

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD-IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**REVALORACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN REGULADOR
DE LOS EFECTOS DE TIPO ESTROGÉNICO DE
LEVONORGESTREL, PROGESTINA SINTÉTICA
DE LA SERIE 19-NOR.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA

M.V.Z. MARTÍN REYES RAMÍREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA ELENA LEMUS BRAVO

2002

El trabajo experimental de esta tesis fue realizado en los Departamentos de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, con el 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.

Mi agradecimiento al CONACYT por haberme otorgado la beca N° 137 888 para la realización de mis estudios de Maestría.

Agradezco en forma especial al Dr. Gregorio Pérez-Palacios, por el apoyo económico que me brindo, mediante la beca de ayudante de investigador en el Sistema Nacional de Investigadores (SNI). Esta beca me permitió concluir y obtener el título de Maestro en Ciencias en Biología de la Reproducción Animal.

Mis agradecimientos al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por todas las facilidades proporcionadas para poder realizar el trabajo experimental de esta tesis.

Agradezco de forma muy especial a la Dra. Ana E. Lemus Bravo por todos los conocimientos transmitidos, los cuales me han servido para mi formación profesional en el área de la investigación. Agradezco también todos sus consejos y apoyos incondicionales, ya que siendo una persona sincera y con gran humildad, eso mismo es lo que me transmitió.

Quiero agradecer al Dr. Pablo Damián Matzumura por todas las observaciones y comentarios que fueron de gran utilidad para este trabajo de tesis y que sirvieron también para continuar mi formación en el área de la investigación. También agradezco su amistad ya que como amigo es muy valioso.

Un agradecimiento sincero para la Dra. Gabriela Morali de la Brena, por sus comentarios valiosos en este trabajo de tesis y también por su conocimiento que me brindo durante el curso de la maestría.

Quiero agradecer al Biólogo Experimental René Santillán Ballesteros por su apoyo durante la realización del trabajo experimental de esta tesis, ya que participo activamente en este trabajo y porque me brindo también sus conocimientos en el área del laboratorio, así como también por sus sugerencias en el manuscrito de la tesis.

Con todo mi cariño para Anabell y Aldo Azahel por su apoyo incondicional, y por que indirectamente han participado en mi formación.

A Sarita por su amistad y apoyo brindado, sin pedirme nada a cambio.

A Leticia, Angeles, Abril, Luis, Gerardo por sus sugerencias durante la realización de esta tesis y por su amistad que me han brindado.

Agradezco a las personas que siempre me han apoyado y que han sido los pilares que me han mantenido en lucha, en especial a mis familiares, Pilar, Angel, Elizabeth, Teófilo, Teresa, incluyendo también así a todos mis primos.

Con todo mi cariño para Alejandro y Hortensia.

Con todo el cariño que se merecen todas las personas que de alguna forma participaron en este trabajo de tesis.

Con gran cariño para mis padres y Hermanos por la confianza depositada en mí.

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	9
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	16
5. OBJETIVO GENERAL	17
6. OBJETIVOS PARTICULARES	17
7. MATERIALES	18
7.1. Material biológico	18
7.2. Material radiactivo	18
7.3. Compuestos químicos	19
8. MÉTODOS	20
8.1. Síntesis de derivados 5α-reducidos de Levonorgestrel (LNG).	20
8.2. Determinación de la constante aparente de disociación (K_d) y el número de sitios de unión (NSU) del receptor intracelular de estrógenos del útero de ratas prepúberes.	21
8.3. Afinidad de unión relativa (AUR) y constante de inhibición (K_i) de Levonorgestrel y sus metabolitos reducidos en el anillo A, por el receptor intracelular de estrógenos en el útero de las ratas prepúberes.	23
8.4. Determinación de la actividad biológica de tipo estrogénico de Levonorgestrel y sus derivados dihidro y tetrahidro-reducidos	

en un sistema de expresión en levaduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	
co-transfectadas.	25
8.5. Inducción del receptor de progesterona estrógeno-dependiente	
en la hipófisis anterior de las ratas hembras adultas castradas.	28
8.6. Análisis estadístico	30
9. RESULTADOS	31
9.1. Síntesis de 5 α -dihidro LNG, 3 α ,5 α -tetrahidro LNG y	
3 β ,5 α -tetrahidro LNG.	31
9.2. Interacción de LNG y sus metabolitos reducidos en el anillo A con	
el receptor intracelular de estrógenos.	31
9.3. Expresión de los efectos de tipo estrogénico de LNG y sus dihidro y	
tetrahidro derivados en el sistema de levaduras.	34
9.4. Características de la unión de los receptores de progesterona	
estrógeno-dependientes inducidos por la administración del 3 β ,5 α -	
tetrahidro LNG.	40
10. DISCUSIÓN	42
11. CONCLUSIONES	48
12. BIBLIOGRAFÍA	50
13. PUBLICACIÓN	58

1.- RESUMEN

El levonorgestrel (LNG) es una progestina sintética derivada de la 19-nortestosterona que es utilizada ampliamente como agente regulador de la fertilidad. El LNG, además de su potente efecto progestacional, induce efectos hormonales de tipo androgénico y recientemente se demostró que la adición de dosis altas de LNG a cultivos de células MCF-7 y T47D, obtenidas de carcinoma mamario humano estrógeno-dependiente, indujo el crecimiento y la proliferación celular, sugiriendo un efecto de tipo estrogénico, el cual fue inhibido por un antiestrógeno pero no por una antiprogestina. Este hecho es controversial con las múltiples evidencias de que el LNG no interactúa con el receptor intracelular de estrógenos (RE) y de que su molécula está impedida para aromatizarse enzimáticamente. Por otro lado, al igual que otras progestinas sintéticas de la serie 19-nor, como la noretisterona y el gestodeno, el LNG se metaboliza a nivel de órganos blanco a la acción hormonal, a los compuestos 5α -dihidro LNG (5α -LNG), $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro LNG ($3\alpha,5\alpha$ -LNG) y $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro LNG ($3\beta,5\alpha$ -LNG), los cuales podrían ser los responsables de los diversos efectos hormonales exhibidos por el LNG después de su administración. La hipótesis elaborada para la realización de este trabajo, propone que los efectos biológicos de tipo estrogénico, descritos para LNG son mediados por sus derivados $3\beta,5\alpha$ y $3\alpha,5\alpha$ tetrahidro-reducidos, a través de su unión a los sitios activos del receptor intracelular de estrógenos. Para comprobar la hipótesis planteada, se estableció como objetivo general esclarecer el mecanismo de acción de LNG, responsable de las actividades hormonales de tipo estrogénico empleando diferentes estrategias. El estudio de la competencia del LNG y sus metabolitos 5α -reducidos con el estradiol- ^3H (E_2 - ^3H), por los sitios activos del RE,

demostraron que el $3\beta,5\alpha$ -LNG y en menor proporción el $3\alpha,5\alpha$ -LNG fueron los únicos derivados que interactuaron con el RE, aunque con baja afinidad de unión (2.4 % y 0.4% respectivamente), comparada con la del E_2 (100%). El empleo de un sistema de expresión en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) co-transfectadas con un vector que contiene el gen del RE humano α y un vector reportero con un elemento de respuesta a estrógenos que regula la expresión del gen de la β -galactosidasa, demostró la capacidad del tetrahydro $3\beta,5\alpha$ -LNG y en menor proporción del tetrahydro $3\alpha,5\alpha$ -LNG para inducir respuestas de tipo estrogénico aunque con una potencia de 700 a 1000 veces menor que la del estradiol y que fueron inhibidas por el ICI-182,780, lo cual sugirió fuertemente un mecanismo de acción de tipo genómico, mediado por el RE. El estudio de la inducción de receptores intracelulares de progesterona (RP) estrógeno-dependientes en la hipófisis anterior de ratas hembras castradas, con la administración de 2.5 mg / día / 6 días consecutivos de $3\beta,5\alpha$ -LNG demostró la actividad de tipo estrogénico de este metabolito sobre el incremento de los RP en la hipófisis anterior de la rata. En conjunto, los resultados obtenidos permitieron cumplir con los objetivos planteados y confirmar la hipótesis de trabajo, destacando la relevancia del metabolismo de esta progestina sintética sobre la expresión de su actividad biológica y esclareciendo así el mecanismo por el cual LNG es capaz de ejercer efectos débiles de tipo estrogénico.

2. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los resultados de numerosos estudios experimentales en investigación básica han permitido el desarrollo y la síntesis de diversos compuestos sintéticos que han contribuido a lograr la disminución del crecimiento acelerado de la población mundial. Un claro ejemplo de ello fue la síntesis en México de la Noretisterona, primera progestina sintética activa por vía oral, realizada en el año de 1951 por los doctores Carl Djerassi, George Rosenkranz y Luis E. Miramontes (Djerassi y cols., 1954). Este acontecimiento de gran relevancia dio origen a la era de la anticoncepción hormonal, que más tarde hizo posible la implementación de programas nacionales de planificación familiar.

En la búsqueda de compuestos con mayor actividad progestacional se obtuvo por síntesis total el Levonorgestrel [13β -etil- 17α -etinil- 17β -hidroxi-4-gonen-3-ona (LNG)] (Smith y cols., 1963), una progestina sintética más potente que la noretisterona, que en la actualidad continúa utilizándose ampliamente como agente regulador de la fertilidad.

El LNG (Figura 1), componente esencial de las formulaciones anticonceptivas de segunda generación, es una progestina sintética derivada de la 19-nortestosterona con potente actividad progestacional (Kloosterboer y cols., 1988). El LNG se utiliza solo (Ball y cols., 1991) o en combinación con un estrógeno (DelConte y cols., 1999), en diferentes formulaciones, orales (DelConte y cols., 1999), inyectables (Crabbé y cols., 1983; Garza-Flores y cols., 1991; Sang, 1994), implantes subdérmicos (Cravioto y cols., 1997; Ba y

cols., 1999), anillos vaginales (Johannisson y cols., 1991; White y cols., 1991; Landgren y cols., 1994; Thau y Jackanicz, 1994) y en dispositivos intrauterinos medicados (WHO, 1990; Sivin y Stern, 1994).

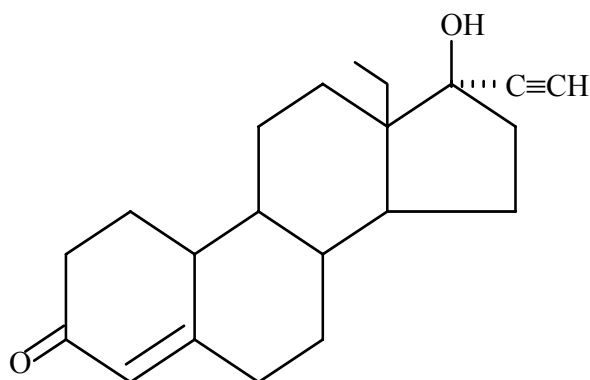


Figura 1. Fórmula estructural del Levonorgestrel (LNG).

El LNG ejerce su efecto anticonceptivo al interferir con el proceso de la ovulación, al inhibir en la hipófisis anterior la síntesis y liberación de las hormonas folículo estimulante y luteinizante (Spona y cols., 1996). Por otro lado, cuando esta progestina se administra a dosis bajas (Brache y cols., 1985; Croxatto y cols., 1987) induce cambios en la consistencia del moco cervical, impidiendo así la penetración espermática.

La actividad progestacional del LNG es mediada a través de su unión con el receptor intracelular de progesterona (RP), pero también se ha observado que después de su administración puede ejercer una variedad de efectos hormonales, particularmente de tipo androgénico como la aparición de acné, hirsutismo, alopecia (Jones, 1995), alteraciones del metabolismo de los carbohidratos y la disminución en plasma de la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) (Darney, 1995).

El LNG, al igual que otras progestinas de la serie 19-nor, después de su administración por vía oral se metaboliza ampliamente a nivel periférico a compuestos 5α -reducidos, siendo los tetrahidros $3\alpha,5\beta$ y en menor proporción el $3\alpha,5\alpha$ los metabolitos más abundantes en la orina (Littleton y cols., 1968; Sisenwine y cols., 1973 ; Stanczyk y Roy, 1990).

Por otra parte, las incubaciones *in vitro* de Levonorgestrel- ^3H (LNG- ^3H) en hipotálamo e hipófisis de ratas hembras castradas demostraron, como se observa en la Figura 2, que esta progestina es biotransformada por la acción de la 5α -reductasa a 5α -dihidro LNG (5α -LNG) y por la acción de las 3α -hidroxiesteroide deshidrogenasa y 3β hidroxiesteroide deshidrogenasa a los $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro LNG ($3\alpha,5\alpha$ -LNG) y $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro LNG ($3\beta,5\alpha$ -LNG) respectivamente (Lemus y cols., 1992).

Los estudios experimentales en los que se determinó la interacción de los metabolitos 5α -reducidos de LNG con los receptores intracelulares de progesterona, demostraron que la 5α -reducción de la molécula de LNG disminuye su afinidad por el receptor intracelular de progesterona, mientras que los tetrahidro-reducidos de LNG ($3\alpha,5\alpha$ -LNG y $3\beta,5\alpha$ -LNG) no tienen la capacidad de unirse con los receptores intracelulares de progesterona (Lemus y col., 1992).

METABOLISMO *IN VITRO* DE LEVONORGESTREL

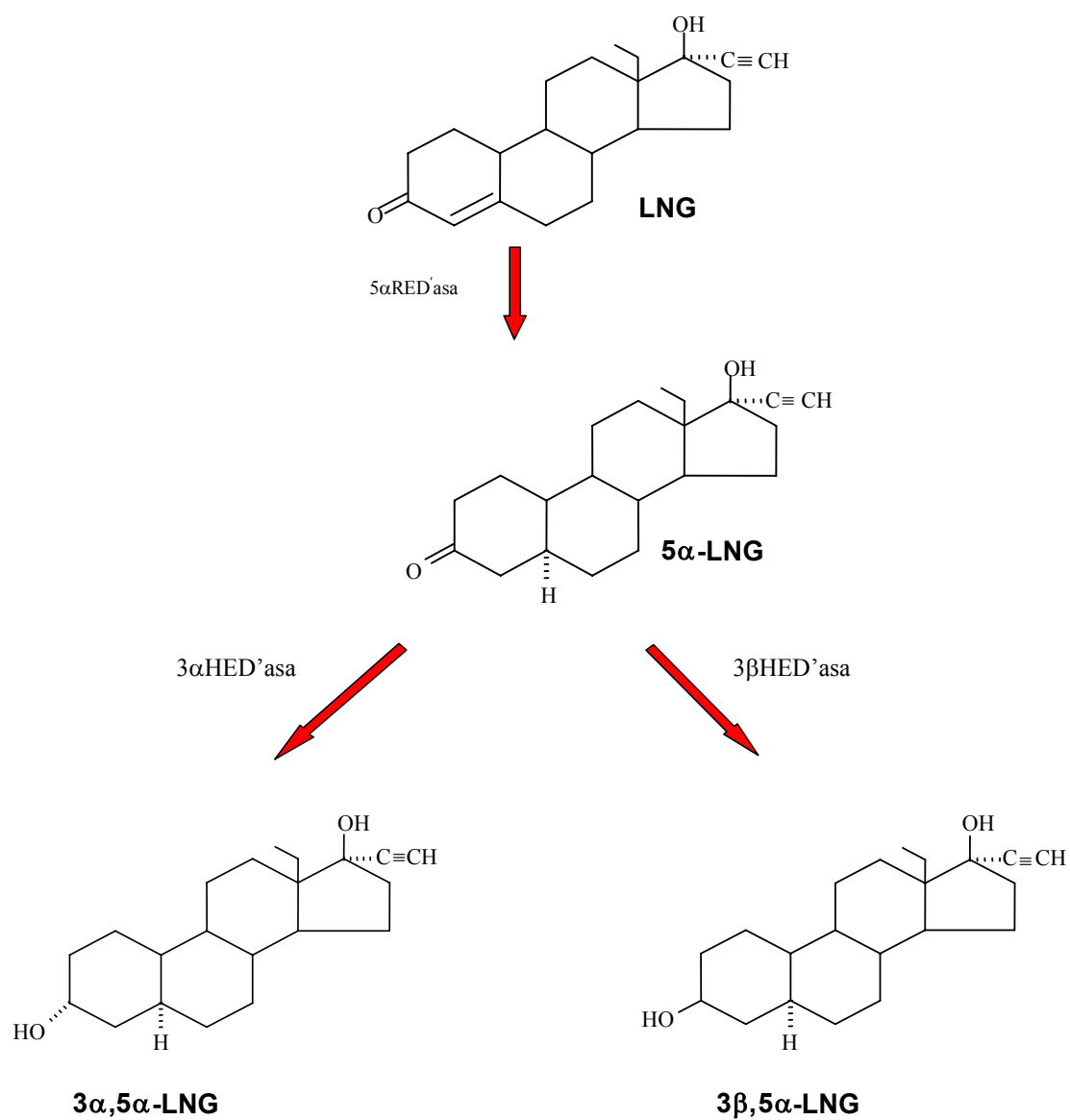


Figura 2. Biotransformación de LNG-³H en hipotálamos e hipófisis de ratas hembras castradas a los metabolitos: 5α-dihidro levonorgestrel (5α-LNG) y a 3α,5α-tetrahidro LNG (3α,5α-LNG) y 3β,5α-tetrahidro LNG (3β,5α-LNG) por la acción de las enzimas 5α-esteroide-reductasa (5αRED'asa), 3α-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3αHED'asa) y 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3βHED'asa) respectivamente.

Los estudios de la interacción de LNG y sus metabolitos reducidos en el anillo A con los receptores intracelulares de andrógenos del citosol de la próstata de ratas castradas demostraron que el LNG y su derivado 5α -dihidro se unen con gran especificidad y alta afinidad a estos receptores (Phillips y col., 1990; Lemus y col., 1992). La unión de LNG y de su metabolito 5α -reducido al receptor de andrógenos es capaz de mediar efectos de tipo androgénico, como la restauración del peso y tamaño del órgano del flanco del hamster macho castrado, después de la administración tópica de LNG y 5α -dihidro LNG (Cabeza y cols., 1995). La inducción de la conducta sexual masculina en la rata macho adulta castrada con la administración de LNG o 5α -dihidro LNG en combinación con benzoato de estradiol así como el incremento del peso de los órganos accesorios (próstata ventral y vesículas seminales) es otra demostración de los efectos androgénicos de LNG y su derivado 5α -dihidro LNG (Moralí y cols., 2002).

Con respecto a los efectos de tipo estrogénico exhibidos por el LNG después de su administración, se han reportado los resultados de estudios clínicos realizados en un grupo de mujeres tratadas con LNG, los cuales mencionan que el 15% de los sujetos en estudio presentaron alteraciones en las pruebas de tolerancia a la glucosa después de un año de tratamiento con la progestina sintética (Spellacy y cols., 1976).

En estudios experimentales recientes se demostró que la administración de grandes concentraciones del LNG a cultivos de células MCF-7 y T47D, obtenidas de carcinoma mamario humano estrógeno-dependiente, induce el crecimiento y la proliferación de estas células (Catherino y cols., 1993; Schoonen y cols., 1995a,b), efecto que fue inhibido por

un antiestrógeno, pero no por una antiprogestina (Van der Burg, 1991; Jeng y cols., 1992; Van der Burg y cols., 1992; Schoonen y cols., 1995b), evidencias que sugieren que el efecto de tipo estrogénico podría ser mediado a través del receptor intracelular de estrógenos. Este hecho es controversial con las múltiples evidencias de que la molécula de LNG no se une a los sitios activos del receptor intracelular de estrógenos (van Kordelaar y cols., 1975 a, b; Pollow y cols., 1989; Phillips y col., 1990) y de que la aromatización enzimática del anillo A de su molécula está impedida por la ausencia del metilo angular del C-19, quedando una interrogante sobre el mecanismo de acción a través del cual esta progestina puede ejercer efectos de tipo estrogénico. En este trabajo de tesis se realizaron una serie de estudios experimentales dirigidos a aclarar la controversia actual del mecanismo de acción, a nivel molecular, mediante el cual el LNG induce efectos hormonales de tipo estrogénico.

3. JUSTIFICACIÓN

Los informes recientes en la literatura de estudios epidemiológicos y clínicos que asocian un incremento del riesgo de trombosis venosa profunda e incluso trombosis pulmonar en las usuarias de anticonceptivos hormonales orales de tercera generación, han obligado a investigar el origen de los efectos de tipo estrogénico de esas progestinas, causantes de trastornos a nivel molecular. Aunque se ha demostrado que el levonorgestrel es una progestina sintética que, después de su administración, induce efectos de tipo estrogénico débiles, en estudios experimentales recientes se observó que la adición de dosis elevadas de esta progestina de 2ª generación a cultivos de células obtenidas de cáncer mamario estrógeno-dependiente indujo el crecimiento y la proliferación celular, los cuales se inhibieron por la acción de un antiestrógeno pero no por una antiprogestina. Los mecanismos por los cuales esta progestina sintética induce efectos de tipo estrogénico requieren ser revalorados debido a que actualmente millones de mujeres en el mundo utilizan levonorgestrel en cualesquiera de sus diferentes formulaciones. Los estudios que se realicen permitirán esclarecer el origen y la polémica de sus acciones estrogénicas.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los efectos biológicos de tipo estrogénico, que han sido descritos después de la administración de levonorgestrel, son mediados por sus productos de conversión metabólica, particularmente por los tetrahidros $3\beta,5\alpha$ y $3\alpha,5\alpha$, a través de su unión al receptor intracelular de estrógenos.

5. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Esclarecer el mecanismo de acción por el cual el LNG induce actividades hormonales de tipo estrogénico después de su administración.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Estudiar, por medio de un análisis de competencia, la interacción del LNG y sus derivados tetrahidro-reducidos con el receptor intracelular de estrógenos del citosol obtenido de úteros de ratas prepúberes.
- ❖ Determinar la respuesta biológica de tipo estrogénico del LNG y sus derivados reducidos en el anillo A, empleando un sistema de expresión en levaduras co-transfectadas con el gen que codifica para el receptor intracelular de estrógenos humano subtipo α (REh α) y con un plásmido reportero que contiene el elemento de respuesta a estrógenos asociado al gen que codifica para la β -galactosidasa.
- ❖ Inducir con los derivados 3 β ,5 α -LNG y 3 α ,5 α -LNG el receptor de progesterona estrógeno-dependiente, en la hipófisis anterior de ratas hembras adultas castradas.

7. MATERIALES

7.1 Material Biológico.

Se utilizaron ratas Wistar prepúberes intactas, con pesos entre 100 y 150 g y ratas hembras adultas castradas con peso promedio de 250 g, proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en donde permanecieron alojadas con ciclos de luz/obscuridad de 14/10 horas, durante el tiempo en que se realizaron los experimentos.

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa RS188N hiperpermeables y cotransfectadas con un plásmido de expresión (pC2) que contiene el gen que codifica al receptor intracelular de estrógenos humano subtipo α (REh α), cuya expresión es dependiente de cobre, y con un plásmido reportero que contiene el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) asociado al gen que codifica a la β -galactosidasa, como indicador de actividad estrogénica. Las levaduras fueron donadas amablemente por el Dr. Richard C. Lyttle del Instituto de Investigación de la Mujer, Wyeth Ayerst (Filadelfia, PA, EUA).

7.2 Material radiactivo.

Los esteroides radiactivos, ORG-2058 [6,7- ^3H] con actividad específica (a.e.) de 45 Ci / mmola y estradiol [2,4,6,7- ^3H], a.e. de 97 Ci / mmola, se obtuvieron de Amersham International plc (Buckinghamshire, Inglaterra). La pureza radioquímica de los esteroides se estableció por un proceso de dilución isotópica inversa que incluye cromatografía en dos

sistemas diferentes y cristalizaciones sucesivas de alícuotas, hasta la obtención de una actividad específica constante.

7.3 Compuestos químicos.

El levonorgestrel, que fue proporcionado generosamente por Schering Mexicana, S.A de C.V., (México, D.F., México) se recrystalizó en metanol y su pureza química se estableció por su punto de fusión y movilidad cromatográfica en placa fina, en dos sistemas diferentes.

Los esteroides radioinertes utilizados en los experimentos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, EUA) y su pureza se estableció por su punto de fusión y movilidad cromatográfica. El antiestrógeno ICI-182,780 fue donado por Zeneca Farma (México, D. F., México).

Todos los reactivos y disolventes empleados en los experimentos fueron de grado analítico.

8. MÉTODOS

8.1 Síntesis de derivados 5α -reducidos de Levonorgestrel (LNG).

Los derivados reducidos en el anillo A del LNG, 5α -dihidro LNG (5α -LNG), $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidro LNG ($3\alpha,5\alpha$ -LNG) y $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro LNG ($3\beta,5\alpha$ -LNG) no están disponibles comercialmente por lo que fue necesario sintetizarlos en el laboratorio por diferentes procedimientos.

El 5α -LNG se obtuvo por reducción del LNG con litio y amoníaco de acuerdo al procedimiento descrito por Bowers y colaboradores (1958), modificado por García de la Mora (Lemus y cols., 1992).

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

Los productos reducidos obtenidos se purificaron por medio de cromatografía “flash” en columnas de sílica gel (Still y cols., 1978) y cristalización en acetona. La pureza química se estableció con base en sus constantes físicas y espectroscópicas como punto de fusión, cromatografía líquida de alta precisión, espectro de infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

8.2 Determinación de la constante aparente de disociación (K_d) y el número de sitios de unión (NSU) del receptor intracelular de estrógenos del útero de ratas prepúberes.

8.2.1 Obtención de citosol.

Se utilizaron grupos de 15 ratas hembras inmaduras intactas con pesos entre 100 y 150 g. Los animales se decapitaron el día del experimento y se disecaron los úteros que se lavaron con solución salina isotónica fría y se secaron entre dos hojas de papel filtro. Los tejidos se fragmentaron finamente con tijera y se pesaron en una balanza analítica registrando el peso. El tejido se homogeneizó utilizando un politrón Brikmann PT 10/35 (Brikmann Instruments Co. Houston, TX, EUA) en una relación peso/volumen de 1:6, con una solución denominada TEDLM compuesta de buffer Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 a la que se le adicionó, EDTA 1.5 mM, ditioneitol 0.25 mM, leupeptina 10 µg/ml y molibdato de sodio 10 mM. El homogeneizado se centrifugó a 180,000 g durante 1 hora a 2° C, en un rotor Beckman SW 50.1. Del sobrenadante (citosol) se tomaron alícuotas para determinar el contenido de proteínas, utilizando una curva patrón de albúmina de suero de bovino (Bradford, 1976).

8.2.2. Curva de saturación del receptor intracelular de estrógenos.

Las características de unión al equilibrio de los receptores intracelulares de estrógenos del citosol de úteros de ratas prepúberes, con el E_2 - 3H como radioligando específico, se determinaron por medio de una curva de saturación.

La unión total se estudió en alícuotas del citosol, con una concentración promedio de proteína de 2 mg/ml, que se incubaron durante 18 horas a 4° C con concentraciones crecientes (1-15 nM) de E₂-³H. Al finalizar el período de incubación, el E₂-³H no unido o libre, se separó del complejo ³H-E₂/receptor por adsorción con una suspensión de carbón recubierto con dextrán (10:1) durante 5 minutos a 4° C, con agitación continua y centrifugación a 800 g. Del sobrenadante que contenía el complejo esteroide/receptor se tomaron alícuotas por triplicado, se les adicionaron 5 ml de la solución de centelleo Insta-Gel Plus® y se determinó su contenido de ³H en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb (Packard Downes Grove IL. EUA.). El “quenching” se corrigió automáticamente en cada muestra por estandarización externa. En forma paralela y en las mismas condiciones experimentales, se determinó la unión no específica en presencia de un exceso de 100 X de E₂ radioinerte. La unión específica se obtuvo al substrair la unión inespecífica de la unión total.

Las características de unión al equilibrio para los receptores intracelulares de estrógenos, en términos de la constante aparente de disociación (K_d) y el 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.

8.3 Afinidad de unión relativa (AUR) y constante de inhibición (K_i) de levonorgestrel y de sus metabolitos reducidos en el anillo A, por el receptor intracelular de estrógenos en el útero de las ratas prepúberes.

La capacidad de unión del LNG y de sus metabolitos 5 α -LNG, 3 α ,5 α -LNG y 3 β ,5 α -LNG al RE, se estableció en un análisis de competencia por los sitios activos del RE del citosol de útero de ratas prepúberes, utilizando el E₂-³H como radioligando específico (Chávez y cols., 1985). La obtención de citosol se realizó de acuerdo a lo descrito previamente. Alícuotas del citosol del útero de ratas prepúberes, con un contenido de proteínas de 4.1 a 5.2 mg/ml, se incubaron con el radioligando específico E₂-³H a la concentración de 1nM, en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (1-500 nM) de los esteroides competidores radioinertes, LNG, 5 α -LNG, 3 α ,5 α -LNG y 3 β ,5 α -LNG, por un período de 18 horas a 4° C. Como controles positivo y negativo se utilizaron idénticas concentraciones de estradiol y dihidrotestosterona (DHT) radioinertes respectivamente. Al término del período de incubación, la separación de los esteroides unidos a los receptores de estrógenos de aquellos que no se unieron, se realizó por adsorción con carbón/dextrán. El contenido de ³H en las muestras se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-carb, con una eficiencia de conteo del 65%.

La afinidad de unión relativa (AUR) del LNG y de sus derivados reducidos en el anillo A se evaluó por su capacidad para competir con el radioligando específico E₂-³H por los sitios activos del RE, tomando la unión del E₂-³H en ausencia de competidor, como 100%, de

acuerdo al método descrito por Reel y colaboradores (1979), empleando la siguiente fórmula:

$$\text{AUR} = \frac{[\text{L}]_{50}}{[\text{C}]_{50}} \times 100$$

En donde:

AUR= Afinidad de Unión Relativa

[L]₅₀= Concentración molar de ligando específico radioinerte (E₂) capaz de inhibir al 50% la unión del radioligando (E₂-³H) al receptor.

[C]₅₀= Concentración molar del esteroide competidor radioinerte, capaz de inhibir al 50% la unión del radioligando al receptor.

La constante de inhibición al 50 % (K_i) se calculó con la fórmula descrita por Cheng y Prusoff (1973).

$$\text{K}_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + (\text{C}/\text{K}_d)}$$

En donde:

K_i = Constante de inhibición

IC₅₀= Concentración molar a la que el competidor radioinerte inhibe el 50% de la unión del radioligando con el receptor.

C= Concentración molar del radioligando

K_d= Constante de disociación del radioligando específico.

8.4 Determinación de la actividad biológica de tipo estrogénico de Levonorgestrel y de sus derivados dihidro y tetrahidro-reducidos en un sistema de expresión en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* co-tranfectadas.

De acuerdo al método descrito por Lyttle (1992), las levaduras se incubaron durante toda la noche a 32° C con agitación constante en un medio que contenía glucosa y aminoácidos esenciales. Al día siguiente, el cultivo de las levaduras se diluyó lo necesario para que a una longitud de onda de 660 nm la densidad óptica (DO) fuera de 0.5, lo cual corresponde a una concentración celular de $2 - 7 \times 10^7$ células/ml. Para estimular la formación del REh α , a cada tubo de prueba con 5 ml de la dilución celular se agregaron 20 μ l de una solución 0.025 M de sulfato cúprico para obtener una concentración final de 100 μ M y se incubaron a 32° C durante 60 minutos. Posteriormente, se adicionaron por separado concentraciones crecientes de 100, 250, 400, 500 y 600 nM de los derivados 3 α ,5 α -LNG y 3 β ,5 α -LNG, así como de 1000 nM de LNG y 5 α -LNG. Como control positivo de los experimentos, se utilizó E₂ a concentraciones de 0.1 a 2 nM y como controles negativos el vehículo (V), testosterona (T), DHT, progesterona (P₄) y pregnenolona (P₅) a concentraciones de 1000 nM. Los tubos se incubaron por un período de 4 horas y 30 minutos a 32° C con agitación constante; transcurrido ese tiempo, se centrifugó a 800 g por 5 minutos y el precipitado que contiene las levaduras se resuspendió en un buffer denominado Z, a pH de 7.4, compuesto por NaH₂PO₄ 40 mM, Na₂HPO₄ 60 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM y β -mercaptoetanol 5 mM. La ruptura mecánica de la pared celular de las levaduras se logró con la adición de perlas de vidrio de 472 a 600 micras, agitando los tubos en un vortex por periodos alternos de 15 segundos de agitación y 15 segundos de reposo en un baño de hielo,

repetiendo el procedimiento por seis veces. Para prevenir la acción de las proteasas durante la agitación y reposo, se agregaron 20 μ l de una solución 40 nM de fluoruro de metil fenil sulfonilo (FMFS). Posteriormente los tubos se centrifugaron a 10,000 g por 10 minutos a 4° C en una microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 R. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 100 μ l con una concentración promedio de proteínas de 0.5 mg/ml y se incubaron con 700 μ l de buffer Z y 200 μ l de *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONFG) como sustrato de la β -galactosidasa, a una concentración de 4 mg/ml. Transcurrido el tiempo de la incubación, la reacción se detuvo con 0.5 ml de carbonato de sodio 1M. La actividad de la β -galactosidasa se evaluó por la cantidad de *o*-nitrofenol obtenido de la hidrólisis del ONFG que produce una coloración amarilla, la cual se midió en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 420 nm.

Con el objetivo de esclarecer si la transactivación del gen de la β -galactosidasa es una acción genómica, se realizaron incubaciones en el sistema de expresión en levaduras con el 3 β ,5 α -LNG y el 3 α ,5 α -LNG que fueron los compuestos que mostraron capacidad para transactivar el gen de la β -galactosidasa, utilizando las dosis de 500 y 2000 nM, respectivamente, combinados con el antiestrógeno esteroidal ICI-182,780 (Wakeling y Bowler, 1992) a la concentración de 1000 nM. Como controles se realizaron incubaciones que contenían únicamente E₂ (1 nM) o ICI-182,780 (1000 nM), o bien, E₂ + ICI-182,780 (1 nM + 1000 nM) o vehículo solo.

Debido a que las diferentes formulaciones anticonceptivas que utilizan levonorgestrel contienen también un componente estrogénico como el etinil estradiol (EE₂), fue

interesante evaluar un posible efecto sinérgico de este estrógeno sintético con los tetrahidros de LNG para lo cual se incubaron las levaduras con $3\beta,5\alpha$ -LNG (250 nM) y $3\alpha,5\alpha$ -LNG (600 nM) solos o en combinación con EE₂ (0.5 nM), en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente.

En todos los experimentos realizados, la actividad de la β -galactosidasa, que se expresa en nmolas/minuto/mg de proteína, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{DO} \times 1.7}{0.0045 \times P \times V \times T}$$

En donde:

DO = Densidad óptica a 420 nm.

1.7= Factor de concentración para el *o*-nitrofenol

0.0045= Densidad óptica de 1 nmola/ml del ONFG.

P= Concentración de proteína (mg/ml).

V= Volumen final de la reacción (ml)

T= Tiempo de incubación del ONFG con la β -galactosidasa (min)

8.5 Inducción del receptor intracelular de progesterona estrógeno-dependiente, en la hipófisis anterior de las ratas hembras adultas castradas.

En la hipófisis anterior de las ratas hembras adultas los receptores intracelulares de progesterona (RP) son dependientes de estrógenos, por lo que después de la castración, la presencia de estos receptores ya no puede ser detectada. El hecho de que este efecto 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; Lemus y cols., 2000) por lo que este modelo experimental se empleó como un marcador biológico de actividad estrogénica.

La actividad estrogénica del $3\beta,5\alpha$ -LNG, metabolito que exhibió la mayor actividad de tipo estrogénico en el sistema de expresión en levaduras, se determinó por su capacidad para inducir el receptor de progesterona estrógeno-dependiente en la hipófisis anterior de las ratas hembras adultas castradas.

A grupos de 15 ratas hembras adultas con peso promedio de 350 g, castradas por lo menos 20 días antes de iniciar los tratamientos, se les administró el $3\beta,5\alpha$ -LNG a la dosis de 2.5 mg/día durante 6 días consecutivos. Como controles experimentales, se utilizaron grupos de ratas a las que se les administraron 5 μ g/día/6 días de benzoato de estradiol (BE_2) ó 100 μ l de propilenglicol que fue el vehículo en el que se disolvieron los esteroides.

Al término de los tratamientos, los animales se decapitaron, se disecaron las hipófisis y se removi6 la neurohip6fisis. Las hipófisis anteriores se lavaron con soluci6n salina isot6nica fría, se secaron entre dos hojas de papel filtro, se fraccionaron finamente con tijera y se registr6 su peso. Los tejidos se homogeneizaron con un pistilo de teflon en un tubo de vidrio, en una soluci6n de buffer TEDM en una relaci6n de peso/volumen de 1:6, suplementada con glicerol al 10% y leupeptina (10 µg/ml) como inhibidor de proteasas. Los homogeneizados se centrifugaron a 105,000 g por 1 hora a 2° C para obtener el citosol del que se tomaron alícuotas de 10 µl para determinar la concentraci6n de proteínas por el método de Bradford (1976), empleando albúmina de suero de bovino para la curva estándar.

El citosol restante se incub6 durante 4 horas a 4° C con ORG 2058-³H a concentraci6n 3 nM, como radioligando específico del receptor de progesterona. Terminada la incubaci6n, se tomaron alícuotas con una concentraci6n de 4 mg de proteína, y se depositaron sobre la superficie de gradientes lineales de 20-35% de sacarosa, preparados en tubos de polial6mero de 13x51 mm (Quick-SealTM). Los gradientes se prepararon con un formador de gradientes (Buchler Instruments, Fort Lee, NJ. EUA) y se centrifugaron en un rotor vertical (VTi 65,serie 984, Beckman) a 400,000 g durante 2 horas y 30 minutos a 2° C. Al término de la centrifugaci6n, se perfor6 el fondo de los tubos y se colectaron fracciones de 85 µl en tubos con bajo contenido de ⁴⁰K para conteo de radiactividad y se determin6 la cantidad de ³H en un espectrómetro de centelleo líquido utilizando Insta-Gel Plus® como soluci6n de centelleo. La uni6n inespecífica se determin6 en un gradiente paralelo a los experimentales adicionando un exceso de 100 X de ORG 2058 radioinerte.

El coeficiente de sedimentación (CS) del complejo ORG 2058-³H/receptor de progesterona, se calculó empleando como referencia el coeficiente de sedimentación de la albúmina de suero de bovino (ASB) con la siguiente fórmula:

$$CS = \left[\frac{A - P_A}{B - P_B} \right] \times 4.6$$

En donde:

CS= Coeficiente de sedimentación expresado en unidades Svedberg (S)

A= Número total de fracciones del gradiente del complejo ORG 2058-³H/receptor de progesterona

P_A= Número de la fracción en que se localizó el máximo contenido de ³H en el gradiente del complejo
ORG2058-³H/receptor de progesterona

B= Número total de fracciones del gradiente de la ASB

P_B= Número de la fracción en que se localizó la concentración máxima de la ASB

4.6 = Coeficiente de sedimentación de la ASB

8.6 Análisis estadístico

Los experimentos, a excepción de la inducción del receptor de progesterona en la hipófisis anterior de ratas castradas que se hizo por duplicado, se realizaron mínimo cinco veces por triplicado y los resultados se expresaron como la media de los valores $\pm$ la desviación estándar (DE). Las diferencias entre grupos experimentales se evaluaron por medio de un análisis de varianza y se consideraron valores significativos, cuando la $P \leq 0.005$ (SSPTSTM). La potencia estrogénica de los metabolitos de levonorgestrel se determinó por la dosis media efectiva (DE₅₀) calculada con el programa computacional Microcal OriginTM.

9. RESULTADOS

9.1 Síntesis de 5 α -dihidro LNG, 3 α ,5 α -tetrahidro LNG y 3 β ,5 α -tetrahidro LNG.

Del proceso de síntesis de los derivados 5 α -reducidos del LNG, se obtuvieron productos de alta pureza química con rendimientos de 60% para el 5 α -LNG y del 98 y 40% en la obtención del 3 α ,5 α -LNG y 3 β ,5 α -LNG respectivamente. El análisis de la movilidad cromatográfica, punto de fusión, espectro de infrarrojo y de las propiedades físicas y espectroscópicas, mostró resultados idénticos a los informados previamente en la literatura (Lemus y cols., 1992).

9.2. Interacción de LNG y de sus metabolitos reducidos en el anillo A con el receptor intracelular de estrógenos.

9.2. 1. Características de la unión al equilibrio del receptor intracelular de estrógenos.

Los resultados obtenidos de la unión específica del E₂-³H a los sitios activos del receptor intracelular de estrógenos del útero de ratas prepúberes se muestran en la Figura 3. La saturación del sistema se obtuvo a la concentración de 6 nM de E₂-³H y se expresó en pmolas de E₂/ml. La expresión a la manera de Scatchard de los resultados obtenidos en la curva de saturación mostró una K_d de 2.03 x 10⁻⁹ M y el NSU estimado fue de 1.2 nmolas/ml/mg de proteína (Figura 3).

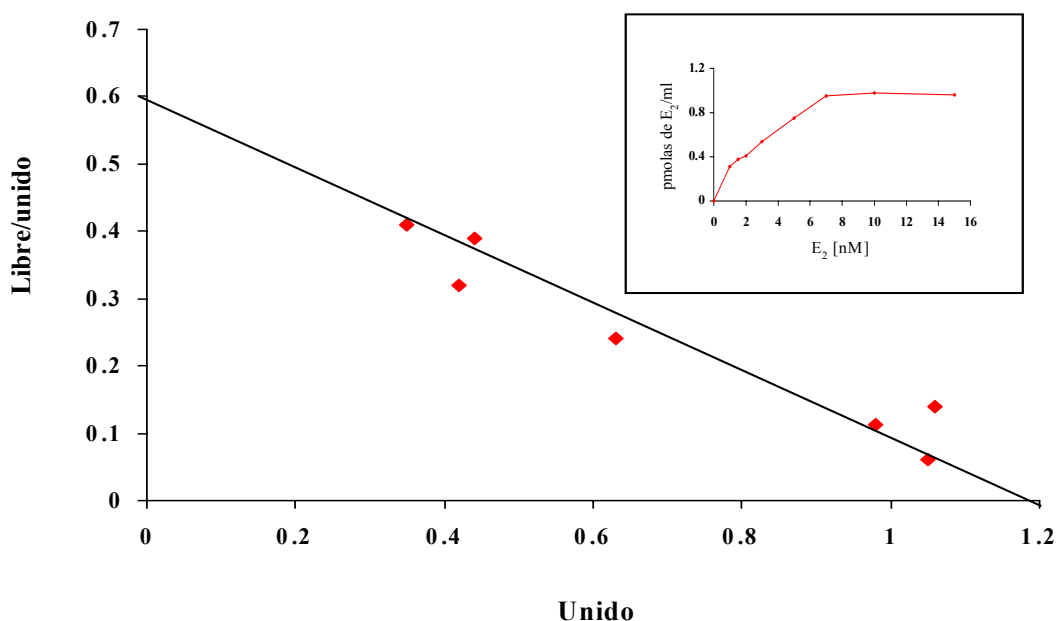


Figura 3. Expresión de la unión específica del E_2 - 3H con los RE en una gráfica a la manera de Scatchard. Los resultados de la curva de saturación (ver recuadro) expresados a la manera de Scatchard mostraron una constante aparente de disociación (K_d) de 2.03×10^{-9} M y un número de sitios de unión (NSU) de 1.2 nmolas/ml/mg de proteína.

9.2.2. Constante de Inhibición al 50% y Afinidad de Unión Relativa de esteroides naturales y sintéticos por el receptor intracelular de estrógenos.

Los resultados del análisis de competencia de E_2 , LNG, 5α -LNG, $3\alpha,5\alpha$ -LNG y $3\beta,5\alpha$ -LNG con el E_2 - 3H por los sitios activos del RE se muestran en la Figura 4. El E_2 radioinerte utilizado como control positivo, como era de esperarse fue el competidor más potente ya que la inhibición del 50% de la unión del radioligando se logró a partir de la concentración de 2 nM. El LNG y su 5α -dihidro no fueron capaces de competir con el radioligando aun a la concentración más alta (500 nM) utilizada en los estudios de competencia. Un comportamiento similar fue observado con DHT, utilizada como control

negativo en la serie de experimentos. El hallazgo de mayor relevancia del estudio fue sin duda la interacción de los derivados reducidos $3\beta,5\alpha$ -LNG y $3\alpha,5\alpha$ -LNG con el RE. El tetrahidro $3\beta,5\alpha$ -LNG fue, después del E_2 , el esteroide que mostró la mayor capacidad para inhibir la unión del radioligando al RE. La inhibición del 50% de la unión del E_2 - 3H al RE se logró con una concentración entre 50 y 100 nM (84.3 nM). La máxima concentración de 500 nM inhibió más del 70% de la unión. El $3\alpha,5\alpha$ -LNG, mostró menor potencia de inhibición que su epímero 3β , ya que solamente la concentración de 500 nM inhibió el 50% de la unión radioligando/RE.

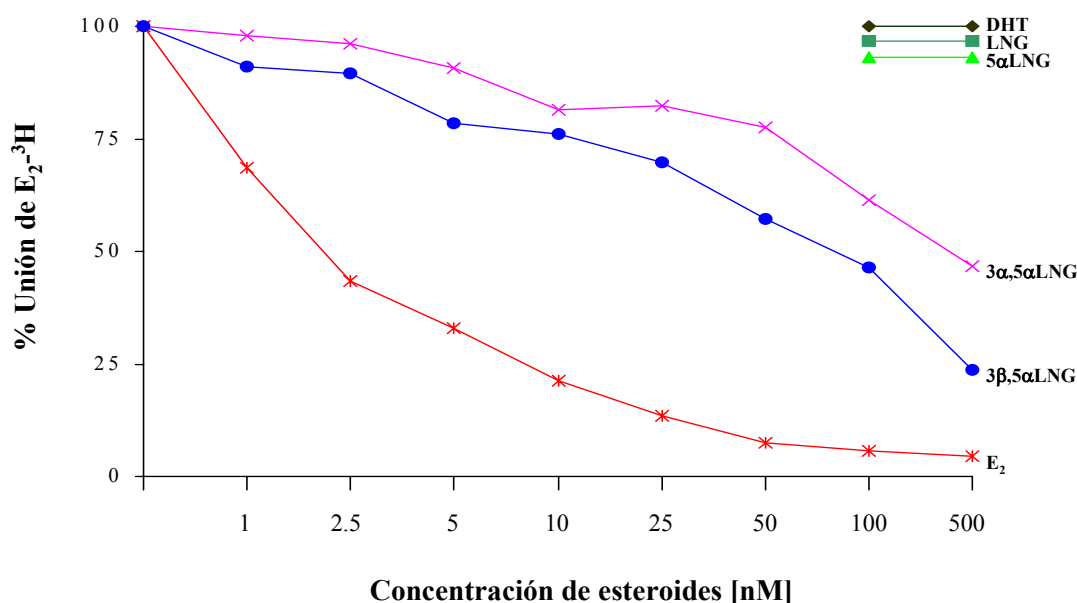


Figura 4. Análisis de competencia de Levonorgestrel (LNG) y de sus metabolitos reducidos en el anillo A con el E_2 - 3H por los sitios de unión del RE del útero de ratas prepúberes. Los resultados demostraron que el $3\beta,5\alpha$ -LNG y en menor proporción el $3\alpha,5\alpha$ -LNG fueron capaces de competir por los sitios activos del RE. El E_2 radioinerte utilizado como control positivo fue el mayor competidor por los sitios de unión del RE. LNG y el 5α -LNG no tuvieron la capacidad para unirse al RE, comportamiento similar al observado con la DHT utilizada como control negativo.

Los valores obtenidos para la afinidad de unión relativa y la constante de inhibición al 50 % de LNG y de sus derivados 5 α -reducidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Afinidad de Unión Relativa (AUR) y Constante de Inhibición (K_i) de esteroides naturales y sintéticos.

Esteroides competidores	AUR (%)^a	K_{i50} (nM)^b
LNG	-----	-----
5 α -LNG	-----	-----
3 α ,5 α -LNG	0.4	466
3 β ,5 α -LNG	2.4	84.3
E ₂	100	2.1

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

b La K_i se determinó por el método descrito por Cheng y Prusoff (1973)

9.3. Expresión de los efectos de tipo estrogénico de LNG y de sus dihidro y tetrahidro-derivados en el sistema de expresión en levaduras.

Los resultados obtenidos de la transactivación del gen de la β -galactosidasa en el sistema de expresión en levaduras, utilizando diferentes concentraciones de LNG y de sus metabolitos reducidos en el anillo A, 5 α -LNG, 3 α ,5 α -LNG y 3 β ,5 α -LNG se muestran en la Figura 5.

El E₂, ligando específico del REh α y que se utilizó como control positivo del experimento, como era de esperarse, fue el esteroide con el que se observó el mayor efecto de

transactivación del gen de la β -galactosidasa, con una respuesta, en términos de actividad enzimática, dependiente de la dosis. Esta respuesta se observó aun a la concentración más baja empleada de 0.1 nM, siendo significativamente diferente del vehículo ($p < 0.005$) a partir de la concentración de 0.5 nM, detectándose el máximo efecto a 2 nM (Figura 5).

La transactivación del gen de la β -galactosidasa con el tetrahidro $3\beta,5\alpha$ LNG, se logró a la concentración de 250 nM con un máximo de actividad a 500 y 600 nM, significativamente diferente ($p < 0.005$) del control de vehículo (Figura 5).

El derivado $3\alpha,5\alpha$ -LNG, aunque con menor potencia que el $3\beta,5\alpha$ -LNG logró también transactivar el gen de la β -galactosidasa, siendo significativamente ($p < 0.005$) diferente del vehículo. La máxima actividad de la β -galactosidasa se observó también con las concentraciones de 500 nM y 600 nM.

El LNG y su derivado 5α -LNG aun a la elevada concentración de 1000 nM, no fueron capaces de transactivar a la β -galactosidasa, un comportamiento similar fue observado con P_4 , P_5 , T, DHT y el V, los cuales se utilizaron como controles negativos.

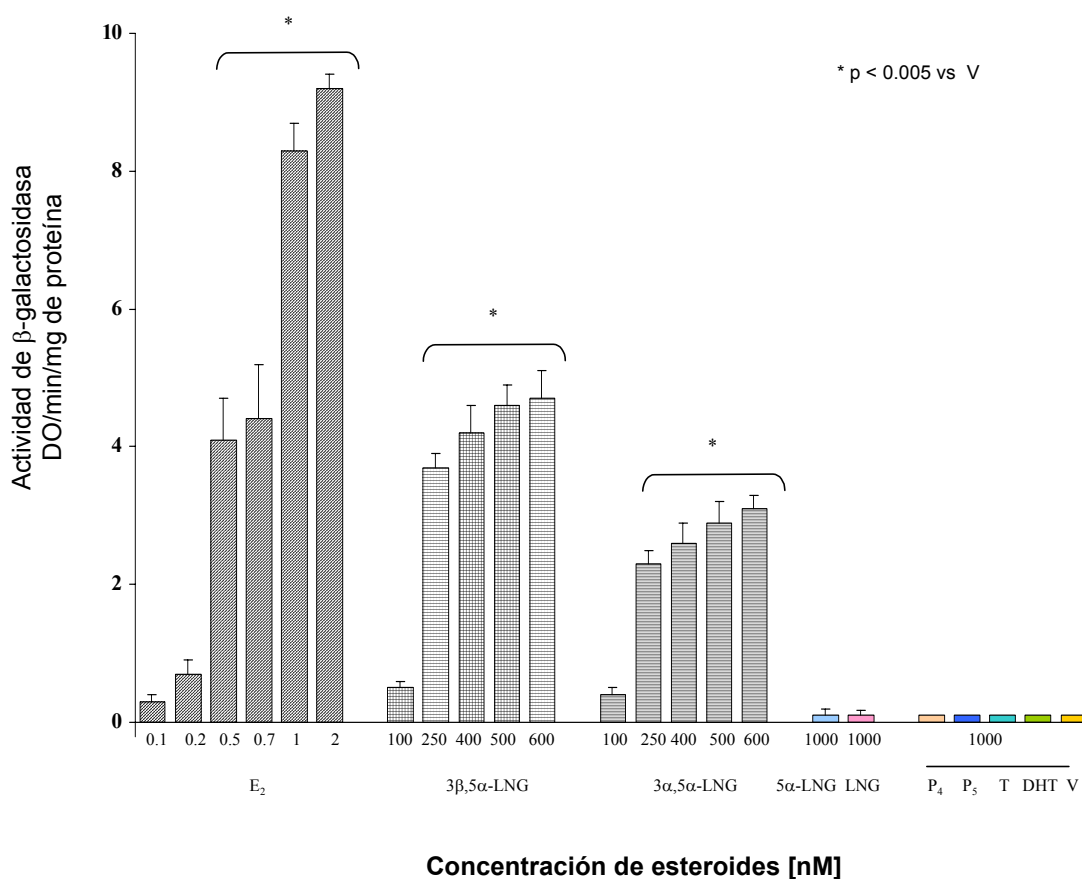


Figura 5. Evaluación de la potencia estrogénica de levonorgestrel y de sus metabolitos reducidos en el anillo A, en función de su capacidad para transactivar el gen de la β-galactosidasa. El estradiol (E₂), que fue utilizado como control positivo, fue el esteroide más potente para transactivar a la β-galactosidasa. El 3β,5α-LNG fue capaz de transactivar el sistema de expresión de levaduras con un máximo efecto a las concentraciones de 500 y 600 nM. El 3α,5α-LNG a las mismas concentraciones, presentó un efecto notoriamente menor que su isómero 3β. El LNG y su derivado 5α-reducido, no transactivaron el sistema de levaduras, efecto similar al observado con progesterona (P₄), pregnenolona (P₅), testosterona (T), dihidrotestosterona (DHT) y el vehículo (V), utilizados como controles negativos. Cada punto representa la media ± la desviación estándar de 5 experimentos por triplicado.

Las dosis media efectivas (DE₅₀) calculadas para el E₂ y los tetrahidros de LNG, 3 β ,5 α y 3 α ,5 α para la inducción de la actividad de β -galactosidasa en el sistema de expresión en levaduras, se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Dosis medias efectivas de E₂ y de los tetrahidros 3 β ,5 α -LNG y 3 α ,5 α -LNG capaces de transactivar el sistema de expresión en levaduras.

Esteroides	DE₅₀ [nM][*]
E ₂	0.70
3 β ,5 α -LNG	524
3 α ,5 α -LNG	1093

* La potencia de tipo estrogénico de los tetrahidros de LNG se estableció con base en la dosis media efectiva (DE₅₀) calculada con el programa computacional Microcal OriginTM

9.3.1. Inhibición de la actividad estrógenica del 3 β ,5 α -LNG y de su isómero 3 α con el antiestrógeno esteroideal ICI-182,780, en el sistema de expresión en levaduras.

El antiestrógeno ICI-182,780 fue capaz de inhibir el 70.5 % de la actividad de la β -galactosidasa inducida por el E₂. Así también el ICI-182,780 disminuyó en un 47.6 % la transactivación mediada por el metabolito 3 β ,5 α -LNG, mientras que la actividad de β -galactosidasa inducida por el 3 α ,5 α -LNG, se inhibió en un 35.9 % en presencia del antiestrógeno. El ICI-182,780 a la misma concentración que se utilizó para inhibir los efectos de tipo estrogénico inducidos por los tetrahidros de LNG, no fue capaz de transactivar el sistema de expresión de levaduras (Figura 6).

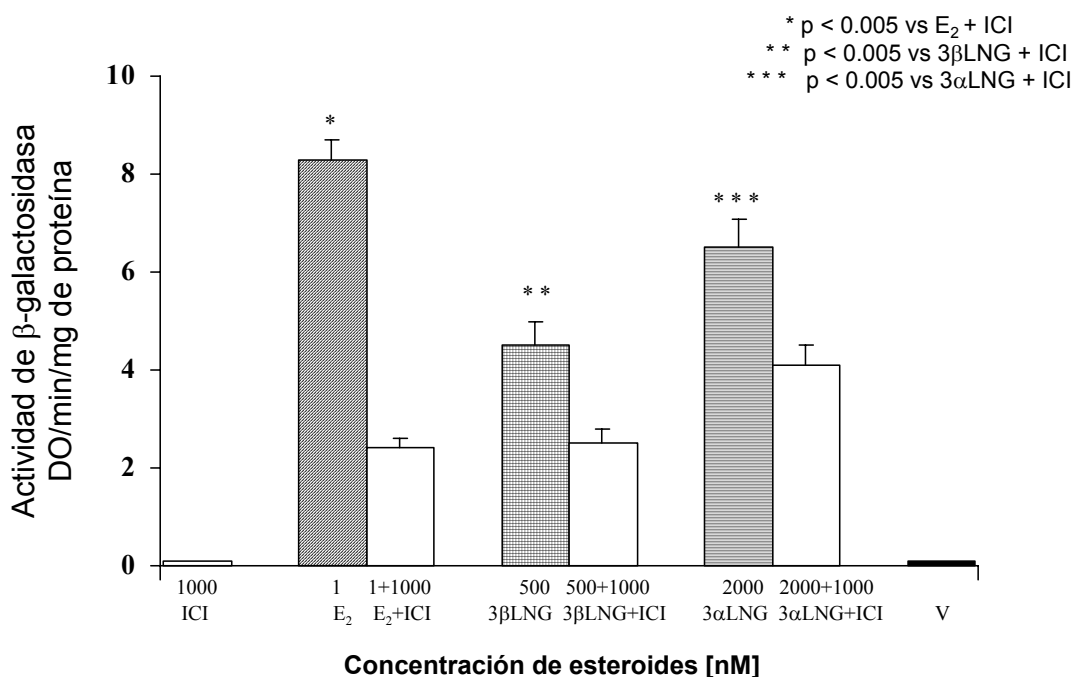


Figura 6. Efecto del antiestrógeno esteroide ICI-182,780 sobre la transactivación del gen de la β-galactosidasa, inducida por E₂, 3β,5α-LNG y 3α,5α-LNG. Los resultados observados en la gráfica muestran que el ICI-182,780 inhibió en un 70.5 % la actividad mediada por el E₂, e inhibió en un 47.6 % y en un 35.9 % la transactivación inducida por el 3β,5α-LNG, y por el 3α,5α-LNG respectivamente. Cada punto representa la media ± la desviación estándar de 5 experimentos por triplicado.

9.3.2. Efecto del EE₂ en combinación con los tetrahidros 3β,5α-LNG o 3α,5α-LNG sobre el sistema de expresión en levaduras.

Los resultados obtenidos de las incubaciones de 250 nM de 3β,5α-LNG y de 600 nM del 3α,5α-LNG en combinación con 0.5 nM de EE₂ no mostraron un efecto de tipo sinérgico sobre la actividad de la β-galactosidasa sino que el efecto observado fue el

resultado de la suma del efecto inducido por el EE₂ solo + el efecto individual del 3 α ,5 α - ó del 3 β ,5 α -tetrahidro LNG (Figura 7).

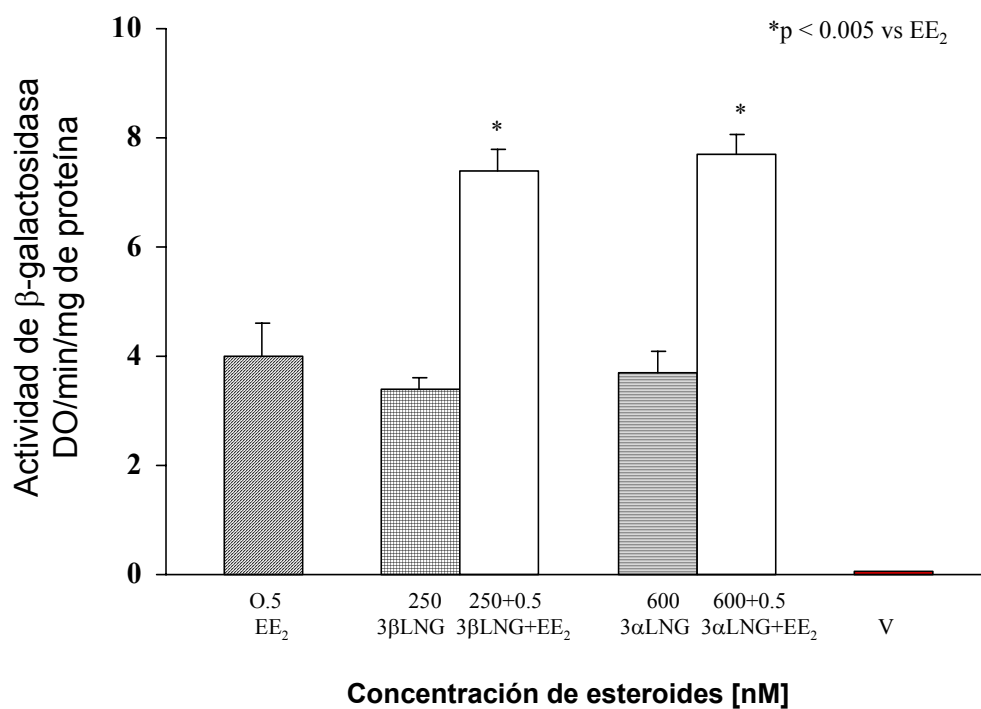


Figura 7. Efecto del etinil estradiol (EE₂) en combinación con 3 β ,5 α -LNG o 3 α ,5 α -LNG, sobre la transactivación del gen de la β -galactosidasa en el sistema de expresión en levaduras. Los resultados mostrados en la gráfica indicaron que la combinación de EE₂ con los metabolitos tetrahidro-reducidos de LNG, tuvo un efecto aditivo. Cada punto representa la media $\pm$ la desviación estándar de cinco experimentos por triplicado.

9.4. Características de la unión de los receptores de progesterona estrógeno-dependientes, inducidos por la administración del derivado $3\beta,5\alpha$ -LNG en las ratas hembras castradas.

Los resultados de la inducción de los receptores de progesterona en la hipófisis anterior de las ratas hembras castradas después de la administración de BE_2 ó $3\beta,5\alpha$ -LNG se observan en la gráfica del análisis de los gradientes de sacarosa (Figura 8).

La administración de 2.5 mg/día/6 días consecutivos del tetrahidro $3\beta,5\alpha$ -LNG a las ratas castradas, restableció en la hipófisis anterior de los animales tratados, la presencia de los RP estrógeno-dependientes, como se observa en la gráfica de los gradientes de sacarosa (Figura 8). El tratamiento con dosis de 5 μ g/día/6 días de BE_2 , utilizado como control positivo del experimento, resultó en una mayor inducción de los RP, que la producida por el $3\beta,5\alpha$ -LNG; mientras que con la administración de propilenglicol, vehículo en el que se administraron los compuestos, no se detectó la presencia de moléculas capaces de unirse al ORG2058- 3H (Figura 8). El exceso de 100 X de ORG2058 radioinerte inhibió totalmente la unión del radioligando tritiado a los RP.

El coeficiente de sedimentación de los RP inducidos por el $3\beta,5\alpha$ -LNG fue de 7.2 S, resultando idéntico al coeficiente de sedimentación de los RP inducidos por el BE_2 y al reportado en la literatura para estos receptores.

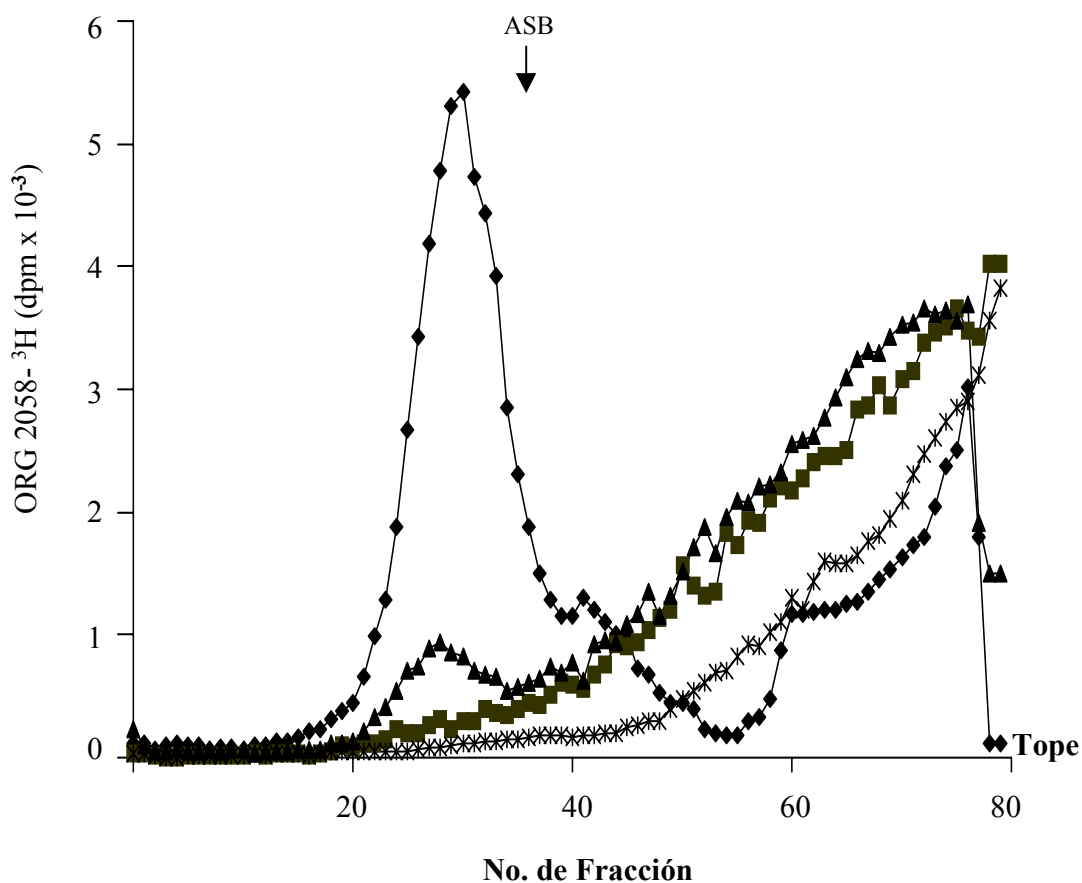


Figura 8. Representación gráfica de la inducción del receptor de progesterona dependiente de estrógenos en la hipófisis anterior de ratas hembras adultas castradas, analizada en gradientes lineales de sacarosa, después de la administración de 2.5 mg/día/6 días de 3 β ,5 α -LNG ($\blacktriangle$), utilizando ORG2058-³H como radioligando. Un grupo de ratas tratadas con 5 μ g/día/6 días de BE₂ se utilizó como control positivo de los experimentos ($\blacklozenge$). La albúmina de suero de bovino (ASB) se empleó como marcador externo. El exceso de 100 x de ORG2058 radioinerte (*) inhibió totalmente la presencia de los RP. El coeficiente de sedimentación del complejo ORG 2058-³H/RP inducido por el 3 β ,5 α -LNG fue de 7.2 S, idéntico al inducido por el BE₂. Un grupo de animales tratados con el vehículo ($\blacksquare$) sirvió como control negativo.

10. DISCUSIÓN

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, demostraron que el LNG y sus derivados dihidro y tetrahidros exhibían muy poca o ninguna afinidad por los RE del citosol del útero de las ratas prepúberes (Lemus y cols., 1992); sin embargo, recientemente se reportó en la literatura que la adición de grandes dosis de LNG a cultivos de células obtenidas de cáncer mamario estrógeno-dependiente, inducían el crecimiento y la proliferación celular y que estos efectos eran inhibidos por un antiestrógeno pero no por una antiprogestina (Van der Burg, 1991; Jeng y cols., 1992; Van der Burg y cols., 1992; Catherino y cols., 1993; Schoonen y cols., 1995 a,b). Estos informes nos motivaron a revalorar la interacción del LNG y de sus derivados reducidos en el anillo A con los RE, así como sus acciones de tipo estrogénico, tomando ventaja de que actualmente se dispone en nuestro laboratorio de técnicas de biología molecular que con una mayor sensibilidad y precisión nos permitieron esclarecer los mecanismos de acción a nivel molecular, responsables de la expresión de los efectos de tipo estrogénico inducidos por el LNG después de su administración.

El proceso de síntesis del 5α -LNG, $3\alpha,5\alpha$ -LNG y $3\beta,5\alpha$ -LNG, del cual se obtuvieron compuestos de alta pureza química, permitió la realización de los diferentes procesos experimentales que constituyen este trabajo de tesis.

Los resultados más relevantes obtenidos del análisis de competencia de LNG y sus derivados 5α -LNG, $3\alpha,5\alpha$ -LNG y $3\beta,5\alpha$ -LNG por los RE, demostraron por primera vez que el derivado $3\beta,5\alpha$ -LNG y en menor proporción su epímero $3\alpha,5\alpha$ -LNG, compiten

eficientemente con el radioligando específico E_2 - 3H por los sitios activos de los RE (Figura 4), pero que la afinidad de unión relativa, así como la constante de inhibición al 50% del $3\beta,5\alpha$ -LNG y del $3\alpha,5\alpha$ -LNG, son significativamente menores que las del E_2 radioinerte empleado como control experimental (Tabla 1). Estos resultados sugieren que los efectos de tipo estrogénico del LNG reportados en la literatura (Van der Burg, 1991; Van der Burg y cols., 1992; Catherino y cols., 1993; Schoonen y cols., 1995a,b) podrían estar mediados por sus tetrahydro-derivados formados por la bioconversión enzimática del LNG en las células y tejidos en que han sido estudiados. Por otro lado, los datos obtenidos también son congruentes con los reportados para los derivados reducidos en el anillo A de otras progestinas sintéticas de la serie 19-nor como la noretisterona y el gestodeno (Chávez y cols., 1985; Lemus y cols., 2000).

En los mismos experimentos de competencia se demostró que el LNG y su derivado 5α reducido, el 5α -dihidro LNG, fueron incapaces de unirse a los RE aun a las máximas concentraciones utilizadas; estos resultados confirman lo informado por varios investigadores sobre la falta de unión del LNG a los RE (van Kordelaar y cols., 1975 a, b; Pollow y cols., 1989; Phillips y col., 1990; Lemus y cols., 1992) y amplían el conocimiento de que el 5α -LNG tampoco es capaz de unirse a los RE (Chávez y cols., 1985; Lemus y cols., 2000) y por lo tanto que los efectos de tipo estrogénico no pueden ser atribuidos a la acción de LNG *per se*, ni a su derivado 5α -reducido.

La unión de un esteroide a un receptor determinado no necesariamente se traduce en una respuesta de tipo agonista, por lo que los resultados obtenidos de la unión de los tetrahidros

$3\alpha,5\alpha$ y $3\beta,5\alpha$ de LNG no son suficientes para establecer que estos derivados sean los responsables de los efectos de tipo estrogénico atribuidos al LNG. La expresión de los efectos biológicos estrogénicos de los tetrahidros de LNG, se demostró en el sistema de levaduras co-transfectadas con el gen del receptor humano α de estrógenos, a través de la expresión de la β -galactosidasa. Los resultados demostraron que aun cuando la actividad de la β -galactosidasa fue estimulada por el $3\beta,5\alpha$ -tetrahidro LNG y en menor proporción por el $3\alpha,5\alpha$ -LNG, la potencia estrogénica y eficacia de los metabolitos de LNG en este sistema, en términos de la DE_{50} , que fueron de 524 nM para el $3\beta,5\alpha$ -LNG y de 1093 nM para el $3\alpha,5\alpha$ -LNG, son significativamente menores en comparación con la DE_{50} del E_2 de 0.70 nM. El LNG y su derivado 5α -LNG no fueron capaces de transactivar el gen de la β -galactosidasa en el sistema de levaduras, lo cual es congruente con la falta de unión de estos compuestos a los sitios activos de los RE, como se observó en los estudios de competencia. Los esteroides utilizados como controles experimentales negativos: pregnenolona, progesterona, testosterona y dihidrotestosterona, aun a las altas concentraciones empleadas, fueron incapaces de transactivar el sistema de levaduras no existiendo diferencia significativa con el vehículo (Figura 5).

Una mayor evidencia de que los efectos de tipo estrogénico de los metabolitos de LNG son mediados a través de los receptores intracelulares de estrógenos, se obtuvo en los experimentos en los que se estudió la acción inhibitoria del ICI-182,780 sobre la expresión de la β -galactosidasa inducida por el $3\beta,5\alpha$ -LNG en el modelo de expresión en levaduras. El ICI-182,780 solo, no fue capaz de inducir la transactivación de la β -galactosidasa, descartándose la posibilidad de la expresión de una actividad estrogénica agonista de este

antiestrógeno. La activación de la β -galactosidasa inducida por el $3\alpha,5\alpha$ -LNG o el $3\beta,5\alpha$ -LNG incubados simultáneamente con el antiestrógeno ICI-182,780 mostró una disminución significativa ($p < 0.005$) en comparación con la exhibida por los tetrahidros solos, en el modelo de levaduras co-transfectadas. La inducción de la actividad de la β -galactosidasa por el estradiol, utilizado como control positivo, fue inhibida eficientemente por el antiestrógeno. Aun cuando los efectos del E_2 y de ambos tetrahidros de LNG fueron inhibidos significativamente por el ICI-182,780 ($p < 0.005$), no se logró la abolición total de la actividad enzimática, lo cual puede ser atribuido a una baja permeabilidad del antiestrógeno en las levaduras, de acuerdo a como lo han señalado Lyttle y cols. (1992).

Recientemente, Mosselman y cols.(1996) y Kuiper y cols. (1996; 1997), demostraron en diferentes tejidos humanos, la presencia de un nuevo subtipo del receptor intracelular de estrógenos al cual denominaron receptor de estrógenos β (RhE β) para diferenciarlo del ya conocido, denominado como receptor de estrógenos α (RhE α). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis no permiten establecer si las acciones de tipo estrogénico ejercidas por los derivados $3\alpha,5\alpha$ -LNG y $3\beta,5\alpha$ -LNG son mediados a través del subtipo β del RE. Sin embargo, una publicación reciente de nuestro laboratorio demostró en células HeLa, transitoriamente co-tranfectadas con los genes del RhE α o del RhE β y con ERE fusionados al gen reportero de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT), que los tetrahidros $3\alpha,5\alpha$ y $3\beta,5\alpha$ del LNG fueron capaces de transactivar a la CAT a través del RhE α , pero no exhibieron ningún efecto mediado por el RhE β (García-Becerra y cols., 2002).

Los resultados de los experimentos en los que se adicionaron al sistema de levaduras los tetrahedros $3\alpha,5\alpha$ o $3\beta,5\alpha$ de LNG simultáneamente con etinil estradiol, no mostraron un efecto estrogénico sinérgico sino que el efecto observado fue el resultado de la suma de los efectos individuales de los tetrahedros y del EE_2 , lo cual sugiere que en las formulaciones anticonceptivas que contienen LNG y EE_2 , los efectos débiles de tipo estrogénico inducidos por los productos de la conversión metabólica del LNG ($3\alpha,5\alpha$ y $3\beta,5\alpha$ -LNG) no potencian las acciones estrogénicas del EE_2 .

La interacción del $3\beta,5\alpha$ -LNG con los RE, en los experimentos de competencia, así como los resultados obtenidos en el modelo de expresión en levaduras que demostraron que la actividad de tipo estrogénico del tetrahidro $3\beta,5\alpha$ -LNG es mediada a través de los RE, se confirmó en un modelo animal *in vivo*. En efecto, el derivado no fenólico $3\beta,5\alpha$ reducido del LNG administrado a dosis elevadas (2.5 mg/día/6 días) a las ratas hembras adultas castradas, incrementó notoriamente el contenido de los RP estrógeno-dependientes, en el citosol de la hipófisis anterior de los animales castrados. Este incremento en los RP, inducidos por el $3\beta,5\alpha$ -LNG, fue sin embargo, significativamente menor que el inducido por la administración de dosis pequeñas de benzoato de estradiol, empleado como control experimental. Los RP, inducidos tanto por el metabolito $3\beta,5\alpha$ -LNG como por el BE_2 , presentaron el mismo coeficiente de sedimentación de 7-9 unidades Svedberg en los gradientes lineales de sacarosa (Figura 8). Estos resultados demuestran que la actividad estrogénica del $3\beta,5\alpha$ -LNG, manifestada en el sistema celular de expresión en levaduras, se confirma en un modelo *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.

El análisis de todos los resultados obtenidos de la serie de estudios experimentales presentados en esta tesis, demuestra que los efectos genómicos de tipo estrogénico, observados después de la administración de grandes dosis de LNG, una progestina sintética de segunda generación, son mediados por dos de sus metabolitos reducidos en el anillo A de su molécula, el $3\beta,5\alpha$ -LNG y el $3\alpha,5\alpha$ -LNG, que interactúan con el $RhE\alpha$ y son capaces de activar genes dependientes de estrógenos.

11. CONCLUSIONES

- ❖ El tetrahidro $3\beta,5\alpha$ -LNG y en menor proporción el $3\alpha,5\alpha$ -LNG, interactúan específicamente con los sitios activos del RE con una afinidad de unión relativa notoriamente menor que la del E_2 .
- ❖ El LNG y su derivado 5α -LNG no son reconocidos por los sitios activos del RE.
- ❖ Los derivados reducidos $3\alpha,5\alpha$ y $3\beta,5\alpha$ de LNG, en el sistema de transactivación en levaduras son capaces de transactivar el gen de la β -galactosidasa a través del $RhE\alpha$ en este sistema de expresión.
- ❖ De acuerdo a la dosis media efectiva calculada, el derivado $3\beta,5\alpha$ -LNG es dos veces más potente que su isómero $3\alpha,5\alpha$ -LNG para transactivar el gen de la β -galactosidasa el sistema de expresión en levaduras, pero es 750 veces menos potente que el E_2 .
- ❖ El efecto de tipo estrogénico de los metabolitos reducidos en el anillo A del LNG observado en el sistema de expresión en levaduras, es un efecto genómico, ya que pudo ser inhibido por el antiestrógeno esteroidal ICI-182,780.
- ❖ El $3\beta,5\alpha$ -LNG a dosis elevadas es capaz de inducir los RP estrógeno-dependientes en la hipófisis anterior de la ratas hembras adultas castradas, aunque con una potencia menor que la del E_2 .

- ❖ Los resultados de todos los experimentos realizados en esta tesis, contribuyen a esclarecer el mecanismo por el cual el LNG administrado a grandes dosis induce efectos de tipo estrogénico, demostrando como sus derivados $3\beta,5\alpha$ -tetrahydro LNG y en menor proporción el $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydro LNG son los responsables de los efectos de tipo estrogénico atribuidos al LNG.

- ❖ Todos los resultados obtenidos del trabajo experimental de tesis confirman la hipótesis planteada.

12. BIBLIOGRAFÍA

Ba MG, Moreau JC, Sokal D, Dunson R, Dao B, Kouedou D, Diadhiou F. 1999. A 5-year clinical evaluation of Norplant[®] implants in Senegal. *Contraception* 59:377-381.

Ball MJ, Ashwell E, Gillmer MDG. 1991. Progestagen-only oral contraceptives: Comparison of the metabolic effects of levonorgestrel and norethisterone. *Contraception* 44: 223-233.

Bowers A, Ringold HJ, Denot E. 1958. Steroids. CI. 19-nordihydrotestosterone derivatives. *Journal American Chemical Society* 80:6115-6118.

Brache V, Faúndes A, Johansson E, Alvarez F. 1985. Anovulation, inadequate luteal phase and poor sperm penetration in cervical mucus during prolonged use of Norplant^R implants. *Contraception* 31:261-273.

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, Krifhnamurthy 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. *Journal American Chemical Society* 94:7159-7161.

Cabeza M, Vilchis F, Lemus AE, Díaz de León L, Pérez-Palacios G. 1995. Molecular interactions of levonorgestrel and its 5 α -reduced derivative with androgen receptors in hamster flanking organs. *Steroids* 60: 630-635.

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.

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 MC, Alvarado G, Canto-de-Cetina T, Bassol S, Oropeza G, Santos-Yung R, Valencia J, Palma Y, Fuziwara JL, Navarrete T, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G. 1997. A multicenter comparative study on the efficacy, safety, and acceptability of the contraceptive subdermal implants Norplant® and Norplant®-II. *Contraception* 55:359-367.

Croxatto HB, Díaz S, Salvatierra AM, Morales P, Ebensperger C, Brandeis A. 1987. Treatment with Norplant^R subdermal implants inhibits sperm penetration through cervical mucus in vitro. *Contraception* 36:193-201.

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 Y-C, Prusoff WH. 1973. Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* 22:3099-3108.

Darney PD. 1995. The androgenicity of progestins. *American Journal of Medicine* 98:Sup 1A, 104S-110S.

DelConte A, Loffer F, Grubb GS. 1999. Cycle control with oral contraceptives containing 20 µg of ethinyl estradiol. *Contraception*. 59:187-193.

Djerassi C, Miramontes L, Rosenkranz G, Sondheimer F. 1954. Steroids. LIV. Synthesis of 19-nor-17 α -ethynyltestosterone and 19-nor-17 α -methyltestosterone. *Journal American Chemical Society* 76:4092-4094.

Evans RW, Sholiton LJ, Leavitt WW. 1978. Progesterone receptor in the rat anterior pituitary: effect of estrogen priming an adrenalectomy. *Steroids* 31:69-81.

García-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Pérez-Palacios G, Larrea F. The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via estrogen-receptor α . *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1761(2002) 1-9. En prensa.

Garza-Flores J, Hall PE, Pérez-Palacios G. 1991. Long-acting hormonal contraceptives for women. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 40: 697-704.

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

Johannisson E, Brosens I, Cornillie F, Elder M, White J, Sheppard B, Hourihan H, d'Arcangues C, Belsey EM. 1991. Morphometric study of the human endometrium following continuous exposure to levonorgestrel released from vaginal rings during 90 days. *Contraception* 43: 361-374.

Jones EE. 1995. Androgenic effects of oral contraceptives: implications for patient compliance. *American Journal of Medicine* 98 Sup 1A:116S-119S.

Kato J, Onouchi T, Okinaga S. 1978. Hypothalamic and hipofhysial progesterone receptors: estrogen-priming effect, diferencial localization, 5 α -dihydroprogesterone binding, and nuclear receptors. *Journal of Steroid Biochemistry* 9:419-427.

Kloosterboer HJ, Vonk-Noordegraaf CA, Turpijn EW. 1988. Selectivity in progesterone and androgen receptor binding of progestagens used in oral contraceptives. *Contraception* 38:325-332.

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 α and β . *Endocrinology* 138: 863-870.

Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-Å. 1996. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:5925-5930.

Landgren B-M, Aedo A-R, Johannisson E, Cekan SZ. 1994. Studies on a vaginal ring releasing levonorgestrel at an initial rate of 27 $\mu\text{g}/24$ h when used alone or in combination with transdermal systems releasing estradiol. *Contraception* 50:87-100.

Lemus A E, 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. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 41: 881-890.

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

Littleton P, Fotherby K, Dennis KJ. 1968. Metabolism of [^{14}C]norgestrel in man. *Journal of Endocrinology* 42:591-598.

Lyttle CR, Damián-Matsumura P, Juul H, Butt TR. 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, Munguía R, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 2002. Hormone-like behavioral effects of levonorgestrel and its metabolites in the male rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 73:951- 961.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. 1996. ER β : identification and characterization of novel human estrogen receptor. *Federation of European Biochemical Societies* 392: 49-53.

Phillips A, Demarest K, Hahn DW, Wong F, McGuire JL. 1990. Progestational and androgenic receptor binding affinities and in vivo activities of norgestimate and other progestins. *Contraception* 41: 399-410.

Pollow K, Juchem M, Grill H-J, Elger W, Beler S, Henderson D, Schmidt-Gollwitzer K, Manz B. 1989. Gestodene: A novel synthetic progestin-characterization of binding to receptor and serum proteins. *Contraception* 40:325-341.

Reel JR, Humphrey RR, Shih Y-H, Windsor BL, Sakowski R, Creger PL, Edgren RA. 1979. Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biologic activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives. *Fertility and Sterility* 31:552-561.

Sang GW. 1994. Pharmacodynamic effects of once-a-month combined injectable contraceptives. *Contraception* 49:361-385.

Scatchard G. 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals New York Academy of Sciences* 51:660-672.

Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ. 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. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 55: 423-437.

Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ. 1995b. Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: II. T47D cell lines. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 55:439-444.

Sisenwine SF, Kimmel HB, Liu AL, Ruelius HW. 1973. Urinary metabolites of DL-norgestrel in women. *Acta Endocrinologica (Copenh)*73:91-104.

Sivin I, Stern J. 1994. Health during prolonged use of levonorgestrel 20 µg/d and the Copper TCu 380Ag intrauterine contraceptive devices: a multicenter study. *Fertility and Sterility* 61:70-77.

Smith H, Hughes GA, Douglas GH, Hartley D, McLoughlin BJ, Siddall JB, Wendt GR, Buzby GC Jr., Herbst DR, Ledig KW, McMenamin JR, Pattison TW, Suida J, Tokolies J, Edgren RA, Jansen ABA, Gadsby B, Watson DHR, Phillips PC. 1963. Totally synthetic (±)-13-alkyl-3-hydroxy and methoxy-gona-1,3,5(10)-trien-17-ones and related compounds. *Experientia* 19:394-396.

Spellacy WN, Buhi WC, Birk SA. 1976. The effects of norgestrel on carbohydrate and lipid metabolism over one year. *American Journal Obstetrics Gynecology* 125:984-986.

Spona J, Feichtinger W, Kindermann Ch, Wünsch C, Brill K. 1996. Inhibition of ovulation by an oral contraceptive containing 100 µg levonorgestrel in combination with 20 µg ethinylestradiol. *Contraception* 54:299-304.

Stanczyk FZ, Roy S. 1990. Metabolism of levonorgestrel, norethindrone, and structurally related contraceptive steroids. *Contraception* 42: 67-95.

Still WC, Kahan M, Mitra A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. *Journal Organic Chemistry* 43: 2923-2925.

Thau R, Jackanicz T. 1994. Contraceptive rings—A user-controlled long-acting method for family planning. En: PFA Van Look, G Pérez-Palacios (Eds.) *Contraceptive Research and Development 1984 to 1994. The road from Mexico City to Cairo and beyond*. Oxford University Press, Delhi, pp107-120.

Van der Burg B, Kalkhoven E, Isbrücker L, de Laat SW. 1992. Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells under growth factor-defined conditions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 42:457-465.

Van der Burg B. 1991. Sex steroids and growth factors in mammary cancer. *Acta Endocrinologica (Copenh.)* 125:38-41.

Van Kordelaar JMG, Broekman MMM, van Rossum JM. 1975a. Interaction of contraceptive progestins and related compounds with the oestrogen receptor. Parte I: effect on [³H]oestradiol distribution pattern in the ovariectomized rat. *Acta Endocrinologica (Copen.)* 78:145-164.

Van Kordelaar JMG, Vermorken AJM, de Weerd CJM, van Rossum JM. 1975b. Interaction of contraceptive progestins and related compounds with the oestrogen receptor. Parte II: effect on [³H]oestradiol binding to the rat uterine receptor in vitro. *Acta Endocrinologica Copenhagen* 78:165-179.

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. *Journal of Steroid Biochemistry* 24: 525-531.

Wakeling AE, Bowler J. 1992. ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43: 173-177.

White JO, Sullivan MHF, Patel L, Croxtall JD, d'Arcangues C, Belsey EM, Elder MG. 1991. Prostaglandin production in human endometrium following continuous exposure to low-dose levonorgestrel released from a vaginal ring. *Contraception* 43: 401- 412.

World Health Organization. Task Force on the Safety and Efficacy of Fertility Regulating Methods. 1990. The TCu 380A, TCu 220C, Multiload 250 and Nova T IUDs at 3, 5 and 7 years of use. Results from three randomized multicentre trials. *Contraception* 42:141-158.

**13. PUBLICACIÓN CIENTÍFICA DERIVADA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL
DE ESTA TESIS.**