol* 41:479-485.
- Pérez-Palacios, G., Garza-Flores, J., 1994. The contributions of Mexican scientists to contraceptive research and development. En: *Contraceptive Research and development 1984 to 1994: The Road from Mexico City to Cairo and Beyond*. PFA Van Look y G Pérez-Palacios (Eds.), Oxford University Press, Delhi, Bombay. pp 233-246.
- Poletti, A., Negri-Cresi, P., Rabuffetti, M., Colciago, A., Celotti, F., Martini, L., 1998. Transient expression of the 5 $\alpha$ -reductase type 2 isozyme in the rat brain in late fetal and early postnatal life. *Endocrinology* 139:2171-2178.
- Poulter, N.R., Chang, C.L., Farley, T.M.M., Meirik, O., Marmot, M.G., 1995. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *Lancet* 346:1575-1582.
- Prenant, A., 1898. La valeur morphologique du corps jaune, son action physiologique et therapeutique possible. *Rev Gen Sci Pur Appl* 9:646-650.
- Prost E., Moore, D.D., 1986. CAT vectors for analysis of eukaryotic promoters and enhancers. *Gene* 45:107-111.
- Reel, J.R., Humphrey, R.R., Shih, Y-H., Windsor., B.L., Sakowski, R., Creger, P.L., Edgren, R.A., 1979. Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biologic activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives. *Fert Steril* 31:552-561.

- Russell, D.W., Wilson, J.D., 1994. Steroid 5 $\alpha$ -reductase: two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 64:25-61.
- Santillán, R., Pérez-Palacios, G., Reyes, M., Damián-Matsumura, P., García, G.A., Grillasca, I., Lemus, A.E., 2001. Assessment of the oestrogenic activity of the contraceptive progestin levonorgestrel and its non-phenolic metabolites. *Europ J Pharmacol* 427:167-174.
- Scatchard, G., 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51:660-672.
- Schoonen, W.G.E.J., Joosten, J.W.H., Kloosterboer, H.J., 1995a. 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.
- Seed, B., Sheen, J.Y., 1988. A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* 67:271-277.
- Sivin, I., Stern, J., 1994. Health during prolonged use of levonorgestrel 20  $\mu$ g/d and the Copper TCu 380Ag intrauterine contraceptive devices: a multicentre study. *Fertil Steril* 61:70-77.
- Slota, K.H., Ruschig, H., Fels, E., 1934. Reindarstellung der hormone aus dem corpus luteum. *Ber Deutsch Chem Gesellsch* 67:1270-1273.
- Smith, C.L., Coonneely, O.M., O'Malley, B.W., 1993. Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6120-6124.

- Smith, H., Hughes, G.A., Douglas, G.H., Hartley, D., McLoughlin, B.J., Siddall, J.B., Wendt, G.R., Buzby, G.C., Herbst, D.R., Ledig, K.W., McMenamin, J.R., Pattison T.W., Suida, J., Tokolics, J., Edgren, R.A., Jansen, A.B.A., Gadsby, B., Watson, D.H.R., Phillips, P.C., 1963. Totally synthetic ( $\pm$ )-13-alkyl-3-hydroxy and methoxy-gona-1,3,5(10)-trien-17-ones and related compounds. *Experientia* 19:394-396.
- Stickland, J., Tolowinska, I.Y., Anthong, F., Dennis, K.J., 1987. The suppression of ovarian function by the new oral contraceptive Femodene. *Contraception* 35:447-456.
- Still, W.C., Kahan, M., Mitra, A., 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. *J Org Chem* 43:2923-2925.
- Täuber, U., Tack, J.W., Matthes, H., 1989. Single dose pharmacokinetics of gestodene in women after intravenous and oral administration. *Contraception* 40:461-479.
- Thigpen, A.E., Cala, K.M., Russell, D.W., 1993. Characterization of Chinese hamster ovary cell lines expressing human steroid  $5\alpha$ -reductase isozymes. *J Biol Chem* 268:17404-17412.
- Tong, W., Perkins, E., Xing, L., Welsh, W.J., Sheehan, D.M., 1997. QSAR models for binding of estrogenic compounds to estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes. *Endocrinology* 138:4022-4025.

- Vilchis, F., Chávez, B., Pérez, A.E., García, G.A., Angeles, A., Pérez-Palacios, G., 1986. Evidence that a non aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J. Steroid Biochem* 24:525-531.
- Ward, S., Back, D.J., 1993. Metabolism of gestodene in human liver cytosol and microsomes in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46:235-243.
- Wilde, M.I., Balfour, A.J., 1995. Gestodene: a review of its pharmacology, efficacy and tolerability in combined contraceptive preparations. *Drugs* 50:364-395.
- Wintersteiner, O, Allen, W.M., 1934. Crystalline progestin. *J Biol Chem* 107:321-336.
- Zaga, V., 2000. Significado biológico del metabolismo del Gestodeno a nivel de órgano blanco. Tesis Recepcional para la obtención del Grado de Maestra en Ciencias. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Zarrow, M.X., Peters, L.E., Caldwell, A.L., 1958. Comparative potency of several progestogenic compounds in a battery of different biological tests. *Ann NY Acad Sci* 71:532-541.
- Zschokke, E., 1898a. Beitrag zur pathologie der ovarien des rindes. *Schweiz Arch Tierhelik* 40:235-268.
- Zschokke, E., 1898b. Über die ursachen der unfruchtbarkeit des rindes. *Landwirtsch. Jahrbuch Schweiz* 4:252-273.

**15. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DEL TRABAJO  
EXPERIMENTAL DE ESTA TESIS**

# The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites

A E Lemus<sup>1,2</sup>, V Zaga<sup>2</sup>, R Santillán<sup>2</sup>, G A García<sup>3</sup>, I Grillasca<sup>3</sup>, P Damián-Matsumura<sup>1</sup>, K J Jackson<sup>4</sup>, A J Cooney<sup>4</sup>, F Larrea<sup>2</sup> and G Pérez-Palacios<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Department of Cell Biology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

<sup>5</sup>Dirección General de Salud Reproductiva, Secretaría de Salud, Mexico City, Mexico

(Requests for offprints should be addressed to A E Lemus, Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán, Vasco de Quiroga 15, México, D.F., C.P. 14000, Mexico; Email: ppal@cenids.ssa.gob.mx)

## Abstract

Gestodene (17 $\alpha$ -ethynyl-13 $\beta$ -ethyl-17 $\beta$ -hydroxy-4,15-gonadien-3-one) is the most potent synthetic progestin currently available and it is widely used as a fertility regulating agent in a number of contraceptive formulations because of its high effectiveness, safety and acceptability. The observation that contraceptive synthetic progestins exert hormone-like effects other than their progestational activities, prompted us to investigate whether gestodene (GSD) administration may induce oestrogenic effects, even though the GSD molecule does not interact with intracellular oestrogen receptors (ER).

To assess whether GSD may exert oestrogenic effects through some of its neutral metabolites, a series of experimental studies were undertaken using GSD and three of its A-ring reduced metabolites. Receptor binding studies by displacement analysis confirmed that indeed GSD does not bind to the ER, whereas its 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro reduced derivative (3 $\beta$ GSD) interacts with a relative high affinity with the ER. The 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  GSD isomer (3 $\alpha$ GSD) also binds to the ER, though to a lesser extent. The ability of the A-ring reduced GSD derivatives to induce oestrogenic actions was evaluated by the use of two different molecular bioassays: (a) transactivation of a yeast system co-transfected with the human ER $\alpha$  (hER $\alpha$ ) gene and oestrogen responsive elements fused to the  $\beta$ -galactosidase reporter vector and (b) transactivation of the hER $\alpha$ -mediated transcription of the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) reporter gene in a HeLa cells expression system. The oestrogenic potency of 3 $\beta$ GSD was also

assessed by its capability to induce oestrogen-dependent progestin receptors (PR) in the anterior pituitary of castrated female rats.

The results demonstrated that 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD were able to activate, in a dose-dependent manner, the hER $\alpha$ -mediated transcription of both the  $\beta$ -galactosidase and the CAT reporter genes in the yeast and HeLa cells expression systems respectively. In both assays the 3 $\beta$  derivative of GSD exhibited a significantly greater oestrogenic effect than its 3 $\alpha$  isomer, while unchanged GSD and 5 $\alpha$ GSD were completely ineffective. Neither 3 $\beta$ GSD nor 3 $\alpha$ GSD exhibited oestrogen synergistic actions. Interestingly, the pure steroidal anti-oestrogen ICI-182,780 diminished the transactivation induced by 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD in the yeast expression system. Furthermore, administration of 3 $\beta$ GSD resulted in a significant increase of oestrogen-dependent PR in the anterior pituitaries of castrated rats in comparison with vehicle-treated animals. The characteristics of the 3 $\beta$ GSD-induced PR were identical to those induced by oestradiol benzoate.

The overall results demonstrate that 3 $\beta$ GSD and its 3 $\alpha$  isomeric alcohol specifically bind to the ER and possess a weak intrinsic oestrogenic activity, whereas unmodified GSD does not. The data contribute to a better understanding of the GSD mechanism of action and allow the hypothesis to be advanced that the slight oestrogen-like effects attributable to GSD are mediated by its non-phenolic, tetrahydro reduced metabolites.

*Journal of Endocrinology* (2000) **165**, 693–702

## Introduction

The availability of novel, very potent synthetic progestins has allowed the development of the so-called third

generation contraceptive formulations, representing a breakthrough in the field of fertility regulation (Kuhl 1996). The most effective of these progestins is gestodene (GSD), a synthetic 19-nor steroid that has been widely

used in low dose combined oral contraceptives (Fotherby & Caldwell 1994, Wilde & Balfour 1995). Recently, a series of studies (WHO 1995a,b, Jick *et al.* 1995, Lewis *et al.* 1996) have suggested that low dose, combined oral contraceptives pills, containing highly potent progestins, such as GSD, probably carry a small risk of venous thromboembolic disease (VTD) beyond that attributable to combined oral formulations containing less potent progestins such as norethisterone or levonorgestrel. The origin of VTD associated with the use of hormonal contraceptives is multifactorial and a number of mechanisms has been involved (Inman & Vessey 1968, Vessey *et al.* 1986, Helmrich *et al.* 1987, WHO 1989, Vandembroucke *et al.* 1994, WHO 1995b, Spitzer *et al.* 1996, Winkler 1998). The unexpected association between the use of GSD containing oral contraceptives and an increased risk of VTD raised the controversial question as to whether GSD may exert potent oestrogen agonistic or synergistic effects (WHO Scientific Group 1998), particularly since the GSD molecule does not interact with intracellular oestrogen receptors (ER) (Düstenberg *et al.* 1987).

Evidence has been accumulated over the last years indicating that contraceptive synthetic progestins exert potent hormone-like effects other than their progestational activities (Vilchis *et al.* 1986, Pérez-Palacios *et al.* 1992, Lemus *et al.* 1997). The hormonal agonist, synergistic and even antagonistic effects of synthetic progestins are mediated either by their interaction with the wrong receptors (Bardin 1983, Chávez *et al.* 1985, Lemus *et al.* 1992) or by their metabolic conversion products (Larrea *et al.* 1987, Lemus *et al.* 1992).

This study was aimed at elucidating the role of the GSD metabolites in determining oestrogen-like effects. A series of experiments were undertaken to assess whether non-phenolic A-ring reduced derivatives of GSD may be involved in mediating its oestrogenic activity, taking advantage of the fact that GSD, after its administration, undergoes extensive metabolism in a similar manner to other 19-nor synthetic progestins (Düstenberg *et al.* 1987). The *in vivo* formation of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  GSD (3 $\beta$ GSD) and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  GSD (3 $\alpha$ GSD) has been demonstrated after the administration of <sup>14</sup>C-labelled GSD to normal women (Düstenberg *et al.* 1987). Assessment of the intrinsic oestrogenic potency of GSD and its derivatives was done by the use of ER binding studies, oestrogen-induced transactivation systems in yeast and HeLa cells previously co-transfected with human ER $\alpha$  (hER $\alpha$ ) expression vectors and their cognate reporter vectors, and induction of oestrogen-dependent progestin receptors (PR) in the rat anterior pituitary.

Additional interest in conducting these studies derived from the observation in our laboratory (Vilchis *et al.* 1986, Morali *et al.* 1990, Pérez-Palacios *et al.* 1992) that norethisterone, a synthetic contraceptive progestin,

exerts potent oestrogen-like effects through its neutral tetrahydro reduced metabolites.

## Materials and Methods

### Steroids and chemicals

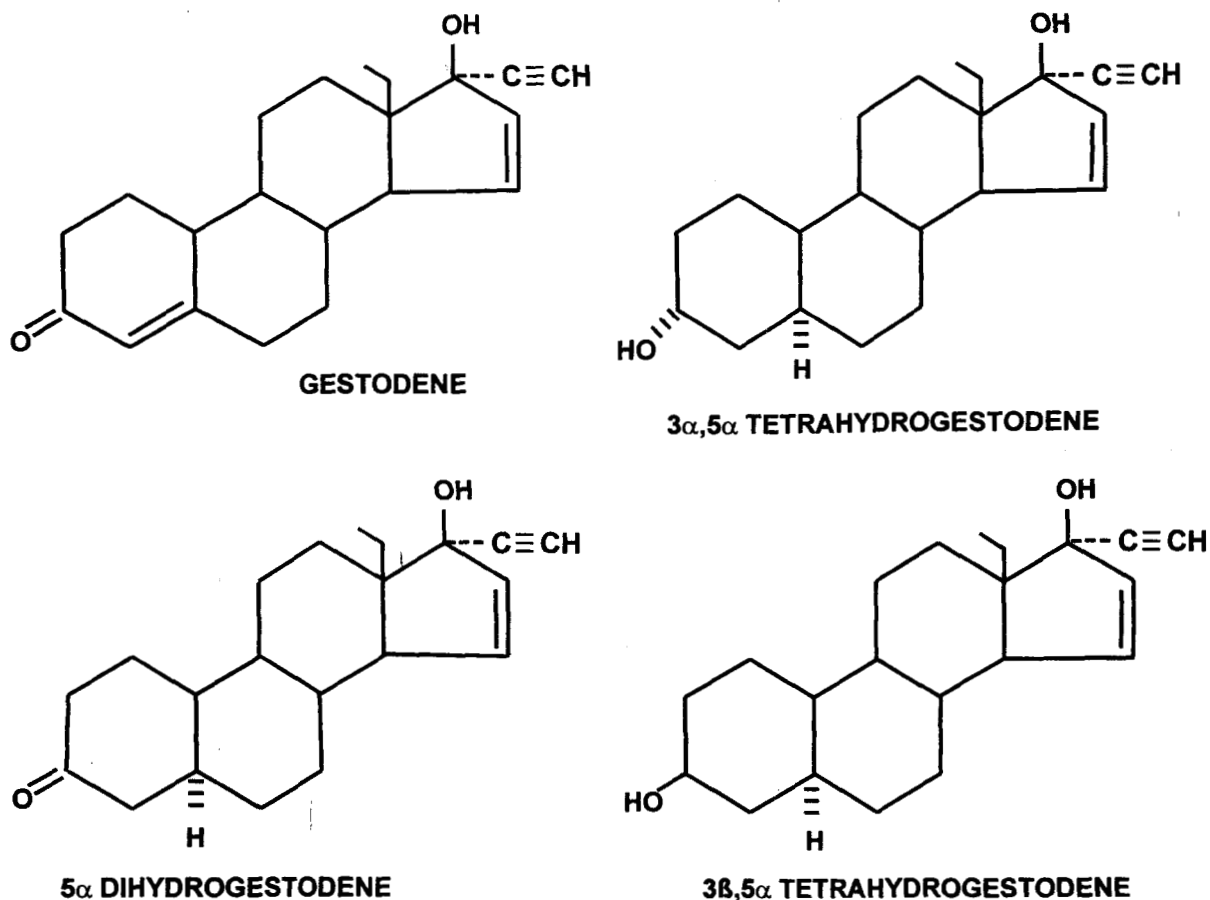
Authentic GSD was kindly provided by Schering AG (Berlin, Germany) and 5 $\alpha$ -dihydro GSD (5 $\alpha$ GSD) was synthesised by lithium-ammonia reduction of GSD, crystallised from ethyl acetate-hexane and purified by flash chromatography (Still *et al.* 1978). A 60% yield of the pure compound was obtained. The 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD tetrahydro derivative (3 $\alpha$ GSD) was prepared from reduction of 5 $\alpha$ GSD with L-selectride under anhydrous conditions (Brown & Krishnamurthy 1972). Sodium hydroxide and hydrogen peroxide were added, and following extraction with ethyl acetate, a mixture of 3 $\alpha$ - (98%) and 3 $\beta$ - (2%) GSD derivatives were obtained (yield: 95%). Synthesis of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  tetrahydro GSD (3 $\beta$ GSD) was performed by sodium borohydride reduction (Bowers *et al.* 1958) of 5 $\alpha$ GSD (yield: 70%). The molecular structures of GSD and its metabolites are depicted in Fig. 1. Chemical purity of GSD and its derivatives was assessed by their melting points, HPLC behaviour, infrared absorption, and <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance. The physical and spectroscopic constants of the A-ring reduced GSD derivatives were as follows:

5 $\alpha$ GSD: m.p. 168–170 °C; i.r. (KBr) 3362, 3258, 3047, 2948, 2924, 2857, 2086, 1697 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.92 (dd, *J*=5.7 and 1.5 Hz, 1H), 5.67 (dd, *J*=5.7 and 3.6 Hz, 1H), 2.60 (s, 1H), 0.867 (t, *J*=7.5 Hz, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  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; MS (FAB) 313.

3 $\alpha$ GSD: m.p. 178–181 °C; i.r. (KBr) 3567, 3392, 3252, 3051, 2929, 2089 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.93 (dd, *J*=5.7 and 1.52 Hz, 1H), 5.65 (dd, *J*=5.7 and 3.6 Hz, 1H), 4.09 (m, 1H), 2.60 (s, 1H), 0.85 (t, *J*=7.5 Hz, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  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, 83.83, 132.30, 135.33; MS (FAB) 315.

3 $\beta$ GSD: m.p. 139–141 °C; i. r. (KBr) 3373, 3281, 2919, 2859 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.84 (dd, *J*=5.5 and 1.2 Hz, 1H), 5.57 (dd, *J*=5.5 and 3.6 Hz, 1H), 3.47 (m, 1H), 2.53 (s, 1H), 0.768 (t, *J*=7.2 Hz, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  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; MS (FAB) 315.

[2,4,6,7-<sup>3</sup>H]oestradiol ([<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>), specific activity (sp. act.) 97 Ci/mmol was purchased from Amersham



**Figure 1** Molecular structures of GSD and three of its A-ring reduced metabolites, 5 $\alpha$ -dihydrogestodene (5 $\alpha$ GSD), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrogestodene (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD) and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrogestodene (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD).

International plc (Bucks, UK) and its radiochemical purity was established by its thin-layer chromatographic behaviour and, by repeated crystallisation of an aliquot to constant specific activity. Other natural and synthetic steroids were supplied by Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). The anti-oestrogen ICI-182,780 was obtained from Zeneca Farma (Mexico City, Mexico). All reagents and solvents used were analytical grade.

#### Oestradiol receptor binding studies

All procedures were performed in accordance with the Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals published by the Universities Federation for Animal Welfare and approved by the Research Ethics Board of the Universidad Autonoma Metropolitana. Immature female, intact Wistar rats (body weight: 100–200 g) without oestrogen priming were used for these studies. Animals were kept under a 14 h light : 10 h darkness cycle, maintained on food and water and allowed

to feed *ad libitum*. Animals were killed by decapitation and uteri were immediately removed, blotted and weighed; thereafter all procedures were carried out at 4 °C. Uterine tissues were homogenised in chilled TEDLM buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 4 °C, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol, 10  $\mu$ g/ml leupeptine, and 10 mM sodium molybdate) in a ratio (w/v) 1:6, with three 10 s bursts.

The homogenate was centrifuged at 180 000 g for 1 h at 2 °C in an SW 50.1 rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Cytosol protein was determined by the Bradford's dye binding method (Bradford 1976) using bovine serum albumin as a standard.

Stereospecificity of the binding of GSD and its derivatives to ER was assessed by displacement analysis as previously reported (Chávez *et al.* 1985). Uterine cytosol aliquots (2.0–3.4 mg protein/ml) were incubated with [ $^3$ H]E $_2$  in the absence or presence of increasing concentrations (1–500 nM) of radioinert E $_2$  at 2–4 °C for 18–20 h. The relative binding affinities (RBA) of GSD



and its derivatives to cytosol ERs were evaluated by their capability to displace bound [ $^3\text{H}$ ]E $_2$  from the ER. Radioactive content in the samples was determined in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer, Model 1900 TR (Packard, Downers Grove, IL, USA) using Insta-Gel Plus as counting solution. The counting efficiency for  $^3\text{H}$  was 65% and quenching was corrected in all samples by external standardisation. The RBA and the inhibition constant ( $K_i$ ) of GSD and its metabolites were calculated according to procedures previously described (Cheng & Prusoff 1973, Reel *et al.* 1979).

#### Oestrogen-induced yeast transactivation system

Oestrogen-like activity of GSD and its A-ring reduced derivatives was assessed in the yeast expression system as previously reported (Lyttle *et al.* 1992), where *Saccharomyces cerevisiae* hyperpermeable yeast strain RS 188 N was co-transfected with an expression vector containing the hER $\alpha$ , under the control of a yeast copper metallothionein promoter and a  $\beta$ -galactosidase reporter vector, expression of which was under the control of oestrogen response elements (EREs). Yeast cultures were grown overnight, as described by Sherman *et al.* (1982), diluted to an optical density (o.d.) of 0.5 at 660 nm and allowed to grow for 1 h, after which ER $\alpha$  synthesis was induced with 100  $\mu\text{M}$  copper sulphate for an additional hour and incubated for 4.5 h with varying concentrations of GSD, its derivatives, and/or other naturally occurring and synthetic steroids including the pure anti-oestrogen ICI-182,780. Oestradiol served as the positive control, while dihydrotestosterone (DHT), progesterone (P $_4$ ) and pregnenolone (P $_5$ ) were the negative controls. Yeast were harvested by centrifugation, washed with Z buffer (50 mM NaH $_2$ PO $_4$ , pH 7.0, 10 mM KCl, 1 mM MgSO $_4$ , 5 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) and the cytosolic fraction was obtained by vortexing with glass beads in Z buffer followed by centrifugation at 10 000 g. The supernatant was assayed for  $\beta$ -galactosidase activity using *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside (4 mg/ml) as substrate, and the o.d. at 420 nm was registered after 10 min.

#### Oestrogen-induced HeLa cells transactivation system

The oestrogen-like actions of GSD and its A-ring reduced derivatives were also assessed in the HeLa cells co-transfected with the mammalian expression vector for human ER $\alpha$  (PCR 3.2-hER $\alpha$ ) and its cognate reporter vector EREe1b-chloramphenicol acetyl transferase (CAT) (Cooney *et al.* 1992, 1993). HeLa cells were plated the day before transfection in a six-well plate at a density of  $3.0 \times 10^5$  cells/well in DMEM-high glucose (HG) without phenol red, which was supplemented with 5% stripped fetal bovine serum (FBS) and 10 000 U of penicillin and streptomycin. Cells were maintained in 5% CO $_2$  atmosphere at 37 °C. The next day, cells were visualised to assure cell density between 30 and 50%.

Transfections were performed in triplicate using SuperFect (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). In a sterile tube, 100  $\mu\text{l}$  of serum-free media was aliquoted and the DNA was added, after vortexing 10  $\mu\text{l}$  of SuperFect reagent were added and vortexed for 10 s. The samples were incubated at room temperature for 5–10 min and afterwards 600  $\mu\text{l}$  of supplemented DMEM-HG were added to each sample and the mixture was pipetted up and down twice. The medium containing the transfection complexes was added to the cell monolayer previously rinsed with PBS. The plates were incubated for 3 h at 37 °C with 5% CO $_2$ . After incubation, the plates containing the transfection complexes were rinsed with PBS, and 3 ml of complete growth medium were added to each well. Twenty-four hours later, the medium in each well was replaced with complete medium containing different concentrations of GSD, 5 $\alpha$ GSD, 3 $\alpha$ GSD, 3 $\beta$ GSD and E $_2$ . Dimethyl sulphoxide (DMSO) or ethanol (EtOH) were used as steroid vehicles. The next day the plates were harvested for CAT assays as previously described (Cooney *et al.* 1992, 1993). Briefly, the medium was aspirated from each well and the plates were rinsed with PBS, and 1 ml of cold TEN (40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) buffer was added to each well. The cells were removed from the monolayer with a cell lifter, and the contents of each well were transferred to an 1.5 ml tube. The tubes were centrifuged for 5 min at 4 °C. The supernatant was removed and 80  $\mu\text{l}$  of cold 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0 were added to each sample which was kept on ice. Samples went through three freeze-thaw cycles and centrifugation at 4 °C. The liquid CAT assay as described by Seed & Sheen (1998) was used to determine the CAT activity, employing 5  $\mu\text{g}$  protein, 25  $\mu\text{g}$  of butyryl coenzyme-A (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA),  $2 \times 10^5$  c.p.m. of xylene-extracted [ $^3\text{H}$ ]chloramphenicol (Dupont NEN Research Products, Boston, MA, USA) and 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0 for 1 h incubation at 37 °C.

#### Oestrogen-induced rat anterior pituitary PR

The induction of PR in the anterior pituitary (AP) of castrated rats was used as previously described (Vilchis *et al.* 1986) to further assess the oestrogenic potency of the 3 $\beta$ GSD derivative. Adult female Wistar rats (body weight 200–250 g) were ovariectomised under ether anaesthesia and kept under a 14 h light : 10 h darkness cycle with free access to water and food. Three weeks after ovariectomy, groups of 20 rats each were daily injected for 6 consecutive days with 100  $\mu\text{l}$  of propylene glycol containing either 500, 1000 or 1500  $\mu\text{g}$  of 3 $\beta$ GSD. Animals treated with 5  $\mu\text{g}$ /day for 6 days oestradiol benzoate (E $_2$ B) or with vehicle alone were used as experimental controls. After completion of the treatment, animals were killed by decapitation and the AP were immediately removed, rinsed with ice-cold TEDM buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at

4 °C, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol, and 10 mM sodium molybdate), blotted and weighed. Thereafter all procedures were carried out at 4 °C. Tissues were homogenised in a glass homogeniser with a Teflon pestle with TEDM buffer supplemented with 10% glycerol (v/v) and 10 µg/ml leupeptine in a tissue:buffer ratio of 1:6 (w/v). Pituitary cytosol preparations were obtained as described for binding studies. Aliquots of cytosol (300–400 µl; 10–14 mg protein/ml) were incubated with 4 nM [6,7-<sup>3</sup>H]ORG 2058 (promegestone) for 4 h at 4 °C and layered on the top of linear sucrose gradients (20–35% in TEDM buffer supplemented with 10% (v/v) glycerol). An excess (125 ×) of radioinert ORG 2058 was added to an incubation set of cytosols from animals treated with 3βGSD. BSA, on a parallel gradient, was used as an external marker. Gradients were centrifuged at 398 000 g for 2 h and 30 min at 2 °C in a VTi 65 rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA). Fractions of 150 µl each were collected from the bottom of the gradients and their radioactive content determined.

#### Statistical analysis

The results of transactivation studies in the yeast and HeLa cells expression systems are expressed as mean ± s.d. for each experimental group. Significance of differences was evaluated by Student's *t*-test. Group differences were considered to be significant when  $P \leq 0.05$ .

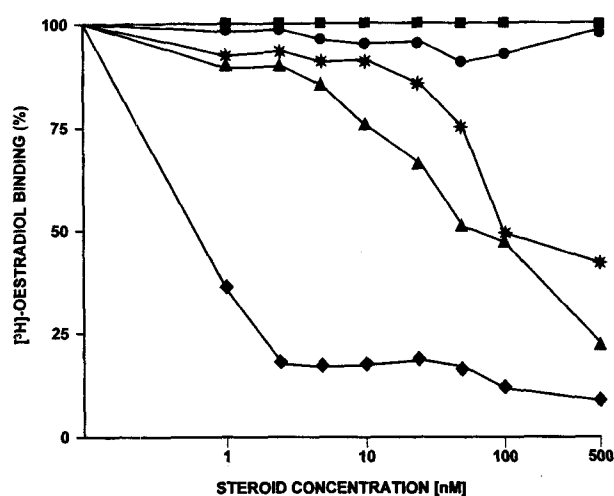
## Results

#### Competition of GSD and its metabolites for ER

The effects of increasing concentrations of non-radioactive GSD and its A-ring reduced derivatives upon the [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub> binding to uterine cytosolic ER obtained from immature rats are shown in Fig. 2. The RBAs and the inhibition constant ( $K_i$ ) for each steroid are shown in Table 1. The only striking competitor for the ER binding sites was the 3βGSD derivative (RBA: 1.34%;  $K_i$ : 40 nM), though the 3αGSD isomer also induced a slight competitive effect (RBA: 0.67%;  $K_i$ : 80 nM). Unmodified GSD and 5αGSD were completely ineffective. Naturally occurring E<sub>2</sub> used as positive control was the most potent inhibitor.

#### Transactivation of the yeast expression system by GSD metabolites

The oestrogen-like effects of GSD and its A-ring reduced metabolites, as assessed in the hyperpermeable yeast expression system, are shown in Fig. 3. The 3β,5α tetrahydro derivative of GSD and its 3α,5α isomer were able to induce the ERα-dependent transactivation of the yeast system in a dose-response manner, similar to that induced by naturally occurring E<sub>2</sub>, yet to a significantly

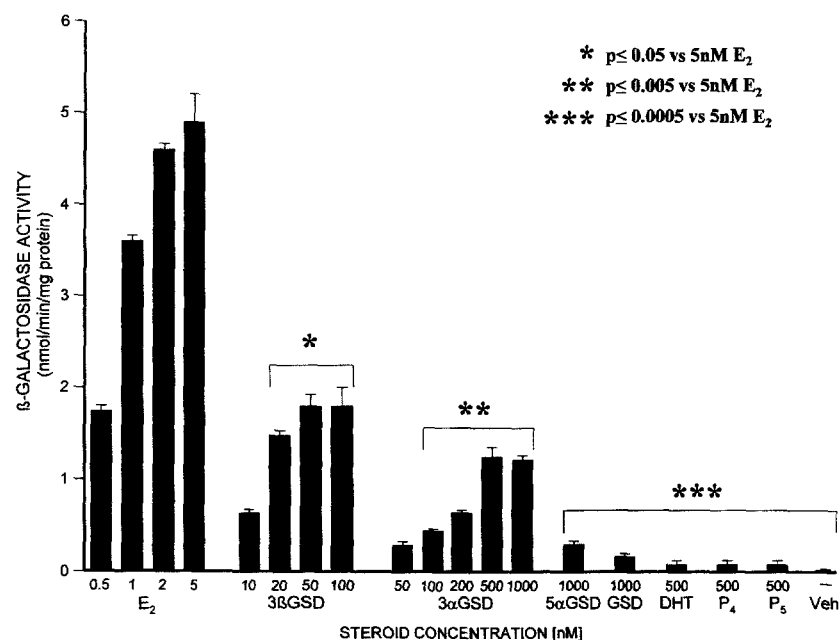


**Figure 2** Competition of GSD and three A-ring reduced GSD metabolites for the rat uterine [<sup>3</sup>H]-ER binding sites. Oestradiol receptors were labelled *in vitro* by overnight incubations of uterine cytosol preparations from prepubertal animals, with 1 nM [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub>, at 4 °C (final incubation volume=200 µl). Increasing concentrations of the following radioinert steroids were added to the incubations: E<sub>2</sub> (◆), GSD (■), 5αGSD (●), 3αGSD (✱) and 3βGSD (▲). Bound and free fractions were separated by the addition of a dextran-coated charcoal suspension. Each point represents the mean of five experiments in triplicate. The results show that 3βGSD was the most effective synthetic steroid competitor for ER binding sites, though 3αGSD also induced a slight competitive effect. Unmodified GSD and 5αGSD were completely ineffective. Naturally occurring E<sub>2</sub>, used as positive control, was the most potent competitor.

lesser extent. At steroid concentrations that induced the highest β-galactosidase transactivation (Fig. 3), the oestrogen-like effect of 3βGSD (50 nM) was 100-fold less potent than E<sub>2</sub> (0.5 nM), whereas 3αGSD (500 nM) was 25-fold less potent than 3βGSD (20 nM). The 5α dihydro derivative of GSD had very little, if any, effect on the oestrogen-mediated transactivation of the yeast expression system, even at 1000 nM dose, whereas unmodified GSD was completely devoid of oestrogen-like effects as depicted in Fig. 3. A lack of oestrogenic potency of DHT, P<sub>4</sub> and P<sub>5</sub>, used as negative controls, was observed on this expression system. When 1 µM of the pure anti-oestrogen

**Table 1** Relative binding affinities (RBAs) and inhibition constants ( $K_i$ ) of natural and synthetic steroids for cytosol ERs. [<sup>3</sup>H]E<sub>2</sub> was used as radioligand. RBAs were determined according to Reel *et al.* (1979) and  $K_i$  values were calculated according to Cheng & Prusoff (1973)

Steroid competitors	RBA (%)	$K_i$ (nM)
GSD	—	—
5αGSD	—	—
3αGSD	0.67	80
3βGSD	1.34	40
E <sub>2</sub>	100	0.53



**Figure 3** Activation of hER $\alpha$ -mediated  $\beta$ -galactosidase activity by GSD and its A-ring reduced metabolites in a yeast expression system. The yeast strain RS 188 N was co-transfected with an expression vector containing the hER $\alpha$  and oestrogen responsive elements fused to the  $\beta$ -galactosidase reporter vector. Yeast were grown in the presence of increasing concentrations of GSD and its derivatives, as well as naturally occurring steroids. The results are expressed as  $\beta$ -galactosidase activity. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments in triplicate (for details see the text). The results show that 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD induced the hER $\alpha$ -mediated  $\beta$ -galactosidase activity in a dose-dependent manner, similar to that observed with naturally occurring E<sub>2</sub> used as positive control. 5 $\alpha$ GSD exhibited very little, if any, oestrogen-like effect, while unchanged GSD was completely ineffective. Dihydrotestosterone (DHT), progesterone (P<sub>4</sub>), pregnenolone (P<sub>5</sub>) and the vehicle (Veh), used as negative controls, were also ineffective.

ICI-182,780 was added to the incubations of co-transfected yeast cultures with either 5  $\mu$ M E<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M 3 $\beta$ GSD or 500  $\mu$ M 3 $\alpha$ GSD, a significant diminution of the  $\beta$ -galactosidase activity induced by E<sub>2</sub> and the two GSD tetrahydro metabolites was observed, as depicted in Fig. 4. To investigate whether GSD and its derivatives may exert synergistic oestrogenic effects, yeast cultures were incubated with 100 nM GSD, 100 nM 3 $\beta$ GSD and 500 nM 3 $\alpha$ GSD in the presence of 0.5 nM E<sub>2</sub>. The results (Fig. 5) showed that neither GSD nor its two tetrahydro-reduced derivatives exhibit synergistic effects with E<sub>2</sub> in this system. Oestradiol exerted additive effects with the GSD tetrahydro metabolites.

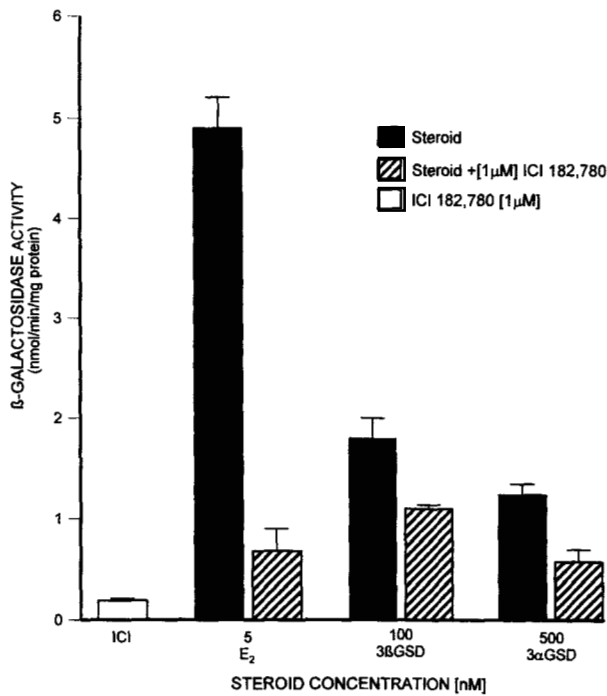
#### Transactivation of the HeLa cells expression system by GSD metabolites

The oestrogen-like effects of GSD and its derivatives as assessed in the HeLa cells expression system are shown in Fig. 6. In general, the results were similar, though not identical, to those obtained in the transactivation yeast expression system. The 3 $\beta$ GSD derivative exhibited

oestrogen agonistic effects, inducing transactivation of the hER $\alpha$ -mediated CAT activity, while its 3 $\alpha$  isomer also induced the transactivation of the CAT system to a significant lesser extent. Unmodified GSD was completely ineffective to activate the hER $\alpha$ -mediated CAT activity, thus indicating a lack of oestrogen agonistic effect (Fig. 6).

#### 3 $\beta$ GSD induction of rat anterior pituitary PR

Incubations of AP cytosol from vehicle-treated castrated rats with [<sup>3</sup>H]ORG 2058 exhibited very little, if any, progestin binding activity as disclosed by the employed gradient labelling technique (Fig. 7), whereas oestradiol benzoate (E<sub>2</sub>B) administration (5  $\mu$ g/day) fully restored the pituitary content of oestrogen-dependent PR. Daily administration of 3 $\beta$ GSD for 6 consecutive days to castrated animals successfully restored anterior pituitary PR in a dose-dependent manner; thus the dose of 500  $\mu$ g/day was almost ineffective, whereas the daily doses of 1000 and 1500  $\mu$ g were able to induce the presence of PR in the rat AP. The [<sup>3</sup>H]ORG 2058 complexes in the

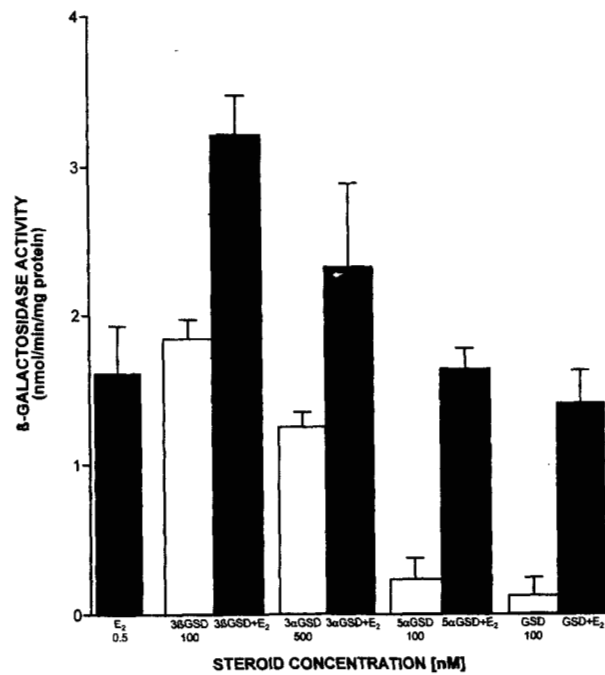


**Figure 4** Effect of the pure anti-oestrogen ICI-182,780 (ICI) on the hER $\alpha$ -mediated  $\beta$ -galactosidase activity in the yeast expression system described in Fig. 3. Yeast cultures were exposed to 5 nM E<sub>2</sub>, 100 nM 3 $\beta$ GSD and 500 nM 3 $\alpha$ GSD in the absence or presence of 1  $\mu$ M ICI. Results are expressed as the  $\beta$ -galactosidase activity and each point represents the mean  $\pm$  s.d. of three experiments in triplicate. E<sub>2</sub> and ICI alone were used as controls. The results show that ICI diminished the oestrogen-like effects of 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD, indicating that these effects are indeed hER $\alpha$ -mediated.

rat pituitary cytosol sedimented at 7–9 S in linear sucrose gradients, whether induced by E<sub>2</sub>B or by 3 $\beta$ GSD (Fig. 7). Addition of an excess of radioinert ORG 2058 completely abolished the PR labelling induced by the administration of 3 $\beta$ GSD (data not shown). These results demonstrated that 3 $\beta$ GSD exhibits, in this model, oestrogenic effects similar to those observed after E<sub>2</sub>B administration with a significantly lower potency.

## Discussion

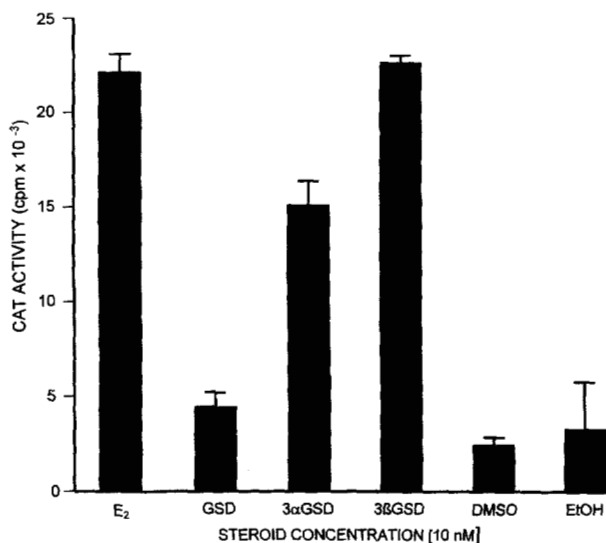
The results presented herein provide evidence that GSD, a widely used contraceptive synthetic progestin, exhibits limited oestrogen-like effects mediated by two of its A-ring reduced metabolites. Receptor binding studies demonstrated that GSD does not interact at all with ER, confirming and extending previous reports (Düstenberg *et al.* 1987, Wilde & Balfour 1995). Interestingly however, the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  tetrahydro GSD derivative specifically binds to ER, though with a significantly lower binding affinity than naturally occurring E<sub>2</sub> (Fig. 2; Table 1). The 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  tetrahydro GSD derivative also interacts with ER, yet to



**Figure 5** Effects of naturally occurring E<sub>2</sub> on the  $\beta$ -galactosidase activity stimulated by GSD and its A-ring reduced derivatives in the yeast expression system. Yeast were grown in the presence of 100 nM GSD, 100 nM 3 $\beta$ GSD and 500 nM 3 $\alpha$ GSD. E<sub>2</sub> was added to incubations at 0.5 nM concentration in ethanol. All determinations were performed at least in triplicate on three separate experiments. The results (mean  $\pm$  s.d.) demonstrate that GSD and its tetrahydro A-ring reduced derivatives, when incubated simultaneously with E<sub>2</sub>, does not exhibit oestrogen synergistic effects. The data show an additive effect of E<sub>2</sub>.

a significantly lesser extent than its 3 $\beta$  isomeric alcohol (Fig. 2; Table 1). These results are similar but not identical to those reported for norethisterone (NET), another 19-nor synthetic contraceptive progestin; indeed, the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  and the 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  reduced NET metabolites specifically interact with ER (Chávez *et al.* 1985) though with a higher relative binding affinity than the corresponding GSD tetrahydro metabolites. The 5 $\alpha$  dihydro derivative of GSD was unable to bind ER (Fig. 2), a finding that correlates with the previous observation that 5 $\alpha$  dihydro NET is not recognised by ER (Chávez *et al.* 1985).

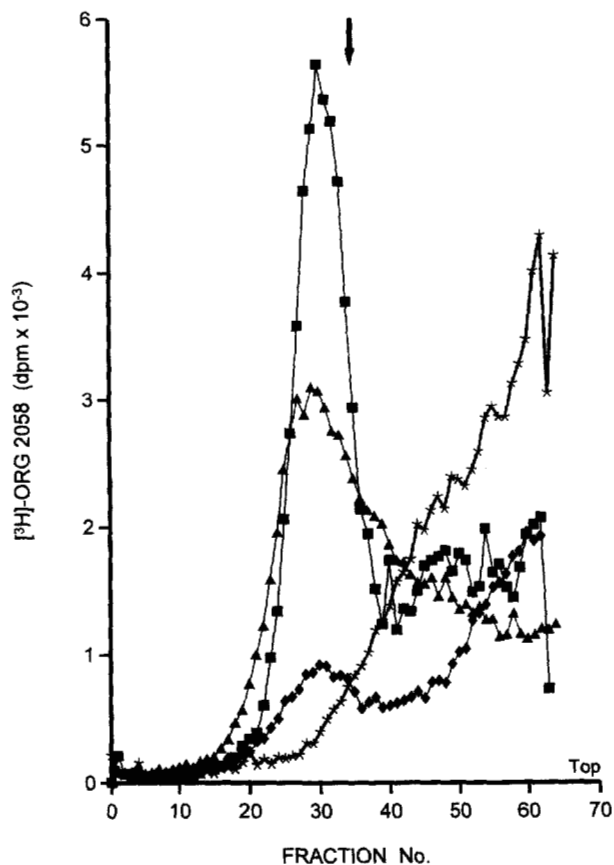
To assess whether the interaction of 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD with the ER results in genomic oestrogen-like effects, a transactivation yeast expression system was used. This system has proved to be a suitable model to evaluate hormone agonistic, synergistic and antagonistic activities (Lyttle *et al.* 1992). The results indicated that 3 $\beta$ GSD was able to induce hER $\alpha$ -mediated  $\beta$ -galactosidase activity in a dose–response manner (Fig. 3) thus demonstrating a clear oestrogen-agonistic effect in this system. Indeed, the 3 $\beta$ GSD-induced transactivation of the  $\beta$ -galactosidase



**Figure 6** Induction of human ER $\alpha$ -mediated transactivation of CAT by GSD and its A-ring reduced metabolites in a HeLa cell expression system. Cells were co-transfected with the expression vector for hER $\alpha$  (PCR 3'-2-hER $\alpha$ ) and its cognate reporter vector (EREe1bCAT). Cells were exposed to GSD, 3 $\beta$ GSD, 3 $\alpha$ GSD and E<sub>2</sub> at 10 nM concentration. DMSO and EtOH were used as vehicles. Results are expressed as the CAT activity (c.p.m.  $\times 10^{-3}$ ) and represent the mean  $\pm$  s.d. of triplicates. The results demonstrate that unmodified GSD was unable to induce hER $\alpha$ -mediated CAT activity in this system, whereas 3 $\beta$ GSD exhibited oestrogen agonistic effects. 3 $\alpha$ GSD exhibited also oestrogen-like effects, though to a lesser extent than 3 $\beta$ GSD.

gene was similar to that exhibited by E<sub>2</sub> though with a significantly lower potency, an observation that is in line with their corresponding binding affinities for the ER. The 3 $\alpha$ GSD isomer also induced hER $\alpha$ -mediated  $\beta$ -galactosidase activity in a dose-dependent manner, indicating an oestrogen agonistic effect. The oestrogen-like potency of 3 $\alpha$ GSD was significantly lower than that of 3 $\beta$ GSD. The lack of oestrogen-like effects of unmodified GSD and 5 $\alpha$ GSD correlates with their lack of binding to ER.

To provide additional support to the observation that oestrogenic effects of 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD are indeed hER $\alpha$ -mediated, a study using ICI-182,780, a pure anti-oestrogen (Wakeling *et al.* 1991), was conducted. The results showed that ICI-182,780 significantly diminished the E<sub>2</sub>-, 3 $\beta$ GSD- and 3 $\alpha$ GSD-induced transactivation of the  $\beta$ -galactosidase gene in the yeast expression system (Fig. 4), thus confirming that the oestrogenic actions of GSD tetrahydro derivatives are mediated through the hER $\alpha$ . Since GSD-containing oral contraceptive formulations are combined with ethynyl oestradiol, it was of interest to investigate whether GSD and/or its A-ring reduced metabolites may exert oestrogen synergistic effects. The results indicated that neither GSD nor its derivatives exhibited oestrogen synergism, rather an



**Figure 7** Induction of oestrogen-dependent PRs in the anterior pituitary of ovariectomised adult rats by 3 $\beta$ GSD. PRs were assessed by a sucrose gradient labelling technique using [<sup>3</sup>H]ORG 2058. BSA (arrow) was used as an external marker. Results are expressed as the sedimentation profile of PR (7–9 S) in cytosol pituitary preparations from animals treated for 6 consecutive days with different doses, 1000  $\mu$ g ( $\blacklozenge$ ) and 1500  $\mu$ g ( $\blacktriangle$ ) of 3 $\beta$ GSD. Animals treated with 5  $\mu$ g oestradiol benzoate (E<sub>2</sub>B)/day for 6 days served as positive controls ( $\blacksquare$ ), whereas rats treated with vehicle alone (\*) were the negative controls. Administration of E<sub>2</sub>B fully restored the pituitary content of PR in castrated animals. 3 $\beta$ GSD was effective in restoring oestrogen-dependent PR in a dose-dependent manner, though it was ineffective at the 500  $\mu$ g/day dose. Addition of an excess of radioinert ORG 2058 abolished the PR labelling induced by 3 $\beta$ GSD (data not shown).

additive effect of GSD and its metabolites was observed when they were simultaneously incubated with E<sub>2</sub> in the yeast expression system (Fig. 5).

To further evaluate the oestrogen-like potency of 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD in a mammalian expression system, HeLa cells co-transfected with the hER $\alpha$  and CAT vectors were used. The results demonstrated that unmodified GSD was unable to induce the hER $\alpha$ -mediated activation of CAT, thus indicating a lack of oestrogen agonistic effect. The 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  reduced metabolite of GSD induced the transactivation of CAT in a similar manner to that of naturally occurring E<sub>2</sub> (Fig. 6). The 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  reduced

GSD derivative also was able to induce the hER $\alpha$ -mediated CAT activation, though with a significantly lower potency than that exerted by 3 $\beta$ GSD. These results are similar to those obtained in the yeast expression system, indicating that both 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD exert oestrogen actions mediated by the hER $\alpha$ , whereas their parent compound, GSD is completely devoid of these effects. Whether GSD and its derivatives also exert oestrogenic actions through the oestrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) activation (Kuiper *et al.* 1996, Mosselman *et al.* 1996), can not be ascertained from these studies and deserve further investigation, particularly because of the relevant role that ER $\beta$  may play on the cardiovascular effects of oestrogens (Kuiper *et al.* 1997, Grohé *et al.* 1998, Giguère *et al.* 1998).

To investigate whether the receptor-mediated oestrogenic activity of 3 $\beta$ GSD, demonstrated in both expression systems, may be expressed in an *in vivo* model, its ability to induce oestrogen-dependent PR in the anterior pituitary was studied in castrated female rats. The results demonstrated that 3 $\beta$ GSD restored, in a dose-dependent manner, the rat pituitary content of PR in a similar fashion to that of E<sub>2</sub>B, though with a significantly lower potency (Fig. 7). This finding is similar to that previously reported for the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  derivative of NET (Vilchis *et al.* 1986); however, the oestrogen agonistic potency of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD was lower than that of the corresponding 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ NET derivative, an observation that correlates with their relative binding affinities for the ER.

This study demonstrates that two GSD derivatives, 3 $\beta$ GSD and 3 $\alpha$ GSD, possess weak oestrogenic activity and lack oestrogen synergistic actions. The weak oestrogen-like potency of the GSD metabolites, as assessed by their low RBA for the ER and the high concentration of 3 $\beta$ GSD required to induce *in vivo* PR in the rat pituitary, does not appear to be related to some clinical effects attributed to GSD use. This observation is in line with the latest case-control studies and analyses which have found no difference in the VTD risk between users of oral contraceptives containing GSD or older 19-nor progestins, particularly when the data were controlled for age and duration of contraceptive use (Farmer & Preston 1995, Spitzer *et al.* 1996, Farmer *et al.* 1997, WHO Scientific Group 1998, IFFS 1999).

The overall results provide a plausible explanation for those studies which have suggested that high concentrations of 19-nor progestins, including GSD, stimulate MCF-7 breast cancer cell growth by activating the ER (Van der Burg *et al.* 1992, Catherino *et al.* 1993, Kalkhoven *et al.* 1994, Schoonen *et al.* 1995). All in all, this study contributes to a better understanding of the mode of action of GSD.

### Acknowledgements

This study has been supported by grants from the WHO Special Programme of Human Reproduction, Geneva,

Switzerland; the National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico City, Mexico, and the División de CBS, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. A J Cooney was supported by an Andrew P Melon Foundation grant. The authors would like to thank Drs C Richard Lyttle and Claudia Pérez, Wyeth Ayerst, Women's Health Research Institute, for the provision of the yeast model system. The assistance of Mr José Luis Ramírez is greatly appreciated.

### References

- Bardin CW 1983 The androgenic, antiandrogenic and synandrogenic actions of progestins. In *Progesterone and Progestins*, pp 135–147. Eds CW Bardin, E Milgröm & P Mauvais-Jarvis. New York: Raven.
- Bowers A, Ringold HJ & Derot E 1958 Steroids CL. 19-nordihydrotestosterone derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **80** 6115–6121.
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** 248–254.
- Brown HC & Krishnamurthy S 1972 Lithium tri-sec-butyl borohydride. A new reagent for the reduction of cyclic and bicyclic ketones with superstereo selectivity. *Journal of the American Chemical Society* **94** 7159–7161.
- Catherino WH, Jeng MH & Jordan VC 1993 Norgestrel and gestodene stimulate breast cancer cell growth through an oestrogen receptor mediated mechanism. *British Journal of Cancer* **67** 945–952.
- Chávez BA, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca I & Pérez-Palacios G 1985 Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry* **22** 121–126.
- Cheng YC & Prusoff WH 1973 Relationship between the inhibition constant (K<sub>i</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. *Biochemistry and Pharmacology* **22** 3099–3108.
- Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW & Tsai M-J 1992 The chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor dimers bind to different GGTC response elements allowing it to repress hormonal induction of vitamin D receptor, thyroid receptor, and retinoic acid receptor. *Molecular Cell Biology* **12** 4153–4163.
- Cooney AJ, Leng X, Tsai SY, O'Malley BW & Tsai M-J 1993 Multiple mechanisms of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-dependent repression of vitamin D receptor, thyroid receptor, and retinoic acid receptor transactivation. *Journal of Biological Chemistry* **268** 4152–4160.
- 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, Lancs, UK: Parthenon.
- Farmer R & Preston T 1995 The risk of venous thromboembolism associated with low oestrogen dose oral contraceptives. *Journal of Obstetrics and Gynecology* **15** 195–200.
- Farmer R, Lawrenson R, Thompson C, Kennedy J & Hambleton R 1997 Population based study of risk of venous thromboembolism associated with various oral contraceptives. *Lancet* **349** 83–88.
- Fotherby K & Caldwell ADS 1994 New progestogens in oral contraception. *Contraception* **49** 1–132.
- Giguère V, Tremblay A & Tremblay GB 1998 Estrogen receptor  $\beta$ : re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* **63** 335–339.
- Grohé C, Kahlert S, Löbberk K & Vetter H 1998 Expression of oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *Journal of Endocrinology* **156** R1–R7.

- Helmrich SP, Rosenberg L, Kaufman DW, Strom B & Shapiro S 1987 Venous thromboembolism in relation to oral contraceptive use. *Obstetrics and Gynecology* **69** 91–95.
- IFFS 1999 Consensus conference on combination oral contraceptives and cardiovascular disease 1999. *Fertility and Sterility* **71** (Suppl 6) 1S–6S.
- Inman WHW & Vessey MP 1968 Investigation of deaths from pulmonary, coronary, and cerebral thrombosis and embolism in women of child-bearing age. *British Medical Journal* **2** 193–199.
- Jick H, Jick SS, Gurewich V, Myers MW & Vasilakis C 1995 Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet* **346** 1589–1593.
- Kalkhoven E, Kwakkenbos-Isbrücker L, de Laat SW, van der Saag PT & van der Burg B 1994 Synthetic progestins induce proliferation of breast tumor cell lines via the progesterone or estrogen receptor. *Molecular and Cell Endocrinology* **102** 45–52.
- Kuhl H 1996 Comparative pharmacology of newer progestogens. *Drugs* **51** 188–215.
- Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson F & Gustafsson J-Å 1996 Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *PNAS* **93** 5924–5930.
- Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S & Gustafsson J-Å 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* **138** 863–870.
- 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. *Journal of Steroid Biochemistry* **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. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **41** 881–890.
- Lemus AE, Enríquez J, García GA, Grillasca I & Pérez-Palacios G 1997 5 $\alpha$ -Reduction of norethisterone enhances its binding affinity for androgen receptor but diminishes its androgenic potency. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **60** 121–129.
- Lewis MA, Heinemann LAJ, MacRae KD, Bruppacher R & Spitzer WO 1996 The increased risk of venous thromboembolism and the use of third generation progestagens: role of bias in observational research. *Contraception* **54** 5–13.
- Lytle CR, Damián-Matsumura P, Juul H & Butt T 1992 Human estrogen receptor regulation in a yeast model system and studies on receptor agonists and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **42** 677–685.
- 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. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **37** 477–484.
- Mosselman S, Polmman J & Dijkema R 1996 ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters* **392** 49–53.
- Pérez-Palacios G, Cerbón MA, Pasapera AM, Castro JI, Enríquez J, Vilchis F, García GA, Moralí G & Lemus AE 1992 Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **41** 479–485.
- Reel JR, Humphrey RR, Shih Y, Windsor BL, Sakovsky R, Cregger PL & Edgren RA 1979 Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biological activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives. *Fertility and Sterility* **31** 552–561.
- 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. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **55** 423–437.
- Seed B & Sheen JY 1998 A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* **67** 271–277.
- Sherman F, Fik GR & Hicks JB 1982 *Methods in Yeast Genetics: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Spitzer WO, Lewis MA, Heinemann LAJ, Thorogood M & MacRae 1996 Third generation oral contraceptives and risk of venous thromboembolic disorders: an international case-control study. *British Medical Journal* **312** 83–88.
- Still WC, Kahan M & Mitra A 1978 Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. *Journal of Organic Chemistry* **43** 2923–2925.
- Van der Burg B, Kalkhoven E, Isbrücker L & de Laat SW 1992 Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast tumor cells under growth factor-defined conditions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **42** 457–465.
- Vandenbroucke JP, Koster T, Briët E, Reitsma PH, Bertina RM & Rosendaal FR 1994 Increased risk of venous thrombosis in oral contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet* **344** 1453–1457.
- Vessey M, Mant D, Smith A & Yeates D 1986 Oral contraceptives and venous thromboembolism: findings in a large prospective study. *British Medical Journal* **292** 526.
- Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, García G, Angeles A & Pérez-Palacios G 1986 Evidence that a non aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *Journal of Steroid Biochemistry* **24** 525–531.
- Wakeling AE, Dukes M & Bowler J 1991 A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Research* **51** 3867–3873.
- WHO 1989 WHO Collaborative Study. Cardiovascular disease and use of oral contraceptives. *Bulletin of the World Health Organization* **67** 417–423.
- WHO 1995a WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *Lancet* **346** 1575–1582.
- WHO 1995b WHO Collaborative Study of Cardiovascular Disease and Steroid Hormone Contraception. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. *Lancet* **346** 1582–1588.
- WHO Scientific Group 1998 Cardiovascular disease and steroid hormone contraception. *WHO Technical Report Series* **877** 41–51.
- Wilde MI & Balfour AJ 1995 Gestodene: a review of its pharmacology, efficacy and tolerability in combined contraceptive preparations. *Drugs* **50** 364–395.
- Winkler UH 1998 Effects on hemostatic variables of desogestrel- and gestodene-containing oral contraceptives in comparison with levonorgestrel-containing oral contraceptives: a review. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **179** S51–S61.

Received 25 October 1999  
 Revised manuscript received 31 January 2000  
 Accepted 10 February 2000

## In vitro metabolism of gestodene in target organs: formation of A-ring reduced derivatives with oestrogenic activity

Ana E. Lemus<sup>a,b,\*</sup>, René Santillán<sup>a</sup>, Pablo Damián-Matsumura<sup>b</sup>, Gustavo A. García<sup>c</sup>, Ivonne Grillasca<sup>c</sup>, Gregorio Pérez-Palacios<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition, S. Zubirán, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Department of Reproductive Biology, UAM-Iztapalapa, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> School of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> School of Medicine, National Autonomous University of Mexico / Mexico City General Hospital, Mexico City, Mexico

Received in revised form 27 February 2001; accepted 2 March 2001

### Abstract

Gestodene (13 $\beta$ -ethyl-17 $\alpha$ -ethynyl-17 $\beta$ -hydroxy-4,5-gonadien-3-one), the most potent progestin ever synthesized, stimulates breast cancer cell growth through an oestrogen receptor-mediated mechanism, and its use in hormonal contraception has been associated with side effects attributable to oestrogenic actions. These observations have remained controversial, since gestodene does not bind to the oestrogen receptor or exert oestrogen-like activities. Recently, we have demonstrated that non-phenolic gestodene derivatives interact with oestrogen receptors and induce oestrogenic effects in cell expression systems. To assess whether gestodene is biotransformed to metabolites with intrinsic oestrogenic potency, [<sup>3</sup>H]- and [<sup>14</sup>C]-labelled gestodene were incubated in vitro with rat anterior pituitary, hypothalamus and ventral prostate homogenates under different experimental conditions. The most remarkable finding was the isolation and identification of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrogestodene and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrogestodene as metabolic conversion products of gestodene, presumably with 5 $\alpha$ -dihydrogestodene as intermediate. The overall results seem to indicate that the weak oestrogenic effects attributable to gestodene could be mediated by its tetrahydro metabolites. © 2001 Published by Elsevier Science B.V.

**Keywords:** Gestodene metabolism; Synthetic progestin; Oestrogenic effect; Gestodene 5 $\alpha$ -reduction

### 1. Introduction

Evidence has accumulated over the last years indicating that contraceptive synthetic progestins may exert a variety of hormonal agonistic, synergistic and even antagonistic effects, other than their progestational activities (Mowszowicz et al., 1974; Vilchis et al., 1986; Castro et al., 1995). A number of experimental studies have demonstrated that these hormone-like effects of synthetic progestins are mediated either by their interaction with the inappropriate steroid receptors (Bardin, 1983; Pérez-Palacios et al., 1983; Lemus et al., 1992) or by their metabolic conversion products (Chávez et al., 1985; Morali et al., 1990; Pasapera et al., 1995). Recent studies have

suggested that gestodene, a potent synthetic progestin widely used in the so-called third-generation contraceptive pills, may induce oestrogen-like effects apparently mediated by the oestrogen receptor (Van der Burg et al., 1992; Catherino et al., 1993; Kalkhoven et al., 1994; Schoonen et al., 1995). Furthermore, the use of gestodene has been associated with a relative low increase in venous thromboembolic disease (Jick et al., 1995; World Health Organization, 1995a,b; Lewis et al., 1996). These unexpected effects of the gestodene molecule prompted us to investigate whether this synthetic progestin exerts oestrogenic effects through some of its metabolites, particularly since gestodene is not recognised by the oestrogen receptor (Düsterberg et al., 1987). Further interest in conducting this study derived from a recent report from our laboratories showing that two gestodene derivatives, the 3 $\beta$ 5 $\alpha$ -tetrahydrogestodene and to a lesser extent its 3 $\alpha$  isomeric alcohol, specifically bind, with a relative low binding affinity, to the oestrogen receptor and activate the human oestrogen receptor- $\alpha$ -mediated transcription of oestrogen-

\* Corresponding author. Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition, S. Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Mexico City, C.P. 14000, Mexico. Tel.: +52-5573-11-60; fax: +52-5655-98-59.  
E-mail address: anaalenalemus@aol.com (A.E. Lemus).



dependent genes in yeast and HeLa cells expression systems. Thus, the slight oestrogen-like effects attributable to gestodene may be mediated by two of its A-ring reduced metabolites (Lemus et al., 2000).

To assess the metabolic fate of gestodene at the target organ level, homogenates of female rat anterior pituitaries and hypothalami and male rat ventral prostates were incubated *in vitro* with [ $^3\text{H}$ ]- and [ $^{14}\text{C}$ ]-labelled gestodene under different incubation conditions in the absence or presence of NADPH. The radiochemical purity of isolated gestodene metabolites was established by a reverse isotope dilution technique. Incubations using [ $^3\text{H}$ ]-labelled testosterone were used as the positive controls, while tissue-free incubations served as the negative controls.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Steroids and chemicals

[9,11- $^3\text{H}$ ]-gestodene ( $^3\text{H}$ -gestodene) specific activity 30.54 Ci/mmol, [ $^{14}\text{C}$ -ethynyl]-gestodene ( $^{14}\text{C}$ -gestodene) specific activity 43.75 mCi/mmol and authentic radioinert GSD were kindly provided by Schering (Berlin, Germany). [1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]-testosterone ( $^3\text{H}$ -testosterone) specific activity 85 Ci/mmol was purchased from NEN<sup>®</sup> Research Products (Boston, MA, USA), 5 $\alpha$ -dihydrogestodene (5 $\alpha$  gestodene) was synthesised by lithium-ammonia reduction of gestodene (Lemus et al., 2000), the 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  gestodene tetrahydro derivative was prepared by reduction of 5 $\alpha$  gestodene with L-Selectride under anhydrous conditions (Lemus et al., 2000) and the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  gestodene tetrahydro

derivative was synthesised by sodium borohydride reduction of 5 $\alpha$  gestodene (Lemus et al., 2000). The chemical purity of gestodene and its derivatives were assessed by their melting points, HPLC behaviour, infrared absorption, and [ $^{13}\text{C}$ ]- and [ $^1\text{H}$ ]-nuclear magnetic resonance. The physical and spectroscopic constants of the A-ring reduced gestodene derivatives have been previously reported (Lemus et al., 2000). Non-radioactive steroids and NADPH were supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). All reagents and solvents used were of analytical grade.

### 2.2. Animals

All procedures using animals were performed in accordance with the Guidelines on the Handling and Training of Laboratory Animals published by the Universities Federation for Animal Welfare and approved by the Research Ethics Board of the Metropolitan Autonomous University-Iztapalapa. Adult male and female Wistar rats (body weight: 200–250 g) used throughout the study were kept under a 14 h-light/10 h-darkness cycle and allowed food and water *ad libitum*. Gonadectomies were performed under light ether anaesthesia. Animals were killed by decapitation and the appropriate tissues were immediately removed, blotted and weighed and then submitted to experimental procedures.

### 2.3. Incubations

Anterior pituitaries (2 mg protein) and hypothalami (4 mg protein) from female rats ovariectomised 21 days prior to experiments were homogenised in a glass homogeniser

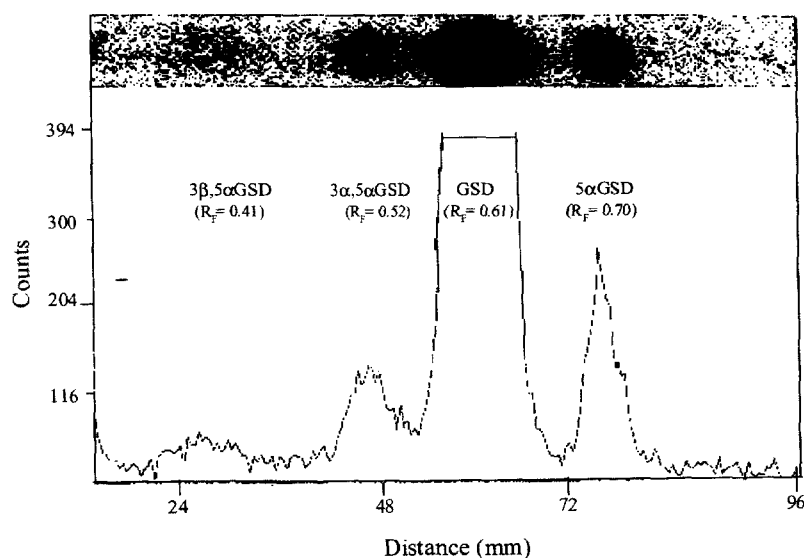


Fig. 1. Representative chromatographic profile of the methanolic extracts of homogenates of rat anterior pituitaries and hypothalami incubated with [ $^{14}\text{C}$ ]-gestodene at pH 7.4. An aliquot was chromatographed on thin-layer plates using two solvent systems. Four radioactive zones were detected, which were identified as 5 $\alpha$ -dihydrogestodene (5 $\alpha$ GSD), unchanged gestodene (GSD), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrogestodene (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD) and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrogestodene (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD). Identical results were obtained when [ $^3\text{H}$ ]-gestodene was used as substrate. Gestodene was not bioconverted to A-ring reduced derivatives when incubations were done at pH 4.8. For details see the text.

Table 1

Radiochemical purity of metabolites isolated after *in vitro* incubation of homogenates of rat anterior pituitary, hypothalamus and ventral prostate with [<sup>3</sup>H]- or [<sup>14</sup>C]-labelled gestodene (GSD)

Isolated metabolites	Successive crystallisations	Pituitary (dpm[ <sup>3</sup> H]/mg)	Hypothalamus (dpm[ <sup>3</sup> H]/mg)	Prostate (dpm[ <sup>14</sup> C]/mg)
5 $\alpha$ GSD	C <sub>1</sub> <sup>a</sup>	1424	696	1217
	C <sub>2</sub>	1252	524	1186
	C <sub>3</sub>	1073	434	1140
	ML <sub>3</sub> <sup>b</sup>	1101	487	1164
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD	C <sub>1</sub>	1069	1208	517
	C <sub>2</sub>	1001	1133	381
	C <sub>3</sub>	931	980	327
	ML <sub>3</sub>	886	1020	358
3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD	C <sub>1</sub>	660	523	274
	C <sub>2</sub>	492	417	176
	C <sub>3</sub>	442	344	147
	ML <sub>3</sub>	472	413	154

<sup>a</sup>Crystals.

<sup>b</sup>Mother liquors.

with a Teflon pestle using Krebs–Ringer phosphate buffer solution, in a tissue/buffer ratio of 1:6 (w/v). Rat ventral prostates (8 mg protein) from male rats castrated 48 h before were homogenised using a Polytron homogeniser (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). To assess whether gestodene serves as a substrate for both 5 $\alpha$ -steroid reductases type 1 and type 2 (Russell and Wilson, 1994), tissues were homogenised using Krebs–Ringer phosphate buffer at two different pHs, 4.8 and 7.4. All procedures were performed at 4°C. Tissue protein was determined by the Bradford dye binding method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as a standard. Tissue preparations were incubated in triplicate with various concentrations (1, 2 and 4  $\mu$ M) of either [<sup>3</sup>H]- or [<sup>14</sup>C]-labelled gestodene in the absence or presence of different concentrations of NADPH (0.5, 1 and 2 mM) in a Dubnoff metabolic incubator at 37.5°C with air as the gas phase for 15, 30 or 60 min. The final incubation volume was 1.0 ml. Incubation of rat anterior pituitary, hypothalamic and ventral prostate homogenates with [<sup>3</sup>H]-testosterone, under identical experimental conditions, were used as positive controls. Tissue-free incubations served as negative controls.

At the end of the incubation period, the reaction was stopped by addition of ethyl acetate and radiolabelled steroids were extracted (4  $\times$ ) using three volumes of water-saturated ethyl acetate. The organic extracts were partitioned between petroleum ether and 10% aqueous methanol and 2.5  $\mu$ g each of the steroid carriers gestodene, 5 $\alpha$  gestodene, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  gestodene and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  gestodene was added to the methanolic extracts. The identification and radiochemical purity of gestodene metabolites were established by a behaviour identical to that of the steroid carriers in two different thin-layer chromatographic systems (chloroform:acetone = 9:1 and benzene:ethyl acetate = 2:1) and recrystallisation to obtain a constant specific activity. [<sup>3</sup>H]-labelled metabolites were located on chromatographic plates using a Packard radiochromatogram scanner, while [<sup>14</sup>C]-labelled gestodene derivatives were detected with the use of a Packard instant imager (Downers Grove, IL, USA). Radioactivity was otherwise determined in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer, model 1900 TR using toluene containing 4.0 g/l PPO (2,5-diphenyl-oxazole) and 100 mg/l dimethyl POPOP [1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl) benzene] as the

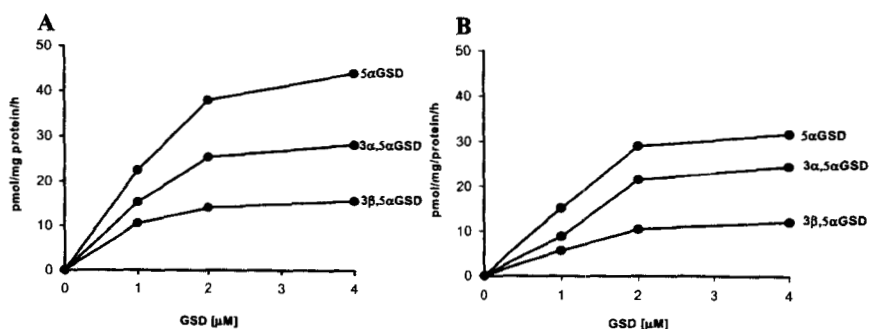


Fig. 2. *In vitro* metabolism of [<sup>14</sup>C]- or [<sup>3</sup>H]-labelled gestodene (GSD) in homogenates of female rat anterior pituitaries (panel A) and hypothalami (panel B) as a function of substrate concentration. 5 $\alpha$ -Dihydrogestodene (5 $\alpha$ GSD) was identified as the major metabolic conversion product, with 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydrogestodene (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD) and its 3 $\beta$  isomer (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD) being formed in smaller amounts. Optimal gestodene bioconversion to its A-ring reduced metabolites occurred at 2  $\mu$ M gestodene.

counting solution. Counting efficiencies for [ $^{14}\text{C}$ ] and [ $^3\text{H}$ ] were 86% and 67%, respectively, and quenching was corrected in all samples by external standardisation. Non-radioactive steroid carriers were detected on chromatograms using the *p*-anisaldehyde-sulphuric/acetic acids reagent.

Enzyme activities were studied for three gestodene concentrations (1, 2 and 4  $\mu\text{M}$ ). The rates of formation of radioactive gestodene and testosterone derivatives are expressed as pmol/mg protein/h. Apparent  $K_m$  and  $V_{\max}$  values of 5 $\alpha$ -steroid reductases were determined using an iterative program (Microcal, Origin<sup>TM</sup>).

### 3. Results

#### 3.1. Incubation of rat anterior pituitary and hypothalamus homogenates with radiolabelled gestodene

After partition of the extracts of rat anterior pituitary and hypothalamus homogenates, 95% of the radioactive material was recovered in the methanolic fraction. When aliquots of methanolic extracts from incubations at pH 7.4 were submitted to thin-layer chromatography, four radioactive zones were detected, as shown in Fig. 1. The less polar zone ( $R_F = 0.70$ ), representing the major metabolic conversion product of both [ $^3\text{H}$ ]-gestodene and [ $^{14}\text{C}$ ]-gestodene, had a chromatographic behaviour identical to that of the 5 $\alpha$  gestodene carrier. After elution, a representative aliquot was mixed with additional radioinert 5 $\alpha$  gestodene and recrystallised to constant specific activity, as shown in Table 1. Zone 2 ( $R_F = 0.61$ ) was identified as unchanged gestodene (Fig. 1), while zones 3 ( $R_F = 0.52$ ) and 4 ( $R_F = 0.41$ ) corresponded to the 3 $\alpha,5\alpha$ - and 3 $\beta,5\alpha$ -tetrahydrogestodene metabolites, respectively. Radiochemical purity data of both gestodene tetrahydro derivatives are shown in Table 1. In contrast, chromatographic analysis of the methanolic extracts of homogenates of rat anterior pituitaries and hypothalami incubated at pH 4.8 re-

Table 2

Rate of formation of A-ring reduced metabolites of [ $^3\text{H}$ ]- or [ $^{14}\text{C}$ ]-labelled gestodene (GSD) in rat hormone-sensitive tissues

Incubated tissues	Incubation pHs	5 $\alpha$ GSD 3 $\alpha,5\alpha$ GSD 3 $\beta,5\alpha$ GSD			DHT <sup>a</sup>
		pmol/mg protein/h			
Anterior pituitary	7.4	37.7	25.3	14.0	165.0
	4.8	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND
Hypothalamus	7.4	29.0	21.5	10.5	111.0
	4.8	ND	ND	ND	ND
Ventral prostate	7.4	55.0	16.3	13.5	222.0
	4.8	69.0	19.8	17.8	318.0

<sup>a</sup>Rates of formation of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) were determined from incubations with [ $^3\text{H}$ ] testosterone used as an experimental control.

<sup>b</sup>ND = Non-detected.

vealed that gestodene was not bioconverted to A-ring reduced derivatives (data not shown).

When the metabolism of radiolabelled gestodene in the anterior pituitary homogenate of castrated rats was studied as a function of substrate concentration, it was found that 5 $\alpha$  gestodene and 3 $\alpha,5\alpha$  gestodene were the major metabolites formed at all substrate concentrations used (Fig. 2, panel A), while the bioconversion of gestodene to 3 $\beta,5\alpha$  gestodene occurred to a significantly lesser extent, as indicated in Fig. 2, panel A. An optimal rate of conversion of gestodene to its reduced derivatives occurred at 2  $\mu\text{M}$ . Results for the rat hypothalamus homogenate incubated with radiolabelled gestodene demonstrated that the formation of its three A-ring reduced metabolites followed the same pattern as that observed in the rat anterior pituitary homogenates, though to a lesser extent, as shown in Fig. 2, panel B. Subsequent experiments were done using [ $^3\text{H}$ ]- or [ $^{14}\text{C}$ ]-labelled gestodene at 2  $\mu\text{M}$ . When the metabolism in vitro of radiolabelled gestodene was studied as a function of time, it was found that 1 h was the optimal incubation period in terms of formation of the A-ring reduced metabolites (data not shown). Biotransformation of radiolabelled gestodene to 5 $\alpha$  gestodene was NADPH-dependent, as no metabolism was seen in the absence of

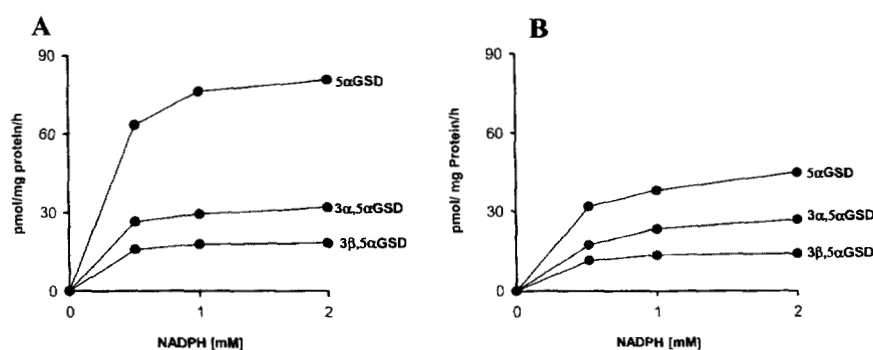


Fig. 3. NADPH-dependence of the in vitro A-ring reduction of [ $^{14}\text{C}$ ]- or [ $^3\text{H}$ ]-labelled gestodene (GSD) in rat anterior pituitaries (panel A) and hypothalamus (panel B). Bioconversion of gestodene to 5 $\alpha$ -dihydrogestodene (5 $\alpha$ GSD) was completely dependent on NADPH as no metabolism was noticed in the absence of the cofactor. Optimal concentration of NADPH in both tissues was 1.0 mM.

Table 3

5 $\alpha$ -Reductase activity in rat hormone-sensitive tissues measured using radiolabelled gestodene (GSD) or testosterone (T) as substrate in incubations at pH 4.8 and 7.4

Incubated tissues	Incubation at pH 7.4 (5 $\alpha$ -reductase type 1)				Incubation at pH 4.8 (5 $\alpha$ -reductase type 2)			
	$K_m$ [nM] Substrate		$V_{max}$ [pmol/mg protein/h] Substrate		$K_m$ [nM] Substrate		$V_{max}$ [pmol/mg protein/h] Substrate	
	GSD	T	GSD	T	GSD	T	GSD	T
Anterior pituitary	2.16	0.78	72.46	217.39	ND <sup>a</sup>	ND	ND	ND
Hypothalamus	3.06	1.50	63.29	188.67	ND	ND	ND	ND
Ventral prostate	0.59	0.65	70.86	289.3	0.58	0.65	88.62	387.1

<sup>a</sup>ND = Non-detected.

the cofactor (Fig. 3, panels A and B). The optimal rate of conversion of gestodene to 5 $\alpha$  gestodene in both anterior pituitary (Fig. 3, panel A) and hypothalamus (Fig. 3, panel B) homogenates was observed at 1.0 mM NADPH.

The rates of formation of 5 $\alpha$  gestodene, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  gestodene and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  gestodene in rat anterior pituitary and hypothalamus homogenates incubated at pH 7.4 are depicted in Table 2. Values of apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  for the bioconversion of gestodene to 5 $\alpha$  gestodene were determined graphically by Lineweaver–Burk plots and are shown in Table 3. Results of the *in vitro* 5 $\alpha$ -reduction of [<sup>3</sup>H]-testosterone in rat pituitary and hypothalamus ho-

mogenates used as an experimental control are shown in Tables 2 and 3.

### 3.2. Incubations of rat ventral prostates with radiolabelled gestodene

Gestodene was biotransformed to 5 $\alpha$  gestodene, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  gestodene and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  gestodene in rat ventral prostate homogenates incubated at two different pHs, 7.4 and 4.8 (Fig. 4, panel A). The optimal substrate concentration at both pHs for the conversion of gestodene to 5 $\alpha$  gestodene, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  gestodene and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  gestodene was 2  $\mu$ M and it

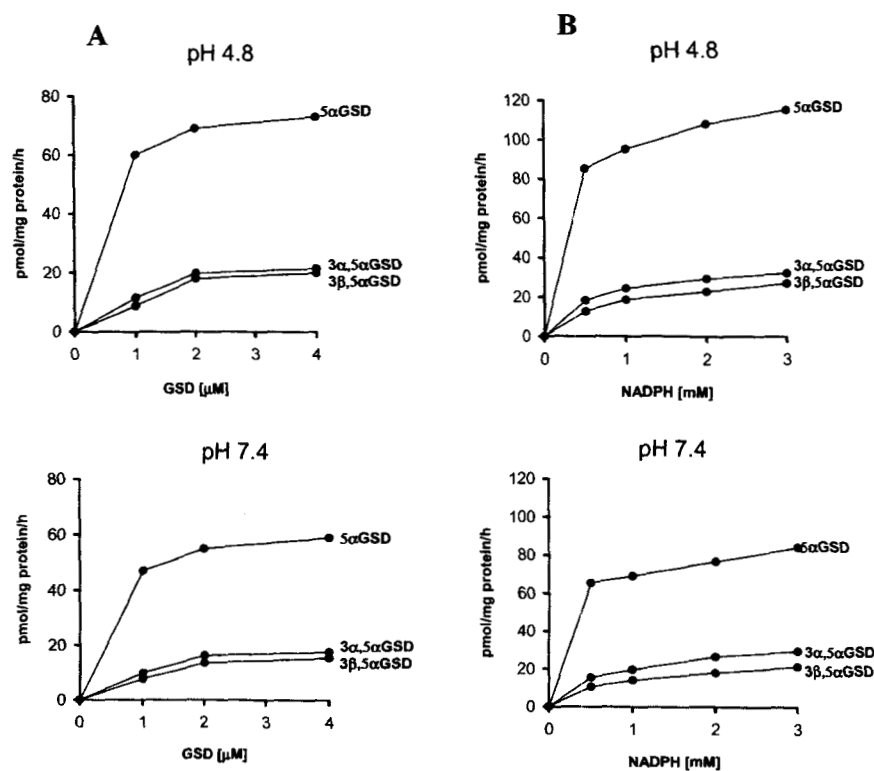


Fig. 4. 5 $\alpha$ -Reduction of [<sup>3</sup>H]- or [<sup>14</sup>C]-labelled gestodene (GSD) in homogenates of rat ventral prostate as a function of substrate (panel A) and NADPH (panel B) concentrations. Bioconversion of gestodene to 5 $\alpha$ -dihydrogestodene (5 $\alpha$ GSD) occurred at pH 4.8 and 7.4, with the highest rate of formation at the acidic pH. Optimal bioconversion occurred at 2  $\mu$ M gestodene. 5 $\alpha$ -Reduction of gestodene was completely NADPH-dependent at both pHs with an optimal 1.0–2.0 mM concentration of the cofactor.

was NADPH-dependent (Fig. 4, panel B) in a manner similar to that observed in rat anterior pituitary and hypothalamus homogenates incubated at pH 7.4. The rates of formation of A-ring reduced metabolites of gestodene and testosterone in the rat ventral prostate are shown in Table 2. Values of apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  for rat prostate  $5\alpha$ -reduction of labelled gestodene and testosterone are shown in Table 3. Only unmodified radiolabelled gestodene was recovered from control tissue-free incubations.

#### 4. Discussion

The results of this study provide evidence that gestodene, the most potent synthetic progestin currently available, is extensively metabolised to A-ring reduced derivatives in steroid hormone-sensitive tissues. Indeed, *in vitro* incubation of [ $^3\text{H}$ ]-gestodene and [ $^{14}\text{C}$ ]-gestodene with homogenates of rat anterior pituitary, hypothalamus and ventral prostate resulted in the formation of radioactive  $5\alpha$  gestodene,  $3\alpha,5\alpha$  gestodene and  $3\beta,5\alpha$  gestodene, thus indicating that gestodene is a substrate for  $5\alpha$ -steroid reductases and  $3\beta$ - and  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases in these target organs (Fig. 5). The  $5\alpha$ -dihydro derivative of gestodene was the major metabolic conversion product, whereas the  $3\beta,5\alpha$ - and  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydro derivatives were formed in smaller amounts, as shown in Table 2 and Fig. 3.

The enzyme-mediated  $5\alpha$ -reduction (Trans A/B ring junction) of gestodene was similar to that of naturally occurring testosterone used as a control (Table 3). The bioconversion of gestodene to  $5\alpha$  gestodene in the rat

anterior pituitary and hypothalamus homogenates occurred only at pH 7.4, in an identical manner to that observed when testosterone was used as substrate. These data demonstrate that  $5\alpha$ -steroid reductase (E.C.I. 3.99.5) type 1 reduces the 4–5 double bond of gestodene in these neuroendocrine organs and are in line with a number of reports (Russell and Wilson, 1994; Mahendroo et al., 1996; Celotti et al., 1997), indicating that the type 1 isozyme is widely expressed in the mammalian brain. The lack of biotransformation of gestodene to  $5\alpha$  gestodene at pH 4.8 strongly suggests the absence of the type 2 isoform of  $5\alpha$ -steroid reductase in the anterior pituitary and hypothalamus, confirming and extending previous observations (Normington and Russell, 1992; Thigpen et al., 1993).

In contrast,  $5\alpha$  gestodene was isolated as the major metabolite of gestodene from homogenates of rat ventral prostate incubated at both pH 4.8 and 7.4, thus indicating that A-ring reduction of this synthetic progestin may be mediated by both  $5\alpha$ -steroid reductases type 1 and type 2 (Tables 2 and 3). The presence of the type 2 isozyme in this accessory sex organ has been well documented (Normington and Russell, 1992; Russell and Wilson, 1994; Poletti et al., 1998) and supports the concept that it is selectively expressed in classical male androgen-dependent structures. The enzyme mediated  $5\alpha$ -reduction of gestodene was NADPH-dependent in all tissues studied (Figs. 3 and 4, panel B), as has been extensively reported for testosterone (Massa et al., 1972).

The most remarkable finding of this study was the isolation and identification of  $3\alpha,5\alpha$  gestodene and  $3\beta,5\alpha$  gestodene as conversion products of gestodene in three target organs, presumably with  $5\alpha$  gestodene as an inter-

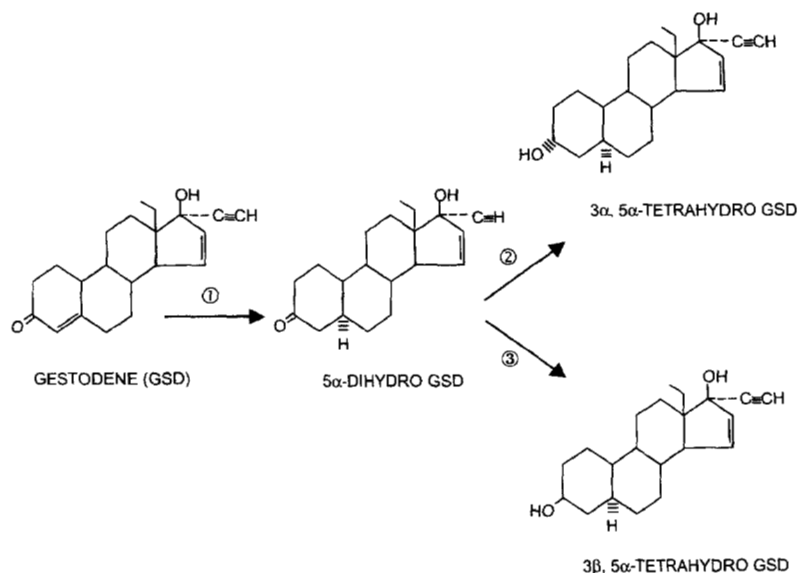


Fig. 5. Metabolic pathways of gestodene (GSD) in hormone-sensitive tissues, as demonstrated in this study by *in vitro* incubation of [ $^3\text{H}$ ]- and [ $^{14}\text{C}$ ]-labelled GSD with homogenates of rat hypothalamus, anterior pituitary and ventral prostate. Radiochemically pure  $5\alpha$ -dihydrogestodene,  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydrogestodene and  $3\beta,5\alpha$ -tetrahydrogestodene were isolated as metabolic conversion products, indicating that gestodene is an adequate substrate for the  $5\alpha$ -steroid reductases type 1 and type 2 (①),  $3\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase (②) and  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (③).

mediate. Although the pharmacokinetics of gestodene after its oral and intravenous administration have been studied (Täuber et al., 1989) and some A-ring reduced gestodene metabolites have been partially identified from human liver incubations (Ward and Back, 1993), this is the first report of the characterisation of neutral reduced gestodene metabolites in hormone sensitive-organs.

Taken together with the recent observations that 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$  gestodene are able to activate co-transfected yeast and HeLa cells cultures with vectors containing the human oestrogen receptor  $\alpha$  and oestrogen-dependent reporter genes (Lemus et al., 2000), these results seem to indicate that the slight oestrogenic effects of gestodene are most likely mediated by its tetrahydro metabolites. Further support for this concept is furnished by the demonstration that the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  derivative of gestodene is able to induce in vivo oestrogen-dependent progesterone receptors in the castrated female rat, yet with a significantly lower potency than that of oestradiol benzoate (Lemus et al., 2000). The finding that gestodene has oestrogen agonistic effects, exerted through its enzyme-mediated formed metabolites, is in line with previous reports indicating that norethisterone, another 19-nor contraceptive progestin, induces oestrogenic actions through its non-phenolic reduced metabolites (Pérez-Palacios et al., 1993; Oropeza et al., 1994). Overall, the data contribute to a better understanding of the mode of action of gestodene and underline the role of peripheral metabolism of synthetic progestins in the modulation of their hormone-like effects.

### Acknowledgements

This study has been supported by grants from the World Health Organization Special Programme of Human Reproduction, Geneva, Switzerland, the National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico and the Division of CBS, Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa, Mexico City. The expert assistance of Dr. Armando Tovar and Q. Alejandrina Acosta is greatly appreciated. The secretarial assistance of Ms. Beatriz Alarcón and Mr. José Luis Ramírez in preparing the manuscript is acknowledged.

### References

- Bardin, C.W., 1983. The androgenic, antiandrogenic and synandrogenic actions of progestins. In: Bardin, C.W., Milgröm, E., Mauvais-Jarvis, P. (Eds.), *Progesterone and Progestins*. Raven Press, New York, NY, pp. 135–147.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Castro, I., Cerbón, M.A., Pasapera, A.M., Gutiérrez-Sagal, R., García, G.A., Orozco, C., Camacho-Arroyo, I., Anzaldúa, R., Pérez-Palacios, G., 1995. Molecular mechanisms of the antihormonal and antiimplantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Mol. Reprod. Dev.* 40, 157–163.
- Catherino, W.H., Jeng, M.H., Jordan, V.C., 1993. Norgestrel and gestodene stimulate breast cancer cell growth through an oestrogen receptor mediated mechanism. *Br. J. Cancer* 67, 945–952.
- Celotti, F., Negri-Cesi, P., Poletti, A., 1997. Steroid metabolism in the mammalian brain: 5 alpha-reduction and aromatization. *Brain Res. Bull.* 44, 365–375.
- Chávez, B.A., Vilchis, F., Pérez, A.E., García, G.A., Grillasca, I., Pérez-Palacios, G., 1985. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J. Steroid Biochem.* 22, 121–126.
- Düsterberg, B., Tack, J.W., Jrause, W., Humpel, M., 1987. Pharmacokinetics and biotransformation of gestodene in man. In: Elstein, M. (Ed.), *Gestodene. Development of a New Gestodene-containing Low Dose Oral Contraceptive*. Parthenon Publishing Group, Carnforth, pp. 35–44.
- Jick, H., Jick, S.S., Gurewich, V., Myers, M.W., Vasilakis, C., 1995. Risk of idiopathic cardiovascular death and nonfatal venous thromboembolism in women using oral contraceptives with differing progestagen components. *Lancet* 346, 1589–1593.
- Kalkhoven, E., Kwakkenbos-Isbrüker, L., de Laat, S.W., Van der Saag, P.T., Van der Burg, B., 1994. Synthetic progestins induce proliferation of breast tumor cell lines via the progesterone or estrogen receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 102, 45–52.
- Lemus, A.E., Vilchis, F., Damsky, R., Chávez, B.A., García, G.A., Grillasca, I., Pérez-Palacios, G., 1992. Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41, 881–890.
- Lemus, A.E., Zaga, V., Santillán, R., García, G.A., Grillasca, I., Damián-Matsumura, P., Jackson, K.J., Cooney, A.J., 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.
- Lewis, M.A., Heinemann, L.A.J., MacRae, K.D., Bruppacher, R., Spitzer, W.O., 1996. The increased risk of venous thromboembolism and the use of third generation progestagens: role of bias in observational research. *Contraception* 54, 5–13.
- Mahendroo, M.S., Cala, K.M., Russell, D.W., 1996. 5 $\alpha$ -reduced androgens play a key role in murine parturition. *Mol. Endocrinol.* 10, 380–392.
- Massa, R., Stupnicka, E., Kniewald, Z., Martini, L., 1972. The transformation of testosterone into dihydrotestosterone by the brain and the anterior pituitary. *J. Steroid Biochem.* 3, 385.
- Moralí, G., Lemus, A.E., Oropeza, M.V., García, G.A., Pérez-Palacios, G., 1990. Induction of male sexual behavior by norethisterone: Role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37, 477–484.
- Mowszowicz, I., Bieber, D.E., Chung, K.W., Bullock, L.P., Bardin, C.W., 1974. Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: comparison with non-progestational antiandrogens. *Endocrinology* 95, 1589–1599.
- Normington, K., Russell, D.W., 1992. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes. *J. Biol. Chem.* 267, 19548–19554.
- Oropeza, M.V., Campos, M.G., Lemus, A.E., García, G.A., 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.
- Pasapera, A.M., Cerbón, M.A., Castro, I., Gutiérrez, R., Camacho-Arroyo, I., García, G.A., Pérez-Palacios, G., 1995. Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. *Biol. Reprod.* 52, 426–432.
- Pérez-Palacios, G., Chávez, B., Vilchis, F., Escobar, N., Larrea, F., Pérez, A.E., 1983. Interaction of medroxyprogesterone acetate with cytosol androgen receptors in the rat hypothalamus and pituitary. *J. Steroid Biochem.* 19, 1729–1735.
- Pérez-Palacios, G., Moralí, G., García, G.A., Cruz, M.L., Lemus, A.E.,

1993. Behavioral effects of synthetic progestins. In: Mornex, R., Jaffiol, C., Leclere, J. (Eds.), *Progress in Endocrinology*. Parthenon Publishing Group, London, New York, pp. 155–159.
- Poletti, A., Negri-Cesi, P., Rabuffetti, M., Colciago, A., Celotti, F., Martini, L., 1998. Transient expression of the 5 $\alpha$ -reductase type 2 isozyme in the rat brain in late fetal and early postnatal life. *Endocrinology* 139, 2171–2178.
- Russell, D.W., Wilson, J.D., 1994. Steroid 5 $\alpha$ -reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 25–61.
- Schoonen, W.G.E.J., Joosten, J.W.H., Kloosterboer, H.J., 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.
- Täuber, U., Tack, J.W., Matthes, H., 1989. Single dose pharmacokinetics of gestodene in women after intravenous and oral administration. *Contraception* 40, 461–479.
- Thigpen, A.E., Cala, K.M., Russell, D.W., 1993. Characterization of Chinese hamster ovary cell lines expressing human steroid 5 $\alpha$ -reductase isozymes. *J. Biol. Chem.* 268, 17404–17412.
- Van der Burg, B., Kalkhoven, E., Isbrücker, L., de Laat, S.W., 1992. Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast tumor cells under growth factor-defined conditions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42, 457–465.
- Vilchis, F., Chávez, B., Pérez, A.E., García, G., Angeles, A., Pérez-Palacios, G., 1986. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J. Steroid Biochem.* 24, 525–531.
- Ward, S., Back, D.J., 1993. Metabolism of gestodene in human liver cytosol and microsomes in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46, 235–243.
- World Health Organization (collaborative study of cardiovascular disease and steroid hormone contraception), 1995a. Venous thromboembolic disease and combined oral contraceptives: results of international multicentre case-control study. *Lancet* 346, 1575–1582.
- World Health Organization (collaborative study of cardiovascular disease and steroid hormone contraception), 1995b. Effect of different progestagens in low oestrogen oral contraceptives on venous thromboembolic disease. *Lancet* 346, 1582–1588.

# A-Ring Reduced Metabolites of 19-nor Synthetic Progestins as Subtype Selective Agonists for ER $\alpha$

FERNANDO LARREA, ROCIO GARCÍA-BECERRA, ANA E. LEMUS, GUSTAVO A. GARCÍA, GREGORIO PÉREZ-PALACIOS, KATHY J. JACKSON, KEVIN M. COLEMAN, ROSLYN DACE, CAROLYN L. SMITH, AND AUSTIN J. COONEY

*Department of Reproductive Biology (F.L., R.G.-B.), Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico 14000; Department of Reproductive Biology (A.E.L.), Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, Mexico 09340; Facultad de Química (G.A.G.), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico 04510; School of Medicine (G.P.-P.), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City General Hospital, Mexico 06726; and Department of Molecular and Cellular Biology (K.J.J., K.M.C., R.D., C.L.S., A.J.C.), Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030*

It has previously been demonstrated that 19-nor contraceptive progestins undergo *in vivo* and *in vitro* enzyme-mediated A-ring double bond hydrogenation. Bioconversion of 19-nor progestins to their corresponding tetrahydro derivatives results in the loss of progestational activity and acquisition of estrogenic activities and binding to the ER. Herein, we report subtype-selective differences in ligand binding and transcriptional potency of nonphenolic synthetic 19-nor derivatives between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . In this study, we have examined both ER- and PR-mediated transcriptional activity of a number of A-ring chemically reduced derivatives of norethisterone and Gestodene. Double bond hydrogenation decreased the transcriptional potency of norethisterone and Gestodene through both PR isoforms with a 100- to 1,000-fold difference, respectively. In terms of the effects of norethisterone and Gestodene and their corresponding 5 $\alpha$ -dihydro (5 $\alpha$ -norethisterone and 5 $\alpha$ -Gestodene), or 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro or 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro deriv-

atives (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -norethisterone/3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -Gestodene and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -norethisterone/3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -Gestodene, respectively) on estrogen-mediated transcriptional regulation, the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives of both norethisterone and Gestodene showed the highest induction when HeLa cells were transiently transfected with an expression vector for ER $\alpha$ . This activity could be inhibited with tamoxifen. These compounds did not activate gene transcription via ER $\beta$ , and none of them showed antagonistic activities through either ER subtype. The 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives of both norethisterone and Gestodene were active in other cells in addition to HeLa cells and activated reporter expression through the oxytocin promoter. In summary, two ER $\alpha$  selective agonists have been identified. These compounds, with ER $\alpha$  vs. ER $\beta$  selective agonist activity, may be useful in evaluating the distinct role of these receptors as well as in providing useful insights into ER action. (*Endocrinology* 142: 3791-3799, 2001)

THE ER, WHICH is a member of the nuclear receptor superfamily, functions as a hormone-dependent transcription factor (1). Transactivation by the ER is mediated by two activation functions (AF): AF-1 is located in the N-terminal domain, and AF-2 is located in the C-terminal ligand-binding domain of the receptor (2). Recently, a novel ER isoform was identified that is preferentially expressed in human and rat ovary and prostate (3). This receptor has been named ER $\beta$  to distinguish it from the classical ER $\alpha$ . Although the biological significance of the existence of two ER subtypes is still unclear, the relative homology (60%) between their respective ligand binding domains (4) raises the possibility of the existence of natural or synthetic ligands with unique binding characteristics for ER $\alpha$  and ER $\beta$  subtypes. Thus, the differential expression and unique ligand binding specificities of the

ER subtypes could provide an explanation for the pleiotropic actions of estrogens in many target tissues (5, 6). We, and others, have previously demonstrated that 19-nor progestins are bio-transformed into several metabolites that exhibit altered hormone properties in target tissues (7-10). A-ring reduction of 19-nor T derivatives such as norethisterone (NET), Gestodene (GSD), and levonorgestrel (LNG) to their corresponding 5 $\alpha$ -dihydro and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro metabolites significantly reduces their progestational activity. Although the dihydro-reduced metabolites bind mainly to PRs, the tetrahydro-reduced metabolites lose their progestational activity and demonstrate significant binding affinity for the ER with *in vivo* estrogenic effects (9-13). These observations support the idea that a given steroid can induce selective and even opposing effects in a variety of organs and tissues depending on its metabolic fate, the availability of steroid receptors, and the presence of different subsets of available steroid-responsive promoters and cofactors.

In the present study, we have evaluated the estrogenic activities of NET and GSD and their metabolites using transient transfections in HeLa and CHO cells with an estrogen

Abbreviations: AF, Activation functions; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; CHO, Chinese hamster ovary; CMV, cytomegalovirus; DMEM-HG, DMEM without phenol red; ERE, estrogen response element; GSD, Gestodene; LNG, levonorgestrel; LUC, luciferase; NET, norethisterone; P<sub>4</sub>, progesterone; PRE, progesterone response element; RBA, relative binding affinities.



response element driven chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter or the oxytocin luciferase reporter and expression vectors for either ER $\alpha$  or ER $\beta$ . The results demonstrated that at low concentrations the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives of both NET and GSD (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, respectively) selectively activate ER $\alpha$ , whereas a weak ER $\beta$  agonistic activity was observed only with the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET derivative at very high concentrations. It appears, therefore, that there are some unique features in the structure of these compounds that promote specific binding to ER $\alpha$  and transactivation via this receptor.

## Materials and Methods

### Reagents

Nonradioactive E2 was purchased from Sigma (St. Louis, MO). [2,4,6,7- $^3$ H]Estradiol ([ $^3$ H]E2; specific activity 72 Ci/mmol) and [ $^3$ H]chloramphenicol (specific activity 38.9 Ci/mmol) were purchased from NEN Life Science Products Research products (Boston, MA). Radioactivity was determined in a Beckman Coulter, Inc. LS6500 scintillation system (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) using Biodegradable Counting Scintillant (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) as counting solution. Cell culture medium was purchased from Life Technologies, Inc. (Grand Island, NY). FBS was from HyClone Laboratories, Inc. (Logan, UT). All other solvents and reagents used were of analytical grade. Authentic NET (17 $\alpha$ -ethynyl-17 $\beta$ -hydroxy-4-estren-3-one) and GSD (13 $\beta$ -ethyl-17 $\alpha$ -ethynyl-17 $\beta$ -hydroxy-4,15-gonadien-3-one) were kindly provided by Schering AG Mexicana, S.A. (Mexico City) and Schering AG (Berlin, Germany), respectively. Synthesis of the corresponding 5 $\alpha$ -dihydro (5 $\alpha$ -NET and 5 $\alpha$ -GSD), and the 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -GSD) and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ - (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD) tetrahydro derivatives, including the description of their corresponding physical and spectroscopic constants has been previously described (12, 13).

### Plasmids

The pLEN-hPR $_A$  was constructed by inserting the full-length human progesterone receptor (PR $_A$ ) cDNA into the *Bam*HI site of the pLEN mammalian expression vector (14). The pLEN-hPR $_B$  was generated by inserting the full-length human PR $_B$  cDNA into the *Bam*HI site of the pLEN vector. The expression vectors for human ER $\alpha$  and ER $\beta$  (pCMV $_5$ -hER $\alpha$  and pCMV $_5$ -hER $\beta$ ) containing the coding sequence of the ER $\alpha$  and ER $\beta$  were kindly provided by Drs. B. S. Katzenellenbogen, University of Illinois (Urbana, IL) and J.-Å. Gustafsson, Karolinska Institute (Huddinge, Sweden), respectively. The estrogen responsive reporter plasmid (ERE-E1b-CAT) contains a fragment of the vitellogenin A2 gene promoter (positions -331 to -87) upstream of the adenovirus E1b TATA box fused to the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene (15). The progesterone responsive reporter plasmid (PRE-E1b-CAT) was used as a reporter for PR $_A$  and PR $_B$  (16). The oxytocin reporter, pROLUC, has been previously described (17).

### Transfections and reporter assays

HeLa and CHO cells were plated the day before transfections, at a density of  $3.0 \times 10^5$  cells/well/6-well plate, in DMEM without phenol red (DMEM-HG), which was supplemented with 5% stripped FBS and 100 U/ml of penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin; and incubated in 5% CO $_2$  at 37 C. The next day, the HeLa or CHO cells were visualized on a microscope to verify that the cell density was 30–50% confluent. Transfections were performed in triplicate using SuperFect (QIAGEN Inc., Valencia, CA) or Lipofectamine (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly: serum-free media (0.1 ml) was aliquoted and DNA added (1  $\mu$ g of the reporter gene plasmid and 0.025–0.5  $\mu$ g of the expression vector depending upon whether ER or PR assays were being performed), after vortexing, 10  $\mu$ l of SuperFect reagent was added and vortexed for 10 sec. Following incubation at room temperature for 5–10 min, 0.6 ml of supplemented DMEM-HG was

added to each sample. The medium containing the transfection complexes was added to the cell monolayer, which had previously been rinsed with PBS. The plates were incubated for 3 h at 37 C in 5% CO $_2$ . After incubation, the plates containing the transfection complexes were rinsed with PBS and 3 ml of supplemented DMEM-HG was added to each well. Lipofectamine transfections were performed as previously described (18). Twenty-four hours later, the medium was replaced with medium containing the compounds of interest at various concentrations ( $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M). Dimethyl sulfoxide or ethanol was used as vehicle. CAT activity using 5  $\mu$ g of protein, 10  $\mu$ g of butyryl coenzyme-A (Sigma MO),  $2 \times 10^5$  cpm of xylene-extracted [ $^3$ H]chloramphenicol in 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0, was assayed as previously described (19–21). For the luciferase assays, 48 h after transfection the cells were rinsed  $1 \times$  with PBS without Ca $^{2+}$  or Mg $^{2+}$ . After aspiration 600  $\mu$ l of  $1 \times$  Passive Lysis Buffer (Promega Corp., Madison, WI) was added to each well of a six-well plate. The plates were incubated at room temperature with rocking/shaking until cells lysed. The cell lysates were transferred to a 1.5-ml microfuge tube and centrifuged for 2 min at 4 C to form clear lysates. Aliquots of cell lysates (20  $\mu$ l) were transferred to 12  $\times$  75 mm polystyrene tubes (Sarstedt, Newton NC) suitable for use with a luminometer. Reagents used were appropriate for the dual-luciferase assay (Promega Corp., Madison, WI). Samples were read on a Monolight 3010 luminometer (PharMingen, San Diego, CA). Statistical significance was determined using two tailed *t* test.

### Receptor binding studies

The relative receptor binding affinities were determined as described by Smith and Kreutner (22). Briefly: an adenovirus-mediated DNA transfer procedure (22, 23) was used to transfect COS-1 cells with 3  $\mu$ g of ER expression vector (pCMV $_5$ -hER $\alpha$  or pCMV $_5$ -hER $\beta$ ). Twenty-four hours later, cells were harvested and whole cell extracts were prepared in TESH (10 mM Tris, pH 7.7, containing 1 mM EDTA, 0.1% monothioglycerol and 0.4 M NaCl). Cell extracts were incubated with 1 pmol [ $^3$ H]E2 and increasing concentrations (0.005–5000 pmol) of either E2 or the synthetic test compounds for 3 h on ice. Free steroid was separated from receptor-bound steroid by adsorption to hydroxyapatite Bio-Gel HTP gel (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). The amount of ER-bound [ $^3$ H]E2 was quantified by scintillation counting.

## Results

### Molecular structures.

The structures of the compounds used in this study for analysis are shown in Fig. 1. All compounds are 19-nor T derivatives. The 5 $\alpha$ -dihydro and 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives of NET and GSD, respectively were prepared by chemical double bond hydrogenation of the A-ring as described in *Materials and Methods*.

### Effects of A-ring reduction upon NET and GSD transactivation through PR

Figure 2 shows the effects on PR transcriptional activity of NET and GSD and their corresponding A-ring reduced derivatives in HeLa cells transfected with PR $_A$  (Fig. 2, A and B) or PR $_B$  (Fig. 2, C and D) expression vectors. Cells were transfected with an expression plasmid for either PR $_A$  or PR $_B$  with a progesterone (P $_4$ )-responsive reporter gene and treated with a  $10^{-8}$  M concentration of each steroid, including P $_4$ . As shown in Fig. 2, both NET and GSD behaved as full PR agonists. GSD is a more potent transcriptional activator of both PR $_A$  and PR $_B$  than either NET or P $_4$  (Table 1). As expected by the previously reported relative binding affinities to PR (24), double bond hydrogenation resulted in a significant reduction in the transcriptional potency of NET and

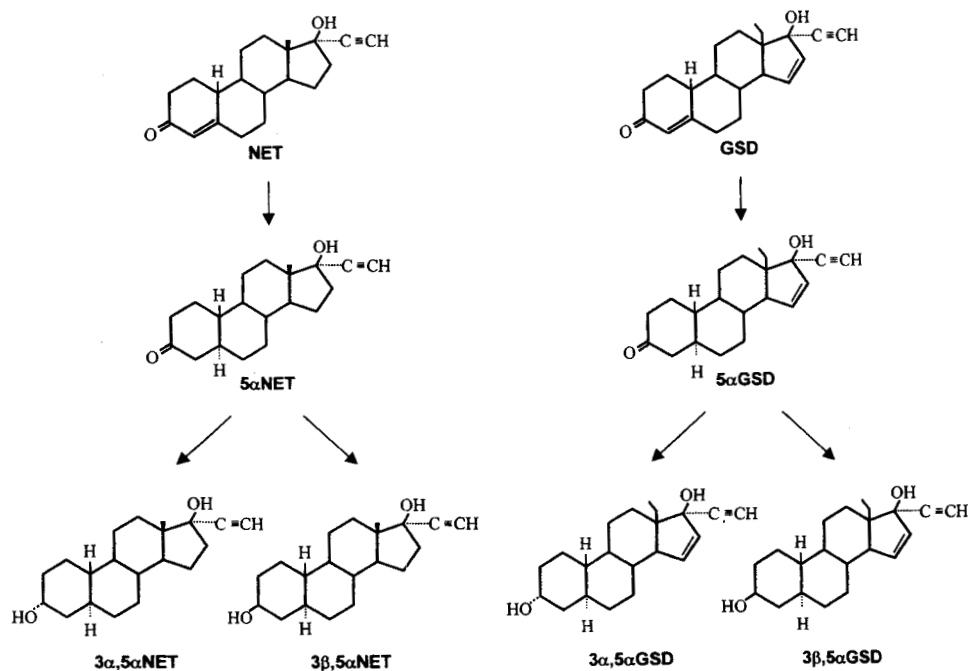


FIG. 1. Molecular structures of NET, GSD, and their corresponding A-ring reduced metabolites.

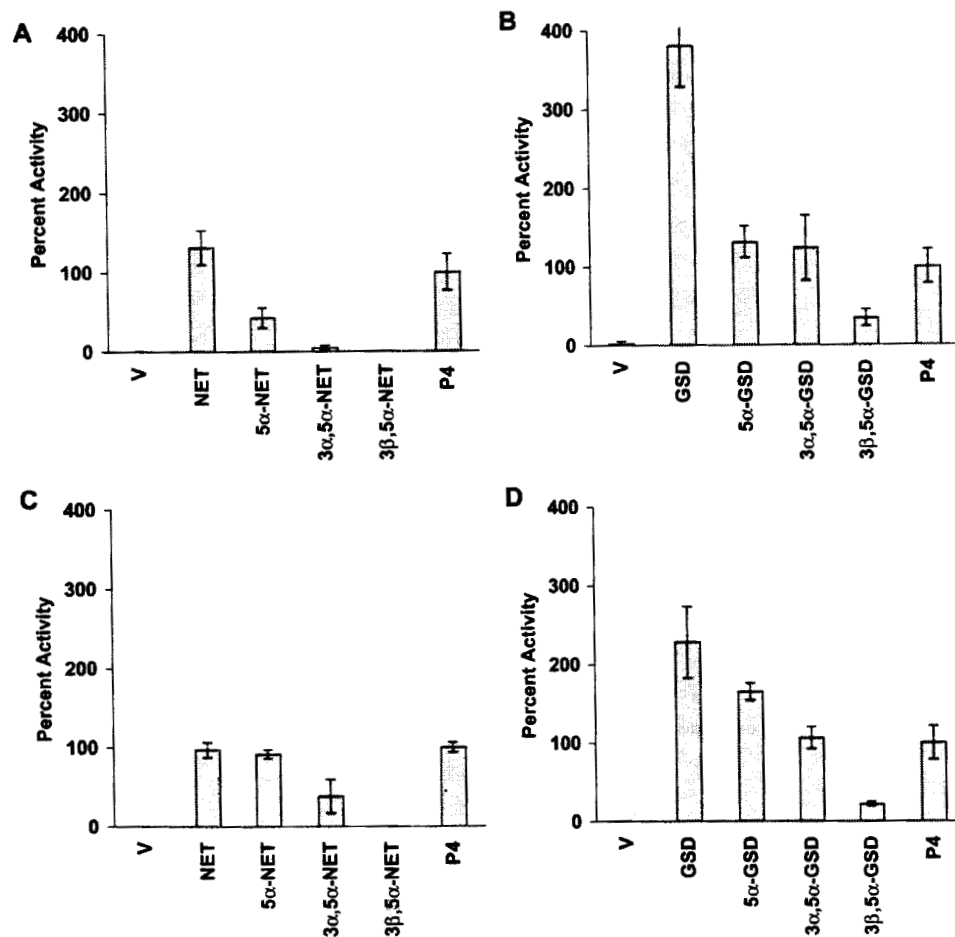


FIG. 2. Activation of PR<sub>A</sub> (A and B) and PR<sub>B</sub> (C and D) by NET, GSD and their reduced metabolites. HeLa cells that were transiently transfected with the corresponding PR expression vector and the PRE-E1b-CAT reporter were cultured either in the absence (V) or presence of  $10^{-8}$  M of P<sub>4</sub> or NET, GSD, or their corresponding synthetic dihydro- and tetrahydro-derivatives. After 24 h, cells were harvested and triplicate dishes were assayed for CAT activity as described in *Materials and Methods* section. Values are the mean  $\pm$  SD of a representative experiment performed in triplicate. The data are normalized to activity with P<sub>4</sub>, which is set at 100%. The activity of PR<sub>B</sub> relative to PR<sub>A</sub> was approximately 5-fold greater.

GSD. The 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives of NET and GSD gave the lowest transactivation through both PRs compared with the other compounds. The 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -

tetrahydro derivatives of NET and GSD have approximately 500- to 1,000-fold difference in transcriptional potency, as judged by their respective EC<sub>50</sub> values (Table 1), obtained in

dose-response experiments (data not shown), when compared with that obtained with their corresponding nonreduced parent compounds.

#### Selective transactivation of ER subtypes

Given the well documented *in vivo* and *in vitro* estrogen-like effects of nonphenolic A-ring-reduced derivatives of NET and GSD (9, 13, 25), the synthesized A-ring-reduced metabolites were examined for their separate activities through ER $\alpha$  and ER $\beta$ . In these studies, the effects of GSD, NET, and their corresponding dihydro and tetrahydro derivatives on receptor-mediated reporter gene transcription were compared with those of E2. As shown in Fig. 3, out of the eight synthetic steroids tested, both 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and

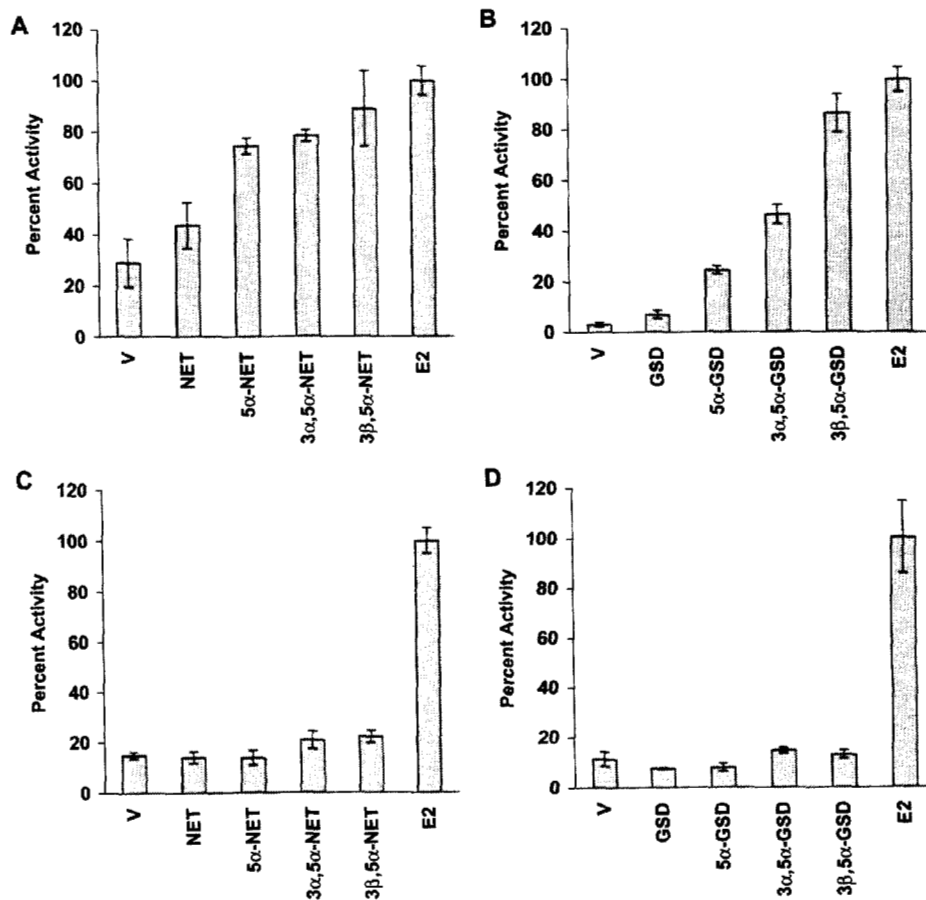
**TABLE 1.** Stimulatory concentrations (EC<sub>50</sub>) of natural progesterone and synthetic steroids on transcriptional activation through the progesterone receptor A and B

Steroid	PR <sub>a</sub> (mol/liter)	PR <sub>b</sub> (mol/liter)
Progesterone	$2.90 \times 10^{-8}$	$8.76 \times 10^{-10}$
NET	$9.10 \times 10^{-11}$	$8.16 \times 10^{-11}$
GSD	$1.36 \times 10^{-11}$	$1.83 \times 10^{-11}$
5 $\alpha$ NET	$1.26 \times 10^{-9}$	$1.80 \times 10^{-8}$
5 $\alpha$ GSD	$3.75 \times 10^{-10}$	$2.29 \times 10^{-9}$
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ NET	$4.62 \times 10^{-8}$	$2.56 \times 10^{-8}$
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ GSD	$1.06 \times 10^{-8}$	$1.28 \times 10^{-8}$
3 $\beta$ ,5 $\alpha$ NET	$6.75 \times 10^{-8}$	$7.91 \times 10^{-8}$
3 $\beta$ ,5 $\alpha$ GSD	$1.01 \times 10^{-8}$	$3.90 \times 10^{-8}$

3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD showed the highest induction of ER-mediated reporter gene transcription when HeLa cells were transiently transfected with the ER $\alpha$  and the ERE-E1b-CAT reporter (Fig. 3, A and B). As depicted, these two compounds 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD at a concentration of  $10^{-8}$  M exhibited a similar transcriptional activity to that observed with the same dose of E2. Interestingly, a similar concentration ( $10^{-8}$  M) of these compounds showed no stimulation of gene transcription through ER $\beta$  (Fig. 3, C and D). Similar results were obtained with the 5 $\alpha$ -dihydro and the 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives of NET and GSD, respectively, but with significantly lower potency for ER $\alpha$ . At all doses used ( $10^{-12}$  M to  $10^{-6}$  M), unmodified NET and GSD led to the lowest levels of induction of ER subtype-mediated reporter gene transcription, compared with the derivatized compounds (data not shown).

Figure 4, A and B, shows a comparison of the agonist activity at various doses ( $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M) of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD on reporter gene transcription through either the ER $\alpha$  or ER $\beta$ . As depicted in Fig. 4A, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET resulted in ER $\alpha$  selective transactivation of reporter gene expression with an EC<sub>50</sub> value that was 100-fold higher than that obtained with E2. As can also be observed in Fig. 4A, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET, at the doses of  $10^{-12}$ – $10^{-7}$  M, was unable to stimulate ER $\beta$ -mediated reporter gene transcription. Only at the highest concentration tested of this compound ( $10^{-6}$  M) was ER $\beta$  able to stimulate reporter CAT activity. Similar results were obtained on transcriptional activation through the ER $\alpha$  and

**FIG. 3.** Effects of NET, GSD, and their dihydro- and tetrahydro-derivatives on ER $\alpha$  (A and B) and ER $\beta$  (C and D)-mediated reporter ERE-E1b-CAT activity. Cells were cultured in the absence (V) or presence of  $10^{-8}$  M of the corresponding natural and synthetic steroids. Values are the mean  $\pm$  SD of a representative experiment performed in triplicate. The data are normalized to activity with E2, which is set at 100%.



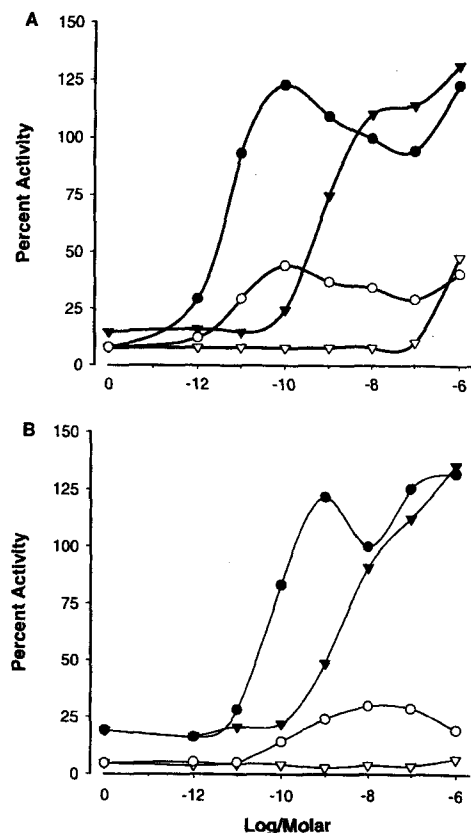


FIG. 4. Dose-dependent activation ER $\alpha$  (closed symbols) but not ER $\beta$  (open symbols) by 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET (A) and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD (B). HeLa cells were transiently transfected with expression vectors for ER $\alpha$  (filled symbol) or ER $\beta$  (open symbol) and an ERE-E1b-CAT reporter gene and cultured in the absence or presence of increasing concentrations ( $10^{-12}$ – $10^{-6}$  M) of E2 (circles) or the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$  derivative (triangles) of NET and GSD, respectively. Values are the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. The data are represented as fold induction relative to the reporter activity plus vehicle alone set as one.

ER $\beta$  with 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD (Fig. 4B). However, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD did not activate transcription through ER $\beta$  even when used at the highest concentration tested (Fig. 4B). Therefore, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD have increased potency and efficacy for activation of ER $\alpha$ -dependent gene expression relative to ER $\beta$ , and these compounds are therefore ER $\alpha$  selective agonists.

Because previously identified ER $\alpha$ -selective ligands were shown to be potent ER $\beta$  antagonists, we investigated whether the NET and GSD derivatives act as antagonists, particularly through ER $\beta$  (26, 27). HeLa cells were transfected with expression vectors for ER $\alpha$  or ER $\beta$  together with the estrogen-responsive reporter gene, and treated with E2 ( $10^{-9}$  M) in the presence or absence of increasing concentrations ( $10^{-8}$ – $10^{-6}$  M) of NET, or GSD and their corresponding A-ring reduced derivatives, or the antiestrogen 4-hydroxytamoxifen ( $10^{-7}$  M). As shown in Fig. 5, with the exception of 4-hydroxytamoxifen, none of the NET (Fig. 5C) or GSD (Fig. 5D) derivatives, at various concentrations ( $10^{-6}$ – $10^{-8}$  M), significantly inhibited ER $\beta$ -induced reporter gene activation. The increased activities that were observed in Fig. 5D were minor and not reproducible. No inhibition of ER $\alpha$  activity was observed, except with 4-hydroxytamoxifen (Fig. 5, A and B), but this is not unexpected considering the relatively poor

binding affinity of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD in comparison to estradiol, and the ER $\alpha$  agonist activity of these ligands. The antiestrogen 4-hydroxytamoxifen was used to ensure that 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD were stimulating target gene expression via ER $\alpha$ . As shown in Fig. 5E, 4-hydroxytamoxifen effectively inhibited the ability of both tetrahydro derivatives to stimulate ER $\alpha$  transcriptional activity.

#### ER binding studies

The relative binding affinities (RBAs) of the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives of NET and GSD, respectively, were determined in extracts of COS-1 cells transfected with expression vectors for either ER $\alpha$  or ER $\beta$ . The numbers represent relative affinities for ER $\alpha$  in comparison to E2, which is set at 100. As shown in Fig. 6A, both compounds showed the ability to displace bound [ $^3$ H]E2 from the ER $\alpha$  with an RBA of 1.18 and 5.23 for the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, respectively. In contrast, these compounds behaved as weak competitors for ER $\beta$  binding sites (Fig. 6B), as judged by their corresponding RBAs (0.00418 and 0.039 for 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, respectively).

#### Promoter and cell specificity of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD activation of ER $\alpha$

To determine whether 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD would activate a natural estrogen responsive promoter selectively through ER $\alpha$ , we transfected the oxytocin promoter luciferase reporter (pROLUC) into HeLa cells with either the ER $\alpha$  or ER $\beta$  expression vectors and subsequently treated with the indicated compounds (Fig. 7, A and B). Both 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD activated reporter expression from the oxytocin promoter through ER $\alpha$  but not ER $\beta$ , whereas the parent compounds NET and GSD had very little effect. Thus, both 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD could selectively activate a naturally occurring estrogen responsive promoter. To investigate the cell specificity of the estrogenic effects of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, we transfected the ERE-E1b-CAT reporter into CHO cells along with an expression vector for ER $\alpha$  (Fig. 7C). Activation of reporter activity by ER $\alpha$  was observed with both 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD, but not to the same level as E2; however, they were statistically significant with  $P < 0.05$ . Both compounds appear to display lower activities in CHO cells than in HeLa cells. This lower activity suggests the relative agonist activity of these compounds may vary depending on cell type. Importantly neither compound stimulated ER $\beta$  transactivation in CHO cells.

#### Discussion

The results of the present study support and extend previous observations from our laboratory that enzyme-mediated hydrogenation of the double bond of 19-nor synthetic-derived T, by formation of A-ring reduced metabolites, determines their biological activity by means of differential interaction with steroid receptors other than PR (9–11, 13, 24). Indeed, the intrinsic estrogenic properties of NET and GSD, two 19-nor T derivatives, most probably lie in their bio-transformation to their corresponding 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives (9). In addition, this study clearly shows the

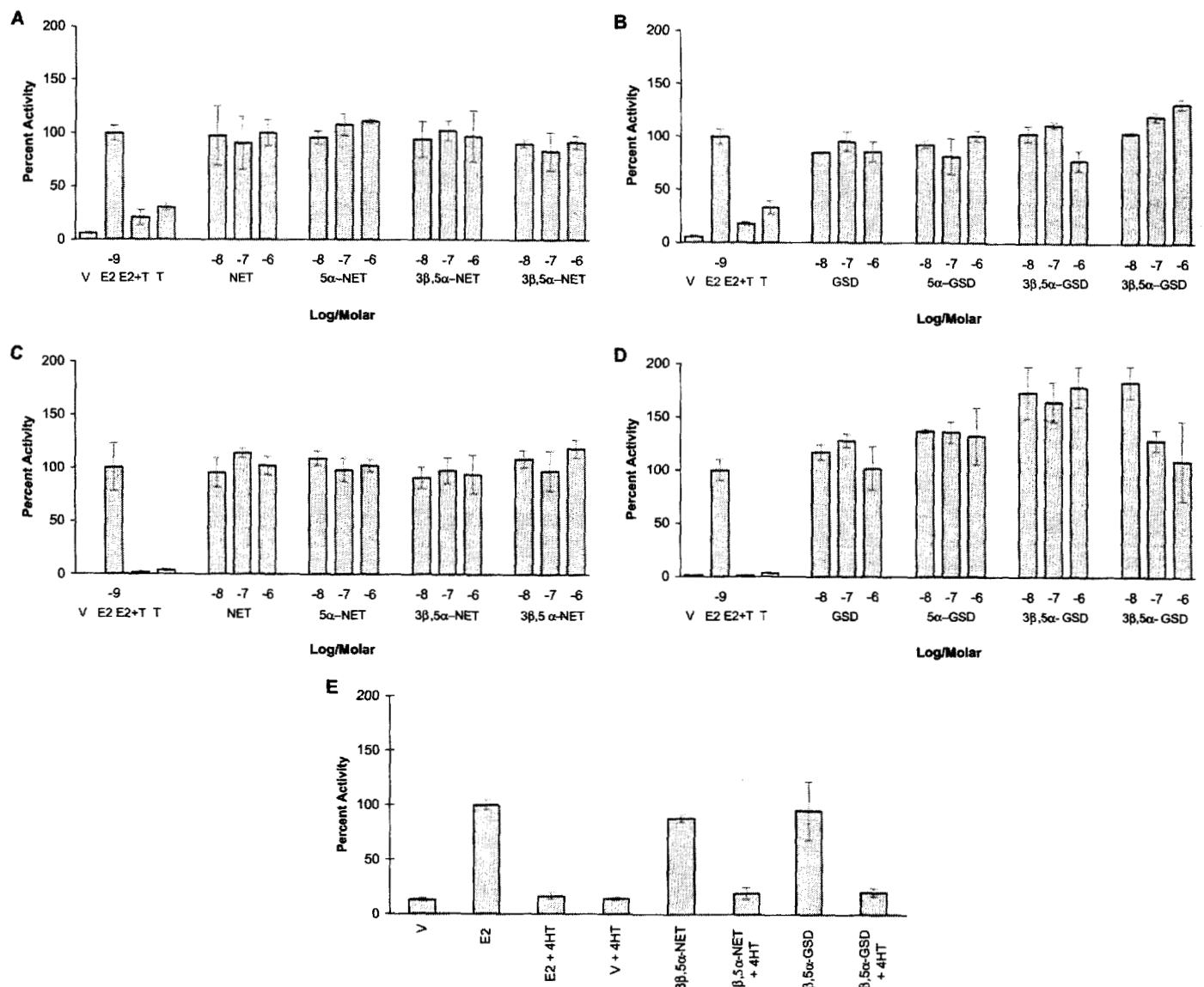


FIG. 5. GSD, NET, and their dihydro and tetrahydro derivatives do not antagonize ER $\alpha$  or ER $\beta$  transactivation, but tamoxifen can inhibit their activity. HeLa cells transiently transfected with the expression vector for ER $\alpha$  (A and B) or ER $\beta$  (C and D) and an ERE-E1b-CAT reporter gene were incubated with 1 nM E2 in the absence or presence of  $10^{-7}$  M of 4-hydroxytamoxifen (T) or various concentrations ( $10^{-8}$  to  $10^{-6}$  M) of either NET (A) or GSD (B) and their corresponding synthetic reduced derivatives. Activation of ER $\alpha$  by 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD was also inhibited by the addition of tamoxifen (E). Values are the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments. Control incubations were performed in the presence of only the vehicles (V: dimethyl sulfoxide and ethanol) or (T: ethanol plus T). The data are normalized to activity with E2, which is set at 100%.

specific activation of ER $\alpha$ -dependent reporter gene expression by both 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD with little if any activation through other receptors tested. Activation of ER $\alpha$  by 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD was observed in both HeLa and CHO cells. In addition, these compounds are capable of activating the oxytocin promoter, a natural estrogen responsive promoter. Therefore, we have demonstrated that these compounds are ER $\alpha$  selective in two different cell lines and on simple and complex natural promoters. This is an important consideration because the relative agonist activity of many ER ligands (e.g. selective ER modulators) varies by cell and promoter type. More detailed analyses will be required to gain a broader understanding of the extent of this specificity. Overall, the results are of biological importance in the

sense that although a second ER (ER $\beta$ ) has been identified, its relevance in estrogen endocrinology is still unclear and compounds such as 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD will enable selective *in vivo* studies of only ER $\alpha$  function.

The calculated RBA values from the slopes generated for ER $\alpha$  were very similar to those obtained in previous studies using rat uterus cytosol that involved mainly the ER $\alpha$  (24). This observation, together with previously published data on the ability of NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET to suppress pituitary LH release, including their estrogen-like effects upon the endometrium in castrated female rats (9, 25), supports the selective binding of the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET to ER $\alpha$  and agrees with the relative distribution of ER $\alpha$  mRNA in different rat and mouse tissues (5, 6, 28, 29). The ER $\alpha$  mRNA is highly ex-

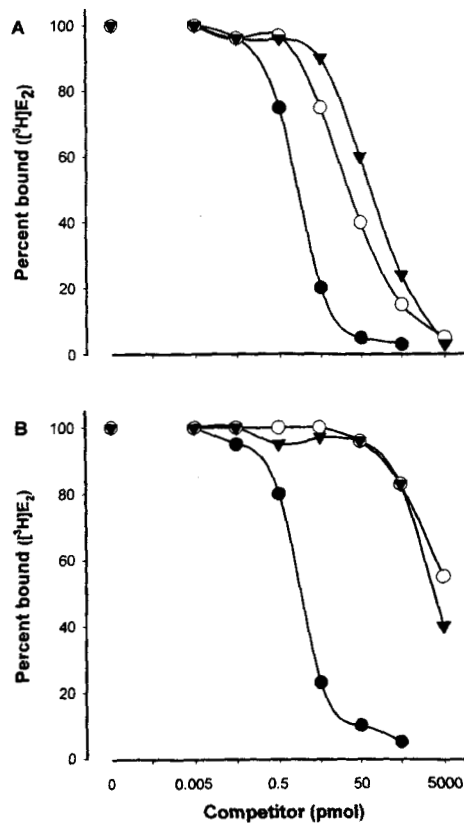


FIG. 6. Relative binding affinity of E2 (closed circle), 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET (open circle) and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD (triangle) for ER $\alpha$  (A) and ER $\beta$  (B). Extracts from COS-1 cells transfected with expression vectors for either ER $\alpha$  or ER $\beta$  were incubated in the presence of 1 pmol [ $^3\text{H}$ ]E2 and increasing concentrations (0.005–5000 pmol) of each of the unlabeled competitors. Free from receptor-bound steroid was separated by adsorption to hydroxyapatite. Values are the mean of a representative experiment performed in duplicate.

pressed in pituitary, uterus, testis, epididymis and kidney, and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET estrogenic responses would be expected in these tissues. Furthermore, these compounds may serve as useful tools to discriminate ER $\alpha$  from ER $\beta$  functions in tissues (e.g. ovary) that express both receptors. Although our findings suggest that 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives have receptor-selective actions, a detailed evaluation of the biological effects of these selective ER $\alpha$  agonists in the ER $\alpha$  or ER $\beta$  knockout mouse models is, of course, also of relevant interest.

The ability to have preferential ligand selectivity for ER $\alpha$  vs. ER $\beta$  receptors, as in the case of this study, could help in the process of identifying additional synthetic or naturally occurring steroids with different relative affinities for both ER subtypes. In this regard, it is known that only those C-19 steroids with a hydroxyl group at C-3 and C-17 have significant affinity for both ER subtypes (5). In addition, as shown herein, the relative spatial orientation of the A-ring with respect to the B-ring, as in the case of 5 $\alpha$ -reduction and hydroxylation at C-3 of NET and GSD, should also be considered as important structural characteristics for ER $\alpha$  ligand recognition. Whether other alterations in ligand structure, besides those occurring in the A-ring, such as substitutions at C-17 in the  $\alpha$  position or the absence of the C-19 methyl

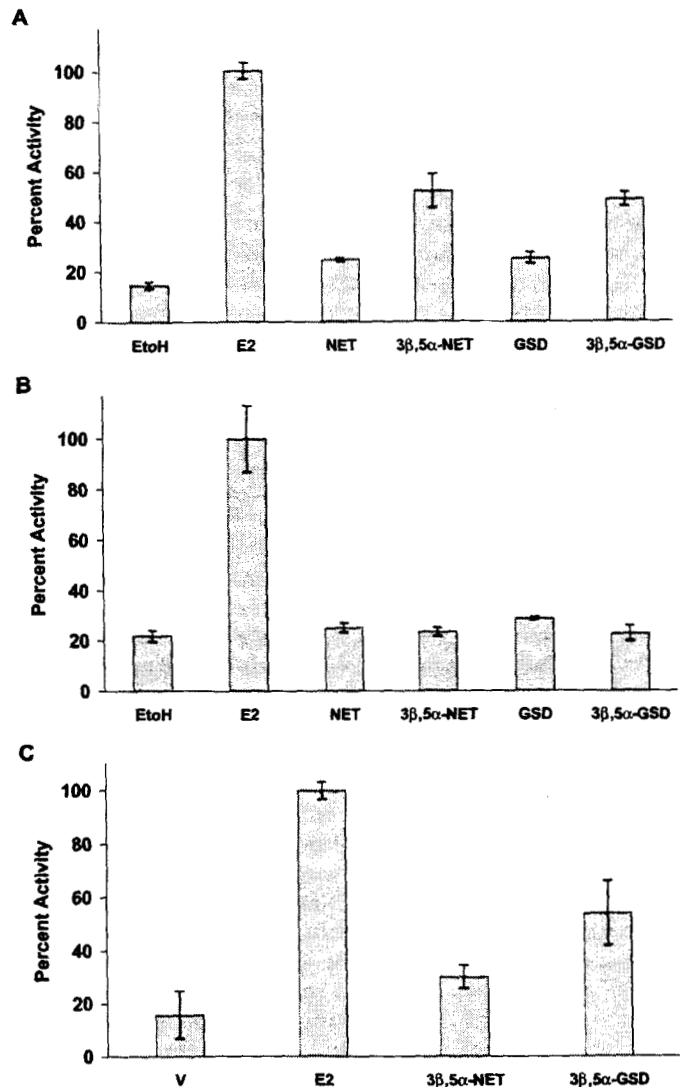


FIG. 7. Activity of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD on a naturally estrogen responsive oxytocin promoter, and in CHO cells. The pROLUC reporter was transfected into HeLa cells with either ER $\alpha$  (A) or ER $\beta$  (B) expression vectors in the presence of E2, NET, GSD, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET or 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD. C, The ERE-E1b-CAT reporter was transfected into CHO cells with the ER $\alpha$  expression vector and treated with either E2, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET or 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD at 10  $\mu\text{M}$ . Values are the mean  $\pm$  SEM of representative experiments. The data are normalized to activity with E2, which is set at 100%.

angular (30) in NET and GSD, are important in selective binding to ER $\alpha$  deserves further investigation.

Interestingly, these observations are consistent with previous computer-based quantitative structure-activity relationship studies of ligand-receptor interactions (31). In these studies, comparative molecular field analysis of both ERs revealed that they are sensitive to adding steric bulk at the 17 $\alpha$ -position on the steroid ring, suggesting that substitutions in this region will enhance the binding affinity more for ER $\alpha$  rather than ER $\beta$ , which is consistent with the experimental findings reported in this study. In addition, the molecular changes elicited by the 19-nor substitution might increase the mobility and electronic density of the A-ring allowing the alignment of the 3 $\beta$ -hydroxy group and the

A-ring hydrogen atoms resembling an estrogen-like environment. There have been several other examples of compounds with differences in the transcriptional activities through both ER subtypes (26, 27). Recently, two novel ligands for ER $\alpha$  and ER $\beta$  have been described (26). One, a nonsteroidal triaryl-substituted pyrazole, with a 120-fold agonist potency preference for ER $\alpha$  and the other, a *cis*-diethyl-substituted tetrahydrochrysenone prepared as a fluorescent ER ligand, is an agonist on ER $\alpha$  but a complete antagonist for ER $\beta$ . In addition, metabolites of methoxychlor were also shown to have similar properties, *i.e.* ER $\alpha$  agonist and ER $\beta$  activities (27). Similarly, Kuiper *et al.* (5), reported ER $\alpha$  and ER $\beta$  relative binding affinities for a number of estrogen derivatives, as well as nonsteroidal phytoestrogens, such as genistein. In addition, these authors also presented evidence that A-ring reduced natural androgens are more ER $\beta$  selective, which may indicate, as described above, the importance of C-17 substitutions and/or the absence of the C-19 methyl angular in ligand-ER interactions. Relative to these previous reports, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -GSD produce better discrimination in relative binding affinity for ER $\alpha$  and ER $\beta$  than other compounds examined and this should facilitate studies on the distinct biological roles of both ER subtypes.

Estrogens are known to have important effects on the reproductive system, and targeted disruption of the ER $\alpha$  gene results in sterility in both male and female mice (32). The ER $\alpha$  knockout mice developed normally but were infertile and did not respond to estradiol. These data, together with other observations in the male mice (33), indicate that ER $\beta$  alone does not appear to be capable of maintaining normal reproductive function in the ER $\alpha$  knockout mice. Although a complementary role between these two ER subtypes cannot be discarded, it is obvious the importance of ER $\alpha$  in the overall actions of estrogens. In this regard, we have shown (34) the ability of NET to significantly suppress serum LH levels in castrated subjects with testicular feminization syndrome, and the effect of NET and its 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro reduced metabolite on LH suppression in the long-term ovariectomized female rat (9, 25, 35). Because these conditions are characterized by the absence of androgen action and estrogen-dependent PRs in both testicular feminization syndrome and ovariectomized rats, the LH suppressing activity of NET was probably due to its interaction with hypothalamic-pituitary ERs. Furthermore, administration of 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro derivatives of NET and GSD is capable of restoring both the content of pituitary PR in the ovariectomized female rat (12, 13) and inducing male sexual behavior when given chronically in combination with 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone to castrated male rats (36), indicating their intrinsic estrogenic activities. These observations suggest that ER $\alpha$  is involved at the hypothalamic-pituitary unit in terms of gonadotropin regulation as well as in other brain areas controlling sexual behavior. In as much as the clinical dimension of the availability of specific ER subtype ligands has yet to be determined, it is envisioned that identification of compounds with preferential selectivity for ER subtypes would be valuable for the development of new potential therapeutic approaches based on receptor-selective hormonal actions and provide an important tool to examine ER $\alpha$  and ER $\beta$  specific cellular and molecular functions.

Overall, the data presented demonstrate that the tetrahydro derivatives of NET and GSD bind and selectively activate gene transcription via ER $\alpha$ . These compounds, in addition to their scientific and therapeutic implications, may also help to identify and differentiate structural features in natural and synthetic ligands responsible for selective binding to ER $\alpha$  and ER $\beta$ .

### Acknowledgments

We thank Mr. Vinh Lam for technical assistance.

Received November 14, 2000. Accepted May 31, 2001.

Address all correspondence and requests for reprints to: Fernando Larrea, M.D., Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Quiroga No. 15, México D. F., C. P. 14000, México. E-mail: larrea@conacyt.mx.

This study was supported in part by grants from the Contraceptive Research and Development Program (to A.J.C. and F.L.), the Andrew W. Mellon Foundation (to A.J.C.), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (to F.L.), and the U.S. Army Medical Research and Materiel Command (DAMD17-98-1-8282 to C.L.S.).

### References

1. Tsai M-J, O'Malley BW 1994 Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451–486
2. Tora L, White J, Brou C, et al. 1989 The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* 59:477–487
3. Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-Å 1996 Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925–5930
4. Kuiper GGJM, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson J-Å 1998 The estrogen receptor  $\beta$  subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 19:253–286
5. Kuiper GGJM, Carlson B, Grandien K, et al. 1997 Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 138:863–870
6. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson J-Å, Korach KS 1997 Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology* 138:4613–4621
7. Stillwell WG, Homing EC, Horning MG, Stillwell RN, Zlatkis A 1972 Characterization of metabolites of steroid contraceptives by gas chromatography and mass spectrometry. *J Steroid Biochem* 3:699–706
8. Braselton Jr WE, Lin TJ, Ellegood JO, Mills TM, Mahesh VB 1979 Accumulation of norethindrone and individual metabolites in human plasma during short- and long-term administration of a contraceptive dosage. *Am J Obstet Gynecol* 133:154–160
9. 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
10. Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, et al. 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
11. Pérez-Palacios G, Cerbón MA, Pasapera AM, et al. 1992 Mechanism of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:479–485
12. 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 progesterin receptors. *J Steroid Biochem* 24:525–531
13. Lemus AE, Zaga V, Santillán R, et al. 2000 The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites. *J Endocrinol* 165:693–702
14. Friedman JS, Cofer CL, Anderson CL, et al. 1989 High expression in mammalian cells without amplification. *Bio Technol* 7:359–362
15. Smith CL, Conneely OM, O'Malley BW 1993 Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6120–6124
16. Allgood VE, Oakley RH, Cidlowski JA 1993 Modulation by vitamin B6 of glucocorticoid receptor-mediated gene expression requires transcription factors in addition to the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 268:20870–20876
17. Burbach JPH, Lopes da Silva S, Cox JJ, Adan RAH, Cooney AJ, Tsai M-J, Tsai SY 1994 Repression of estrogen-dependent stimulation of the oxytocin gene by chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I. *J Biol Chem* 269:15046–15053
18. Smith CL, Nawaz Z, O'Malley BW 1997 Coactivator and corepressor regu-

- lation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol* 11:657–666
19. Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai M-J 1992 COUP-TF dimers bind to different GGTCA response elements allowing it to repress hormonal induction of VDR, TR and RAR. *Mol Cell Biol* 12:4153–4163
  20. Cooney AJ, Leng X, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai M-J 1993 Multiple mechanisms of COUP-TF-dependent repression of VDR, TR and RAR transactivation. *J Biol Chem* 268:4152–4160
  21. Seed B, Sheen JY 1988 A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acyltransferase activity. *Gene* 67:271–277
  22. Smith CL, Kreutner W 1998 *In vitro* glucocorticoid receptor binding and transcriptional activation by topically active glucocorticoids. *Drug Res* 48: 956–960
  23. Allgood VE, Zhang Y, O'Malley BW, Weigel NL 1997 Analysis of chicken progesterone receptor function and phosphorylation using an adenovirus-mediated procedure for high efficiency DNA transfer. *Biochemistry* 36: 224–232
  24. Chávez BA, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G 1985 Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 22:121–126
  25. Larrea F, Moctezuma O, Pérez-Palacios G 1984 Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. *J Steroid Biochem* 20:841–847
  26. Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS 1999 Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor- $\alpha$  or estrogen receptor- $\beta$ . *Endocrinology* 140: 800–804
  27. Gaido KW, Leonard LS, Maness SC, et al. 1999 Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 140:5746–5753
  28. Shughrue PJ, Komm B, Merchenthaler I 1996 The distribution of estrogen receptor- $\beta$  mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids* 61:678–681
  29. Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I 1997 Comparative distribution of estrogen receptor- $\alpha$  and  $\beta$  mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507–525
  30. Jordan VC, Mittal S, Gosden B, Koch R, Lieberman ME 1985 Structure-activity relationships of estrogens. *Environ Health Perspect* 61:97–110
  31. Tong W, Perkins E, Xing L, Welsh WJ, Sheehan DM 1997 QSAR models for binding of estrogenic compounds to estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes. *Endocrinology* 138:4022–4025
  32. Couse JF, Korach KS 1999 Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358–417
  33. Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, et al. 1996 Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137:4796–4805
  34. Pérez-Palacios G, Chavez B, Escobar N, et al. 1981 Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. *J Steroid Biochem* 15:125–130
  35. Garza-Flores J, Menjivar M, Cardenas M, Reynoso M, Garcia GA, Pérez-Palacios G 1991 Further studies on the antagonistic mechanism of action of norethisterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 38:89–93
  36. Morali G, Lemus AE, Oropeza MV, Garcia 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