

---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**FORMACIÓN DE DERIVADOS 5 $\alpha$ -REDUCIDOS DE NORETISTERONA EN  
OSTEOBLASTOS Y SU INTERACCIÓN CON RECEPTORES DE  
ESTRÓGENOS**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:  
**BIOL. EXP. MARÍA DE LOS ANGELES HERNÁNDEZ RAMÍREZ**

DIRECTORA

**DRA. ANA ELENA LEMUS BRAVO**

ASESORES  
**DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA**  
**DR. JESÚS CHIMAL MONROY**

MÉXICO D.F., DICIEMBRE 06

---

---

---

---

**Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en el Depto. Biología de la Reproducción y en el Depto. Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.**

**La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACYT (C/PFPN-2002-35-32).**

**La Maestría en Biología Experimental fue apoyada por la beca otorgada durante el período 2004-2005 por parte de CONACyT con el No. de registro 185578.**

---

---

---

---

## COMITÉ TUTORAL

### Directora

**Dra. Ana Elena Lemus Bravo**  
Profesora Titular "C"  
Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
anaelenalemus@aol.com

### Asesores

**Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura**  
Profesor Titular "C"  
Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa  
pgdm@xanum.uam.mx

**Dr. Jesús Chimal Monroy**  
Investigador Titular "A" T.C.  
Instituto de investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México  
jchimal@servidor.unam.mx

---

---

---

---

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada”:

**“FORMACIÓN DE DERIVADOS 5 $\alpha$ -REDUCIDOS DE NORETISTERONA EN OSTEOLASTOS Y SU INTERACCIÓN CON RECEPTORES DE ESTRÓGENOS”**

**JURADO DE EXAMEN**

---

Presidente

**Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura**

Profesor Titular “C”  
Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa

---

Vocal

**Dr. Javier Velázquez Moctezuma**

Profesor Titular “C”  
Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa

---

Secretaria

**Dra. Gabriela Morali de la Brena**

Investigador Titular “B”  
Unidad de Investigación Médica en Farmacología,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S.

---

---

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A **DIOS**...por permitirme despertar cada día, por enseñarme y ayudarme a perseverar para lograr cada meta y cada sueño...

**“Quienes nos aman jamás nos dejan, siempre estarán aquí...en el corazón...”**

A la memoria de mi **Papa ANGEL**... Gracias por todo...

Con Amor y Eterno agradecimiento a mis padres, **Alicia** y **Juan**, quienes con su esfuerzo, amor y confianza me han guiado y procurado lo mejor para mí... Gracias!!!

Con cariño y respeto a mi tío **Rodolfo**, Gracias por su ejemplo, apoyo y por animarme a salir adelante ante cualquier adversidad...

A mis hermanos: **Ana Cristina**, **Luis Miguel** y **José Juan**, quienes con su apoyo y cariño me enseñan cada día lo importante que es la comunicación y estar unidos... los quiero mucho...!!!

Con cariño a **Rodrigo**...por tu apoyo, comprensión y tus consejos, por todo lo que tú y yo sabemos...Gracias!... “Siempre serás el amor de mi vida...”

A mis tíos **Javier**, **Carmen** y **Refugio**, por el apoyo que siempre me han brindado...

A **Leti**...Gracias amiga por tu amistad y cariño...por tu apoyo y por compartir conmigo tus conocimientos y experiencias...

A mis amigas **Vara**, **Inés**, **Elsa** y **Tania**, gracias chicas por su amistad, cariño y apoyo... a mis compañeros **Armando**, **Xochil** y **Gabriel**, por su apoyo...

A mis **Maestras** y **Maestros**, por compartir conmigo sus conocimientos a través de mi formación académica...

---

---

---

---

Un agradecimiento al **Dr. Fernando Larrea Gallo**, Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción, al **Dr. Octavio Villanueva**, Jefe del Bioterio y a la **Dra. Verónica Navarro**, al Biólogo **Roberto Chavira**, del Departamento Biología de la Reproducción, al **Departamento de Gastroenterología**, del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por las facilidades y el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo.

A la **Maestra Juanita**...por guiarme y formar parte de este trabajo...por su paciencia, apoyo y enseñanza...por su sinceridad y sus consejos...Gracias por todo!...

Al **Dr. Pablo**...por su amistad, confianza, y apoyo en todo momento...por el conocimiento que día a día recibo de usted...Gracias!..

A la **Dra. Ana Elena**...por su apoyo, por cada enseñanza recibida...por el trabajo y tiempo brindado...

Un sincero agradecimiento a los miembros del Jurado: **Dra. Gabriela Morali de la Brena** y **Dr. Javier Velázquez Moctezuma**, por los valiosos comentarios y por el tiempo que dedicaron a la revisión de este escrito.

A todas las personas que de alguna forma me han ayudado a lo largo de mi vida y de mi camino...

**“No son las debilidades lo que demuestran lo que somos... son nuestras decisiones...y nuestra perseverancia para lograr el éxito...”**

---

---

<b>ÍNDICE</b>	
<b>Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>14</b>
4.1. General.....	14
4.2. Particulares.....	14
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>14</b>
<b>6. Material y Métodos.....</b>	<b>15</b>
6.1. Material Biológico.....	15
6.2. Material Radiactivo.....	15
6.3. Esteroides Radioinertes.....	15
6.4. Medio de Incubación.....	17
6.5. Colagenasa tipo II.....	17
6.6. Obtención y Cultivo Primario de Osteoblastos.....	17
6.7. Estudios de Metabolismo <i>In Vitro</i> .....	19
6.7.1. Preparación de los Cultivos de Osteoblastos.....	19
6.7.2. Incubación del Cultivo Primario de Osteoblastos con NET-[ <sup>3</sup> H]....	19
6.7.3. Extracción de los Metabolitos formados durante la incubación....	20
6.7.4. Separación e Identificación de los Metabolitos.....	21
6.8. Interacción de NET y sus Metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos, con los receptores intracelulares de estrógenos.....	22
6.8.1 Obtención del Citosol de los Osteoblastos.....	22
6.8.2. Curva de Saturación.....	23
6.8.3 Determinación de la Constante Aparente de Disociación ( $K_d$ ) y el Número de Sitios de Unión (NSU) del receptor intracelular de estrógenos.....	23
6.8.4. Análisis de Competencia de NET y sus Metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos por los sitios activos de unión del receptor de estrógenos unidos al E <sub>2</sub> -[ <sup>3</sup> H].....	24

---

---

<b>7. Resultados</b> .....	<b>26</b>
7.1 Formación <i>in vitro</i> de Metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de NET-[ <sup>3</sup> H] en Osteoblastos de calvaria de rata, mantenidos en cultivo.....	26
7.2 Biotransformación de T-[ <sup>14</sup> C] en osteoblastos de calvaria de rata mantenidos en cultivo.....	28
7.3. Estereoespecificidad de la unión de la NET y sus derivados 5 $\alpha$ - reducidos, al receptor intracelular de estrógenos.....	31
7.3.1 Constantes de unión al equilibrio del receptor intracelular de estrógenos.....	31
7.3.2. Estereoespecificidad de la unión de NET y sus derivados 5 $\alpha$ - reducidos, al receptor intracelular de estrógenos de osteoblastos de rata recién nacida.....	32
<b>8. Discusión</b> .....	<b>34</b>
<b>9. Conclusiones</b> .....	<b>37</b>
<b>10. Bibliografía</b> .....	<b>38</b>

## RESUMEN

La Noretisterona (NET) es una progestina sintética derivada de la 19-Nortestosterona, que ha sido utilizada en la mujer postmenopáusica, como terapia de reemplazo hormonal, con efectos benéficos sobre la remodelación ósea, ya que además de detener la pérdida de la masa ósea, estimula la formación de hueso, efectos que son regulados por estrógenos. Sin embargo, aún cuando la NET *per se* no es capaz de inducir efectos de tipo estrogénico, debido a que no se une a los receptores de estrógenos (RE) y por su estructura química no se puede aromatizar, es eficientemente bioconvertida en órganos blanco, a derivados reducidos en el anillo A, los cuales interactúan con los receptores intracelulares de estrógenos y expresan efectos biológicos de tipo estrogénico. En un estudio previo, se demostró que el derivado  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro de NET, y en menor proporción el  $3\alpha,5\alpha$ - estimulan la proliferación, diferenciación y mineralización de osteoblastos de calvaria de rata neonatal, de manera similar al efecto inducido por el estradiol ( $E_2$ ). Estos hallazgos, sugieren que los efectos benéficos de NET sobre la actividad de los osteoblastos podrían estar mediados por sus productos de conversión metabólica y su posterior interacción con los RE.

La hipótesis que se plantea en esta tesis es que los osteoblastos de la calvaria de la rata neonatal poseen las enzimas  $5\alpha$ -esteroide reductasa,  $3\alpha,5\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y  $3\beta,5\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, capaces de reconocer y utilizar a la NET como sustrato y biotransformarla a metabolitos reducidos en el anillo A, los cuales al interactuar con los receptores intracelulares de estrógenos, serían los responsables de los efectos biológicos de tipo estrogénico que inducen la formación de hueso.

Con el objetivo de demostrar la hipótesis planteada, se estudio el destino metabólico de NET en los osteoblastos de calvaria de rata, mantenidos en cultivo, incubados con NET- $[^3H]$ , en presencia y ausencia de finasteride, un inhibidor de las  $5\alpha$ -esteroide reductasas. La separación e identificación de los productos de conversión metabólica de NET se realizó con el método de dilución isotópica

inversa. Los resultados demostraron que la NET es bioconvertida a sus metabolitos  $5\alpha$ -NET,  $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -NET y que la presencia de finasteride, inhibió la formación de  $5\alpha$ -NET y consecuentemente de  $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -NET.

La capacidad de unión de los derivados reducidos de NET con los receptores intracelulares de estrógenos del citosol de los osteoblastos, se determinó mediante análisis de competencia utilizando  $E_2$ - $[^3H]$  como radioligando. Los resultados demostraron que mientras la NET y su derivado  $5\alpha$ -NET fueron incapaces de interactuar con los RE, los derivados  $3\beta,5\alpha$ -NET y  $3\alpha,5\alpha$ -NET, se unen con alta afinidad, de manera semejante a la observada con el  $E_2$ .

Estos resultados en su conjunto confirman la hipótesis de trabajo planteada y sugieren fuertemente que el mecanismo de acción a través del cual, NET ejerce sus efectos sobre la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, involucra su biotransformación a metabolitos tetrahydro reducidos y su posterior interacción con RE.

## SUMMARY

Norethisterone (NET) is a synthetic 19-norprogesterone, widely used in hormone replacement formulations in postmenopausal women, taking advantage of its beneficial effects on bone turnover. Indeed, NET not only prevents bone mineral loss and reduces bone resorption but also stimulates bone formation, which are an estrogen-mediated effects. The mechanisms of estrogen-like bone actions of 19-norprogestins are not fully understood, particularly since these synthetic steroids neither interact with estrogen receptors (ER) nor undergo enzyme mediated aromatization; however, NET is extensively bioconverted in target organs to A ring reduced tetrahydro derivatives, which are selectively recognized by the human ER $\alpha$  and are able to transactivate estrogen dependent genes in cell expression systems. A recent study from our laboratory have presented evidence that two non-phenolic NET derivatives, the 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ - and the 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro NET derivatives are capable to stimulate cell proliferation, differentiation and mineralization in cultured osteoblasts from neonatal rat calvariae, strongly suggesting that the beneficial bone effects of NET are mediated via its reduced derivatives.

The working hypothesis of this research project establishes that cultured neonatal rat osteoblasts possess 5 $\alpha$ -steroid reductases, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase and 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, capable to bioconvert NET to its A-ring reduced tetrahydro derivatives, which bind to the ER and are able to induce estrogen-like action in the bone cells.

To assess whether NET is bioconverted to its tetrahydro reduced derivatives in bone cells, we studied the metabolism of [ $^3$ H]-NET in cultured neonatal rat osteoblasts, in the presence and absence of finasteride, a potent inhibitor of 5 $\alpha$ -steroid reductases. The identification of the NET metabolic conversion products was done by the use of reverse isotope dilution technique. The results demonstrated the NET was bioconverted to 5 $\alpha$ -dihydroNET, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET and

$3\beta,5\alpha$ -NET, and that finasteride precluded the formation of  $5\alpha$ -dihydroNET and its tetrahydro reduced metabolites.

The interaction of NET and its non-phenolic metabolites with ER was studied in cytosol preparations of osteoblasts, by a competitive analysis, using [ $^3$ H]-estradiol as the radioligand. The results revealed that while NET and  $5\alpha$ -NET do not interact with ER, the  $3\beta,5\alpha$ - and  $3\alpha,5\alpha$ -NET metabolites bind with high relative affinity to the ER, in a manner similar to that observed with naturally occurring estradiol.

The overall results confirm the working hypothesis, strongly suggesting that the effects of NET on bone cells are mediated by its non-phenolic reduced metabolites and their further interaction with ER.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La investigación científica así como el desarrollo tecnológico en el área biomédica en México en la última década, han contribuido a lograr un importante incremento en la esperanza de vida al nacimiento. En los años 30's del siglo XX, los mexicanos vivían un promedio de 33.9 años (INEGI, 2004), razón por la cual las enfermedades propias de la vejez no llegaron a constituir un problema de salud pública. En los últimos 50 años en México, la expectativa de vida de las mujeres se incrementó de 45 a 77.8 años (INEGI, 2004) como resultado del establecimiento y aplicación de programas de salud materno-infantil por medio de los cuales se ha logrado brindar a la mujer una mejor atención médica durante el embarazo y el puerperio, así como disminuir la tasa de mortalidad infantil, al prevenir enfermedades infecto-contagiosas mediante campañas de vacunación, higiene y nutrición. Sin embargo, como la edad (47.3 a 49 años) en que se presenta la menopausia no ha cambiado (Malacara y cols., 2002), las mujeres pasarán un período prolongado de su vida activa en esta etapa, la cual podría prolongarse por 30 años o más.

Datos estadísticos muestran que en México, la osteoporosis se presenta en una de cada tres mujeres mayores de 45 años, lo cual representa aproximadamente el 16% de la población (Murillo-Urbe y cols., 1999).

La menopausia se puede definir como el cese de la función ovárica, que se hace evidente por la interrupción natural de la menstruación. Durante esta etapa la mujer presentará cambios fisiológicos como consecuencia de una deficiente producción de hormonas esteroides sexuales, principalmente de estrógenos, que pueden derivar en diversos problemas de salud como son: trastornos del síndrome climatérico, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, tromboembolismo profundo y aumento de lípidos en sangre (Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002), así como a osteoporosis y fragilidad ósea, los cuales traen como consecuencia un incremento en el riesgo a sufrir fracturas que incapacitan a la mujer en sus actividades e incluso pueden llegar a causarle la muerte.

La osteoporosis es una situación patológica que evoluciona en forma silenciosa como resultado del desbalance entre la formación y la reabsorción o resorción ósea (Ralston, 2001; Tobias y cols., 2002), lo cual disminuye la dureza e integridad del hueso y por tanto aumenta su porosidad. Este padecimiento que se asocia en la menopausia a la falta de estrógenos, exhibe un incremento en la resorción ósea, ocasionando una pérdida acelerada de la masa del hueso y un deterioro de su microarquitectura (Nilas y Christiansen, 1987; Heaney y cols., 1978).

El recambio de hueso viejo por hueso nuevo, conocido como proceso de remodelación ósea, se lleva a cabo mediante la actividad acoplada de los osteoclastos (células degradadoras de hueso) y los osteoblastos (células formadoras de hueso), sobre una misma superficie ósea. Cada ciclo de remodelación ósea consta de dos fases: la de resorción y la de formación (Raisz, 2005). En la fase de resorción, los osteoclastos generan un microambiente ácido y liberan enzimas que degradan la matriz ósea, compuesta principalmente por colágena e hidroxapatita. Una vez que el proceso de reabsorción ha terminado los osteoclastos mueren por apoptosis. Durante la fase de formación, los osteoblastos rellenan con hueso nuevo la zona excavada por los osteoclastos, depositando nueva colágena y matriz ósea (Raisz, 2005) que posteriormente se mineraliza. Cuando existe un buen balance entre la resorción y la formación, no hay cambios en la masa del hueso, iniciándose un nuevo ciclo de remodelación en un periodo que puede ser de tres meses a dos años.

Los estrógenos, y en particular el estradiol ( $E_2$ ), juegan un papel fundamental en el mantenimiento de un buen balance entre la formación y la resorción ósea así como en la conservación de la masa del hueso (Lindsay y cols., 1976). El  $E_2$  incrementa la actividad celular osteoblástica al estimular la proliferación, diferenciación y la mineralización en el proceso de formación de hueso (Ernst y cols., 1988; Masuyama y cols., 1992; Qu y cols., 1998), a lo cual se atribuyen los beneficios del uso clínico de estrógenos naturales y sintéticos en el manejo de la osteoporosis en la mujer postmenopáusica.

El éxito logrado con el uso de estrógenos para detener la pérdida del contenido mineral, al disminuir la resorción y restaurar la formación de la masa ósea, confirma que la terapéutica a base de estrógenos es una eficiente estrategia hormonal antiresortiva (Lindsay y cols., 1976; Riis y cols., 1987; Lindsay y cols., 1990; Christiansen y Riis, 1990; Ettinger y cols., 1992; Tobias y Compston, 1999; Bjarnason y cols., 2000; Khastgir y cols., 2001; Scholes y cols., 2002). Aún cuando el mecanismo molecular a través del cual actúan los estrógenos no ha sido completamente esclarecido, éstos podrían ejercer su acción en sitios potenciales, como serían: 1) las células T, al estimular la producción de citocinas, 2) células osteoblásticas (formadoras de hueso), alterando la producción del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) o de osteoprotegerina (OPG), 3) por inhibición directa de los osteoclastos diferenciados (células degradadoras de hueso) y 4) sobre los osteoblastos o los osteocitos (células maduras derivadas de los osteoblastos), actuando directamente sobre la formación ósea, ampliando la respuesta a fuerzas mecánicas iniciadas por estas células (Raisz, 2005).

Por otra parte, el E<sub>2</sub> puede también ejercer actividad anabólica al incrementar la actividad celular de los osteoblastos para la formación de la masa ósea. Los resultados de estudios *in vitro*, utilizando líneas celulares con fenotipo osteoblástico (Masuyama y cols., 1992; Ikegami y cols., 1994; Majeska y cols., 1994) o cultivos primarios de osteoblastos humanos y de roedores (Ernst y cols., 1988; Scheven y cols., 1992; Qu y cols., 1998), han demostrado que el E<sub>2</sub> es capaz de estimular la proliferación celular (Ernst y cols., 1988; Masuyama y cols., 1992; Majeska y cols., 1994; Ikegami y cols., 1994), la síntesis de proteínas y de enzimas de la matriz ósea (Scheven y cols., 1992) e inducir el proceso de mineralización (Qu y cols., 1998), a través de un mecanismo de acción que implica la interacción del estradiol con los subtipos  $\alpha$  y  $\beta$  del receptor intracelular de estrógenos, identificados en osteosarcomas y osteoblastos humanos y de rata (Eriksen y cols., 1988; Komm y cols., 1988; Arts y cols., 1997; Onoe y cols., 1997).

Un mayor sustento al efecto anabólico del E<sub>2</sub> en el hueso, lo aportan los resultados de estudios *in vivo* realizados en ratas ovariectomizadas, en las que la administración de altas dosis de E<sub>2</sub> fue capaz de inducir un notorio incremento de la masa ósea (Chow y cols., 1992; Tobias y Compston, 1999). Por otra parte, el uso en mujeres postmenopáusicas, de elevadas dosis de estrógenos, como terapia de reemplazo hormonal, indujo también un importante incremento de la masa ósea (Vedi y cols., 1996; Vedi y Compston, 1996; Tobias y Compston, 1999; Khastgir y cols., 2001).

Si bien, el papel de los estrógenos, tanto en modelos experimentales en animales, como en mujeres postmenopáusicas está perfectamente estudiado (Chow y cols., 1992; Khastgir y cols., 2001), la acción de la progesterona sobre el hueso ha sido motivo de gran controversia. Aún cuando está bien demostrado que el osteoblasto posee las dos isoformas del receptor nuclear de progesterona, las cuales son dependientes de estrógenos, (Mac Namara y Loughrey, 1998; Rickard y cols., 2002), los resultados obtenidos en diversos estudios son contradictorios. Mientras algunos experimentos realizados, tanto *in vivo* como *in vitro*, han demostrado que la progesterona estimula la formación de hueso (Barbagallo y cols., 1989; Scheven y cols., 1992; Tremollieres y cols., 1992), otros reportan que este esteroide, a dosis relativamente altas, inhibe la formación de hueso en cultivos de calvaria de rata fetal (Canalis y Raisz, 1978). Algunos grupos de investigación han reportado que en el modelo de rata ovariectomizada, la progesterona fue incapaz de prevenir la pérdida de masa ósea (Kalu y cols., 1991; Roux y cols., 1996; Yamamoto y cols., 1998). En estudios clínicos, realizados en mujeres postmenopáusicas, se demostró que la progesterona no exhibió ningún efecto sobre la pérdida del contenido mineral del hueso (Riis y cols., 1987; Ikram y cols., 1999).

Aún cuando los efectos benéficos del uso de estrógenos en el tratamiento de la osteoporosis parecen incuestionables, la terapia de reemplazo hormonal con estrógenos ha generado un gran debate debido a que existen datos clínicos que sugieren que su administración por periodos de tiempo prolongado, incrementa el riesgo de desarrollo de carcinoma mamario o cérvico-uterino (Jick y cols., 1979;

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, 2002). Estas observaciones han propiciado la búsqueda de otras alternativas de terapia de reemplazo hormonal, efectivas para el control y la prevención de la osteoporosis, pero sin riesgo para la salud de la mujer. Una de las estrategias terapéuticas que se ha empleado con buenos resultados es el uso de progestinas sintéticas, particularmente de las derivadas de la 19-nortestosterona como la Noretisterona (NET), una progestina ampliamente utilizada en formulaciones hormonales anticonceptivas. Un número importante de estudios clínicos ha demostrado que la administración de NET a la mujer postmenopáusica, resulta benéfica para detener la pérdida del contenido mineral e incrementar la densidad de la masa ósea (Lindsay y cols., 1978, Abdalla y cols., 1985, Christiansen y cols., 1985, Selby y cols., 1985; Christiansen y Riis, 1990; Horowitz y cols., 1993; Scopacasa y cols., 1999; Delmas y cols., 2000). Sin embargo, el mecanismo de acción a nivel molecular, por medio del cual la NET ejerce su acción sobre el hueso, no ha sido esclarecido.

## 2. ANTECEDENTES

Las progestinas sintéticas, son compuestos esteroides que poseen efectos biológicos de tipo gestacional, que son utilizados como agentes anticonceptivos por un gran número de mujeres, debido a su capacidad para bloquear la ovulación mediante un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel de hipotálamo e hipófisis, que inhibe la síntesis y secreción de las hormonas gonadotróficas. Las modificaciones estructurales en las moléculas de estos compuestos, además de que les han conferido mayor actividad gestacional, han inducido la expresión de efectos biológicos de tipo estrogénico, androgénico, glucocorticoide e incluso efectos antihormonales.

Dentro de las progestinas más empleadas en la terapia anticonceptiva y de reemplazo hormonal, se encuentran las que derivan de la 19-nortestosterona (19-nor), un esteroide relacionado estructuralmente con la testosterona, de la cual difiere por la ausencia del metilo angular en el carbono 19. En este grupo se encuentra la Noretisterona (NET), progestina con potente actividad gestacional.

La NET es la primera progestina activa por vía oral que se sintetizó en México por los investigadores Carl Djerassi, Luis E. Miramontes y George Rosenkranz, hace más de 50 años, en los laboratorios Syntex de México (Djerassi y cols., 1952) y desde entonces ha sido usada en diferentes formulaciones anticonceptivas y en la terapia de reemplazo hormonal. Esta progestina sintética, además de su efecto gestacional, es capaz de ejercer diversos efectos hormonales. Nuestro grupo de investigación ha demostrado en estudios *in vitro*, que la NET se biotransforma en órganos hormono-sensibles y hormono-dependientes a metabolitos neutros reducidos en el anillo A de la molécula, como 5 $\alpha$ -dihidroNET (5 $\alpha$ -NET), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro-NET (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET) y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidroNET (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET) (Larrea y cols., 1987), los cuales interactúan de manera específica con los diferentes receptores

intracelulares de hormonas esteroides sexuales (Chávez y cols., 1985) e inducen diversos efectos biológicos.

Los estudios de interacción de los metabolitos  $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -NET con los receptores intracelulares de esteroides muestran que el derivado  $3\beta,5\alpha$ -NET, y en menor proporción el  $3\alpha,5\alpha$ -NET, interactúan con alta afinidad con los receptores intracelulares de estrógenos (Chávez y cols., 1985; Larrea y cols., 2001). La expresión de sus efectos biológicos de tipo estrogénico se demostró por su capacidad para inducir receptores de progesterona estrógeno-dependientes en la hipófisis anterior de ratas hembras castradas (Vilchis y cols., 1986), por el hecho de restablecer la conducta sexual masculina en las ratas macho adultas castradas, al ser administrados en combinación con dihidrotestosterona (Moralí y cols., 1990) y por la capacidad de transactivación de genes estrógeno-dependientes, en sistemas de expresión celular (Larrea y cols., 2001).

Los resultados de diversos estudios clínicos, demostraron que la administración de NET a mujeres postmenopáusicas fue capaz de estimular el aumento de la densidad de la masa ósea, disminuyendo el recambio del hueso (Abdalla y cols., 1985; Christiansen y cols., 1985; Selby y cols., 1985; Horowitz y cols., 1993; Scopacasa y cols., 1999; Delmas y cols., 2000). Aún cuando el mecanismo de acción por el cual NET ejerce sus efectos sobre el hueso no se ha esclarecido, es muy posible que sus efectos para estimular la masa ósea sean de tipo estrogénico, inducidos por sus derivados no aromáticos, producto de la conversión metabólica después de su administración, ya que la NET *per se* es incapaz de unirse a los receptores intracelulares de estrógenos (Chávez y cols., 1985), y por su estructura química (19-nor) no puede ser aromatizada enzimáticamente (Gual y cols., 1962; Breuer, 1970).

Recientemente, nuestro grupo de investigación se interesó en estudiar los efectos de concentraciones crecientes de  $E_2$ ,  $P_4$ , NET y sus derivados reducidos en el anillo A, sobre la proliferación, diferenciación y mineralización de osteoblastos de calvaria de rata recién nacida, mantenidos en cultivo. Los resultados obtenidos

demuestran que el E<sub>2</sub> fue el esteroide de mayor actividad sobre los parámetros estudiados, a diferencia de la P<sub>4</sub> que fue completamente inactiva y que la NET, únicamente a las concentraciones más altas y por tiempos prolongados, indujo efectos débiles sobre los osteoblastos. Por otra parte, los metabolitos tetrahydro reducidos de NET, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET, aún a las más bajas concentraciones y desde los tiempos más cortos, son capaces de incrementar significativamente la actividad osteoblástica en forma semejante a como lo hace el estradiol, solo que con menor potencia (Enríquez y cols., 2006). Estos resultados sugieren fuertemente que los efectos benéficos de NET en el tratamiento de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas, no son efectos progestacionales, sino efectos de tipo estrogénico, mediados por los metabolitos tetrahydro reducidos, producto de su conversión metabólica.

Aún cuando algunos estudios bioquímicos en osteoblastos han demostrado la presencia de actividad de 5 $\alpha$ -esteroide reductasa (Issa y cols 2002) y 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Víttek y cols., 1974), así como la presencia de receptores intracelulares de estrógenos, la capacidad enzimática de los osteoblastos para reconocer y utilizar a la molécula de NET como substrato y biotransformarla a sus derivados 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahydro reducidos, así como la interacción de estos metabolitos con los receptores de estrógenos presentes en el osteoblasto, no se ha demostrado.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El uso de Noretisterona, en la terapia de reemplazo hormonal, para el control y la prevención de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas ha resultado ser una estrategia exitosa. Sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción por el cual esta progestina ejerce sus efectos sobre la función de los osteoblastos. Aún cuando los resultados de estudios realizados por nuestro grupo de investigación sugieren que la Noretisterona ejerce sus efectos sobre la actividad osteoblástica a través de sus derivados reducidos en el anillo A, es relevante demostrar la capacidad enzimática del osteoblasto para reconocer y utilizar como substrato a la Noretisterona y biotransformarla a sus derivados  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro, así como la interacción de estos metabolitos con los receptores intracelulares de estrógenos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 GENERAL

Demostrar la capacidad enzimática de los osteoblastos de calvaria de la rata recién nacida mantenidos en cultivo, para biotransformar Noretisterona marcada isotópicamente, a sus metabolitos reducidos en el anillo A, así como determinar en el citosol de los osteoblastos, la interacción de estos metabolitos con los receptores intracelulares de estrógenos.

### 4.2 PARTICULARES

1.- Estudiar el metabolismo *in vitro* de Noretisterona-[<sup>3</sup>H], en cultivos primarios de células osteoblásticas, empleando el método de dilución isotópica inversa.

2.- Evaluar la interacción de Noretisterona y de sus derivados reducidos en el anillo A, con los receptores intracelulares de estrógenos de los osteoblastos, mediante análisis de competencia, utilizando Estradiol-[<sup>3</sup>H] como radioligando.

## 5. HIPÓTESIS

La célula osteoblástica de la calvaria de la rata recién nacida, posee las enzimas 5 $\alpha$ -esteroide reductasa, 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, capaces de reconocer y utilizar a la Noretisterona como substrato y bioconvertirla a sus metabolitos 5 $\alpha$ -dihidro Noretisterona, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro Noretisterona y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro Noretisterona, los cuales, al interactuar con los receptores intracelulares de estrógenos, serían los responsables de los efectos biológicos de tipo estrogénico, que inducen la formación de hueso.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Material Biológico

Las ratas hembra de la cepa Wistar de 1 a 3 días de edad, fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todos los procedimientos en los que se emplearon animales de laboratorio se realizaron de acuerdo a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana, de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y la aprobación del Comité de Ética para la Investigación del mismo Instituto.

### 6.2 Material Radiactivo

La Noretisterona-6,7- $^3\text{H}$  (NET- $^3\text{H}$ ), con actividad específica (a.e.) de 55 Ci/mmola, se obtuvo de Schering AG, (Berlín, Alemania) y la Testosterona-4- $^{14}\text{C}$  (T- $^{14}\text{C}$ ) con a.e. de 50 mCi/mmola, se obtuvo de American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO). El Estradiol-2,4,6,7,16,17- $^3\text{H}$  ( $\text{E}_2$ - $^3\text{H}$ ), con a. e. 157Ci/mmola, se obtuvo de Amersham Biosciences, (Inglaterra). La pureza radioquímica de los esteroides radiactivos se estableció por cromatografía de partición en papel, en dos sistemas de diferente polaridad y por cristalizaciones sucesivas de alícuotas, adicionadas del correspondiente esteroide radioinerte, hasta la obtención de la actividad específica constante.

### 6.3 Esteroides Radioinertes

Los esteroides radioinertes Estradiol ( $\text{E}_2$ ), Testosterona (T),  $5\alpha$ -Dihidrotestosterona ( $5\alpha$ -DHT),  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro T ( $3\alpha,5\alpha$ -T) y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro T ( $3\beta,5\alpha$ -T) se adquirieron en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). La NET fue proporcionada amablemente por Schering Mexicana S. A. de C. V. (Ciudad de México). La pureza química de cada uno de los esteroides se determinó, después

de cristalizaciones sucesivas en disolventes apropiados, por medio de su movilidad cromatográfica en placa fina y por sus constantes fisicoquímicas como el punto de fusión, el análisis del espectro de infrarrojo y por resonancia magnética nuclear. El Finasteride, inhibidor esteroide de la 5 $\alpha$ -esteroide reductasa, fue obtenido de Merck Sharp & Domhe, México.

Los derivados reducidos de NET: 5 $\alpha$ -DihidroNET (5 $\alpha$ -NET), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidroNET (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET) y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidroNET (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET) no se encuentran disponibles en forma comercial por lo se sintetizaron en la Facultad de Química de la UNAM, en colaboración con el Dr. Gustavo A. García de la Mora, de acuerdo al método de Bowers y cols. (1958), modificado por García de la Mora (1985). El derivado 5 $\alpha$ -dihidroNET se sintetizó a partir de la reducción de NET con una mezcla de litio y amoníaco de acuerdo al método descrito por Bowers y cols. (1958). Los derivados 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ - y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro de NET se obtuvieron por la reducción del 5 $\alpha$ -dihidroNET con borohidruro de sodio, obteniendo como producto final una mezcla de ambos epímeros, los cuales se separaron por cromatografía de flash, en un sistema de acetato de etilo:hexano (3:7 v/v). La pureza química de los derivados de NET, fue determinada después de su cristalización, por el punto de fusión, comportamiento cromatográfico en HPLC y por resonancia magnética nuclear. Las constantes físicas y espectroscópicas de los derivados reducidos de la NET fueron las siguientes:

5 $\alpha$ -NET [p.f. = 225°C;  $[\alpha]_D$  (CHCl<sub>3</sub>)= -5.5°], H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 2.57 ppm (s1H) y 0.9 ppm ( $\delta$ , 3H).

3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET [p. f.= 191°C;  $[\alpha]_D$  (CHCl<sub>3</sub>)= -25°], H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 3.45 ppm (bm, 1H, C3-H); 2.77 ppm (s, 1H); 0.82 ppm (s, 3H).

3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET [p. f.= 117 °C;  $[\alpha]_D$  (CHCl<sub>3</sub>)= -1.56 °], H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 3.98 ppm (m, 1H, CH<sub>3</sub>); 2.6 ppm (s, 1H); 0.88 ppm (s, 3H).

#### 6.4 Medio de Incubación

El medio de incubación DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco Life Technologies NY, EUA), libre de rojo de fenol, se adicionó con 3.7 g de bicarbonato de sodio, se ajustó el pH a 7.4, se esterilizó por filtración en un dispositivo de filtrado con poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Corning, NY, EUA) y se mantuvo a 4° C hasta el inicio del cultivo de los osteoblastos. Al tiempo de realizar la incubación se le agregaron aminoácidos no esenciales a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , piruvato de sodio a 100  $\mu\text{M}$  y una solución que contiene antibióticos y un agente antimicótico (100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycin y 250 ng/ml de anfotericina B) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) así como suero de bovino fetal (SBFC) al 10%, previamente tratado con una suspensión de 2.5 g de carbón activado / 0.25 g de dextrán T-70, para adsorber los esteroides endógenos.

#### 6.5 Colagenasa tipo II

La colagenasa tipo II (Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) se preparó al 0.3 % en DMEM, se esterilizó por filtración sobre una membrana con poro de 0.22  $\mu\text{m}$  y se almacenó en congelación hasta el momento de realizar la digestión enzimática de los parietales de las ratas para el aislamiento de los osteoblastos.

#### 6.6. Obtención y Cultivo Primario de Osteoblastos

Las ratas hembras de la cepa Wistar se decapitaron bajo condiciones asépticas, se disecaron cuidadosamente los parietales que se limpiaron perfectamente para eliminar sangre y tejidos blandos y se seccionaron en pequeños fragmentos de aproximadamente 1  $\text{mm}^2$  para proceder al aislamiento de los osteoblastos, mediante el método descrito por Wong y Cohn, (1974). Brevemente: los fragmentos de tejido óseo se incubaron en una solución al 0.3% de colagenasa tipo II, durante 10 minutos a 37°C en un incubador Napco®, modelo 4100 con ambiente controlado, con una atmósfera húmeda de 5% de  $\text{CO}_2$  en aire. Al

finalizar el periodo de incubación, las células disgregadas y suspendidas en la solución de colagenasa, se retiraron cuidadosamente para ser descartadas por su contenido predominante de fibroblastos. Los fragmentos de los parietales nuevamente se incubaron en la solución de colagenasa durante 30 minutos a 37°C, con agitaciones suaves cada cinco minutos y las células aisladas de esta segunda digestión enzimática se transfirieron a un tubo cónico estéril. El procedimiento de digestión enzimática de los fragmentos de los parietales se repitió cuatro veces consecutivas. La suspensión de células resultante de la 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 5<sup>a</sup> digestión se trató con un volumen igual de DMEM suplementado con 10% de SBF para inactivar a la colagenasa. Las suspensión de las células se centrifugó a 286 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante (colagenasa inactivada) se desechó. El botón celular formado se resuspendió en un volumen adecuado de DMEM suplementado con 10% de SBF, aminoácidos no esenciales a una concentración de 100 µM, piruvato de sodio a 100 µM y la solución acuosa que contenía la mezcla de antibióticos y antimicótico. El fenotipo de estas células fue previamente determinado por nuestro grupo de trabajo, mediante la presencia de osteocalcina (OC) y por la actividad de fosfatasa alcalina (FA). De la suspensión celular se tomaron alícuotas de 10 µl y se depositaron en una cámara de Neubauer para determinar al microscopio el número total de células. Se sembraron  $6 \times 10^6$  células en botellas para cultivo con una superficie de 75 cm<sup>2</sup> y se mantuvieron en un incubador con atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> en aire, a 37°C, hasta alcanzar la confluencia. Posteriormente, las células se cosecharon con una solución de tripsina al 0.25% y 1 mM de EDTA, se centrifugaron a 286 g durante cinco minutos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en el medio de cultivo y se sembraron bajo las condiciones experimentales requeridas para realizar los estudios de metabolismo o de interacción con los receptores de estrógenos.

## 6.7. Estudios de Metabolismo *In Vitro*

### 6.7.1 Preparación de los Cultivos de Osteoblastos

Los osteoblastos se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células por caja de Petri de 100 mm<sup>2</sup>, en DMEM suplementado con 10% de SBF, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y la solución de antibióticos y antimicótico y se mantuvieron en el incubador durante 24 horas, en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> en aire a 37°C para permitir la adhesión celular. Al término de este período de tiempo, el medio de los cultivos de los osteoblastos se retiró y se reemplazó por DMEM suplementado con 5% de SBFC y se incubaron por 24 horas adicionales.

### 6.7.2 Incubación del Cultivo Primario de Osteoblastos con NET-[<sup>3</sup>H]

Al término de las 24 horas de incubación, el medio de los cultivos se retiró y se reemplazó por DMEM suplementado con 5% de SBFC, aminoácidos no esenciales, antibióticos y antimicótico y NET-[<sup>3</sup>H] a una concentración de 2 μM y se incubaron durante 24 y 48 horas. Como controles positivos del experimento se utilizaron cultivos de osteoblastos incubados con T-[<sup>14</sup>C] a una concentración de 2 μM, ya que la T es el sustrato natural de las enzimas 5α-esteroide reductasa y 3α- y 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasas y sirvió para validar el modelo experimental, para realizar los experimentos del metabolismo de NET-[<sup>3</sup>H]. Adicionalmente se realizaron incubaciones en presencia de Finasteride, un inhibidor de la 5α-esteroide reductasa. Incubaciones de NET-[<sup>3</sup>H] y T-[<sup>14</sup>C] en ausencia de osteoblastos se emplearon como controles negativos. La determinación de proteínas se realizó en cultivos de osteoblastos mantenidos únicamente con el medio en el que se incorporaron los esteroides radiactivos, utilizando el método de Bradford (1976). La actividad enzimática de los cultivos de osteoblastos, al término de la incubación, se detuvo al colocar las cajas de cultivo sobre hielo (4°C). Los osteoblastos se desprendieron de las cajas con la ayuda de

un gendarme, se transfirieron a tubos cónicos y se procedió a la extracción de los esteroides formados.

### 6.7.3 Extracción de los Metabolitos formados durante la Incubación

Para la extracción de los metabolitos, del medio acuoso de incubación, se adicionaron a los tubos que contienen las células, 30 ml de acetato de etilo (EtOAc) saturado con agua y se agitaron vigorosamente en un vortex para lograr mecánicamente la ruptura de las células. La separación del EtOAc (fase orgánica) de la fase acuosa, se logró por centrifugación a 800 g durante 10 minutos, a 4°C. La fase orgánica se recolectó en un matraz de fondo redondo y el proceso se repitió dos veces. Las fases orgánicas recolectadas se evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio con vacío (Büchi, tipo KRvr 65/45, Suiza). Para determinar la eficiencia del proceso de extracción, los extractos orgánicos se disolvieron en metanol, se tomaron alícuotas representativas para medir el contenido de  $^3\text{H}$  ó  $^{14}\text{C}$ , en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tricab (Modelo 1900TR). La eficiencia de conteo fue de 65% para [ $^3\text{H}$ ] y de 86% para [ $^{14}\text{C}$ ] y en todas las muestras se corrigió el fenómeno de “quenching” con el método de estandarización externa.

Al extracto orgánico, se le agregaron como “carriers” (esteroides radioinertes que al incrementar la masa de los compuestos radiactivos formados, permitan su visualización por medios físicos, como la absorción de luz ultravioleta, o por la formación de complejos coloridos, con reactivos específicos), 10 µg de cada uno de los siguientes esteroides: testosterona, dihidrotestosterona,  $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro T y  $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro T para los experimentos en que se utilizó la T- $^{14}\text{C}$  como substrato, o bien 10 µg de NET,  $5\alpha$ -NET,  $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -NET, para las incubaciones con NET- $^3\text{H}$ .

#### 6.7.4 Separación e Identificación de los Metabolitos

La separación, purificación e identificación de los productos de la conversión metabólica de la NET-[<sup>3</sup>H] y de T-[<sup>14</sup>C], se realizó por el método de dilución isotópica inversa (Lemus y cols., 1992), mediante la determinación de la movilidad cromatográfica en placa fina de sílica gel, en los sistemas cloroformo/acetona 9:1 y benceno/acetato de etilo 2:1. Los esteroides utilizados como referencias, se localizaron en la placa con el reactivo compuesto por 100 ml de ácido acético glacial, 2 ml de ácido sulfúrico concentrado y 1 ml de *p*-anisaldehído y exposición a calor a 150°C durante 3 minutos. La detección de los esteroides marcados con <sup>14</sup>C en las placas de cromatografía se realizó mediante un analizador de imágenes Packard Instant Imager (Packard Downers Grove, IL, EUA), mientras que los marcados con <sup>3</sup>H se ubicaron de acuerdo a la movilidad de los esteroides de referencia. Las zonas del cromatograma, correspondientes a cada uno de los esteroides formados, se cortaron y eluyeron con metanol en tubos especiales de vidrio con bajo contenido de <sup>40</sup>K, se les adicionó la solución de centelleo preparada con 4 g de 2,5-difenil oxazol (PPO) y 100 mg de 1,4-bis-2(4-metil-5-fenil-oxazolil) benceno (dimetil POPOP) por litro de tolueno de grado de centelleo y se contaron en el espectrómetro de centelleo líquido.

La pureza radioquímica de los metabolitos formados se determinó por cristalizaciones en diferentes solventes orgánicos, hasta que la a.e. permaneció constante en por lo menos dos cristalizaciones sucesivas y fue idéntica en cristales y aguas madres.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados de la bioconversión enzimática se expresan como el porcentaje de bioconversión de NET y T, en sus metabolitos reducidos en el anillo A.

## 6.8 Interacción de NET y sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos con los receptores intracelulares de estrógenos

### 6.8.1 Obtención del citosol de osteoblastos

Para la obtención del citosol (fracción soluble) de los osteoblastos, se emplearon 1 197 millones de células. A los cultivos de osteoblastos se les retiró el medio y se reemplazó por medio nuevo suplementado con 10% de SBF previamente tratado con una suspensión de carbón activado y dextrán T-70 para adsorber los esteroides endógenos (SBFC) y se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> en aire, durante 24 horas. Al término del tiempo, el medio se reemplazó con DMEM suplementado con 5% de SBFC y se incubaron por 24 horas más. Tres horas antes de obtener el citosol de los osteoblastos, al cultivo se le adicionó DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales a la concentración de 100  $\mu$ M, piruvato de sodio a 100  $\mu$ M y la solución acuosa de antibióticos y antimicótico. Transcurrido este período, las células se cosecharon con una solución de tripsina al 0.25% y EDTA 1 mM, se centrifugaron a 286 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en un volumen adecuado de buffer TDELM, constituido por buffer Tris-HCl a la concentración de 20 mM y pH de 7.4, al que se le adicionó EDTA 1.5 mM, ditioneitol 0.25 mM, molibdato de sodio 10 mM y 10 mg/ml de leupeptina y se sonicaron durante 2:30 minutos a intervalos de, 30 segundos de sonicación por 30 segundos de reposo, en hielo. Posteriormente, el lisado celular se ultracentrifugó a 160 070 g en una ultracentrifuga Beckman, modelo XL-90 (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA) durante una hora a 4°C, empleando un rotor Beckman SW 40 Ti. El citosol (sobrenadante) obtenido después de la ultracentrifugación contiene los receptores de estrógenos con los que se realizaron los estudios. Se tomaron alícuotas del citosol para determinar el contenido de proteínas por el método de Bradford (1976).

### 6.8.2 Curva de Saturación

Las características de unión al equilibrio del  $E_2$ - $[^3H]$  (radioligando específico) a los receptores intracelulares de estrógenos del citosol de osteoblastos se verificaron por medio de una curva de saturación.

Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l citosol con una concentración de proteínas de 160  $\mu$ g y se incubaron durante 18 horas a 4°C, con  $E_2$ - $[^3H]$  a una concentración de 1.0 nM en presencia de concentraciones crecientes de estradiol (1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 nM) en un volumen final de incubación de 1 ml. Al término de la incubación, el complejo estradiol-receptor ( $E_2$ -RE) se separó del estradiol libre ( $E_2$ ) con una suspensión de carbón activado y dextrán T-70 en buffer TEDLM (800  $\mu$ l / tubo), con agitación continua durante un minuto, a 4°C y centrifugación a 800 g por 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante obtenido, que contiene el  $E_2$ -RE, se tomaron alícuotas para determinar el contenido de  $[^3H]$  en el espectrómetro de centelleo líquido, empleando Aqueous Counting Scitillant® (Amersham Corporation, Arlington Heights, IL USA) como solución de centelleo. La corrección del factor del “quenching” se realizó automáticamente con un estándar externo. La unión total del  $E_2$ - $[^3H]$  unido al receptor, expresada en nmolas/ml, se calculó con base a la actividad específica del radioligando.

### 6.8.3 Determinación de la constante aparente de disociación ( $K_d$ ) y del número de sitios de unión (NSU) de los receptores intracelulares de estrógenos del citosol de osteoblastos

La  $K_d$  y el NSU se obtuvieron al representar en la forma descrita por Scatchard (1949), los resultados obtenidos de la curva de saturación. La gráfica de 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 el modelo de “ligando-receptor” empleado, existen otras proteínas que pueden unir en forma no específica grandes concentraciones del

ligando, la manera de determinar 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 nmolas/mg de proteína presente en las preparaciones de citosol del osteoblasto 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.

#### *6.8.4 Análisis de competencia de NET y metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos, por los sitios de unión de los receptores de estrógenos unidos a E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H]*

La capacidad de la Noretisterona y de sus metabolitos reducidos en el anillo A, para unirse a los receptores de estrógenos, se determinó mediante competencia por los sitios de unión del receptor de estrógenos del citosol de los cultivos primarios de osteoblastos, utilizando E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] como radioligando específico.

Se incubaron en tubos de vidrio, alícuotas de 100  $\mu$ l del citosol de los osteoblastos con un contenido de proteína de 160  $\mu$ g y E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] a la concentración de 0.25 nM, a 4°C durante 18 horas, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de 0.25, 0.5, 0.75, y 1.0 nM de los esteroides radioinertes: estradiol (E<sub>2</sub>), Noretisterona (NET), 5 $\alpha$ -dihidro noretisterona (5 $\alpha$ -NET), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro noretisterona (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET), 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro noretisterona (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET) y Dexametasona (Dmx). Al término de la incubación, la separación de los esteroides unidos a los receptores de estrógenos, de aquellos que no se unieron, se realizó por adsorción con la suspensión de carbón/dextrán, con agitación

suave durante un minuto, a 4°C. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos. Al término de la centrifugación y para determinar el contenido de [<sup>3</sup>H] en las muestras, se tomaron alícuotas de 100 µl por triplicado del sobrenadante que contiene el E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] unido al receptor y se contaron en el espectrómetro de centelleo líquido. La cantidad de [<sup>3</sup>H], expresada en dpm, del E<sub>2</sub> radiactivo unido al receptor de estrógenos (RE) en ausencia de E<sub>2</sub> radioinerte, se consideró como el 100% de la unión. La capacidad de los derivados reducidos en el anillo A de la NET y la Dmx para competir con el E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] por los sitios de unión de los RE se estableció por la afinidad de unión relativa (AUR) y la constante de inhibición al 50% (K<sub>i50</sub>), de acuerdo a los métodos descritos por Reel y cols., 1979 y por Cheng y Prusoff, 1973, respectivamente.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Formación in vitro de metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos de NET-[<sup>3</sup>H] en osteoblastos de calvaria de rata, mantenidos en cultivo.

La capacidad de los osteoblastos aislados de la calvaria de rata recién nacida, para biotransformar NET en sus metabolitos reducidos 5 $\alpha$ -NET, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET, se estudió incubando NET-[<sup>3</sup>H] a la concentración de 2  $\mu$ M, pH de 7.4 y a 37°C, durante 24 y 48 horas.

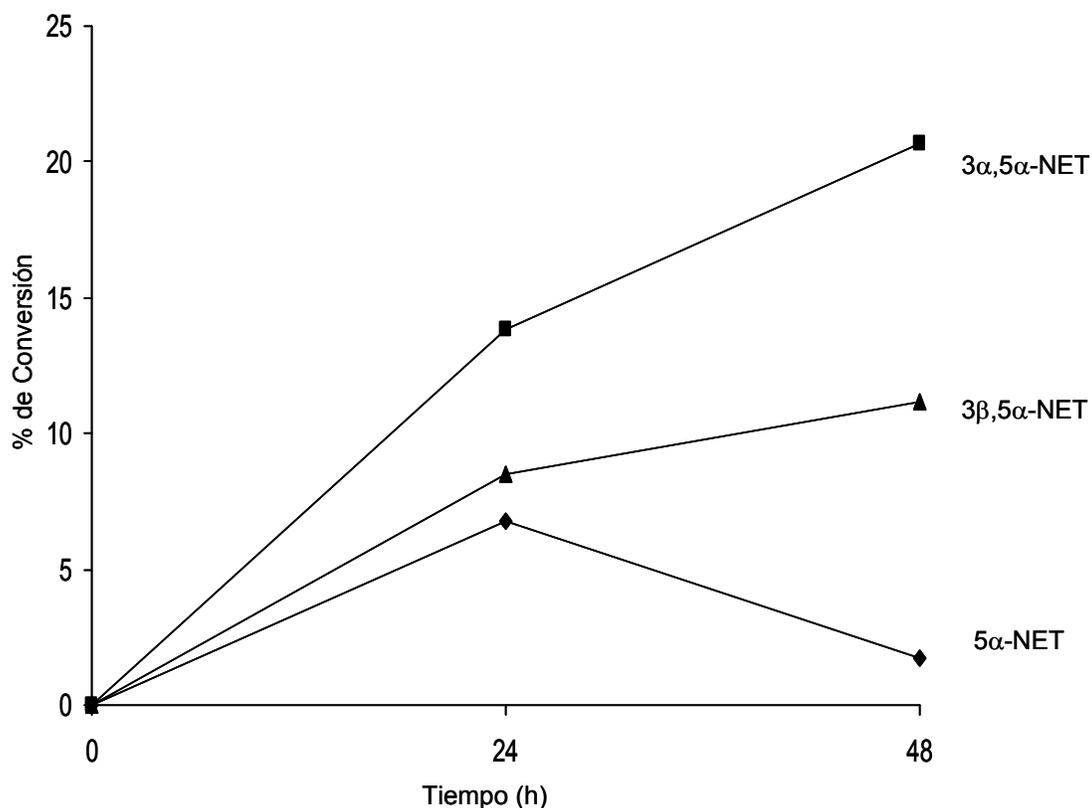
Después de la extracción repetida con EtOAc, del medio acuoso de incubación, el 96% del material radiactivo incubado se recuperó en la fracción orgánica. El análisis de la placa fina, después de la cromatografía de los extractos orgánicos de las incubaciones realizadas tanto a 24 como a 48 h, mostró la presencia de cuatro zonas radiactivas de diferente polaridad. La zona 1, que fue la de mayor polaridad, con un R<sub>F</sub> de 0.38, correspondió exactamente con el "carrier" de 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET. La zona 2 mostró movilidad cromatográfica idéntica a la del "carrier" de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET, con un R<sub>F</sub> de 0.43. La zona 3, que exhibió un R<sub>F</sub> de 0.46, fue identificada, por su comportamiento cromatográfico, como Noretisterona y representa el sustrato radiactivo no metabolizado. La zona 4 fue la zona radiactiva de menor polaridad, con un R<sub>F</sub> de 0.61 idéntico al "carrier" de 5 $\alpha$ -NET.

La determinación del contenido de [<sup>3</sup>H] en cada una de las zonas identificadas, permitió conocer la eficiencia de bioconversión de NET, a sus metabolitos 5 $\alpha$ -reducidos.

Como puede apreciarse en la Figura 1, el 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET representó el mayor producto de conversión metabólica de la NET-[<sup>3</sup>H], en los dos tiempos estudiados y su formación fue dependiente del tiempo de incubación. El porcentaje de bioconversión fue del 13.8% a las 24 h de incubación y del 20.7% cuando el tiempo se prolongó a 48 h.

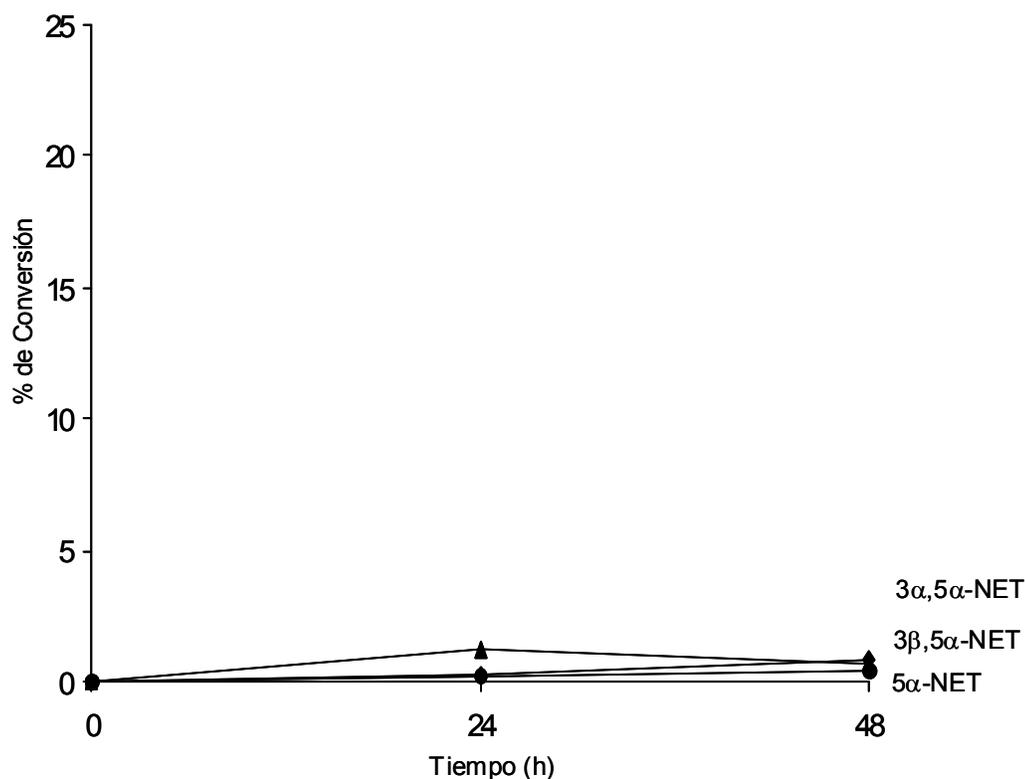
La bioconversión de NET en el tetrahidro  $3\beta,5\alpha$ -NET, al igual que el epímero  $3\alpha$ , se incrementó en función del tiempo de incubación, siendo de 8.5% a las 24 h y de 11.2% al incubar durante 48 h. Sin embargo, como puede observarse, su formación fue menor que la del  $3\alpha,5\alpha$ -NET.

La zona correspondiente a  $5\alpha$ -NET fue la que exhibió el menor contenido de [ $^3\text{H}$ ] y, a diferencia de los tetrahidos, la formación a 48 h fue menor (1.7%) que la observada a las 24 h (6.8%).



**Figura 1.** Formación de  $5\alpha$ -NET,  $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -NET, en las incubaciones de osteoblastos con NET- $[^3\text{H}]$  realizadas a diferentes tiempos. Los resultados representan el promedio de 5 experimentos realizados por triplicado.

Los resultados de los experimentos realizados en presencia de Finasteride (1mM), se muestran en la Fig. 2. La adición del Finasteride inhibió completamente la biotransformación de NET en 5 $\alpha$ -dihidroNET y consecuentemente la formación de los tetrahidros 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ - y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET.

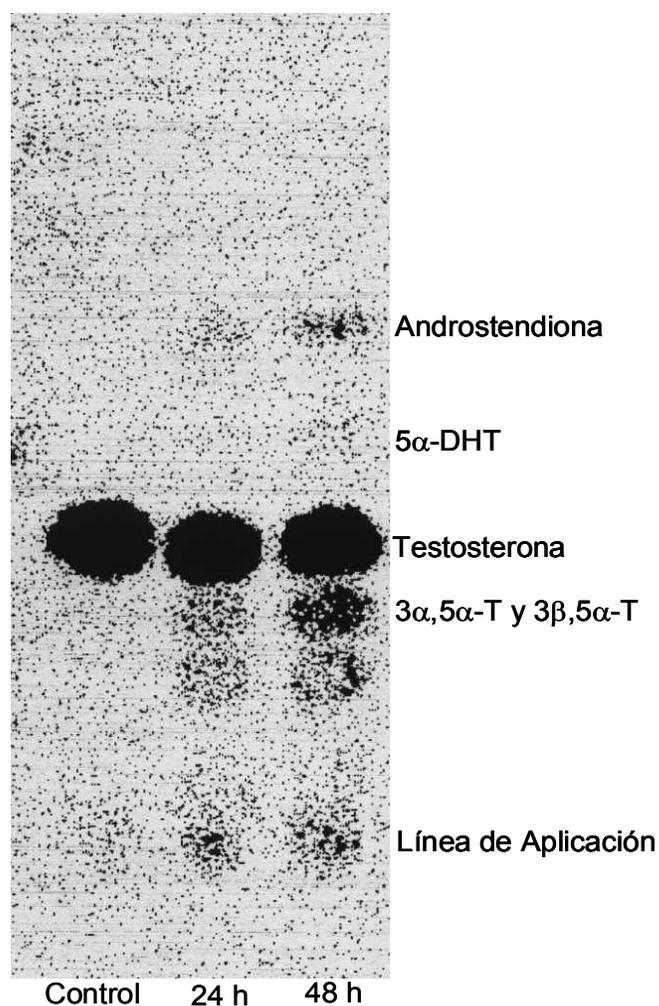


**Figura 2.** Inhibición de la formación de derivados 5 $\alpha$ -reducidos de NET por Finasteride. La formación de metabolitos de NET, reducidos en el anillo A, fue bloqueada a los dos tiempos estudiados, por la acción del Finasteride. Los resultados representan el promedio de 5 experimentos realizados por triplicado.

## 7.2 Biotransformación de Testosterona-[<sup>14</sup>C] en osteoblastos de calvaria de rata, mantenidos en cultivo.

La cromatografía de los extractos orgánicos de las incubaciones de los osteoblastos con T-[<sup>14</sup>C] mostró la presencia de cuatro zonas radiactivas con diferente movilidad cromatográfica (Fig. 3). La zona 1 ( $R_F$  0.28), que representa el mayor producto de la conversión metabólica de T, correspondió en movilidad cromatográfica a las referencias y "carriers" del 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidroT (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -T) y del

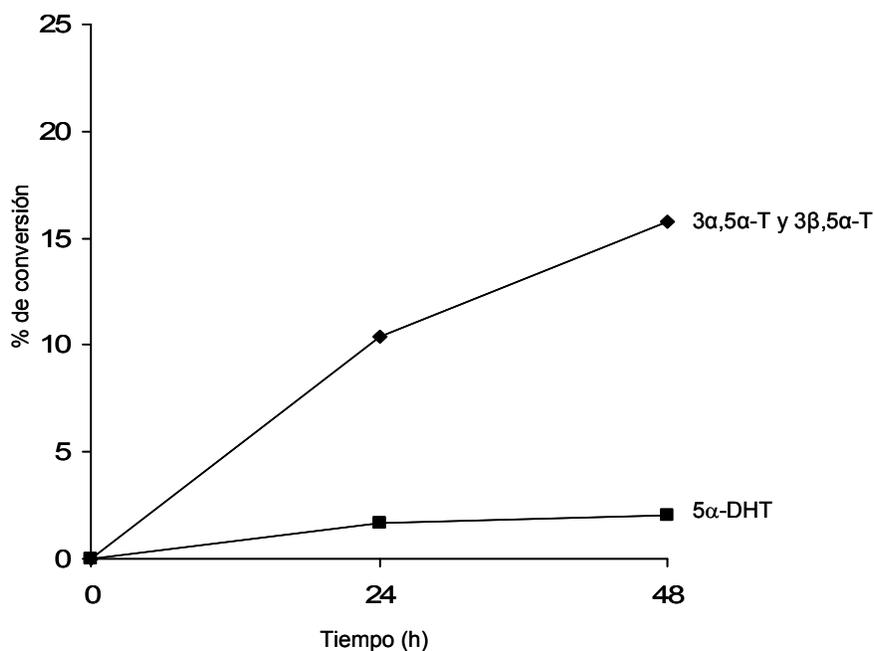
$3\beta,5\alpha$ -tetrahidroT ( $3\beta,5\alpha$ -T), los cuales no se separan cromatográficamente debido a que poseen una estructura química idéntica, difiriendo únicamente en la orientación del grupo hidroxilo del C-3. La estrategia que se siguió para establecer la cantidad formada de cada tetrahidro, fue mediante la cristalización de dos alícuotas con idéntico contenido de  $[^{14}\text{C}]$ , a las que se les agregaron 10 mg de  $3\alpha,5\alpha$ -T ó 10 mg de  $3\beta,5\alpha$ -T radioinertes. El proceso de cristalización se realizó repetidas veces hasta que la actividad específica permaneció constante en por lo menos dos cristalizaciones sucesivas y fue idéntica en cristales y aguas madre.



**Figura 3.** Perfil cromatográfico representativo, donde se observa la localización de los productos de la conversión metabólica de la T- $[^{14}\text{C}]$  en osteoblastos. Alícuotas de los extractos orgánicos fueron cromatografiados en placa fina. Las zonas radiactivas detectadas se describen de acuerdo a la polaridad creciente de su movilidad cromatográfica.

La zona 2, con movilidad cromatográfica idéntica a la T con  $R_F$  de 0.34, correspondió al substrato radiactivo no metabolizado. La zona 3, exhibió el mismo comportamiento cromatográfico que el "carrier" de  $5\alpha$ -DHT, con un  $R_F$  de 0.43, mientras que la zona 4, que fue la de menor polaridad, con un  $R_F$  de 0.49, fue identificada como androstendiona.

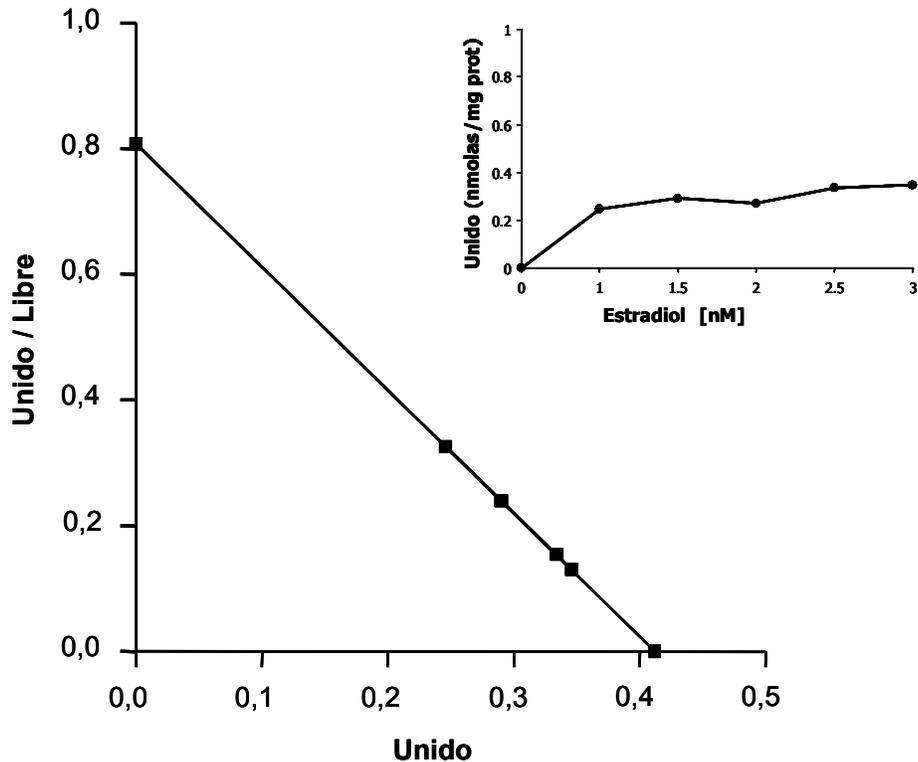
Como puede observarse en la Figura 4, la formación de  $5\alpha$ -DHT, tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación fue menor al 2%. En contraste, la biotransformación de T a los tetrahidos  $3\alpha,5\alpha$ -T y  $3\beta,5\alpha$ -T a las 24 horas de incubación fue de 11%, incrementándose a 15.8% al prolongar el tiempo de incubación a 48 horas. La proporción de formación de los tetrahidos  $3\alpha,5\alpha$  y  $3\beta,5\alpha$  fue de 1:1 de acuerdo a la pureza química obtenida después de las cristalizaciones.



**Figura 4.** Bioconversión de T-[ $^{14}$ C] en metabolitos  $5\alpha$ -reducidos, en osteoblastos, en función del tiempo de incubación. Las incubaciones fueron realizadas a 24 y 48 horas. Los mayores productos de la conversión metabólica de testosterona fueron los tetrahidos  $3\alpha,5\alpha$ - y  $3\beta,5\alpha$ -. Los resultados representan el promedio de 5 experimentos realizados por triplicado.

### 7.3 Estereoespecificidad de la unión de los derivados tetrahidro reducidos de NET, a los receptores intracelulares de estrógenos.

#### 7.3.1 Constantes de unión al equilibrio de los receptores intracelulares de estrógenos



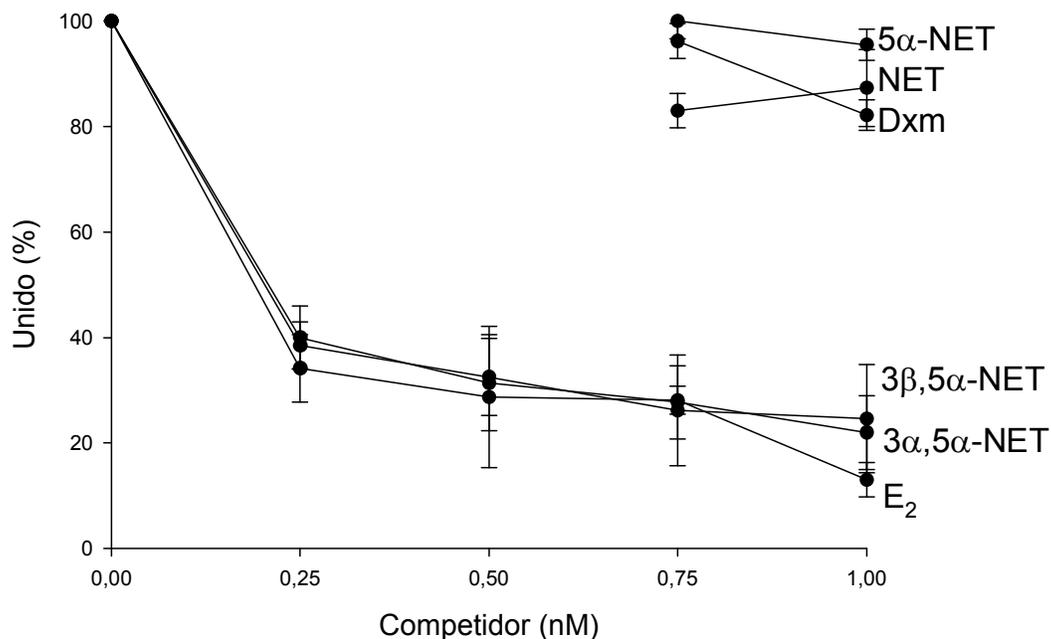
**Figura 5.** Análisis de la unión específica de  $E_2$ - $^3H$ , con los receptores de estrógenos (RE), en preparaciones de citosol de osteoblastos de calvaria de rata recién nacida. Las constantes de la unión al equilibrio del  $E_2$  con el RE se determinaron al graficar los valores de la curva de saturación a la manera de Scatchard.

La unión específica del  $E_2$ - $^3H$  a los sitios de unión de los RE del citosol de osteoblastos de calvaria de rata neonatal, se muestra en el inserto de la figura 5. Como puede observarse, la saturación del sistema se obtuvo a concentraciones de 1 – 1.5 nM del radioligando. De la representación de la curva de saturación, a la manera de Scatchard (1949) (Figura 5), se obtuvieron la constante aparente de disociación ( $K_d$ ), la cual fue de  $1.1 \times 10^{-9} M \pm 0.2$ , y el número de sitios de unión

(NSU) de 0.42 nmolas/mg de proteína, valores semejantes a los reportados en la literatura para los RE.

### 7.3.2 Estereoespecificidad de la unión de NET y sus derivados 5 $\alpha$ -reducidos, a los receptores intracelulares de estrógenos de osteoblastos de rata recién nacida.

Los resultados del análisis de competencia de NET y sus derivados 5 $\alpha$ -NET, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET por los sitios de unión de los RE, en el citosol obtenido de osteoblastos de calvaria de rata recién nacida, se muestran en la Figura 6. La unión de E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H], en ausencia de competidores, se tomó como el 100% de unión.



**Figura 6.** Análisis de competencia de NET y sus metabolitos 5 $\alpha$ -dihidro (5 $\alpha$ -NET), 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET) y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -tetrahidro (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET) por los sitios de unión de los RE, en el citosol de osteoblastos de calvaria de rata neonatal. Como controles se emplearon estradiol (E<sub>2</sub>) y Dexametasona (Dxm). Los resultados se expresan como el porcentaje de unión de E<sub>2</sub>-[<sup>3</sup>H] en presencia de concentraciones crecientes de los esteroides competidores empleados. Los resultados se expresan como el promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 experimentos.

Los resultados demostraron, como era de esperarse, que el E<sub>2</sub> radioinerte utilizado como control positivo, fue el mayor competidor por los sitios de unión de los RE. La NET y su derivado 5 $\alpha$ -NET, así como la Dxm, fueron incapaces de interactuar con el RE, aún a las concentraciones más altas (1.0 nM).

El hallazgo de mayor relevancia fue sin duda la demostración de que tanto el 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET, así como el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET, fueron capaces de competir con el E<sub>2</sub> por los sitios de unión del receptor de estrógenos, mostrando una alta afinidad de unión relativa (AUR) semejante a la del E<sub>2</sub>; sin embargo, el 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET fue sensiblemente mejor competidor que su epímero 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET. La AUR y la constante de inhibición al 50% (K<sub>i50</sub>), se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Afinidad de unión relativa (AUR) y constante de inhibición (K<sub>i</sub>) de esteroides naturales y sintéticos.

Esteroides Competidores	AUR (%) <sup>a</sup>	K <sub>i</sub> 50%[nM] <sup>b</sup>
E <sub>2</sub>	100	0.15
NET	---	---
5 $\alpha$ -NET	---	---
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET	90	0.17
3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET	95	0.16
Dxm	---	---

a La AUR fue calculada de acuerdo al procedimiento descrito por Reel y colaboradores (1979).

b La K<sub>i</sub> se determinó por el método descrito por Cheng y Prusoff (1973).

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran claramente que células osteoblásticas mantenidas en cultivo, obtenidas de la calvaria de ratas recién nacidas, biotransforman eficientemente a la NET, una progestina sintética de la serie 19-nor, ampliamente utilizada en formulaciones anticonceptivas y de terapia de reemplazo hormonal, a sus metabolitos tetrahidro reducidos en el anillo A, los cuales interactúan con una alta afinidad de unión relativa con los receptores intracelulares de estrógenos de los osteoblastos.

En efecto, la incubación *in vitro* de NET-[<sup>3</sup>H] con osteoblastos de rata, resultó a las 48 horas, en la formación de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET y 3 $\beta$ .5 $\alpha$ -NET, con un porcentaje de bioconversión un poco mayor al 31%, y de 5 $\alpha$ -dihidro NET, en menor proporción, indicando una gran actividad de 5 $\alpha$ -esteroide reductasas y de dos enzimas de la familia de las aldo-ceto reductasas, la 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Jez y cols., 1997). La gran biotransformación de NET a sus dos derivados tetrahidro reducidos sugiere fuertemente que la 5 $\alpha$ -NET es un intermediario obligado para la biosíntesis de los tetrahidros, lo cual se demostró por la inhibición completa de la formación de 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -NET y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -NET inducida por finasteride, un inhibidor selectivo de las 5 $\alpha$ -esteroide reductasas. Esta observación apoya el concepto que la formación de los tetrahidro derivados de NET requiere de la 5 $\alpha$ -reducción enzimática (unión de tipo *trans* entre los anillos A y B), como un primer paso metabólico. La presencia de los sistemas enzimáticos, capaces de biotransformar a la NET en sus metabolitos reducidos en el anillo A, en los osteoblastos de la calvaria de ratas recién nacidas, se confirmó adicionalmente con el estudio del metabolismo de un andrógeno, la testosterona, que es el substrato natural de estas enzimas. La incubación de cultivos de osteoblastos con testosterona-[<sup>14</sup>C], a diferente pH (7.4 y 5.2), resultó a las 48 horas, en la formación de 5 $\alpha$ -DHT, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -androstadiol y 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -androstadiol, demostrando la actividad de

5 $\alpha$ -reductasas tipos 1 y 2 y de 3 $\alpha$ - y 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas. La adición de finasteride a las incubaciones, inhibió completamente la formación de 5 $\alpha$ -DHT y consecuentemente, la formación de androstandioles. El hallazgo más relevante del estudio fue la demostración, por vez primera, en osteoblastos de rata, de la actividad de la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que cataliza la formación de derivados 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ , tanto de NET como de testosterona. En estudios previos, en los cuales se utilizó testosterona como sustrato, se había demostrado la formación de 5 $\alpha$ -DHT y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -androstandiol en tejido óseo de rata adulta (Vittek y cols., 1974) y en osteoblastos y líneas celulares de humanos (Schweikert y cols., 1980; Bruch y cols., 1992; Shimodaira y cols., 1996). La expresión transcripcional de los genes que codifican las 5 $\alpha$ -reductasas 1 y 2 en osteoblastos humanos, también ha sido demostrada (Issa y cols., 2002). Recientemente, Steckelbroeck y cols., 2004, han delineado la relevancia de la 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa citosólica en un número importante de eventos biológicos.

Diversos estudios clínicos han demostrado que la administración de NET a mujeres postmenopáusicas, previene la pérdida mineral del hueso y reduce el proceso de resorción ósea (Abdalla y cols., 1985; Christiansen y Riis, 1990; Horowitz y cols., 1993), y también previene la pérdida ósea en mujeres jóvenes tratadas con agonistas de la LH-RH (Riis y cols., 1987).

Los mecanismos por los cuales NET ejerce efectos de tipo estrogénico no han sido dilucidados, particularmente debido a que esta progestina 19-nor no interacciona con los receptores de estrógenos (Chávez y cols., 1985; Santillán y cols., 2001) y no puede ser aromatizada enzimáticamente (Gual y cols. 1962). Sin embargo, en virtud de que diversos estudios realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que los metabolitos tetrahydro reducidos de varias progestinas sintéticas con estructura 19-nor, pueden ejercer efectos de tipo estrogénico (Vilchis y cols., 1986; Morali y cols., 1990; Santillán y cols. 2001), fue de interés examinar la interacción de NET y sus

---

---

metabolitos  $5\alpha$ -reducidos, con los receptores intracelulares de estrógenos de osteoblastos de la calvaria de ratas recién nacidas, a través de un estudio de competencia. Los resultados obtenidos de las curvas de saturación, realizadas en el citosol de osteoblastos, como fuente del receptor de estrógenos, e incubadas con concentraciones crecientes de estradiol- $^3\text{H}$ , representadas a la manera de Scatchard, demostraron que las constantes de equilibrio, como la  $K_d$  y el número de sitios de unión, fueron similares a las descritas en osteoblastos humanos y líneas osteoblásticas de osteosarcoma de humano y de rata (Komm y cols., 1988; Eriksen y cols., 1988; Gray, 1989), validando el modelo experimental.

Los resultados del estudio de competencia revelaron que NET y  $5\alpha$ -NET no compiten con el estradiol- $^3\text{H}$  por los sitios de unión de los receptores de estrógenos en los osteoblastos de rata, mientras que los metabolitos  $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -NET, interactúan con los receptores de estrógenos con una afinidad de unión relativa y una constante de inhibición del todo similares a las observadas con el estradiol natural. Este sorprendente hallazgo de la gran capacidad intrínseca de unión de los metabolitos tetrahydro reducidos de NET con los receptores de estrógenos de los osteoblastos, no descrita previamente en otros tejidos o líneas celulares, está en línea con los datos recientemente informados por nuestro grupo de investigación (Enríquez y cols. 2007 en prensa) de que los efectos de algunas progestinas sintéticas 19-nor, sobre los procesos de proliferación y diferenciación celular, incluyendo la mineralización en osteoblastos, son mediados por sus metabolitos no fenólicos, que poseen la capacidad de transactivar genes estrógeno dependientes (Larrea y cols., 2001; García-Becerra y cols., 2002). En conjunto, todos los resultados obtenidos en este estudio, confirman la hipótesis planteada y muestran un panorama de oportunidades en investigación y diseño de nuevas estrategias farmacológicas en la terapia de reemplazo hormonal en la postmenopausia.

## 9. CONCLUSIONES

El análisis integral de los resultados obtenidos en las diversas fases del estudio, permite derivar las siguientes conclusiones:

1. Los osteoblastos de rata poseen los sistemas enzimáticos requeridos para la biotransformación de NET, una progestina sintética 19-nor, a dos metabolitos tetrahidro reducidos, el  $3\alpha,5\alpha$ -NET y el  $3\beta,5\alpha$ -NET.
2. El metabolismo de testosterona en los osteoblastos permitió validar el modelo experimental utilizado y confirmó los datos obtenidos con NET.
3. Los metabolitos  $3\alpha,5\alpha$ -NET y  $3\beta,5\alpha$ -NET interactúan con los receptores de estrógenos de los osteoblastos de rata, con una afinidad de unión relativa similar a la observada con estradiol.
4. Los resultados del estudio, en conjunto con informes recientes de nuestro laboratorio, demuestran que los efectos benéficos de la administración de NET sobre la remodelación ósea en mujeres postmenopáusicas, son mediados por sus metabolitos no fenólicos, reducidos en el anillo A.
5. Los hallazgos abren nuevas opciones en la investigación y desarrollo de estrategias alternas de reemplazo hormonal para el manejo de la condición peri- y postmenopáusica.

---

---

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Abdalla HI, Hart DM, Lindsay R, Leggate I, Hooke A. 1985. Prevention of bone mineral loss in postmenopausal women by norethisterone. *Obstet Gynecol.* 6:789-92.
- Arts J, Kuiper G, Janssen J, Gustafson J-A, Lowik C, Pols H, Van Leeuwen J. 1997. Differential expression of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinol.* 11:5067-5070.
- Barbagallo M, Carbognani A, Palummeri E, Chiavarini M, Pedrazzoni M, Bracchi PG, Passeri M. 1989. The comparative effect of ovarian hormone administration on bone mineral status in oophorectomized rats. *Bone.* 10:113-116.
- Bjarnason NH, Byrjalsen I, Hassager C, Haarbo J, Christiansen C. 2000. Low doses of estradiol in combination with gestodene to prevent early postmenopausal bone loss. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 3:550-560.
- Bradford MM. 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.
- Bowers A, Ringold HJ, Denot E. 1958. Steroids. Cl. 19-Nordihydrotestosterone derivatives *J. Am. Chem. Soc.* 80 : 6115-6121.
- Breuer H. 1970. Metabolism of progestagens. *Lancet* 2:615-616.
- Bruch HR, Wolf L, Budde R, Romalo G, Schweikert HU. 1992. Androstendione metabolism in cultured human osteoblast-like cells. *J. Clinical. Endocrinol. Metab.* 75:101-105.

- Canalis E, Raisz LG. 1978. Effect of sex steroids on bone collagen synthesis in vitro. *Calcif. Tiss. Res.* 25:105-110.
- 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.
- Cheng Y-C, Prusoff WH. 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.
- Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. 1992. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J. Clin. Invest.* 89:74-78. mediated pathophysiological disorders. *Drug Discov Today* 1999; 4:209-221.
- Christiansen C, Riis BJ, Nilas L, Rødbro P, Deftos L. 1985. Uncoupling of bone formation and resorption by combined oestrogen and progestagen therapy in postmenopausal osteoporosis. *Lancet.* 2:800-801.
- Christiansen C, Riis BJ. 1990.  $17\beta$ -estradiol and continuous norethisterone: a unique treatment for established osteoporosis in elderly women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71:836-841.
- Delmas PD, Confavreux E, Garnero P, Fardellone P, de Vernejoul MC, Cormier C, Arce JC. 2000. A combination of low doses of  $17\beta$ -estradiol and norethisterone acetate prevents bone loss and normalizes bone turnover in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 11:177-187.
- Délos S, Hielé C, Martin PM, Raynaud JP. 1994. Inhibition of the activity of 'basic'  $5\alpha$ -reductase (type 1) detected in DU 145 cells and expressed in insect cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 48:347-352.

- Djerassi C, Miramontes L, Rosenkranz G. 1952. Steroids. 19-nor-17-ethynyltestosterone and 19-nor-17-methyltestosterone. Meeting Am. Chem. Soc. Abstract 18J.
- Enríquez J, Lemus AE, Chimal-Monroy J, Arzate H, García GA, Herrero B, Larrea F, Pérez-Palacios G. 2006. The effects of synthetic 19-norprogestins on osteoblastic cell function are mediated by their non-phenolic reduced metabolites. *J. Endocrinol.* (En prensa)
- Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg NJ Riggs BL. 1988. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241:84-86.
- Ernst M, Schmid CH, Froesch ER. 1988. Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85:2307-2310.
- Ettinger B, Genant HK, Steiger P, Madvig P. 1992. Low-dosage micronized 17 beta-estradiol prevents bone loss in postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2:479-488.
- García-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Pérez-Palacios G, Larrea F. 2002. The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor- $\alpha$ . *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 82:333-341.
- Gual C, Morato T, Hayano M, Gut M, Dorfman RI. 1962. Biosynthesis of estrogens. *Endocrinology.* 71:920-925.
- Gray TK. 1989. Estrogens and the skeleton: cellular and molecular mechanisms. *J. Steroid. Biochem.* 34:285-287.

- Heaney RP, Recker RR, Saville PD. 1978. Menopausal changes in bone remodeling. *J. Lab. Clin. Med.* 92:964-970.
- Horowitz M, Wishart JM, Need AG, Morris HA, Nordin BEC. 1993. Effects of norethisterone on bone related biochemical variables and forearm bone mineral in post-menopausal osteoporosis. *Clinical. Endocrinol.* 39:649-655.
- Ikegami A, Inoue S, Hosoi T, Kaneki M, Mizuno Y, Akedo Y, Ouchi Y, Orimo H. 1994. Cell cycle-dependent expression of estrogen receptor and effect of estrogen on proliferation of synchronized human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinol.* 2:782-789.
- Ikram Z, Dulipsingh L, Prestwood KM. 1999. Lack of effect of short-term micronized progesterone on bone turnover in postmenopausal women. *J Women's Health & Gend Based Med.* 8:973-978.
- Issa S, Schnabel D, Feix M, Wolf L, Schaefer HE, Russell DW, Schweikert HU. 2002. Human osteoblast-like cells express predominantly steroid 5 $\alpha$ -reductase type 1. *J. Clinical. Endocrinol. Metab.* 87:5401-5407.
- Jick H, Watkins RN, Hunter JR, Dinan BJ, Madsen S, Rothman KJ, Walker AM. 1979. Replacement estrogens and endometrial cancer. *N. Engl. J. Med.* 300:218-222.
- Jez JM, Bennett MJ, Schlegel BP, Lewis M, Penning TM. 1997. Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* 326:625-636.
- Kalu DN, Salerno E, Lui CC, Echon R, Ray M, Garza-Zapata M, Hollis BW. 1991. A comparative study of the actions of tamoxifen, estrogen and progesterone in the ovariectomized rat. *Bone and Mineral.* 15:109-124.

- Khastgir G, Studd J, Holland N, Alaghband-Zadeh J, Fox S, Chow J. 2001. Anabolic effect of estrogen replacement on bone in postmenopausal women with osteoporosis: histomorphometric evidence in a longit Budinal Study. J. Clinical. Endocrinol. Metab. 86:289-295.
- Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR. 1988. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science 241:81-84.
- Larrea F, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores, Pérez-Palacios G. 1987. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroenocrine level. J. Steroid Biochem. 27:657-663.
- Larrea F, García-Becerra R, Lemus AE, García GA, Pérez-Palacios G, Jackson KJ, Coleman KM, Dace R, Smith CL, Cooney AJ. 2001. A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective Agonists for ER $\alpha$ . Endocrinology. 142:3791-3799.
- Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chávez BA, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 1992. Mechanism of action of levonorgestrel: *in vitro* metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. J. Steroid Biochem Molec. Biol. 41:881-890.
- Lemus AE, Santillán R, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 2001. *In vitro* metabolism of gestodene in target organs: formation of A-ring reduced derivatives with oestrogenic activity. Eur. J. Pharm. 417:249-256.
- Lindsay R, Aitken JM, Anderson JB, Hart DM, MacDonald EB, Clarke AC. 1976. Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. Lancet.1:1038-1041.

- Lindsay R, Hart DM, Purdie D, Ferguson MM, Clark AS, Kraszewki A. 1978. Comparative effects of oestrogens and a progestagen on bone loss in postmenopausal women. *Clin. Sci. Mol. Med.* 54:193-195.
- Lindsay R, PhD M, Tohme J. 1990. Estrogen treatment of patients with established postmenopausal osteoporosis. *Obstet. Gynecol.* 2:290-295.
- Malacara JM, Canto de Cetina T, Bassol S, Gonzalez N, Cacique L, Vera-Ramirez ML, Nava LE. 2002. 43 :11-19.
- Majeska RJ, Ryaby JT, Einhorn TA. 1994. Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. *J. Bone Joint. Surg.* 76:713-721.
- Masuyama A, Ouchi Y, Sato F, Hosoi T, Nakamura T, Orimo H. 1992. Characteristics of steroid hormone receptors in cultured MC3T3-E1 osteoblastic cells and effect of steroid hormones on cell proliferation. *Calcif Tissue Int.* 51:376-381.
- Morali G, Lemus AE, Oropeza MV, García GA, Pérez-Palacios G. 1990. Induction of male sexual behavior by norethisterone: Role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 37:477-484.
- Mac Namara P, Loughrey HC. 1998. Progesterone receptor A and B isoform expression in human osteoblasts. *Calcif. Tiss. Int.* 63:39-46.
- Murillo-Urbe A, Carranza-Lira S, Martínez-Trejo NA, Santos González JE, 1999. Epidemiologic variables in postmenopausal women. *Ginecol Obstet Mex.* 67:478-83.
- Nilas L, Christiansen C. 1987. Bone mass and its relationship to age and the menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65:697-702.

- Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T. 1997 Expression of estrogen receptor  $\beta$  in rat bone. *Endocrinol.* 10:4509-4512.
- Qu Q, Perälä-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Väänänen HK, Härkönen P. 1998. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone.* 22:201-209.
- Raisz LG. 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.* 12:3318-3325.
- Ralston SH. 2001. Genetics of osteoporosis. *Revs. Endocrin & Metab Disord.* 2:13-21.
- Reel JR, Humphrey RR, Shih, Y-H, Windsor BL, Sakowski R, Creger PL, Edgren RA. 1979. Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biological activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives. *Fert. Steril.* 31:552-561.
- Rickard DJ, Waters KM, Ruesink TJ, Khosla S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Riggs BL, Spelsberg TC. 2002. Estrogen receptor isoform-specific induction of progesterone receptors in human osteoblasts. *J Bone Miner. Res.* 17:580-592.
- Riis BJ, Thomsen K, Strøm V, Christiansen C. 1987. The effect of percutaneous estradiol and natural progesterone on postmenopausal bone loss. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 156:61-65.
- Roux C, Kolta S, Chappard C, Morieux C, De Vernejoul MC. 1996. Bone effects of dydrogesterone in ovariectomized rats: a biologic, histomorphometric, and densitometric study. *Bone* 5:463-468.

- Selby PL, Peacock M, Barkworth SA, Brown WB, Taylor GA. 1985. Early effects of ethinyloestradiol and norethisterone treatment in post-menopausal women on bone resorption and calcium regulating hormones. *Clin. Sci.* 69:265-271.
- Scatchard G. 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY. Acad. Sci.* 51:660-672.
- Shimodaira K, Fujikawa H, Okura F, Shimizu Y, Saito H, Yanaihara T. 1996. Osteoblast cells (MG-63 and HOS) have aromatase and 5 $\alpha$ -reductase activities. *Biochem Mol. Biol. Int.* 39:109-116.
- Scholes D, LaCroix AZ, Ichikawa LE, Barlow WE, Ott SM. 2002. Injectable hormone contraception and bone density: results from a prospective study. *Epidemiol.* 5:581-587.
- Scopacasa F, Horowitz M, Need AG, Morris HA, Nordin BEC. 1999. The effects of low dose norethisterone on biochemical variables in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 9:494-498.
- Scheven BAA, Damen CA, Hamilton NJ, Verhaar HJJ, Duursma SA. 1992. Stimulatory effects of estrogen and progesterone on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186:54-60.
- Sweikert HU, Rulf W, Niederle N, Schafer HE, Keck E, Kruck F. 1980. Testosterone metabolism in human bone. *Acta Endocrinol.* 95:258-264.
- Steckelbroeck S, Jin Y, Gopishetty S, Oyesanmi B, Penning TM. 2004. Human Cytosolic 3 $\alpha$ -Hodroxysteroid dehydrogenases of the aldo-keto reductase superfamily display significant 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J. Biol. Chem.* 279:10784-10795.

- Stuart JD, Lee FW, Noel DS, Kadwell SH, Overton LK, Hoffman CR, Kost TA, Tippin TK, Yeager RL, Batchelor KW, Bramson HN. 2001. Pharmacokinetic parameters and mechanisms of inhibition of rat type 1 and 2 steroid 5 $\alpha$ -reductases: determinants for different *in vivo* activities of GI198745 and finasteride in the rat. *Biochem. Pharm.* 62:933-942.
- Tobias JH, Compston JE. 1999. Does estrogen stimulate osteoblast function in postmenopausal women?. *Bone.* 2: 121-124.
- Tobias JH, Flanagan AM, Scutt AM. 2002. Novel therapeutic targets in osteoporosis. *Expert Opin Ther. Targets.* 6:41-56.
- Tremollieres FA, Strong DD, Baylink DJ, Mohan S. 1992. Progesterone and promegestone stimulate human bone cell proliferation and insulin-like growth factor-2 production. *Acta Endocrinol.* 126:329-337.
- Vedi S, Croucher PI, Garrahan NJ, Compston JE. 1996. Effects of hormone replacement therapy on cancellous bone microstructure in postmenopausal women. *Bone.* 19:69-72.
- Vedi S, Compston JE. 1996. The effects of long-term hormone replacement therapy on bone remodeling in postmenopausal women. *Bone.* 19:535-539.
- Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, García GA, Angeles A, Pérez-Palacios G. 1986. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J. Steroid Biochem.* 24:525-531.
- Vittek J, Altman K, Gordon GG, Southren AL. 1974. The metabolism of 7 $\alpha$ -3H-Testosterone by rat mandibular bone. *Endo.* 94:325-329.

- Wong G, Cohn DV. 1974. Separation of parathyroid hormone and calcitonin-sensitive cells from non-responsive bone cells. *Nature*. 252:713-715
- Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288:321-333.
- Yamamoto Y, Kurabayashi T, Tojo Y, Yahata T, Honda A, Tomita M, Tanaka K. 1998. Effects of progestins on the metabolism of cancellous bone in aged oophorectomized rats. *Bone*. 5:533-5337.

---

“Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada”:

**“FORMACIÓN DE DERIVADOS 5 $\alpha$ -REDUCIDOS DE NORETISTERONA EN OSTEÓBLASTOS Y SU INTERACCIÓN CON RECEPTORES DE ESTRÓGENOS”**

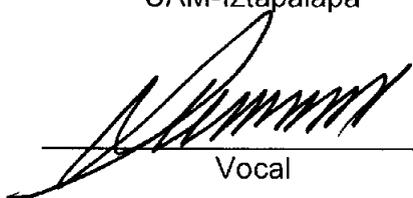
**JURADO DE EXAMEN**



\_\_\_\_\_  
Presidente

**Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura**

Profesor Titular “C”  
Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa



\_\_\_\_\_  
Vocal

**Dr. Javier Velázquez Moctezuma**

Profesor Titular “C”  
Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
UAM-Iztapalapa



\_\_\_\_\_  
Secretaria

**Dra. Gabriela Morali de la Brena**

Investigador Titular “B”  
Unidad de Investigación Médica en Farmacología,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI, I.M.S.S.

---