

03081

9
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“ESTUDIO IN VITRO DEL MECANISMO DE ACCION DE LA
PROGESTERONA Y PROGESTINAS SINTÉTICAS A NIVEL DE
LA TRANSCRIPCIÓN: EN BUSQUEDA DE UN MODELO PARA
EL ESTUDIO DE LA REGULACION GENICA POR
HORMONAS ESTEROIDES”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BASICA
P R E S E N T A :

M. EN I.B.B. ANA MARIA PASAPERA LIMON

ASESOR: DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES

MEXICO, D. F.

1799

273021

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR-ZUBIRAN, Y EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA U.N.A.M., BAJO LA DIRECCION DEL DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES Y EL DR. JEAN FRANÇOIS SAVOURET DEL I.N.S.E.R.M. U 135, FRANCIA. CON FONDOS DEL CONACYT, PROYECTO No. 0925PM Y DE LA DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADEMICO PROYECTO No. IN215996 .

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de una manera muy especial al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes que con su actitud durante el desarrollo de este trabajo me dio el valor y el coraje para llegar a la culminación del mismo.

Agradezco también al los miembros de mi comité tutorial, Dr. Lino Díaz de León Hernández, en paz descanse, y en particular al Dr. Alejandro García Carrancá por sus atinados comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo y sobre todo por su amistad y apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Jean François Savouret que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A los Miembros del Jurado por su tiempo y dedicación en la revisión de esta tesis: Dr. Horacio Merchant Larios, Dra. Irma Villapando Fierro, Dr. Vicente Madrid Marina, Dr. Gerardo Gamba Ayala, Dra. Carmen Gómez Eichelman, Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

A mis amigos Elizabeth, Ivonne, Rubén, Christophe, Juanita, Adriana, Elena y Rocío con todo cariño.

A los compañeros del laboratorio que de una u otra manera contribuyeron a dar fin a este estudio.

A los integrantes del Laboratorio del Dr. Alejandro García Carrancá en especial a Miriam y Nestor por su ayuda incondicional.

Al CONACYT por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado.

Al PADEP por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

A Dios por darme la oportunidad de vivir la vida

A Juan, Anna Sofía e Ikrám Alejandra que son lo mas importante y la razón de mi vida.

A mis padres con un amor infinito y toda mi admiración.

A mis hermanos y sobrinos con todo mi cariño.

*A mi nueva familia : Gabriel, Leila, Leo, Andrés, Alex y Moro,
Gracias por su apoyo.*

“Eres lo que tu profundo y vigoroso deseo es. Como es tu deseo, es tu voluntad. Como es tu voluntad, son tus actos. Como son tus actos, es tu destino”.

Brihadaranyaka Upanishad IV.
4.5

INDICE

ORGANIZACIÓN DE LA TESISi

RESUMEN.....ii

CAPITULO PRIMERO

ESTUDIOS *IN VIVO* DE LOS EFECTOS PROGESTACIONALES Y/O ANTIPROGESTACIONALES DE LA NORETISTERONA A NIVEL DE LA TRANSCRIPCIÓN.

I. INTRODUCCIÓN1

1.1 LA PROGESTERONA.2

1.1.1 Síntesis y metabolismo de la progesterona2

1.1.2 Mecanismo de acción de la progesterona en órganos blanco
.....3

1.2 EL RECEPTOR DE LA PROGESTERONA

1.2.1 Características generales4

1.2.2 Clonación del ADNc del RP5

1.3 LA SUPERFAMILIA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES
.....6

1.3.1 Mecanismo general de acción de los receptores de hormonas
esteroides 8

1.3.2 Los receptores de hormonas esteroides como transactivadores ...9

1.3.3 Activación del receptor de progesterona13

1.3.4 Unión del receptor de progesterona al ADN14

1.3.5 Efectos de los receptores en la transcripción15

1.4 COACTIVADORES Y REPRESORES17

II. ANTECEDENTES19

2.1 LAS PROGESTINAS SINTÉTICAS20

2.1.1 Nomenclatura y Clasificación20

2.1.2 Progestinas con actividades progestacionales21

2.1.3 Progestinas con actividades estrogénicas21

2.1.4 Progestinas con actividades androgénicas21

2.2 ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS PROGESTINAS22

2.2.1 Derivados de un núcleo de pregnano	23
2.2.2 Derivados con núcleos del androstano y del estrano	24
2.2.3 Organos blanco y sistemas metabólicos afectados por las progesterina.....	25
2.3 CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PROGESTINAS	26
2.3.1 Efectos de las progesterinas sobre los receptores	27
2.3.2 Efectos de las progesterinas sobre los factores de crecimiento	28
2.3.3 Efectos de las progesterinas sobre algunos protooncogenes	28
2.4 PRINCIPALES USOS Y APLICACIONES DE LAS PROGESTINAS	29
2.4.1 Compensación de la deficiencia lutea	29
2.4.2 Protección del endometrio	30
2.4.3 Tratamiento del cáncer de mama	30
2.5 LOS ANTAGONISTAS HORMONALES	30
2.5.1 Mecanismo de acción de los antagonistas hormonales	31
2.5.2 La RU-486 como antiprogesterina	32
2.5.3 La Noretisterona y sus metabolitos	35
2.5.4 Los efectos estrogénicos de la Noretisterona (NET).....	35
2.5.5 El metabolismo de la NET.....	36
2.5.6 Los efectos de la NET sobre el gen de la Uteroglobina	38
III. OBJETIVOS DE LA TESIS	40

CAPITULO SEGUNDO

CARACTERIZACIÓN DE LAS REGIONES PROGESTERONA-REGULADAS LOCALIZADAS EN LA REGIÓN 5' DEL GEN DE LA UTEROGLOBINA (UG/CC10): EN BÚSQUEDA DE UN MODELO MOLECULAR PARA EVALUAR COMPUESTOS CON ACTIVIDAD PROGESTACIONAL.

IV. LA UTEROGLOBINA (UG/CC10)

4.1.1 La UG/CC10 como un marcador de actividad progestacional	42
4.1.2 Características generales de la UG/CC10	42
4.1.3 Fisiología de la UG/CC10	43
4.1.4 Regulación Hormonal de la UG/CC10	45
4.1.5 La UG/CC10 es una proteína regulada por progesterona	46
4.1.6 Regulación transcripcional de la UG/CC10	48

V. METODOLOGIA	51
5.1 Construcciones	52
5.2 Preparación y purificación del ADN plasmídico	55
5.3 Cultivos celulares	56
5.4 Transfección de vectores	56
VI. RESULTADOS	57
4.1 Evaluación de la actividad CAT de los vectores UG-TK CAT	58
6.2 Evaluación de la actividad CAT en relación a cantidad de ADN	59
6.3 Evaluación de la actividad CAT en relación al tiempo de incubación	59
6.4 Evaluación de la actividad transcripcional de los PREs de el gen UG/CC10 transfectados y estimulados con R 5020	60
6.5 Representación gráfica de las construcciones evaluadas	62
6.6 Resultados de los ensayos CAT en células T47-D	63
6.7 Resultados de los ensayos CAT en células CV1	64
VII. DISCUSION	69

CAPITULO TERCERO

VIII. CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO MOLECULAR *IN VITRO* PARA LA EVALUACIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD PROGESTACIONAL Y/O ANTIPROGESTACIONAL

Pasapera AM., García-Becerra R, García de la Mora GA, and Savouret JF. Characterization of a AGMK-CV1 cell line stably transfected with the rabbit progesterone receptor: A new model to study progestins and antiprogestins. Molecular and cellular Endocrinology enviado. 1999

IX. PUBLICACIONES CONCERNIENTES A ESTE ESTUDIO

Pasapera, A. M., Cerbón, M. A., Castro, I., Gutiérrez, R., Camacho Arroyo, I., García, G. A. and Pérez-Palacios, G. Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepuberal rabbits. Biology of Reproduction. Vol 52(2), 1995. pp. 426-432.....

Castro, I., Cerbón, M.A., Pasapera, A.M., Gutiérrez-Sagal, R., García, G.A., Orozco, C., Camacho-Arroyo, I., Anzaldúa, R., Pérez-Palacios, G. Molecular mechanisms of the antihormonal and antiimplantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. Mol. Reprod. Dev. Vol 40(2), 1995. pp. 157-163.....110

Pasapera AM, Camacho-Arroyo I, García GA, Savouret JF, Pérez-Palacios G and Cerbón MA. In vitro molecular assessment of the mechanisms of action of new contragestational agents. Archives of Medical Research S203-S207, 1995.....117

X. BIBLIOGRAFIA

CAPITULO PRIMERO:

ESTUDIOS *IN VIVO* DE LOS EFECTOS PROGESTACIONALES
Y/O ANTIPROGESTACIONALES DE LA NORETISTERONA A
NIVEL DE LA TRANSCRIPCION.

Organización de la tesis.

Esta tesis trata el estudio del modo de acción de las progestinas sintéticas derivadas de la 19-nor-testosterona, específicamente el de la noretisterona (NET), y consta de 3 partes. En la primera parte se presenta una introducción general, que incluye los datos más importantes sobre las progestinas sintéticas, haciendo énfasis en la NET. Incluye también los artículos originales derivados de esta investigación sobre los efectos hormonales de la NET *in vivo*, los cuales nos han dado la pauta para continuar con los estudios sobre el modo de acción molecular *in vitro* de las progestinas sintéticas y sus metabolitos y explicar así sus efectos hormonales y/o antihormonales, parte de los cuales conforman la segunda y tercera parte de la tesis.

En la segunda parte de la tesis se presenta la caracterización de varias regiones situadas delante del promotor del gen de la Uteroglobina (UG/CC10), proteína regulada por la progesterona (P_4) en el útero de la coneja, así como su participación en la regulación hormonal de éste gen por la P_4 y progestinas sintéticas. Se subclonaron en vectores reporteros varias secuencias de la región 5' del promotor del gen de la UG/CC10 que incluyeron las cuatro regiones descritas en la literatura como regiones hormono-reguladas. Se estudió su participación en la actividad transcripcional del vector en presencia de diversos tratamientos hormonales con el fin de encontrar la secuencia que serviría como modelo molecular para la evaluación de compuestos con actividad progestacional.

Los resultados iniciales obtenidos demostraron que las regiones estudiadas no se ajustan a los requerimientos para hacer el estudio *in vitro* de la regulación transcripcional por la P_4 y progestinas sintéticas, aún cuando la regulación de la transcripción *in vivo* de este gen en útero de la coneja, esta bajo el control de la P_4 . Los resultados obtenidos, así como otros estudios señalan que la regulación de la UG/CC10 por la P_4 es mucho mas compleja ya que el gen posee en su secuencia varios elementos de regulación muy importantes, diferentes de los elementos de respuesta a progesterona. Por otra parte, como la síntesis y secreción de la UG/CC1 son reguladas en el endometrio de una

manera específica de tejido y de circunstancias hormonales, es plausible pensar del requerimiento de factores de transcripción específicos del endometrio para obtener la expresión de este gen en sistemas *in vitro* tal y como sucede *in vivo*.

Como el objetivo de esta tesis fue el desarrollar un modelo que permitiera evaluar la actividad progestacional de las progestinas a nivel transcripcional, se procedió al diseño y construcción de un modelo molecular *in vitro* que consta de la generación de un vector que porta en su secuencia dos elementos de respuesta a P₄ sintéticos los cuales regulan la activación de la transcripción de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) como un gen reportero.

Con los resultados obtenidos utilizando este modelo pudimos evaluar el efecto hormonal de NET y sus metabolitos a nivel de la transcripción. Ahora se cuenta con un modelo molecular para evaluar de una manera más rápida y confiable los efectos progestacionales y/o antiprogestacionales de diferentes progestinas a nivel de la transcripción, ensayos que son de suma importancia para estudios posteriores, tanto de progestinas existentes en el mercado, así como de aquellas de nueva síntesis.

De esta tercera y última parte se presentan un artículo original y un manuscrito el cual esta en preparación para ser enviado a publicar en una revista de circulación internacional. De estos dos artículos se hace una discusión y se plantean los posibles estudios a futuro.

RESUMEN

La Noretisterona (NET) y el Levonorgestrel (LNG) son progestinas sintéticas ampliamente utilizadas como agentes anticonceptivos y en terapia hormonal. Ambos compuestos son biotransformados en tejidos blanco en metabolitos reducidos en el anillo A de su molécula, los cuales poseen diferentes propiedades biológicas. El objetivo de este estudio fue determinar los mecanismos moleculares a través de los cuales se llevan a cabo los efectos progestacionales y/o antiprogestacionales de NET, LNG y sus metabolitos reducidos. Para este propósito se caracterizó a la región 5' del gen de la UG/CC10 con el fin de localizar las regiones hormono-reguladoras y así utilizarlas en la construcción de un modelo *in vitro* que permitiera evaluar la actividad hormonal de diferentes progestinas a nivel de la transcripción.

Así mismo se obtuvo un ensayo molecular *in vitro*, altamente eficiente basado en la detección de la expresión de un gen reportero [la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT)] cuya transcripción es regulada por dos elementos de respuesta a progesterona (PRE₂) insertados en la región promotora delante de la caja TATA (PRE₂-TATA-CAT). Se utilizó como línea celular la CV-1 la cual es derivada de riñón de mono, y no poseen receptores a hormonas esteroides. Estas células fueron cotransfectadas con un vector de expresión que codifica para el receptor de progesterona y el vector reportero PRE₂-TATA-CAT. Los datos obtenidos usando este modelo demostraron que NET y LNG poseen una fuerte actividad progestacional ya que inducen la actividad CAT de una manera similar a la de la potente progestina R5020. Los metabolitos de NET y LNG exhiben una actividad progestacional débil; aunque el metabolito 5 α -NET, cuando es simultáneamente administrado con una progestina como el R5020, presenta un fuerte efecto antiprogestacional, similar al presentado por el RU486 .

Con los resultados aquí presentados se muestra claramente que los efectos hormonales que presentan NET y LNG así como sus metabolitos, se llevan a cabo a nivel de la transcripción, y que el uso de sistemas de transfección *in vitro* de vectores quiméricos que portan en su secuencia los elementos de regulación hormonal (PREs) unidos a un gen reportero proporciona un excelente modelo molecular que permite evaluar el efecto hormonal o antihormonal de diversos compuestos a nivel de la transcripción.

SUMMARY

Norethisterone (NET) and Levonorgestrel (LNG) are synthetic progestins that have been widely used as contraceptive agents and in hormonal therapy. Both compounds are biotransformed in target tissues to their A-ring reduced metabolites, which possess different biological effects. The purpose of this study was to determine the molecular mechanisms that would explain the progestational and/or antiprogestational effects of NET, LNG and their reduced metabolites. The 5' region of the UG/CC10 gene was characterized to locate the hormone-regulatory regions so they could be used in the construction of an *in vitro* model that would allow the assessment of the hormonal activity of various progestins at the transcription level.

Thus, a highly efficient *in vitro* molecular assay was obtained, based upon the detection of the expression of a reporter gene (the enzyme Chloranphenicol-Acetyl-Transferase (CAT)), whose transcription is regulated by two progesterone-responsive elements (PRE₂) inserted upstream in the promoter region (TATA box) (PRE₂-TATA-CAT). A cell line obtained from the monkey's kidney (CV-1) was used because of its lack of steroid hormone receptors. These cells were cotransfected with an expression vector which encodes for the progesterone receptor, and with the reporter gene PRE₂-TATA-CAT. The data obtained using this model demonstrated that NET and LNG possess a strong progestational activity, because they induce CAT activity in a similar fashion as the potent progestin R5020.

The NET and LNG metabolites exhibit a weak progestational activity; nevertheless, metabolite 5 α -NET, when administered simultaneously with a progestin such as R5020, presents a strong antiprogestational effect, similar to that of RU486. The results here presented clearly demonstrate that the hormonal effects shown by NET, LNG and their metabolites, are exerted at the transcription level; and that the use of *in vitro* transfection systems of chimeric vectors that carry in their sequence the hormone responsive elements (HREs) bound to a reporter gene, provides an excellent molecular model that allows the assessment of the hormonal or antihormonal effect of different compounds at the transcription level.

INTRODUCCION

LA PROGESTERONA

Síntesis y metabolismo de la progesterona.

La progesterona (P_4) es la progestina natural más importante secretada por la mujer a lo largo de su vida reproductiva. En los mamíferos, la P_4 es la hormona responsable de la preparación morfofuncional del endometrio para la nidación del huevo fertilizado, el mantenimiento de la gestación y el desarrollo alveolar de la glándula mamaria, evento esencial para el proceso de la lactancia (Graham y Clarke, 1997).

La estructura química básica de la P_4 y sus derivados hidroxilados y/o reducidos (progestinas naturales) es la del hidrocarburo pregnano, constituido por 21 átomos de carbono. Los principales órganos de producción de P_4 son el cuerpo lúteo del ovario y la placenta. La corteza suprarrenal y el testículo también biosintetizan P_4 aunque como intermediario en la formación de otras hormonas esteroideas (Hicks *et al.*, 1988) (Fig. 1).

La molécula de P_4 , una vez que ha sido sintetizada, puede servir como sustrato para la síntesis de un grupo de compuestos conocidos como progestinas naturales. Este proceso se realiza a través de cambios estructurales mediados por la acción de sistemas enzimáticos, localizados tanto en los órganos esteroideogénicos como a nivel de los órganos blanco (sensibles a P_4). Las modificaciones enzimáticas de la P_4 modulan su actividad biológica intrínseca y ocurren fundamentalmente en los anillos A y D, así como en la cadena lateral (figura 1). Las progestinas reducidas en el C-5, particularmente las 5β -progestinas (dihidro-derivados), tienen una gran potencia anestésica mientras que los compuestos reducidos en el C-5 y en el C-3 (tetrahydro-derivados) modulan el funcionamiento del aparato neuronal relacionado con la síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (LH-RH) (Kim *et al.*, 1989; Romano *et al.*, 1989).

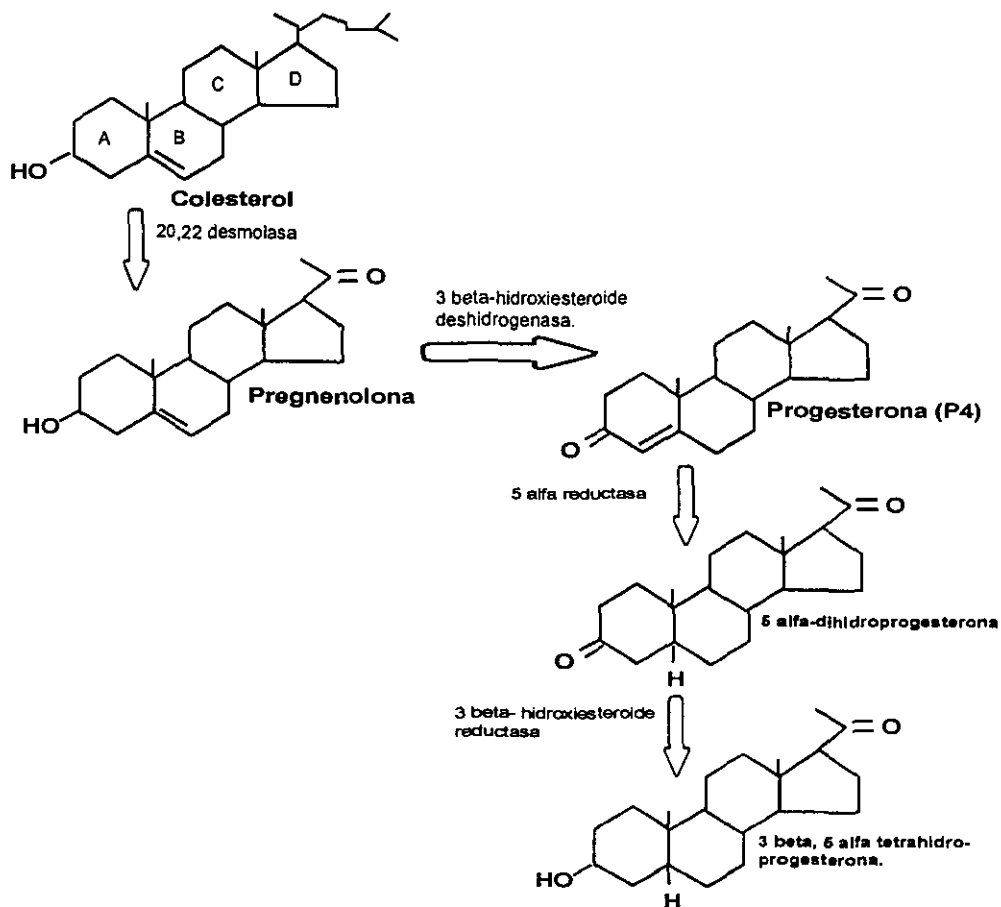


Figura 1. Biosíntesis de la progesterona (P₄) a partir del colesterol y formación de progestinas naturales reducidas en el anillo A (dihidro y tetrahidro derivados) a partir de P₄.

Mecanismo de acción de la progesterona en órganos blanco.

Los órganos principales donde actúa la P₄ son el útero, la glándula mamaria, y el cerebro (Camacho-Arroyo *et al.*, 1995, Graham y Clarke, 1997). La P₄ actúa en las células blanco vía un receptor nuclear conocido como receptor de progesterona (RP).

Las células que son blanco de acción de la P₄, como el útero, que antes se mencionó, sufren un aumento en la cantidad de RP inducido por la acción de los estrógenos, de tal forma que estas células son así preparadas para responder al estímulo de la P₄ después de la ovulación. Dado que el incremento en las concentraciones de la P₄ en el plasma es el responsable de la falta de

ovulación en el embarazo, vía un sistema de retroalimentación negativo en el eje hipotálamo-hipófisis-gonada, éste efecto inhibitor descrito desde hace muchos años, fue la base y principio de la creación de muchos de los anticonceptivos que contienen un análogo de la P_4 (una progestina) (Bardin *et al.*, 1983).

EL RECEPTOR DE LA PROGESTERONA

Características generales del RP

El RP es una proteína nuclear con un peso aproximado de 225 kDa en su forma inactiva (8s) y de 110 kDa en su forma activada (4s), la presencia de este receptor en las células de un órgano blanco ha sido reportada, y ésta se ve incrementada por el aumento preovulatorio de los estrógenos (Bayard *et al.*, 1978). Los RPs han sido aislados a partir de oviducto de pollo (Sherman *et al.*, 1970, Toft y O'Malley, 1972) y de endometrio de mamíferos (Milgrom y Baulieu, 1970). Posteriormente éstos fueron caracterizados y se observó que la inducción de la síntesis de éstos RP estaba regulada por los estrógenos (Milgrom *et al.*, 1973; Leavitt *et al.*, 1974) explicando la elevación de los niveles de RP durante la fase folicular. Por otra parte se ha demostrado que un medio ambiente hormonal dominado por P_4 , resulta en una disminución en las concentraciones de su propio receptor, concepto que es apoyado por las bajas concentraciones de RP encontradas en el embarazo, así como en el endometrio de mujeres que reciben anticonceptivos orales (Aufrere y Benson, 1976).

La purificación del RP permitió la preparación de anticuerpos monoclonales contra esos receptores (Milgrom, 1985), hecho que condujo a la preparación del ADN complementario (ADNc) del RP. Esas herramientas moleculares constituyen la base de la caracterización de las propiedades de estos receptores, su talla, su distribución subcelular, así como la caracterización de sus ARNs mensajeros.

Clonación del ADNc del RP.

Los ADNc del RP de conejo (rRP) de pollo y del humano (hRP) (Loosfelt *et al.*, 1986, Misrahi *et al.*, 1987) ya han sido clonados y caracterizados, los cuales fueron obtenidos tanto de tejido uterino como de líneas celulares ya establecidas como la T47.D para el humano. Los ADNc del RP de pollo (cRP) fueron obtenidos de igual forma por otros grupos (Conneely *et al.*, 1986, Jelich *et al.*, 1986, Gronemeyer *et al.*, 1987)

Las secuencias primarias del hRP, del rRP y del cRP están constituidas respectivamente de 933, 930 y 786 aminoácidos (Figura 2). La homología de la región básica rica en residuos de cisteínas que constituye el dominio de unión al ADN (residuos 567-644 para el hRP) es del 100% entre las tres especies, y la homología global es del 83.3% entre el hRP y el rRP, sin embargo es menos importante entre el conejo y el pollo. La región amino terminal diverge totalmente entre las tres especies.

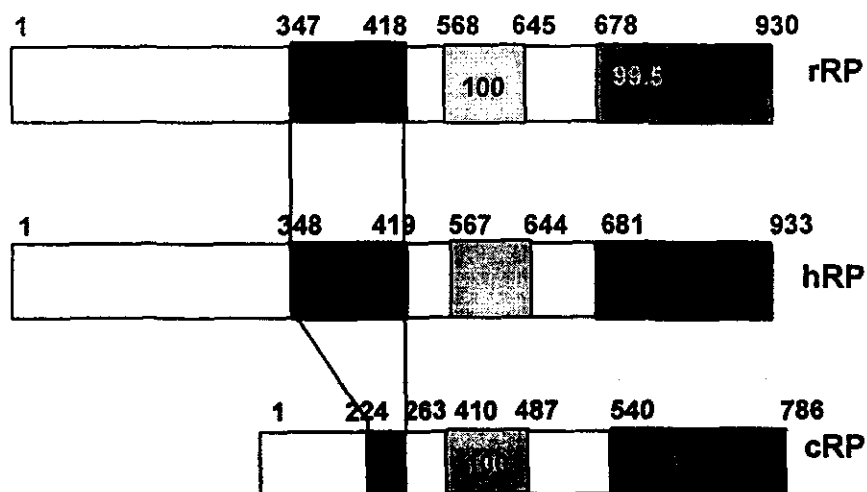


Figura 2. Comparación de las secuencias primarias de los receptores de progesterona entre especies. Las secuencias primarias de los receptores de progesterona humano (hRP), conejo (rRP) , y pollo (cRP), fueron alineados de acuerdo a su dominio de unión al ADN, y los porcentajes de homología han sido calculados en relación al receptor humano (Chaucherau, 1993)

Hoy en día los sistemas de expresión que emplean los ADNc del RP en líneas celulares inmortalizadas son muy utilizados en el estudio del modo de acción

del RP, ya que éste tipo de sistemas permite abordar la regulación que ejercen estos receptores de hormonas esteroides a nivel molecular.

LA SUPERFAMILIA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES

El RP pertenece a una superfamilia de factores transcripcionales trans-activadores y se encuentra en el genoma de los mamíferos como una sola copia y en el humano se localiza en el cromosoma 13. Dentro de esta familia de receptores nucleares están comprendidos todos los receptores a hormonas esteroides los cuales incluyen a los rademás de los receptores a la progesterona (PR), a los receptores a los estrógenos (ER), a los andrógenos (AR), a los glucocorticoides (GR), a los mineralocorticoides (MR), y a la vitamina D (VDR), así como a los receptores a hormonas tiroideas (RT), y a los retinoides (RARs y RxRs) (Evans, 1988; Béato, 1989; Jensen, 1991; Lazar, 1993; Giguère, 1994). Existe un cierto número de factores transcripcionales conocidos como receptores huérfanos los cuales también están incluidos en esta familia, estos factores han sido clonados por hibridación cruzada, e incluyen el factor COUP-TF, el receptor de la dioxina (RAh; Dension *et al.*, 1986; Hapgood *et al.*, 1989) así como los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR); (Isseman y Green, 1990; Dreyer *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1993, Poellinger, 1992); para ninguno de estos receptores, ningún ligando fisiológico ha sido descrito (tabla 1).

<u>I. RECEPTOR</u>	<u>LIGANDO</u>
GR	Glucocorticoides
PR	Progesterona
MR	Mineralocorticoides
AR	Andrógenos
ER	Estrógenos
VDR	1,25 dihidroxyvitamina D3
TR alfa	Hormona tiroidea T3
TR beta	Hormona tiroidea T4
RAR alfa	Acido retinoico
RAR beta	Acido retinoico
RAR gamma	Acido retinoico
RXR alfa	isómero 9-cis del ác. retinoico
RXRβ/H-2RIIBP	isómero 9-cis del ác. retinoico
RXR gamma	isómero 9-cis del ác. retinoico
EcR	Ecdisona

2. RECEPTORES HUERFANOS

EAR-1: v-erbA related receptor 1
 EAR-2: v-erbA related receptor 2
 COUP/EAR-3: Chicken Ovalbumin upstream promoter transcription factor.
 ERR-1: Estrogen receptor related receptor 1
 ERR-2: Estrogen receptor related receptor 2
 HFN4: Hepatocyte nuclear factor 4
 SVP: Sevenup
 USP: Ultraspiracle
 E75: Gen inductible por la ecdysona (locus 75B)
 FTZ-F1: Factor implicado en la activación del gen fushitaratzu (ftz).
 TLL: Tailless
 KNI: Knirps
 KNRL: Knirps related
 EGON: Embryonic gonad
 AhR: Receptor de la dioxina
 PPAR: Receptor activado por los proliferadores de peroxisomas.

Tabla 1: FAMILIA DE LOS RECEPTORES NUCLEARES. La lista 1 comprende a los receptores cuyos ligandos fisiológicos han sido identificados. La lista 2 comprende a los receptores huérfanos, para los cuales ningún ligando fisiológico ha sido identificado a la fecha. Los receptores huérfanos SVP, USP, E75, FTZ-F1, TLL, KNI, KNRL y EGON pertenecen a la *Drosophila Melanogaster*, al igual que EcR. Los restantes pertenecen a los vertebrados.

Aún cuando no está del todo esclarecido en mecanismo de acción de los receptores a hormonas esteroides, los resultados de diversos estudios coinciden en que el mecanismo clásico por el cual las hormonas esteroides ejercen sus efectos podría esquematizarse de la siguiente manera:

Mecanismo general de acción de los receptores de hormonas esteroideas

Cuando una hormona viaja a través del torrente sanguíneo y ésta alcanza a su vez a su órgano blanco, la unión del ligando (hormona) al receptor provoca la transformación y activación del mismo receptor, activación que se caracteriza por que el receptor es liberado de las proteínas asociadas al él (estas incluyen entre otras a las proteínas de choque térmico HSP90, p23 y otras) que normalmente lo mantienen en un estado "inactivo". Posterior a esta activación inicial, el receptor adquiere una mayor afinidad por secuencias específicas reguladoras, o elementos de respuesta hormonal (HRE), dentro del ADN, que son quienes finalmente controlan la regulación de la expresión de los genes blanco (Beato y Schütz, 1996)

Los HRE se caracterizan por ser regiones dentro del ADN de 5 a 6 pares de bases, en repeticiones directas o inversas (Martínez y Whali, 1991; Umesono *et al* 1991). La unión de los receptores a estas secuencias permite entonces la activación del promotor y la expresión del gen que las contiene, de tal forma que el receptor puede interactuar con el resto de la maquinaria de transcripción (Béato, 1989; O'Malley, 1990, Katzellenenboge y Katzelenengogen, 1996).

Hay datos en la literatura que demuestran que una vía que utilizan los receptores a hormonas esteroideas para activar la transcripción de un gen que posee un promotor con HREs presentes, es a través de su interacción directa con la maquinaria basal de transcripción, sin embargo, la mayoría de los genes responsivos a estas hormonas poseen promotores complejos, los cuáles poseen sitios de unión tanto para receptores a hormonas esteroideas como para otros factores de transcripción que en conjunto y orquestados por los factores de transcripción tejido-específicos son los responsables de la expresión específica de los genes.

Los receptores a hormonas esteroideas como transactivadores.

Gracias a la clonación de genes o de los ADNc codantes para los diferentes receptores se ha logrado un gran avance en la comprensión de la estructura y de

la función de estos receptores (PR: Loosfelt *et al.*, 1986; Misrahi *et al.* 1987; Gronemeyer *et al.*, 1987; ER: Walter *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1986; Krust *et al.*, 1986; GR: Weinberger *et al.*, 1985; Hollenberg *et al.*, 1985; MR: Ariza *et al.*, 1987; AR: Tan *et al.*, 1988; Lubahn *et al.*, 1988; VDR: Mc Donnell *et al.*, 1987; Baker *et al.*, 1988; TR: Weinberger *et al.*, 1986; revisión: Lazar, 1993; RAR: Petkovitch *et al.*, 1987; Leroy *et al.*, 1991; Zelent *et al.*, 1991; RXR: Y *et al.*, 1991; Leid *et al.*, 1992 revisión Giguère, 1994). Haciendo una comparación de secuencias proteínicas entre los diferentes receptores, y en base a los estudios funcionales basados en mutagénesis dirigida ya sea de tipo de inserción (Giguère *et al.*, 1986), puntuales o de delección (Kumar *et al.*, 1986; Gronemeyer *et al.*, 1987; Kumar *et al.*, 1987; Rusconi y Yamamoto *et al.*, 1987; Kumar y Chambon., 1988; Guiochon-Mantel *et al.*, 1988; Fawell *et al.*, 1990a; Jenster *et al.*, 1991; Dahlman-Wright *et al.*, 1992; Dahlman-Wright *et al.*, 1994) y de receptores quiméricos (Green y Chambon, 1987; Kumar *et al.*, 1987; Petkovitch *et al.*, 1987; Hollenberg y Evans, 1988; Webster *et al.*, 1988; Danielsen *et al.*, 1989; Eul *et al.*, 1989; Zilliacus *et al.*, 1992) es como se han descrito a estas proteínas, que por compartir ciertas características funcionales y estructurales se les ha designado como pertenecientes a "la familia de los receptores nucleares" (Evans, 1988).

La caracterización de estos receptores ha determinado la presencia de 6 dominios funcionales discretos A/B, C, D, E y F (figura 3). La región N-terminal (A/B) es la menos conservada entre esta familia de receptores y posee principalmente una función transactivadora. A la fecha no está totalmente determinado cual es el papel de esta región en la transactivación ejercida por estos receptores, pero lo que sí está demostrado es que esta región es determinante en el proceso de la activación de la transcripción génica, en un contexto célula y promotor específico.

La región central de los receptores, que es una región pequeña (-70 a 80 aa) presenta el dominio C, el más conservado entre éstos. Este dominio está conformado por una estructura de "hélice-vuelta-hélice" la cual contiene en su núcleo 2 átomos de zinc y cuatro cisteínas al inicio de cada hélice, formando una especie de "dedos de zinc". Ya está demostrado que son tres residuos de aminoácidos localizados al inicio de cada hélice los responsables del reconocimiento de los HREs.

Los HREs son secuencias de ADN que consisten en dos repeticiones de 5 o 6 pares de bases formando palíndromes imperfectos separados por un número específico de bases (Kumar y Chambon, 1988, Fawell *et al.*, 1990, DeMarzo *et al.*, 1990), para el caso del elemento de respuesta a progesterona (PRE) son 3 pares de bases las que separan a cada repetición de tal manera que el RP reconoce la secuencia consenso AGNACA nnn TGTNCT, que también es reconocida por el RA y el RG (Beato M, 1989). El mecanismo de reconocimiento específico de secuencia no es claro, sin embargo existen ahora grandes contribuciones de los estudios de cristalografía de rayos X y mutagénesis dirigida, que han puesto en evidencia que el DBD del RP, así como de los otros receptores a hormona esteroides esta en complejo con el ADN en forma antiparalela, además proponen funciones específicas de cada dedo de zinc en estas interacciones (Danielsen *et al.*, 1989; Luisi *et al.*, 1991; Umesosno *et al.*, 1989). El primer dedo de zinc está involucrado en el reconocimiento específico del HRE, confiriendo de esta manera la especificidad a los receptores, el segundo dedo de zinc, estabiliza de alguna manera unión del receptor al ADN a través de su unión directa a la estructura de bases del ADN además de también estar involucrado con la dimerización de los receptores a través de una región llamada CAJA-P (Dahlman-Wright *et al.*, 1991; Freedman *et al.*, 1992, Langley *et al.*, 1997). Varios estudios basados en movilidad electroforética y geles de retardo han mostrado que la unión del ligando es indispensable para que ocurra la unión al ADN por parte de algunos receptores (Karvonen *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1993).

El dominio de bisagra se encuentra entre el DBD y el dominio de unión al ligando, al rededor de los aminoácidos 627 y 670. El papel de la región de bisagra se ha dirigido hacia la localización nuclear (Zhou *et al.*, 1994). Esta región también posee sitios de fosforilación importantes par la activación transcripcional de los receptores.

Por último, la región carboxilo-terminal la cual contiene el sitio de unión al ligando, además de poseer un cierto número de otras funciones como lo son la interacción con proteínas de choque térmico, dimerización y una actividad transactivadora dependiente del ligando, ésta región se encuentra muy poco

conservada además de ser hipervariable en longitud (Katzellenbogen y Katzellenbogen, 1996).

Los estudios de cristalografía de los RE , RAR , RXR y de hormonas tiroideas presentan en esta región una bolsa hidrofóbica donde se une el ligando. Se presentan datos donde se observa que después de la unión del ligando, ocurre entonces un cambio conformacional en el cual la hélice de 12 de la región carboxilo-terminal pasa hacia arriba para así cubrir la cavidad de unión al ligando y estabilizar la unión al ligando por el receptor (Wagner et al., 1995; Renaud et al., 1995; Brzozowski et al., 1997) .

Muchos de los receptores a hormonas esteroides así como de otros miembros de la superfamilia de los receptores nucleares han demostrado presentar una activación importante dependiente del ligando, la cual ha sido designada AF-2 o τ c (Tau 4)(Banahmad *et al.*, 1995; Barettino *et al.*, 1994; Danielian *et al.*, 1992; Durand *et al.*, 1994), la cual está localizada en la región carboxilo-terminal del dominio de unión al ligando (dominio E) y ésta parece estar modulada por una familia de coactivadores transcripcionales los cuales se unen a la región AF-2 de una manera dependiente del ligando provocando un incremento en la transcripción. La contribución de los dominios de activación AF-1 y AF-2 en la activación transcripcional de los receptores varía extremadamente entre los diferentes receptores. Cabe señalar que muchos de los receptores nucleares no poseen una función poderosa AF-1, además de que esta región no esta conservada entre los receptores, por lo cual, el reclutamiento de coactivadores de AF-2, pareciera ser un paso crítico y conservado en la activación de la transcripción de los receptores nucleares dependiente del ligando.

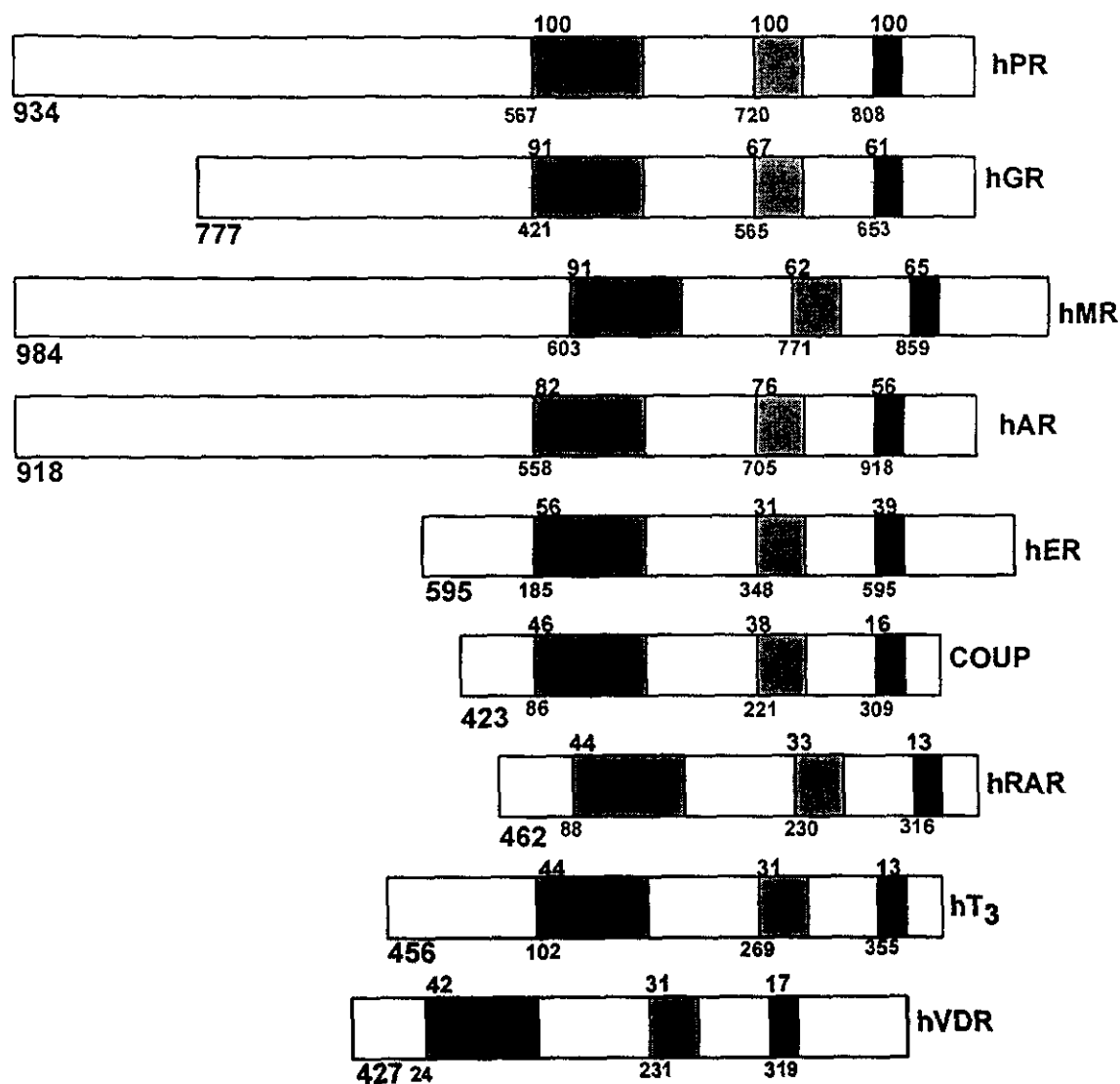


Figura 3. Estructuras de los receptores nucleares y homologías. La región marcada en gris oscuro posee la secuencia con la mayor homología entre los receptores, y corresponde a la región de unión al ADN, y que se caracteriza por poseer una estructura de dedos de zinc. Las otras 2 regiones (gris claro y negro) que se encuentran en la región carboxilo terminal, son de naturaleza hidrofóbica la cual incluye la AF-2. La región N-terminal es una región hipervariable de un receptor al otro e incluye a la AF-2. Los números escritos arriba de cada región conservada indican el porcentaje de homología de la secuencia proteínica en relación al hPR. El número a la izquierda de cada receptor indica el número de aa. La posición del primer aa de cada una de las regiones conservadas esta indicado debajo de cada región (Cohen-Solal, 1994).

Activación del RP.

Como primeramente se mencionó, por lo general, en ausencia de ligandos específicos, los receptores a esteroides son inactivos *in vivo*. La adición de la hormona resulta en una transformación rápida del receptor inactivo a un estado activo, en el cual, el receptor se vuelve más pequeño (de 8s a 4s). Este proceso ha sido referido como activación o transformación. Antes de la activación por la hormona, el receptor esteroide forma complejos oligoméricos los cuales no se unen al ADN. Se propone que éste estado inactivo, se mantiene por asociación del receptor a otras proteínas. Algunas de las proteínas que han sido propuestas para ser componentes del complejo oligomérico con el RP son las proteínas 90 KDa, proteína de choque térmico (HSP 90) (Cadepond *et al.*, 1991; Callebaut *et al.*, 1992) y p59 (Tai *et al.*, 1992). Estas proteínas han sido también encontradas en complejos con los RG, RM, RE, y RA forma hetero-oligomérica. Se ha observado que cuando se forma el complejo con HSP90 y/o p59 con los RPs o los receptores de glucocorticoides, los receptores no pueden unirse al ADN. El tratamiento del complejo oligomérico del receptor con sales u hormonas *in vitro* resulta en la disociación del mismo para producir un receptor que puede ser activo y unirse al ADN (Beato y Sánchez, 1996).

En el caso particular del RP, éste interactúa con dos moléculas de HSP90 que son liberadas en presencia de su ligando (P_4), quedando así el receptor activado el cual se une como un dímero a los elementos de respuesta a P_4 (PRE). (Landers y Spelsberg 1992, Christensen *et al.*, 1991, Carson-Jurica *et al.*, 1990) (Figura 4)

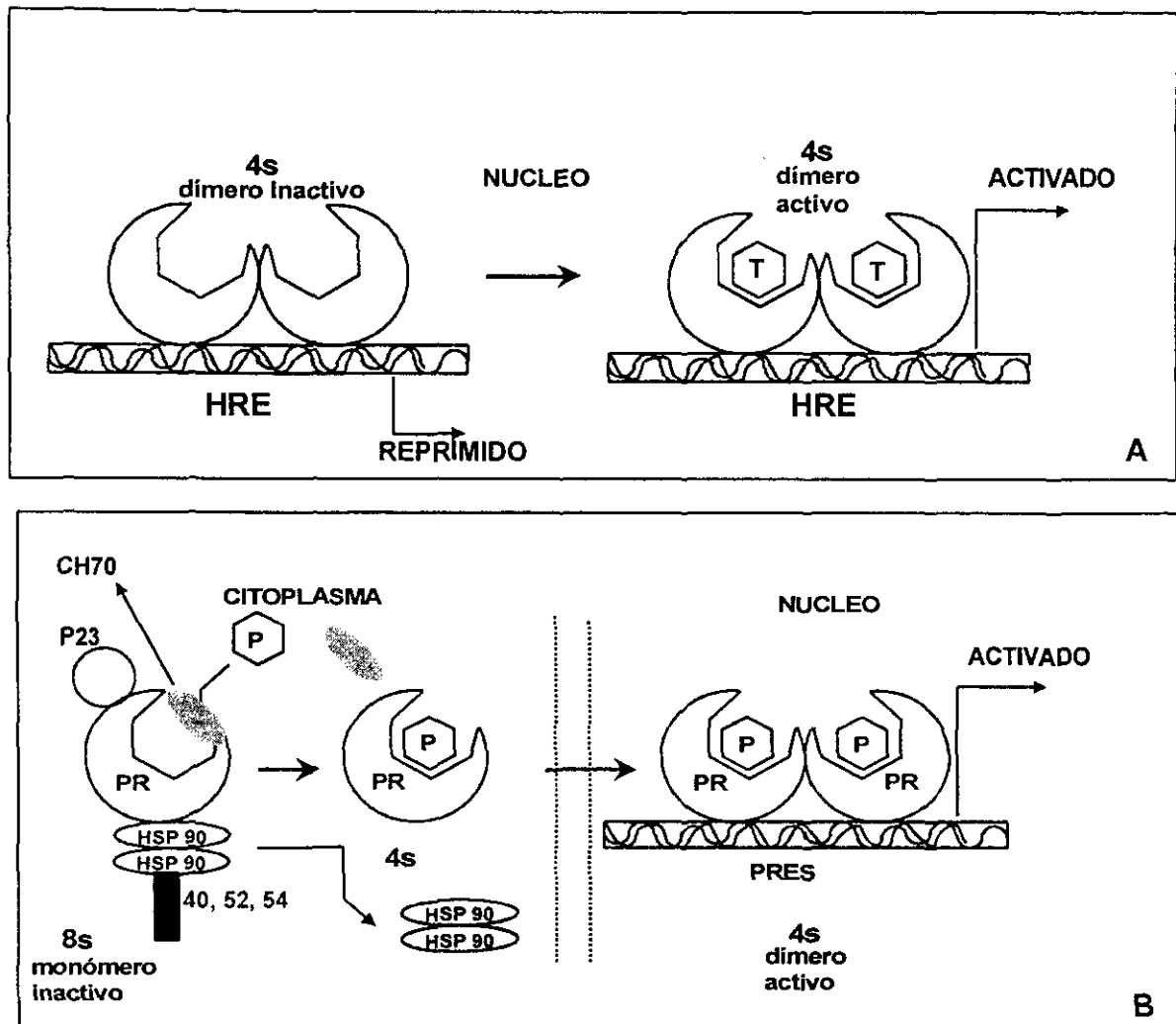


Figura 4. Activación del RP. La localización subcelular del receptor antes de unirse al ligando, puede afectar la vía moduladora de la transcripción. A. Los receptores para agentes no esteroideos no unidos a su ligando como los receptores a hormonas tiroideas o al ácido retinoico se unen típicamente como dímeros a su elemento de respuesta (HRE) aun en ausencia de ligando, y pueden actuar como represores sin ligando, o como activadores transcripcionales en presencia de ligando. B. Algunos de los receptores para hormonas esteroideas como el RP, o el RG, pueden estar en el citoplasma (no necesariamente para el RP) como grandes monómeros unidos a proteínas de choque térmico (HSP 90 y p23) a chaperoninas (70) e inmunofilinas (40, 52, 54) es este estadio no afectan la transcripción. Cuando el ligando, en este caso la P_4 , se une al RP, este es liberado de ese complejo oligomérico y el receptor activado se une como dímero (puede ser AA, AB o AB) a los elementos de respuesta a P_4 (PRES) y activa la transcripción (Katzelenbogen y Katzelenbogen, 1996)

Unión del RP al ADN

El paso posterior a la unión de la P_4 a su receptor, es el cambio conformacional que sufre este receptor, resultando en la liberación de HSP90 (la cual está unida en una región cercana al dominio de unión al ligando (LBD), provocando

cambios en la región LBD). De ésta forma los receptores se convierten en activadores transcripcionales, que a su vez pueden interactuar con otros factores de transcripción, desencadenando así al inicio de la transcripción de un gen que contiene elementos de respuesta a estos receptores (HRE) dentro de las secuencias aledañas al promotor (Beato M, 1989).

En ciertos casos las hormonas esteroides regulan negativamente la expresión de los genes por un proceso que implica ya sea una competencia por la unión al ADN entre el receptor y otro factor de transcripción donde el sitio de unión engloba a los HREs, o por contacto proteína-proteína con los diferentes factores que no se unen al ADN (Akerblom *et al.*, 1988, Oro *et al.*, 1988, Sakai *et al.*, 1998).

Es importante hacer notar que los efectos de los diferentes factores de transcripción sobre diferentes promotores ensayados *in vitro* son muy dependientes de la línea celular utilizada en el ensayo o ensayos de transfección, y son probablemente el reflejo de la abundancia relativa de esos diferentes factores en las células (Strähle *et al.*, 1988).

Efectos a nivel de la transcripción

La regulación de la transcripción génica es un proceso esencial para la acción de las hormonas esteroides. A principios de los años 60s, se estableció la importancia que tenían los efectos hormonales sobre la síntesis de proteínas precedida por un incremento en la síntesis de RNA (Mueller *et al.*, 1958). En los últimos veinte años, gracias a los avances técnicos en el cultivo de células, en la síntesis de RNA y secuenciación de ácidos nucleicos, interacciones de receptores, estructura de la cromatina, e interacciones ADN-receptores, han permitido un gran adelanto en el estudio y comprensión de los mecanismos de acción hormonal.

La regulación de la transcripción de genes por los receptores, es generalmente estudiada a través de una medición de la tasa de transcripción de un plásmido recombinante, que contiene elementos de respuesta hormonal (HRE),

acoplados a un gen reportero, que codifica por lo general para una enzima bacteriana o de insecto. De tal manera que la cantidad de enzima sintetizada permite visualizar la regulación de la transcripción ejercida por los complejos ligando-receptor que unidas a una secuencia de regulación integrada en promotor, estimulan la transcripción (Beato et al., 1996).

Los estudios moleculares del RP han podido demostrar la presencia de dominios funcionales implicados en las diferentes funciones del RP como factores de transcripción, los cuales están indicados en la figura 5 y han sido descritos anteriormente.

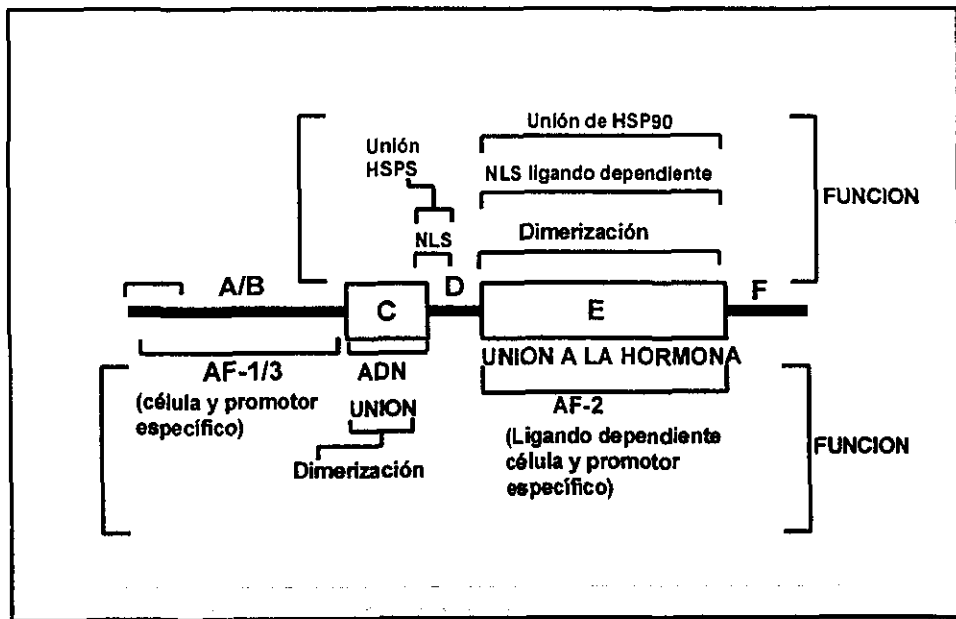


Figura 5. Estructura esquemática y partes funcionales del RP. Las funciones de los tres principales dominios funcionales del RP se indican en ésta figura. Estos tres dominios funcionales son el dominio N-terminal (A/B), el dominio de unión al ADN (C) y el dominio de unión a la hormona (E). El RP contiene dos señales de localización nuclear (NLS), una señal constitutiva, la cual está dentro del dominio de unión al ADN (DBD) y otra que es activada por la hormona y se encuentra localizada en el HBD. HSPS: proteínas de choque térmico (Smith *et al.*, 1990)

COACTIVADORES Y REPRESORES EN LA ACTIVACION TRANSCRIPCIONAL POR RECEPTORES A ESTEROIDES.

A la fecha ya ha sido reportado un gran número de coactivadores putativos relacionados con la superfamilia de receptores nucleares (Chen et al., 1995, Treuter et al., 1998; Onate et al., 1998; Miolanen et al., 1998) Esos coactivadores funcionan como un complejo de múltiples subunidades con los receptores nucleares donde cada componente puede actuar de maneras diferentes: funcionando como intermediarios entre los receptores nucleares y la maquinaria básica de transcripción, o reclutando al complejo de preiniciación u otras proteínas coactivadoras o modulando la estructura de la cromatina (Chen et al., 1997; Ding et al., 1998; Glass et al., 1997; Horwitz et al., 1996; Torchia et al., 1997). Se postula ahora que la asociación diferencial de los receptores con los coactivadores podría jugar un papel determinante en la regulación hormono-específica de los genes.

Aunque se ha reportado que AF-2 interactúa directamente con los componentes de la maquinaria básica de transcripción, existen evidencias experimentales en contra de la existencia de proteínas adicionales que actúan como coactivadores o co-represores (Mangelsdorf y Evans, 1995; Glass et al., 1997; Horwitz et al., 1996). Es sabido que receptores tales como el RT, RAR o COUP actúan como potentes represores en ausencia del ligando, y se ha demostrado que reclutan a los corepresores N-NoR/RIP13 y SMRT/TRAC (Kurokawa et al., 1995; Chen et al., 1995; Sande et al., 1996; Seol et al., 1996; Zamir et al., 1997). Otros estudios a este respecto, sugieren otro papel adicional que involucra a los correpresores en la regulación de los receptores unidos a un antagonista (Smith et al., 1997).

Un paso importante en la activación de los receptores como factores transcripcionales, es su unión al ligando ya que posterior a este evento, el receptor sufre cambios conformacionales importantes, en su región de unión al ligando, que incluyen, entre otros, un rearrreglo de los dominios de activación que dirige hacia la disociación de los correpresores, y permite la asociación de los coactivadores así como cofactores que sirven para diferentes funciones. Los estudios de interacción proteína-proteína, han propuesto varios candidatos

proteicos que podrían actuar como coactivadores de los receptores activados por el ligando (Glass et al., 1997; Horwitz et al., 1996). Entre esas proteínas podemos mencionar únicamente a los coactivadores promiscuos, CBP/p300 (Chakravarti et al., 1996; Kamei et al., 1996; Hanstein et al., 1996) y a los miembros de la familia de coactivadores SRC-1 (SRC-1/N-CoA1, TIF-2/GRIP1/NcoA2, p/CIP/ACTR) los cuales han demostrado de manera convincente que actúan como coactivadores para muchos receptores nucleares.

El RP a diferencia de los otros receptores de hormonas esteroides ha sido detectado en análisis electroforéticos como dos isoformas de peso molecular distinto (llamados A de 79-94 KDa y B de 100-120 kDa), debido a que la longitud de la región amino-terminal es diferente (164 aminoácidos de diferencia) (Misrahi et al., 1988).

Las dos isoformas del RP pueden exhibir especificidad por genes diferentes y algunas veces pueden expresarse diferencialmente en tipos celulares diferentes (Graham et al., 1996, Spelberg et al., 1992; Lessey et al., 1983; Kastner et al., 1990; Gronemeyer et al., 1991), además de que, en estudios de transfección, se ha podido demostrar que poseen actividades transcripcionales diferentes, un ejemplo de ello es que ha demostrado *in vitro* que algunas de las isoformas pueden funcionar como transrepresores de las funciones transactivadoras de los receptores de estrógenos por lo que se propone que la expresión diferencial de las isoformas del RP podrían ser las responsables de una inhibición tejido específica de los genes blanco para estrógenos por progestinas (Chalbos y Galatier, 1994; Tora, et al., 1988; Meyer et al., 1992; Tung et al., 1993; Vegeto et al., 1993; McDonnell et al., 1992; Wen et al., 1994).

La distribución de los RPs en los diferentes tejidos se ha demostrado que es diferencial, lo que significa que ambos receptores, aún cuando unen a un mismo ligando, tienen funciones diferentes (Tung et al., 1993; Vegeto et al., 1993; O'Malley et al., 1997).

ANTECEDENTES

LAS PROGESTINAS SINTÉTICAS.

Alrededor de los años 50s comenzaron a aparecer una serie de compuestos progestacionales, o análogos de la P_4 , como agentes terapéuticos así como componentes de los anticonceptivos orales, en esos años se les caracterizó como "progestágenos", sin embargo, a la fecha es grande la controversia acerca del concepto de progestágenos y progestinas. Sin embargo, en los últimos 10 años el desarrollo de nuevas progestinas ha sido extraordinario.

En el año de 1996 (Editorial, 1996) se llevó a cabo la primera reunión que trató los avances más recientes en el campo de las progestinas sintéticas, así como su aplicabilidad presente y futura en el desarrollo y tratamiento de muchas enfermedades. Se discutió la importancia que tiene el estudio de las progestinas para el campo de la salud y la investigación. Algunos de estos temas son presentados en esta tesis a manera de introducción hacia el estudio y entendimiento del modo de acción de las progestinas sintéticas.

Nomenclatura y clasificación

La P_4 así como sus metabolitos activos, son agentes progestacionales naturales de gran importancia biológica (Yen *et al.*, 1993). Los agentes progestacionales, en general, se han definido como sustancias, que como la P_4 , son capaces de transformar a un endometrio tratado con estrógenos en un endometrio secretor (ensayo de Clauberg), si cumplen con esta característica entonces son llamadas "progestinas". Todas las progestinas tienen por lo menos ésta función en común, además de compartir una estructura química de tipo esteroideo. Sin embargo, está bien demostrado que las progestinas pueden tener muchos efectos adicionales en el metabolismo del cuerpo y en los órganos blanco, diferentes a las respuestas que se presentan en el endometrio.

En la década de los 60s las progestinas se clasificaron según sus efectos biológicos, los cuales fueron ensayados en animales de laboratorio y los resultados llevaron a definir las como se describe a continuación:

Progestinas con actividades progestacionales

Los ensayos más comúnmente utilizados fueron El *ensayo de Clauberg* (Clauberg, 1933) el cual permite una discriminación específica de los efectos de diversos esteroides sobre el endometrio, de tal manera se pudo clasificar como *progestinas verdaderas*, a aquellos compuestos que producían una máxima arborización de las glándulas endometriales y un epitelio columnar mínimo. Posteriormente se clasificaron como *progestágenos* a aquellas que presentaban efectos similares a aquellas mezclas de estrona y P₄, que en general producían una arborización glandular y presencia de células epiteliales columnares largas con o sin vacuolas perinucleares.

Las progestinas frecuentemente poseen actividades estrogénicas o androgénicas las cuales son muy importantes de evaluar. Químicamente es posible de clasificar cuatro familias de compuestos sintéticos: 1. Derivados de la 17-hidroxi-progesterona; 2. Derivados con un anillo de estrano (como la 19-nortestosterona); 3. Derivados con un anillo de androstano y 4. Isómeros de P₄, como la retroprogesterona. La estructura química de algunos de éstos compuestos se muestra en la figura 6.

Progestinas con actividades Estrogénicas

Para evaluar las actividades estrogénicas de los compuestos, se realizaba el *ensayo de Allen-Doisy*, el cual se basa en la caracterización de la cornificación vaginal en ratas o ratones castrados.

Actividades Androgénicas

Los efectos androgénicos eran evaluados por el crecimiento de la próstata ventral en respuesta al tratamiento de acuerdo al *protocolo de Hershberger*. Estos estudios permitieron entonces la organización de dichos compuestos en categorías cuyos efectos eran paralelos a aquellos de los esteroides endógenos, sin embargo esto limitó el espectro biológico de muchos compuestos lo que se tradujo en resultados discrepantes entre los laboratorios aun cuando se hablara de la misma progestina. (Edgren *et al.*, 1967).

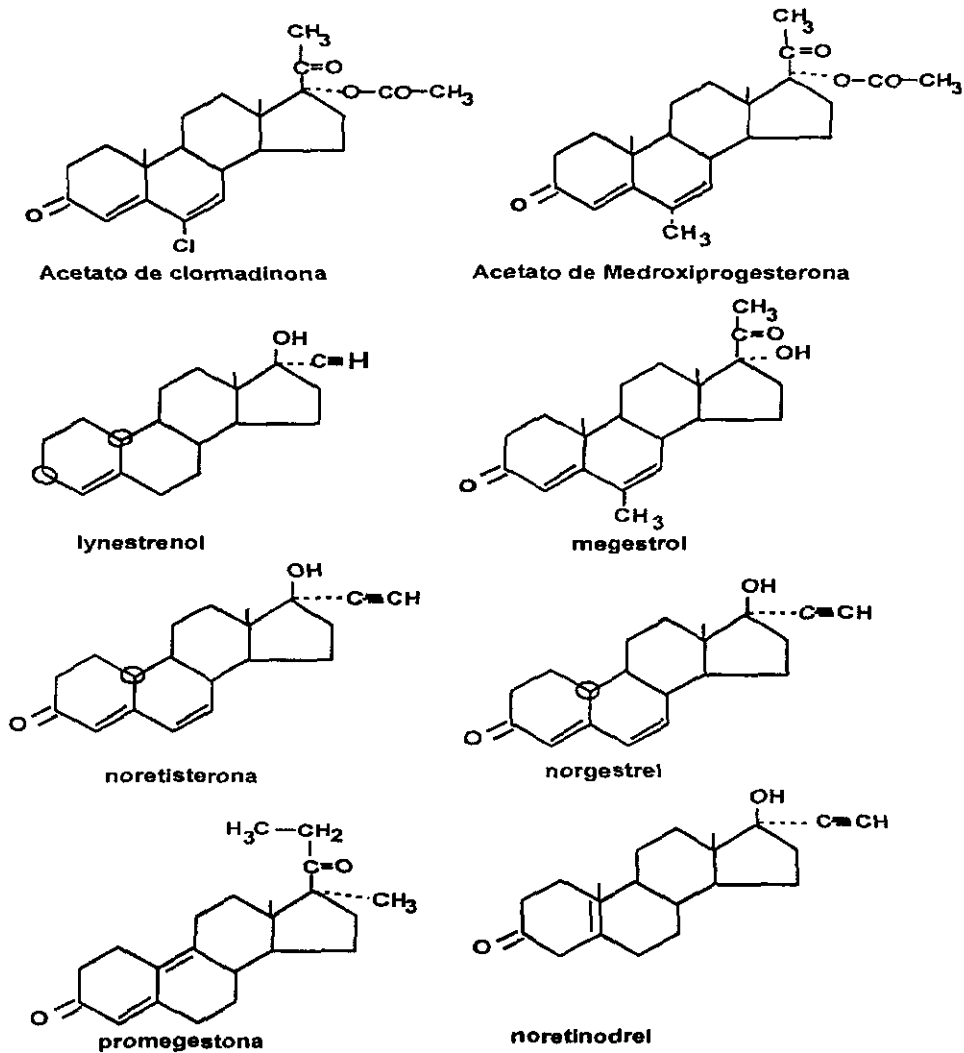


Figura 6. Estructura química de algunas de las progestinas. Los pequeños círculos señalan las características de estructura química más importantes de estas progestinas.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROGESTINAS SINTÉTICAS

Como antes se mencionó las progestinas sintéticas se clasifican principalmente de acuerdo con la molécula esteroide básica de la cual derivan, así tenemos:

Derivados con un núcleo del pregnano

Son Progestinas de 21 átomos de carbono de estructura relacionada con la P₄. Los derivados de 17 hidroxiprogestero, son en general compuestos con una fuerte actividad progestomimética y son capaces de mantener el embarazo en roedores ovariectomizados, no son compuestos estrogénicos. El uso de estos compuestos como anticonceptivos es limitado. Es probable que el compuesto más importante de esta serie sea el acetato de medroxiprogestero, el cual es efectivo por vía oral y que es empleado en diversas indicaciones ginecológicas. Entre éstas progestinas tenemos las siguientes:

(A) Progesterona (4-pregnen-3,20-diona) y sus derivados

1. Medrogestona: 6,17-dimethyl-4,6-pregna-dien-3,20-diona.

(B) Retroprogesteronas

2. Dydrogesterona: 9 β ,10 α -pregna-4,6-diene-3,20-diona.

(C) Derivados de la 17 α -hydroxy-progesterona.

3. Caproato de Hidroxiprogestero: 17 α -hidroxiprogestero-3,20-diona-hexanoato.

4. Acetato de medroxiprogestero: 17 α -acetatoxy-6 α -methyl-4,6-pregnane-3,20-diona.

5. Megestrol: 17 α -hidroxiprogestero-6-methyl-4,6-pregnandien-3,20-diona-acetato.

6. Acetato de clormadinona: 6-cloro-17-hidroxiprogestero-4,6-pregnandien-3,20-diona-17-acetato.

7. Acetato de Ciproterona: 6-cloro-17 α -hidroxiprogestero-1 α ,2 α -methylen-4,6-pregnandien-3,20-diona-17-acetato.

19-Nor-Progesterona

8. Demegestona: 17-methyl-19-norpregna-4,9-dien-3,20-diona.

9. Promegestona: 17 α ,21-dimethyl-19-norpregna-4,9-dien-3,20-diona.

10. Trimegestona: 21S-hidroxiprogestero-17 α ,21-dimetil-19-norpregna-4,9-dien-3,20-diona.

(E)17 α -hidroxinorprogesterona.

11. Caproato de Gestonorona :17-hidroxi-19-norpregn-4-ene-3,20-diona-hexanoato.

12. Acetato de Nomegestrol :17 α -acetoxi-6-methyl-19-norpregna-4,6-dien-3,20-diona.

Derivados con núcleos del androstano y del estrano

Progestinas de 19 átomos de carbono con una estructura relacionada a la testosterona. Son compuestos menos activos en el análisis de McPhail, y poseen una leve actividad estrogénica. Estos compuestos son capaces de mantener el embarazo, inducir decíduoma, y son muy activos en el análisis de McGinty. Numerosos compuestos se han originado a partir de éstos precursores, sin embargo, desde el punto de vista práctico, se podría decir que los mas importantes son dos: La Noretisterona y el Noretinodrel. *In vivo*, el acetato de noretisterona es convertido principalmente en noretisterona, la cual parece ser la forma activa de esas moléculas (Black *et al.*, 1973, Walls *et al.*, 1977) y sólo la NET se une al RP en citosol de endometrio. La serie de compuestos generados de éste grupo son:

(F)Derivados de testosterona

13. Etisterona

14. Noretisterona

15. Acetato de noretisterona

16. Linestrenol

17. Diacetato de etinodiol

18. Noretinodrel

19. Tibolone

20. Acetato de Quingestranol

21. Levonorgestrel

22. Gestodeno

23. Desogestrel

24. Norgestimato

25. Dienogest

26. Norgestrienona

27. Gestrienona.

La gran mayoría de los anticonceptivos orales combinan una progestina con un estrógeno (García y Pincus, 1964). En la mayoría de éstos compuestos el estrógeno utilizado es el Etililestradiol o el Mestranol (figura 7).

Los mecanismos de acción de los anticonceptivos orales incluyen: la prevención de la ovulación, la alteración del moco cervical y movilidad tubular, así como las modificaciones en el endometrio que previenen la implantación. En general, su efectividad, depende de la acción combinada de esos parámetros. Ha sido reportado que a bajas dosis (minipill), ciertas progestinas, administradas solas, son anticonceptivos activos aún cuando no se ha interrumpido la ovulación (Martinez-Manatou *et al.*, 1966, Beaulieu y Kelly, 1991; Pascualini *et al.*, 1996)

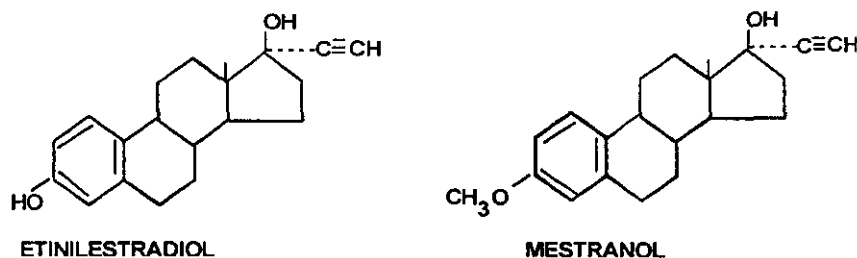


Figura 7. Estructura de los dos estrógenos sintéticos mas utilizados en las formulaciones de los anticonceptivos orales. Estructura química del etinil estradiol y del mestranol, componentes principales de los anticomceptivos orales.

Organos Blanco y sistemas metabólicos afectados por las progestinas.

Las respuestas biológicas de las progestinas pueden presentar importantes efectos en otros tejidos además del endometrio, entre los que se incluyen: El hígado y el matabolismo de: los lípidos, de los carbohidratos, procesos de hemostasia/fibrinólisis, proteínas, regulación del agua y electrolitos, así como la glándula mamaria, el hueso, el cerebro, el sistema inmune, y el sistema

cardiovascular y en general, todos aquellos órganos donde el RP ha sido detectado.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS PROGESTINAS

La acción de las progestinas está dada por muchos factores entre los que se puede mencionar; la estructura, su afinidad por el RP o por otros receptores de hormonas esteroides, el órgano blanco bajo consideración, la respuesta biológica, las condiciones experimentales, la dosis, así como el metabolismo y transformación de las mismas (Pascualini *et al.*, 1998)

La mayoría de las progestinas sintéticas que se usan en la actualidad en la clínica son esencialmente derivados químicos de la 19-nortestosterona o de la 17-acetoxiprogesterona. Como antes se mencionó, los resultados de muchos estudios coinciden en que el efecto anticonceptivo de las progestinas sintéticas se ejerce cuando se administran en grandes dosis, provocando una inhibición de la ovulación (Gobelsman *et al.*, 1979), o bien cuando se administran en dosis bajas, provocando una alteración de las proteínas contenidas en el moco cervical y que de esta forma incompatibiliza el proceso de la fecundación por la imposibilidad de una penetración espermática (Rudel *et al.*, 1967).

Todas las progestinas por lo general regulan a la baja a los receptores de estrógenos, y dependiendo de la ruta de administración -ya sea oral o vaginal- las progestinas pueden manifestar diferentes efectos, los cuales se deben principalmente a su metabolismo. La P₄ administrada en forma oral presenta una amplia variación en su absorción, y su biodisponibilidad varía de acuerdo al individuo. Todas las progestinas sintéticas son rápidamente absorbidas, con una máxima concentración en suero que ocurre entre 2-5 horas. Todas son mayor o menormente metabolizadas en el hígado, poseen una vida media mayor que aquella que presenta la P₄, y se encuentran niveles estables en el plasma durante su uso a largo plazo (Bardin *et al.*, 1983).

Las progestinas ejercen su efecto progestacional, al igual que la P₄, a través de su interacción con los RP, siendo la isoforma A más activa que la B, los cuales son citosolubles y de localización nuclear (figura 4).

Estas progestinas también pueden interactuar con un RP membranal (Smith *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1991), siendo las respuestas vía RP citosoluble mucho más lentas (Baulieu *et al.*, 1991). Ya ha sido demostrado que las progestinas sintéticas se biotransforman al igual que las hormonas naturales (figura 1) a nivel de los órganos blanco y que los productos de transformación metabólica pueden interactuar con receptores localizados dentro de las células blanco. El efecto biológico de estas interacciones puede resultar en actividades agonistas, antagonistas y/o sinérgicas, dependiendo de la naturaleza del receptor al que se unen (Pérez-Palacios *et al.*, 1981, Chavez *et al.*, 1985).

Las progestinas también pueden interactuar con otros receptores a hormonas esteroides (RA, RG, RM y en algunos casos estrógenos RE) y pueden tener una especificidad muy variable (Chávez *et al.*, 1985, Enríquez *et al.*, 1997). Algunas progestinas han mostrado unirse a otra clase de receptores como por ejemplo el receptor GABA-A y el receptor de Glicina. (Ed. Progestins 1996 y referencias que se encuentran ahí).

Efecto de las progestinas sobre los receptores de hormonas esteroides

En células de cáncer de mama, las progestinas han demostrado tener un efecto antagonista sobre la proliferación inducida por los estrógenos, esto a través de un control del RE o de los RP. Se ha demostrado que las progestinas reducen la cantidad de ARNm del RE reduciendo la transcripción de este gen (Alexander *et al.*, 1990; Saez *et al.*, 1978; Classen *et al.*, 1993; Pérez-Palacios *et al.*, 1992), haciéndose este efecto máximo a las 6 h después del tratamiento. También ha sido demostrado que varias progestinas como R-5020, acetato de NET, decremantan en un 80% el nivel de RP en 2 líneas celulares hormono-dependientes (Botella *et al.*, 1994; Alexander *et al.*, 1989; Nardulli *et al.*, 1988). Un dato interesante a este respecto es el efecto inhibitorio de la proliferación celular inducida por estrógenos que poseen varias progestinas (Schoonen *et al.*,

1995). Un caso particular a este respecto es la inhibición de la proliferación de las células MCF-7 por efecto de la progestina gestodeno, el cuál es debido a una proteína específica que une gestodeno (Coletta *et al.*, 1989)

Efecto de las progestinas sobre los factores de crecimiento IGFs, EGF y TGFs.

Los datos que existen en la literatura sobre los efectos de las progestinas sobre los factores de crecimiento son contradictorios. Ya que las progestinas pueden inhibir el efecto mitogénico de los factores de crecimiento de insulina (IGFs) en células de cáncer de mama, ya sea a través de una disminución de los receptores de IGF o a través de producir un incremento en la proteína que une a IGF-1 la cual inhibe el efecto mitogénico de IGF (Goldfine *et al.*, 1994; Papa *et al.*, 1991, Yee *et al.*, 1994). Sin embargo, existen otros estudios que demuestran que en células en T-47D la progesterona puede potenciar el efecto estimulador del crecimiento de insulina a través de un incremento en el nivel de expresión del receptor de insulina (Papa *et al.*, 1990).

Las progestinas también pueden inducir la expresión de factores de crecimiento como (EGF, TGF- α), así como del receptor al factor de crecimiento (EGF-R) tanto de la proteína como de su ARNm. Se ha descrito de igual forma una disminución en la concentración del ARNm del factor antiproliferativo TGF- β (Murphy *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 1988; Jeng *et al.*, 1991). Estos efectos fueron inhibidos por la antiprogestina RU-486 (Murphy *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 1988). Se ha reportado una sobreexpresión de EGF y de TGF- α posterior a un aumento de ciertos oncogenes así como de otros genes del ciclo celular, lo que ha sugerido que esos factores de crecimiento no son los directamente implicados en la estimulación de la fase primaria de crecimiento de las células de cáncer de mama estimuladas con progestinas (Musgrove *et al.*, 1991)

Efecto de las progestinas sobre algunos protooncogenes

Se ha reportado un aumento en la expresión de los protooncogenes c-myc, c-fos y c-jun por efecto de las progestinas (Musgrove *et al.*, 1991, Alkhalaf *et al.*, 1992, Wong *et al.*, 1991). Recientemente se describió una secuencia homóloga

a un PRE dentro de la región 5' del gen de c-myc. Esta región estimuladora es positiva en células RP+ y negativa en células RP- (Moore *et al.*, 1997). La expresión de la proteína p53 en células T47-D, esta también reducida por efecto de las progestinas, lo cual también puede contribuir al efecto estimulador del crecimiento que presentan estas progestinas (Hurd *et al.*, 1995).

PRINCIPALES USOS Y APLICACIONES DE LAS PROGESTINAS

Compensación en una deficiencia Lutea:

La indicación primaria del uso de una progestina es la compensación de una insuficiencia de P₄ (deficiencia lutea). La deficiencia lutea se puede presentar durante dos fases principales a lo largo de la vida de una mujer.

La primera fase incluye el período de la adolescencia después de la menarquia y a los 35-40 años de edad, fases durante las cuales se cree que se esta bajo una dominancia relativa de estrógenos. Este desequilibrio puede conducir a desordenes en el ciclo menstrual, y a la aparición del síndrome premenstrual, y además se encuentra asociada con la aparición de miomas así como de mastopatías.

En todos estos casos, las progestinas se administran diariamente por un período de 10-14 días en la segunda fase del ciclo. También durante esta fase, las progestinas, libres de efectos androgénicos colaterales, son utilizadas para tratar el síndrome de ovario poliquístico.

La segunda fase, alrededor de las edades de 45-48 años, la cual se caracteriza por una fase lutea deficiente acompañada por una incipiente hipoestrogenemia. Debido a que el etinilestradiol puede provocar riesgos cardiovasculares, este no es adecuado como anticonceptivo en este estadio. Lo más recomendable es una dosis antigonadotrópica de una progestina durante 20 o 21 días del ciclo seguido por la administración de un estrógeno natural durante los últimos días del ciclo.

Protección del endometrio

Una dosis adecuada de una progestina administrada por 10 días o más en cada ciclo permite confiar en una protección contra un cáncer endometrial causado por el uso de estrógenos durante la terapia hormonal de reemplazo. Los datos más recientes han revelado que una combinación de estrógenos + progestinas en la terapia de reemplazo, no permite por completo una protección total contra el cáncer endometrial .

En el tratamiento del cáncer de mama.

Por muchos años, las progestinas han sido utilizadas ampliamente en las terapias de cáncer de mama. La estrategia para estos tratamientos es la reducción de los estrógenos disponibles en las células mamarias, ya que se tenía claro que en la fisiología la progesterona así como sus metabolitos presentaban un efecto antiestrógeno fisiológico.

Las dos progestinas más utilizadas a este respecto es la MPA, y el acetato de megestrol. Cuando estas son usadas en dosis elevadas, estas progestinas presentan un efecto antigonadotrópico importante, el cual ha sido reportado tanto en mujeres premenopausicas, como en mujeres post-menopausicas. Los niveles de testosterona y estradiol y estrona en suero están disminuidos en un 30% durante el tratamiento, lo cual debe de ser importante para la observación de los bajos niveles de la proteína unida de esteroides sexuales, SHBG. Lo que finalmente se traduce bajas cantidades de estrógenos disponibles para las células (Pascualini *et al.*, 1998)

LOS ANTAGONISTAS HORMONALES.

Los antagonistas hormonales o antihormonas inhiben la acción hormonal a nivel del receptor (Furr, 1987). Sin embargo existen otros mecanismos para disminuir la acción de una hormona, e.g. la supresión de la secreción ya sea de manera quirúrgica o farmacológica. Existen descritas varias drogas que pueden

suprimir de manera específica la síntesis de esteroides. Tal como la aminogutetimida, o la metapirona (Baulieu y Kelly, 1990).

Existen también efectos antagonistas a nivel postreceptor, sin embargo el mejor blanco para un antagonista hormonal es a nivel de receptor, en este sentido ya existen varias antihormonas descritas que caen en este tipo (Neuman *et al.*, 1970, Neri *et al.*, 1975, Pascualini *et al.*, 1998) (figura 8).

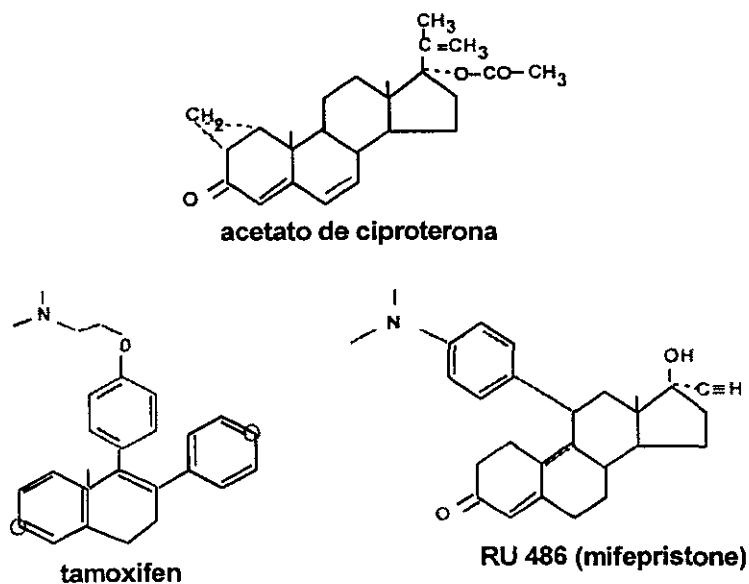


Figura 8. Estructura de algunos compuestos con actividad antiandrogénica, antiprogestacional, antiglucocorticoide y antiestrogénica.

Mecanismo de acción de los antagonistas hormonales

Existen descritos dos mecanismos fundamentales través de los cuales actúan los antagonistas de P_4 :

El primero es a partir de un efecto clásico antagonista, el cual se caracteriza por la inhibición de todas las actividades de un agonista. En este sentido, los RP normalmente ocupados por un agonista, regulan la transcripción uniéndose como dímeros a los elementos de respuesta a progesterona (PRES) presentes en el gen regulado. En este sentido los complejos RP-antagonista también se unen a los PRES pero no son productivos. De esta forma, la inhibición por este

tipo de antagonistas involucra la competencia entre dos ligandos, agonistas contra antagonistas, por el sitio de unión en los RP seguida por la competencia entre las dos clases de RP-ligando para unirse a los PREs.

Se sabe que en presencia del agonista, la unión al ADN conlleva a una respuesta transcripcional específica, aumento o inhibición de la transcripción de un gen hormono-regulado, mientras que con el antagonista la unión al ADN es abortiva. En este último caso, esta actividad inhibidora, es controlada por numerosos factores los cuales incluyen: afinidad por los receptores, afinidad de los complejos por los PREs, así como el número y ocupación de los PREs en un promotor y otros factores más (Baulieu y Kelly, 1990).

Por otra parte, se ha demostrado que los complejos RP-antagonista, pueden presentar actividad estimuladora de la transcripción y que ésta no es siempre percibida, pero se cree que esto se lleva a cabo a través de sitios de unión en el ADN o a través de proteínas que se unen al ADN y no involucran a los PREs (Horwitz, 1993). De esta forma, con estos mecanismos novedosos, los antagonistas podrían en teoría afectar no solamente a los genes que contienen PREs, sino también a los genes que no son regulados por el RP y sobre los cuales los agonistas no tendrían ningún efecto. De tal forma que ahora se podría explicar como una antiprogestina puede tener efectos en genes que no son blanco de P_4 .

La RU-486 como antiprogestina

La antiprogestina RU-486 [mifepristona; 17β -hidroxi- 11β -(4-dimetilaminofenil)- 17α -(1-propinil)-estra-4,9-dien-3-ona] es la antiprogestina más estudiada. Esta molécula pertenece al grupo de antiprogestinas que unen al ADN y es como la NET, un derivado de la 19-nortestosterona. La RU-486 (Phillibert *et al.*, 1985) fue conocida primeramente por poseer actividad antiglu corticoide, aunque sus propiedades antiprogestacionales y abortivas fueron demostradas más tarde. Esta progestina en combinación con prostaglandinas ha sido usada exitosamente como una alternativa médica para el aborto temprano (Silvestre *et al.*, 1990), como un agente anticancerígeno en procesos clínicos para cáncer de

mama avanzado RP+ (Ulmann *et al.*, 1990, Garfield *et al.*, 1987), y en el tratamiento de meningiomas (Lamberts *et al.*, 1992), como una droga efectiva en el tratamiento del síndrome de Cushing (Nieman y Loriaux, 1987), en el tratamiento de la hipertensión inducida por tratamiento con glucocorticoides (Kalimi, 1989). El análisis molecular del modo de acción de esta progestina, ha sido de gran ayuda para la concepción de nuevos medicamentos así como para tener una mejor comprensión del mecanismo de acción de la P₄.

In vivo, la RU-486 inhibe totalmente la acción de la P₄ (Philibert *et al.*, 1985) tanto en la rata como en la coneja, e inhibe el efecto de R5020 en células humanas de cáncer de mama (Horwitz, 1985). La RU-486 inhibe la producción de proteínas inducidas específicamente por progesterona, esto ya ha sido mostrado para el caso de la Uteroglobina (Rauch *et al.*, 1985). El modo de acción de la RU-486 es a través de la inhibición de la acción hormonal a nivel del RP en tejidos blanco. Se ha demostrado que ésta progestina se une con alta afinidad al RP e induce la unión de éste a los PREs localizados en genes hormono-regulados del humano, conejo y rata, (Garfield y Baulieu, 1987) pero impide la función de la maquinaria de transcripción que se desencadenaría normalmente con la P₄. (Vegeto *et al.*, 1992). La RU-486 también interactúa con el receptor a glucocorticoides para antagonizar los efectos de glucocorticoides (Meei-Huey *et al.*, 1993). También se ha reportado (Meei-Huey *et al.*, 1993) que la RU-486 posee algunas propiedades parecidas a la de los estrógenos.

El primer paso en el modo de acción de las antiprogestinas es su interacción con los RP (Philibert *et al.*, 1985). El antagonista RU-486 unido al RP desencadena la activación del receptor de la misma forma como lo hace el agonista es decir:

- a) Ocurre una disociación de los complejos activos 8S, el cual implica las proteínas de choque térmico *in vivo* e *in vitro* (El-Ashry *et al.*, 1989).
- b) La oligomerización de los receptores (Guiochon-Mantel *et al.*, 1989, Delabre *et al.*, 1993) y la transferencia al núcleo (El-Ashry *et al.*, 1989, Guiochon-Mantel *et al.*, 1989, Delabre *et al.*, 1993).

c) La unión a los sitios específicos PRE *in vivo* (Guiochon-Mantel *et al.*, 1988, Meyer *et al.*, 1990, Delabre *et al.*, 1993) e *in vitro* (Bailly *et al.*, 1990, Guiochon-Mantel *et al.*, 1988, Al Ashry *et al.*, 1989, Meyer *et al.*, 1990, Klei Hitpass *et al.*, 1990, Allan *et al.*, 1992, Sartorius *et al.*, 1993)

Los estudios de Meyer y cols. (1990) proponen que la RU-486 no tiene la capacidad de activar la función transactivadora 2 (TAF2 o AF-2) que se encuentra localizada en la región de unión a la hormona del RP. Los efectos agonistas parciales reportados para la RU-486 dependen de la función de transactivación del dominio terminal TAF1 o AF-1. También se ha descrito una función de represión dentro del dominio de unión a la hormona (Picard *et al.*, 1988, Hollerbery y Evans, 1988, Spanjaard *et al.*, 1993).

Otros estudios por el contrario no han demostrado este efecto antiprogestacional de la RU 486 en el pollo, efecto que se ha explicado por el cambio en la posición de la glicina 575 por una cisteína en el RP, por lo que resulta en una incapacidad para unir al RU-486 (Benhamou *et al.*, 1992). La sustitución de esta cisteína por una glicina (y no por otro aminoácido) produce un receptor que une al RU 486 cuya actividad se encuentra inhibida. En el caso del RP humano, se ha demostrado que los últimos residuos de la región C-terminal, son requeridos para que este RP una a la P₄, mientras que los antagonistas (RU 486, ORG 31806, ORG 31376) se unen a un sitio localizado en la región más cercana al N-terminal del dominio de unión a la hormona (Vegeto *et al.*, 1992). Para estudiar su modo de acción, varios cientos de dichas progestinas han sido sintetizadas, pero a la fecha, solo una, el mifepristone (RU 486), ha sido ampliamente estudiado tanto en animales de laboratorio como en el humano (Garfield y Baulieu, 1987). Como lo hemos visto, muchos de los estudios moleculares utilizando la RU 486 han sido enfocados para profundizar en el modo de acción a nivel molecular de las progestinas incluyendo al agonista natural, así como sus efectos a nivel fisiológico.

La Noretisterona y sus metabolitos.

La Noretisterona (NET) (17α -etinil- 17β -hidroxi-4 estren-3 ona), es una progestina sintética, derivada de la 19-nor-testosterona la cual presenta una fuerte actividad progestacional (Hertz, R., *et al.*, 1954; Pérez-Palacios, *et al.*, 1981). Esta progestina se diferencia de la testosterona por que carece del carbono 19 (19 Nor) y posee un grupo etinilo en el carbono 17 en posición α de la molécula.

La NET fue sintetizada en México por Djerassi, Miramontes y Rosenkranz (Djerassi C, *et al.*, 1952) y desde entonces ha sido utilizada ampliamente como anticonceptivo oral o inyectable así como en dispositivos intrauterinos medicados, anillos vaginales e implantes subdérmicos. Las pruebas clínicas y experimentales han demostrado que la NET no posee exclusivamente actividad progestacional, sino también presenta efectos de tipo androgénico, estrogénico y glucocorticoide e incluso puede presentar algunos efectos antihormonales (Revez *et al.*, 1960; Cerbón, *et al.*, 1990; Jeng y Jordan, 1991; Cerbón *et al.*, 1991; Markiwicz y Gurpide, 1994; Pasapera *et al.*, 1995; Castro *et al.*; 1995; Lemus *et al.* 1996; Enríquez , 1997).

La complejidad que implica la comprensión del modo de acción de esta progestina ha sido incrementada con los estudios dirigidos a demostrar que la NET puede ser bitransformada *in vivo* a etinilestradiol, sin embargo, los resultados de estos estudios han sido muy controversiales y la aromatización de la NET, es un tema que aun no esta resuelto, aunque la mayor parte de los estudios apoyan la teoría de que, mas que la falta del carbono 19 en la molécula de NET, es la presencia del etinilo en la posición 17, el factor que interfiere de alguna manera con la aromatización de la molécula "in vitro" e "in vivo" (Okada, 1964; Tillwell, 1972). En contraste, otros estudios a este respecto, han demostrado que la aromatización *in vitro* de NET, puede ser posible en preparaciones de microsomas de placenta (Barabieri K.L. *et al.*, 1983) aunque su bioconversión en la mujer gestante no ha sido demostrada y es muy poco probable.

Efectos estrogénicos de la NET.

Muchos efectos de tipo estrogénico han sido atribuidos a la molécula de NET , sin embargo ha sido demostrado que la molécula *per se*, es incapaz de unirse

al receptor de estrógenos, aun en la mejores condiciones experimentales (Chávez B., *et al.*, 1985), este dato que es de gran importancia, particularmente por que la NET no se aromatiza *in vivo*, hallazgo que ha dado pie a toda una serie de estudios sobre los diversos efectos hormonales de los metabolitos (compuestos no fenólicos) formados enzimáticamente en los órganos blanco, y su participación en el efecto estrogénico descrito para la NET.

En la literatura ya se había descrito la presencia de varios metabolitos reducidos en el anillo A de la molécula de NET, tanto en suero como en orina de mujeres usuarias de esta progestina (Braselton W.E. *et al.*, 1979) posteriormente y de igual forma, los experimentos llevados a cabo en varias especies de mamíferos demostraron que estos diferentes productos de bioconversión de NET, son capaces de interactuar con los diferentes receptores a hormonas esteroides sexuales (Braselton *et al.*, 1979; Chávez *et al.*, 1985, Pérez-Palacios *et al.*, 1992, Larrea *et al.*, 1987).

El metabolismo de la NET

Dado que el metabolismo de las hormonas esteroides juega un papel muy importante en los efectos producidos por éstas, y con base en un número importante de pruebas recientes que indican, que en el caso de las hormonas esteroides naturales, su biotransformación en los sitios blanco donde ejercen sus efectos desempeña un papel muy importante. El termino que se ha utilizado par describir a este tipo de compuestos es "activación metabólica" y esto es debido a que los productos metabólicos de muchos compuestos pueden convertirse en esteroides más potentes, e.g. la estrona, que puede ser convertida a estradiol en el útero, la glándula mamaria y el tejido adiposo, la dihidroepiandrosterona (DHEA) a androstendiol, (un derivado de DHEA) y androstendiona, todos metabolitos potenciales precursores de testosterona (Bardin *et al.*, 1983), también podemos mencionar como otro ejemplo claro el metabolito $3\alpha, 5\alpha$ -tetrahydroderivado de P_4 , el cual es el responsable del efecto sedativo de la P_4 el cual esta relacionado a la modulación alostérica del receptor de GABA (Beaulieu y Kelly, 1990). Con estos datos tan importantes, queda claro que el metabolismo de los esteroides es entonces extremadamente importante

para determinar el mecanismo de acción de los esteroides sexuales, y progestinas sintéticas de una manera mas profunda (Beaulieu 1970, Muller *et al.*, 1950; Beaulieu y Kelly, 1990).

Con base a estos antecedentes sobre el metabolismo de los esteroides naturales, y la demostración de la presencia de productos metabólicos de la NET tanto en suero como en orina, a través de diversos estudios bioquímicos, se ha establecido que efectivamente la NET también se metaboliza tanto *in vitro* como *in vivo*, a nivel de órganos blanco y que los productos de transformación metabólica son principalmente 5 α -reducidos (Braselton W.E., 1972) (fig. 9). Varios estudios han demostrado que los metabolitos 5 α -reducidos de la NET (5 α -DHNET) se unen a los RA y RP y que los metabolitos tetrahidrorreducidos (3 β ,5 α THNET) interactúan con los RE (Chávez *et al.*, 1985).

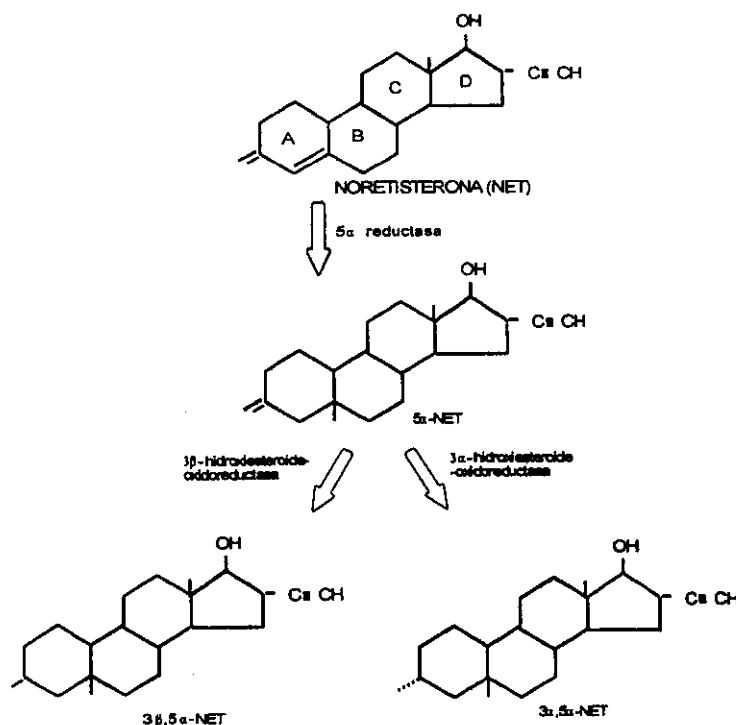


Figura 9. Reducción enzimática de la noretisterona. La reducción enzimática de la NET da como resultado metabolitos reducidos en las posiciones 5 y 3 de la molécula de NET.

Las características de unión de estos metabolitos con los receptores a hormonas esteroides ya han sido informadas (Chávez *et al.*, 1985). La NET intacta se une con alta afinidad al RP y produce efectos biológicos a nivel de órganos blanco, el 5 α -DHNET también se une al RP, aunque con menor afinidad, así como al RA (Larrea *et al.*, 1987); sin embargo, muchos de los efectos biológicos resultantes de estas interacciones no han sido completamente evaluados, aunque hay datos que sugieren fuertemente que sus efectos son de tipo antihormonal (Castro *et al.*, 1995, Cerbón *et al.*, 1990, Pasapera *et al.*, 1995; Lemus A.E. *et al.*, 1996). El metabolito 3 β ,5 α -THNET (compuesto no fenólico y no aromatizable) se une específicamente al RE dando por resultado un efecto típicamente estrogénico (Vilchis *et al.*, 1986).

En 1979, Reel y col. (Reel *et al.*, 1979) evaluaron por el método de McPhail (Mc Phail 1934), el efecto progestacional producido por los derivados de la 19-Nortestosterona. Entre estos compuestos evaluaron las propiedades de unión de la 5 α -DHNET al RP así como las respuestas biológicas después de su administración. Ellos reportaron que el 5 α -DHNET producía un efecto antagonista a la acción de la P₄; ya que no encontraron ninguna correlación entre la afinidad por RP y la actividad biológica de la progestina.

Efectos de la NET y sus metabolitos sobre la síntesis de Uteroglobina

Utilizando el modelo de la Uteroglobina (UG/CC10) (Savouret *et al.*, 1987), nosotros hemos realizado varios trabajos dirigidos al estudio del mecanismo de acción progestacional a nivel molecular a través del cual, la NET y sus metabolitos ejercen sus efectos.

En esos estudios, primeramente se demostró que la NET, así como sus metabolitos, son capaces de interactuar con el RP, y producir una respuesta biológica específica como lo es la síntesis de la uteroglobina (UG/CC10) y de su ARNm en el útero de la coneja prepúber (Cerbón *et al.* 1990). Un hallazgo interesante de estos estudios, fue el demostrar que el metabolito 5 α -reducido de NET, 5 α DHNET, aún cuando presenta propiedades de unión al RP importantes (10⁻⁷ M), el efecto biológico resultante de esta interacción no es de tipo agonista

(Cerbón *et al.*, 1990) datos que dieron pauta a ésta serie de estudios dirigidos a evaluar los posibles efectos antagonistas que podrían presentar los derivados de NET tanto en la coneja prepúber como en la coneja gestante y estudiar su modo de acción a nivel molecular a través de un modelo *in vitro* que permitiera evaluar la actividad transcripcional inducida por estas progestinas.

Los primeros estudios se realizaron administrando de manera simultánea los metabolitos de NET con P_4 en la coneja prepúber, así como NET y sus metabolitos en la coneja gestante, utilizando como control de actividad antiprogestacional para ambos a la antiprogestina, RU-486 (Pasapera *et al.*, 1995, Castro *et al.*, 1995). Los parámetros evaluados en estos estudios fueron la síntesis de la UG/CC10 y su ARNm, la regulación a la baja del RP, así como la inhibición de la implantación en la coneja gestante.

Los resultados de estos estudios indicaron que el metabolito 5α DHNET administrado solo, exhibe una actividad progestacional débil, y que cuando éste es administrado de manera simultánea con P_4 es capaz de inhibir el efecto agonista de la P_4 de una manera dual y dosis dependiente, exhibiendo efectos típicos antagonistas similares a aquellos que presenta el RU-486 (Pasapera *et al.*, 1995) de igual manera, este metabolito de NET, es capaz de inhibir la implantación del blastocisto en etapas tempranas de la gestación y es capaz de inhibir el proceso de regulación a la baja del RP inducido por la P_4 (Castro *et al.*, 1995)

Como se demuestra a lo largo de esta tesis, el estudio de la NET se ha convertido en un objetivo interesante ya que esta molécula además de que es sujeta a una activación metabólica los productos de esa biotransformación son capaces de producir efectos hormonales totalmente diferentes de aquellos que presenta el compuesto del cual derivan (Artículos 1 y 2).

No son claras hasta ahora, cuales son las acciones de estos metabolitos en el útero y mucho menos en otros órganos, ni cuales son los mecanismos moleculares de acción de esta progestina así como de sus metabolitos, por lo que en esta tesis se propuso diseñar un modelo *in vitro* que permitiera estudiar

el modo de acción a nivel de la transcripción de estas progestinas para ejercer un efecto progestacional y/o antiprogestacional. Para el diseño de este modelo se tomó como base el mecanismo general que utiliza la progesterona para desencadenar la transcripción de los genes que ella regula.

OBJETIVOS DE LA TESIS

De esta forma, los objetivos que se propusieron fueron los siguientes:

- 1) Hacer un estudio de los efectos hormonales de NET y sus metabolitos a nivel de la transcripción, mediante la construcción de un modelo in vitro representativo de la regulación génica por progesterona en mamíferos, utilizando como base el gen de la Uteroglobina.
- 2) Caracterizar la región 5' del promotor del gen de la Uteroglobina, en la búsqueda de las secuencias hormono-reguladoras que servirán para la construcción del modelo in vitro de evaluación de actividad progestacional.

Se realizó un estudio donde se analizaron 7 fragmentos de ADN localizados arriba del promotor del gen de uteroglobina (-3254—395) región en la cual se encuentran los elementos de regulación por progesterona (PREs) reportados en la literatura, los resultados obtenidos demuestran que la regulación por R5020, una progestina muy potente, estimula de manera importante la transcripción, sin embargo, las secuencias analizadas presentan muchas regiones que contienen elementos de regulación para factores específicos del endometrio, así como regiones silenciadoras a las cuales se unen factores específicos de ciertas líneas celulares, hecho que demuestra que la regulación de la transcripción de este gen es mucho mas compleja de lo que ha sido previamente contemplado.

Debido a que estas características en la regulación limitan el uso de este modelo como un modelo general de estudio, entonces se propuso diseñar otro sistema el cual se conformó por el uso de un vector de expresión que posee en sus secuencias dos PREs sintetizados artificialmente, unidos a un promotor mínimo (TK) y la CAT como gen reportero. Al transfectar esta construcción en una línea celular que expresó únicamente el RP, se obtuvo un modelo *in vitro* adecuado para este estudio.

Para lograr este propósito se plantearon los siguientes objetivos:

- 3) Obtener un modelo *in vitro* que nos permita evaluar a nivel transcripcional, la actividad progestacional y/o antiprogestacional de varias progestinas sintéticas (Artículo 3).
- 4) Confirmar en estudios *in vitro* que la NET y su metabolitos ejercen sus efectos progestacionales y/o antiprogestacionales a través de su interacción con los RP y a su vez con los PREs de los genes regulados por hormonas esteroideas (Artículo 4).

CAPITULO SEGUNDO:

CARACTERIZACION DE LAS REGIONES PROGESTERONA-REGULABLES LOCALIZADAS EN REGION 5' DEL GEN DE LA UTEROGLOBINA (UG/CC10): EN LA BUSQUEDA DE UN MODELO MOLECULAR PARA EVALUAR COMPUESTOS CON ACTIVIDAD PROGESTACIONAL.

LA UTEROGLOBINA Y SU USO COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD PROGESTACIONAL.

Características generales de la uteroglobina

La uteroglobina (UG/CC10) o blastoquinina es una proteína de secreción globular, homodimérica, de bajo peso molecular (16KDa) la cual fue detectada por primera vez en fluidos uterinos de conejas gestántes en la etapa de preimplantación del blastocisto (Krishnan y Daniel, 1967; Beier, 1968). Años mas tarde, se detectó en otros órganos diferentes del útero, como el oviducto, el tracto genital masculino, el pulmón de conejas (os) así como en otras especies de mamíferos como la liebre, el humano, la rata y el ratón. También se le conoce a la UG como proteína de 10 KDa de las células clara (CC10) debido a que su peso molecular estimado por análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida desnaturalizantes, es aparentemente de 10 KDa, y también a que es un producto de secreción de las células clara del pulmón. La UG/CC10 esta compuesta por dos subunidades idénticas de 70 aminoácidos cada una (o 77 aminoácidos en rata y ratón), unidas por 2 puentes disulfuro en forma antiparalela y por otros enlaces no covalentes (Miele *et al.*, 1994). Es capaz de unir con alta afinidad *in vitro* y en estado reducido, hormonas esteroides sexuales como la progesterona y la 5 α -pregnane -3,20 diona (Beato y Beier, 1975; Fridlansky y Milgrom, 1976), los retinoides (Lopez de Haro *et al.*, 1994) y los fosfolípidos (Umland *et al.*, 1995).

Se sintetiza como un precursor que lleva un péptido señal de 21 aminoácidos (19 en la rata y ratón) y en el extremo amino terminal, que se corta durante el procesamiento intracelular (Miele *et al.*, 1987).

Los ADNc de la UG/CC10 de conejo (Chadra *et al.*, 1981), liebre (López de Haro y Nieto, 1986), Humano (Singh *et al.*, 1988), rata (Nordlund-Moller *et al.*, 1990) y ratón (Margraf *et al.*, 1993) y hamster (Gutierrez-Sagal, 1997) han sido clonados y secuenciados. Se conoce además, la secuencia del gen de la UG/CC10 en todas las especies señaladas anteriormente excepto la del gen de la liebre. El

gen de la UG/CC10 existe en el genoma en una sola copia y consta de tres exones y dos intrones (Suske *et al.*, 1983, Wolf *et al.*, 1990, Ray *et al.*, 1993)

Función fisiológica de la UG/CC10

A pesar de los grandes esfuerzos de investigación que se han realizado en los últimos 30 años para comprender el papel fisiológico de la UG/CC10 son pocos los estudios que puedan esclarecer la función de la misma. Sin embargo se ha logrado un gran avance en el entendimiento de sus propiedades físicas, químicas y biológicas, mismo que ha permitido plantear diversas hipótesis que tratan de explicar la función de la UG/CC10. Una de ellas, se basa en una de las características más generales y mejor conocidas de la UG/CC10: su capacidad de unir compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular.

La UG/CC10 es capaz de unir P_4 con alta afinidad *in vitro* (Beato y Beier, 1975; Fridlansky y Milgrom, 1976). Por esta razón, se ha llegado a pensar que la UG/CC10, al estar presente en alta concentración en el fluido uterino durante el período de preimplantación, podría bien, proteger a los blastocistos de los efectos tóxicos de altas concentraciones de P_4 necesarias para el mantenimiento del embarazo o bien, la UG/CC10 podría transportar esteroides hacia el blastocisto o hacia el epitelio endometrial (Savouret y Milgrom 1983).

Desafortunadamente la UG/CC10 unida a la P_4 no se ha podido aislar del útero de la coneja (Tancredi *et al.*, 1982); lo cual despierta serias dudas con relación a si la P_4 es uno de los ligandos naturales de esta proteína.

A pesar de que los datos estructurales de la proteína sugieren fuertemente que esta diseñada para unir compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular y a pesar de que existen diferentes ligandos para ella, se desconocen completamente el/los ligando(s) endógeno(s) de la UG/CC10. La elucidación del verdadero ligando podría ayudar a vislumbrar la función fisiológica de esta proteína.

Otra posible función de la UG/CC10, distinta a la que se ha propuesto en base a su capacidad de unión de compuestos hidrofóbicos, es la modulación de la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2). La PLA2 hidroliza el enlace éster sn-2-acilo de los glicerofosfolípidos, generando ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Cuando el ácido graso liberado es el ácido araquidónico este sirve de sustrato en la biosíntesis de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Además, la hidrólisis de la 1-alkuil-2-acil-sn-glicerofosfocolina por la PLA2 produce el precursor del factor de activación de plaquetas. Los eicosanoides y el factor de activación de plaquetas son potentes mediadores de las reacciones inflamatorias y alérgicas respectivamente. Los agentes que pueden inhibir la biosíntesis de los eicosanoides y del factor de activación de plaquetas son potentes mediadores de las reacciones inflamatorias y alérgicas respectivamente. Los agentes que pueden inhibir la síntesis de los eicosanoides y del factor de activación de plaquetas, a través de una inhibición de la PLA2, podrían tener un potencial terapéutico significativo. La UG/CC10 es capaz de inhibir la actividad de la PLA2 pancreática de porcino *in vitro* (Miele *et al.*, 1994). Sin embargo se ha demostrado recientemente que la UG/CC10 humana sólo inhibe esta enzima cuando la concentración de calcio, un cofactor esencial de la PLA2, es limitante (Andersson *et al.*, 1994) lo que implicaría que las UG/CC10 pueden secuestrar iones calcio.

Se ha demostrado que la UG/CC10 humana recombinante evita que las células del trofoblasto humanas y las células de NIH 3T3 invadan la membrana basal artificial (Matrigel). La UG/CC10 se une, con alta afinidad, a un receptor proteico de la superficie de estas células, no glicosilado y de alto peso molecular (~190 KDa) (Kundu *et al.*, 1996). De la misma manera estos investigadores han demostrado que la UG/CC10 es incapaz de suprimir la invasividad de dos líneas celulares derivadas de un coriocarcinoma humano. Estas células carecen del receptor de la UG/CC10 que fue detectado en las células del trofoblasto humano y en las células NIH 3T3. Por éstas razones se ha llegado a pensar que la UG/CC10 y su proteína de unión podrían desempeñar un papel importante en la regulación de la migración celular e invasión de la matriz extracelular del endometrio, durante la implantación del embrión. En esta etapa del embarazo, las células del trofoblasto penetran el epitelio del endometrio para que se lleve a

cabo la implantación y se establezca con éxito el embarazo. Sin embargo, esta invasión tiene que ser limitada y perfectamente regulada, puesto que una disregulación en este proceso puede derivar en un tumor de los más metastásicos que se conocen: El coriocarcinoma (Strickland y Richards, 1992).

La UG/CC10 de conejo, también se une con alta afinidad a una proteína localizada en microsomas y membranas plasmáticas de diferentes órganos de rata y conejo, *in vitro*. La proteína receptora tiene un peso molecular de aproximadamente 90 kDa. A diferencia del receptor de las células del trofoblasto humano y de las células NIH 3T3, descrito anteriormente, este receptor solo puede unir la UG/CC10 de conejo en estado reducido (Díaz-González y Nieto, 1995). La existencia de un posible receptor para la UG/CC10 es un hallazgo reciente que puede abrir nuevas vías en el estudio de esta proteína y contribuir a descubrir la fisiología de la UG/CC10.

Regulación hormonal de la UG/CC10

La UG/CC10 fue primeramente detectada en el útero de la coneja gestante, sin embargo también se ha detectado en el pulmón de varias especies y se ha demostrado que no existe ninguna diferencia fisicoquímica o inmunológica entre la UG/CC10 del pulmón y la del endometrio de la coneja, ni entre sus ARNm (Torkkeli *et al.*, 1987, Savouret *et al.*, 1986, López de Haro y Nieto, 1985) sin embargo la síntesis en el pulmón es completamente independiente de los esteroides ováricos a pesar de que existen receptores intracelulares para la P₄ (Savouret *et al.*, 1980; Camacho-Arroyo *et al.*, 1994.)

En el pulmón son los glucocorticoides los que estimulan la síntesis de la UG/CC10 (Torkkeli *et al.*, 1987). Existen datos en la literatura que indican que esta regulación podría ser a nivel de la transcripción (Fernández-Renau *et al.*, 1984), además de que se ha demostrado la existencia de sitios de unión para el receptor de glucocorticoides en la región 5' arriba del promotor del gen de esta proteína, 2.6 Kb arriba del sitio de inicio de la transcripción (-2600) (Cato *et al.*, 1984).

La UG/CC10 también se expresa de manera abundante en el pulmón de todas las especies que han sido estudiadas hasta ahora y al igual que en los conejos, ésta también está regulada por glucocorticoides.

La extirpación de las glándulas suprarrenales provoca una reducción del 50% de la concentración del ARNm de la UG/CC10 de pulmón de rata, mientras que la administración de glucocorticoides exógenos restablecen la concentración normal de este mensajero (Hagen *et al.*, 1990). La generalidad de este fenómeno contrasta fuertemente con lo particular que ha resultado ser la UG/CC10 del endometrio de la coneja.

Por otra parte, en la próstata y el epidídimo de los conejos, los andrógenos estimulan la expresión del gen de la UG/CC10 (López de Haro *et al.*, 1988). En el oviducto de la coneja la UG/CC10 está regulada por estrógenos (Goswami y Fiegelson, 1974).

La regulación de la expresión en los tejidos antes mencionados así como en otras especies, se desconoce casi por completo, ya que no se han realizado estudios en relación con este tema excepto por el trabajo reportado por Manyak *et al.*, (1988) que demuestra la presencia de UG/CC10 en la próstata humana, sin embargo no reporta datos relacionados con su regulación hormonal.

La UG/CC10 es una proteína regulada por la progesterona en el útero.

Como antes se mencionó, el endometrio de la coneja preñada sintetiza y secreta UG/CC10 durante los primeros días de la gestación, alcanzando su máxima concentración al rededor del quinto día del embarazo y después disminuye hasta que es prácticamente indetectable a partir del doceavo día de la gestación (Mayol y Longenecker, 1974; Gutierrez-Sagal *et al.*, 1993). Este patrón puede reproducirse, en conejas ovariectomizadas y en animales intactos, mediante un tratamiento secuencial de estrógenos y P₄ (Bullock y Willen, 1974; Daniel, 1976; Nieto y Beato, 1980). La síntesis de esta proteína es regulada a nivel transcripcional por estradiol y P₄ (Shen *et al.*, 1983). Estas hormonas inducen, a través de sus receptores intracelulares, la expresión del

gen de la UG/CC10, interactuando con los elementos de respuesta a hormonas esteroides localizados en la región 5' del gen de la UG/CC10 arriba del sitio de inicio de la transcripción (Bailly *et al.*, 1986; Slater *et al.*, 1990; López de Haro *et al.*, 1990; Gómez-Lahoz *et al.*, 1992).

La UG/CC10 también se expresa en el útero de la liebre y es regulada por esteroides ováricos, sin embargo la concentración que alcanza en el fluido uterino de animales estimulados con estrógenos y P_4 es 10 veces menor a la que ha sido observada en la coneja (López de Haro, 1986).

La UG/CC10 ha sido detectada en el endometrio humano por inmunohistoquímica (Kikukawa *et al.*, 1988) así como su ARNm, donde se reporta que la máxima expresión de este gen ocurre en la fase lutea-media del ciclo menstrual y dado que en ésta etapa las concentraciones de P_4 son más elevadas, los autores proponen que la regulación de la transcripción del gen de la UG/CC10 podría ser ejercida por P_4 (Peri *et al.*, 1994).

La UG/CC10 no se ha podido detectar en úteros de rata, ratón aunque para la rata ya se ha detectado la presencia de su ARNm y se ha propuesto que su regulación es similar a como sucede en la coneja, no siendo así para el ratón (Hagen *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1990, Ray *et al.*, 1996; Margraf *et al.*, 1993). Estos hallazgos sugieren que la abundante secreción de esta proteína en el útero de la coneja, justo antes de la implantación, es un caso particular de este animal. Aún cuando se ha podido detectar la UG/CC10 en el útero de otras especies, ninguna de ellas es equiparable a la coneja, ni siquiera la liebre, que está más relacionada filogenéticamente.

Los efectos del estradiol y de la P_4 sobre la síntesis de la UG/CC10 así como de su ARNm han sido ampliamente estudiados, y se ha demostrado que la P_4 administrada sola aumenta la cantidad de ARNm, aunque al parecer también tiene efectos post-transcripcionales, ya que el aumento de la proteína es 3 veces superior de aquel presentado por el ARNm. El estradiol aumenta la cantidad de proteína y de ARNm de manera proporcional (lo que se propondría como una activación puramente transcripcional). Las dos hormonas juntas

tienen un efectos sinérgico sobre el aumento del ARNm y por consecuencia de la proteína (Loosfelt *et al.*, 1981).

La expresión del gen de UG/CC10 ha sido ampliamente utilizada como modelo para evaluar la actividad progestacional de diversos compuestos, así como también ha sido utilizada para estudiar los efectos de varias antihormonas (Cerbón *et al.*, 1990, Cerbón *et al.*, 1992, Gutierrez-Sagal *et al.*, 1993, Pasapera *et al.*, 1995, Castro *et al.*, 1995; Savouret y Milgrom 1983). Se ha demostrado que el RU 486 bloquea completamente la activación transcripcional inducida por P_4 y que el tamoxifen inhibe la estimulación inducida por la administración de dosis bajas de estradiol (El tamoxifen en útero es un agonista débil). Es interesante notar que la RU 486 bloquea por completo la activación inducida por el estradiol aún cuando no une al RE y que el tamoxifen aumenta la estimulación inducida por la P_4 cuando éste no se une al RP (Rauch *et al.*, 1985).

Regulación transcripcional del gen UG/CC10

La regulación transcripcional del gen de la UG/CC10, por diferentes hormonas, en diferentes estados fisiológicos, ha despertado un gran interés y se han dirigido muchos esfuerzos para elucidar los factores de regulación específicos de tejido involucrados en la regulación de su expresión. En este sentido se ha logrado un gran avance en el conocimiento de algunos de sus elementos genéticos en cis y de su interacción con factores de regulación transcripcional ubicuos y/o específicos de tejido (Hackett *et al.*, 1996; Miele *et al.*, 1994; Denning *et al.*, 1995; Pérez-Martínez *et al.*, 1996) Se han identificado a la fecha varias regiones del promotor de la UG/CC10 (2.25 Kb) protegidas de la digestión con ADNsa I por extractos nucleares de células pulmonares (Bingle y Gitlin, 1993; Stripp *et al.*, 1992). El análisis de una de estas regiones que se extiende desde -76 hasta -132 pb en el promotor de la UG/CC10 de la rata (región I), ha revelado varias secuencias específicas que interaccionan con el factor nuclear de hepatocitos-3 (HNF-3), con la proteína de unión a octámeros (Oct-1) y con proteínas de la familia AP-1 (jun B y Fra 1) (Bingle y Gitlin, 1993; Sawaya *et al.*, 1993).

En los promotores de las UG/CC10 de ratón, humano y conejo también existe una región equivalente a la región I del promotor de rata muy conservada (Stripp *et al.*, 1994, wolf *et al.*, 1992). La eliminación de esta región disminuye la actividad del promotor de la UG/CC10 de rata, esto por análisis de expresión transitoria así como en ratones transgénicos (Bingle *et al.*, 1995; Ray *et al.*, 1995; Sawaya y Luse, 1994). Otra de las regiones protegidas en el promotor de la UG/CC10 de rata, está centrada a rededor de -200 pb (región II) (stripp *et al.*, 1994; Stripp *et al.*, 1992). Esta región a diferencia de la anterior, tiene poca homología con las regiones equivalentes de los promotores de las otras especies, es rica en G/C y su eliminación también disminuye la actividad del promotor en las células H441 (Sawaya y Luse, 1994; Sawaya *et al.*, 1993; Stripp *et al.*, 1992).

Las proteínas que interactúan con esta región aún no han sido identificadas (Stripp *et al.*, 1992) (Figura 1).

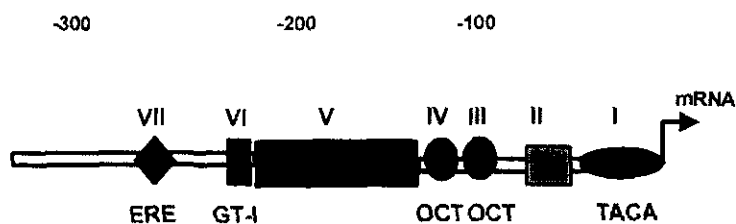
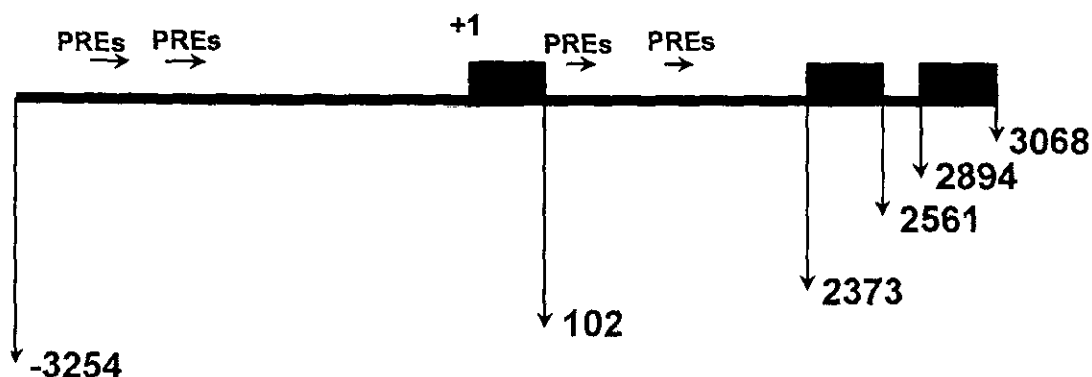


Figura 1. Estructura del promotor de la UG/CC10. Se describen siete regiones importantes (I a la VII). Estas regions incluyen una región TACA (un elemento no canónico de la caja TATA) región I, Las regiones III y IV, poseen repeticiones invertidas de una secuencia rica en A/T, que se parecen mucho a las secuencias octaméricas (OCT). La región VI posee un sitio de unión para la familia de factores de transcripción Sp1, y la región VII contiene un elemento de respuesta a estrógenos (ERE).

Otros estudios de interacción entre el RP y las secuencias del gen de UG/CC10, han demostrado también una zona de interacción del RP al nivel de las secuencias 5' dentro del primer intron (Bailly *et al.*, 1986) la cual posee una secuencia 5'-TGTTCACT-3', que es medio palíndromo del PRE (Figura 2).

Los estudios por microscopía electrónica de las interacciones *in vitro* entre los RPs y los PREs contenidos en el gen UG/CC10 han revelado la formación de bucles de ADNs resultado de la interacción de los oligómeros de receptor

unidos a los PREs contenidos entre las regiones -2247 a -2372 y -2706 a -2616 (Thénevy *et al.*, 1997).



Localización de las regiones protegidas por el RP

-2706 - -2682	-2247 - -2399	+397 - +316
-2676 - -2652	-2392 - -2372	+967 - +1006
-2640 - -2616		

Figura 2. Estructura del gen de la UG/CC10 de -3254 a 3068 pb. Los tres exones del gen están representados por los rectángulos. Sus límites están indicados en nucleótidos. Los intrones y la región 5' están representados por la línea negra (Thénevy *et al.*, 1987).

Para definir de una manera más precisa la regulación de la transcripción de el gen UG/CC10 por la progesterona y así poder establecer un modelo *in vitro* para evaluar los efectos transcripcionales de varias progestinas sintéticas por efecto hormonal, nosotros estudiamos la hormono-dependencia de la activación transcripcional de varias secuencias 5' del gen, las cuales fueron clonadas y transfectadas en líneas celulares establecidas. Las construcciones se obtuvieron mediante la clonación de varios fragmentos de restricción de la región 5' del promotor del gen de la UG/CC10 dentro del vector pEMBL 8+ que posee entre otros elementos, el promotor de la Timidina Cinasa (TK), el ADNc que codifica para la enzima Cloranfenicol Acetyl Transferasa (CAT).

METODOLOGIA

CONSTRUCCIONES

El plásmido pUG 16 que contiene el gen de la UG/CC10 fue gentilmente donado por el Dr. Edwin Milgrom (laboratoire des hormones et reproduction, INSERM, U135, Le kremlin Becêtre, Francia) y está descrito en (Loosfelt et al., 1981). Las construcciones que se realizaron para este estudio a partir de este gen, incluyen las secuencias 5'arriba del promotor las cuales fueron obtenidas clonando fragmentos de restricción de la región de -3254 a -395 del gen (Figura 4).

1) Manipulación del ADN

Los fragmentos de la región 5' del gen UG/CC10, se obtuvieron por medio de la digestión con las enzimas de restricción más convenientes (Figura 5).

De manera general se utilizó 1 unidad (U) de enzima/ μg de ADN en la solución amortiguadora indicada por el proveedor.

Los cortes enzimáticos se realizaron en un volumen de 20 a 50 μl .

2) Extracción de fragmentos de restricción

Posteriormente el ADN digerido se sometió a una separación por el método de electroforesis en geles de agarosa al 1% y tampón TBS. Se obtuvieron las bandas de interés por el método de Extracción de fragmentos con papel DEAE (Sambrook et al., 1992).

Debido a que la eficiencia en la extracción por éste método depende muchas veces de la talla de los fragmentos, para la extracción de fragmentos de talla mayor de 1000 pb, se le agregó NaOH a una concentración final de 20 mM (para aumentar el pH hasta 9). Después de la extracción se le agregó acetato de potasio pH 4.8 hasta una concentración final de 30 mM, de tal manera que se pudiera neutralizar el medio y así evitar la desnaturalización del ADN.

3) Emparejamiento de extremos cohesivos

Antes de realizar la ligación de los fragmentos de ADN con el vector reportero, aquellos que presentaban extremos cohesivos incompatibles fueron emparejados para dejar extremos rasos. Para este procedimiento se utilizó a la enzima T4 polimerasa la cual permite rellenar los extremos 5' salientes.

La reacción de emparejamiento se realizó a temperatura ambiente en un volumen de 20-50 μ l, durante 30 minutos en presencia de 200-300 μ M 4 dNTP/ μ g de ADN y una unidad de enzima. El ADN se precipitó posteriormente con etanol y acetato de sodio a una concentración final de 300mM (en presencia de EDTA 0.25 mM para evitar la precipitación de los dNTPs) después se hizo la extracción con fenol y 2 extracciones con cloroformo, se resuspendió el precipitado en agua y se verifica la cantidad y calidad del ADN en un gel de agarosa (Sambrook et al., 1992).

4) Desfosforilación del ADN

Antes de ligar los fragmentos obtenidos con el vector, es necesario desfosforilar éste último para evitar la ligación del vector con él mismo y así aumentar el porcentaje de vector con fragmentos integrados.

Para 10-30 μ g de vector, la desfosforilación se lleva a cabo en 100 μ l con una unidad de enzima CIP (fosfatasa alcalina). La incubación se efectúa durante 15 min a 37° C, después a 56° C 15 min, y por último 15 min a 56° C agregando 1 U mas de enzima.

La CIP, es relativamente resistente a la extracción con el fenol, para inactivarla por completo es necesario agregar SDS 0.5% final, EDTA 0.1 mM final y 1U de proteinasa K, incubar 30 min a 37° C y después 15 min a 68° C (temperatura a la cual la CIP es inactivada por la proteinasa K) (comunicación personal). El ADN es precipitado y verificado una vez mas como antes se describió.

5) Ligación de los fragmentos de ADN y el vector

Los fragmentos correspondientes a la región 5' del gen de la UG/CC10, fueron insertados delante del promotor TK, el cual controla la expresión del gen CAT en las células transfectadas.

La ligación se efectúa típicamente en un volumen de 20 μ l en presencia de 2 U de enzima T4 ADN ligasa y un triple exceso molar del inserto con relación al vector (100 ng). La ligación de los extremos cohesivos se llevó a cabo durante 2-4 h a temperatura ambiente, y 16 h a 12° C, con 9 U de enzima para las extremidades rasas.

Las ligaciones se diluyeron 1:5 y se utilizaron directamente para transformar a las bacterias.

6) Transformación de las bacterias competentes

Posterior a la ligación, las bacterias competentes fueron transformadas con 1-10 ng de ADN de la reacción. A esta concentración de ADN se dice que únicamente las moléculas circulares son transformantes (comunicación personal).

Las células competentes (almacenadas a -70°C XL-1 blue, Stratagene) se descongelaron lentamente a 4°C. Las alícuotas utilizadas para la transformación (50 μ l de células por transformación) se colocaron en tubos de polipropileno y 5 μ l del producto de ligación diluido (dilución 1:5) fueron agregados a las bacterias. Las bacterias y el ADN se conservaron a 4° C durante 30 min. Posteriormente se metieron los tubos de incubación a 42°C por 45 seg para producir un choque térmico y se agregó inmediatamente medio SOC (Sambrook *et al.*, 1992). Las bacterias se sometieron a agitación por 60 min y posteriormente se sembraron en cajas petri con medio selectivo. Las clonas

obtenidas fueron resistentes a la ampicilina y por lo tanto han integrado el plásmido (con o sin inserto). (Protocolo Stratagene).

7) Hibridación de colonias en papel filtro

En el caso de que la desfosforilación del vector haya sido ineficaz o se haya utilizado un vector no desfosforilado para la ligación, por lo general el porcentaje de clonas que han integrado el fragmento es muy bajo. La hibridación de colonias sobre filtro es un método rápido para detectar las clonas positivas, es decir, que integraron el inserto.

La sonda de ADN , complementario a una parte o a la totalidad del inserto, se marcaron radioactivamente (Sambrook *et al.*, 1992). Los filtros de nitrocelulosa se colocaron sobre las cajas de petri que contenían las colonias y se orientaron para posteriormente poder identificar en las cajas las colonias que hibridaron positivamente (Frederik *et al.*, 1987).

Preparación y purificación del ADN plasmídico.

La purificación de los plásmidos contenidos en las clonas identificadas como positivas, fueron purificados mediante el uso de columnas para purificación de ADN (plásmidos) de Quiagen, siguiendo básicamente las instrucciones del fabricante.

Este método de purificación además de ser rápido, es adecuado ya que la pureza que se obtiene de los plásmidos es muy buena y éstos pueden ser utilizados directamente para transfectarlos en líneas celulares sin la necesidad de hacer purificaciones posteriores.

CULTIVOS CELULARES

Transfección de los vectores.

Los cultivos celulares, los métodos de transfección transitoria o estable, así como la determinación de la actividad CAT están descritos en los materiales y métodos de las publicaciones 3 y 4.

Es importante señalar que para este estudio se utilizó la línea celular T-47D, la cual es una línea celular derivada de un cáncer pleural de mama (Keidar *et al.*, 1979). Esta línea celular contiene RP, RG, y RA y RE aunque en muy bajas concentraciones. El medio de cultivo utilizado fue D-MEM, y 5% de CO₂.

Se utilizó también la línea celular CV1 la cual es una línea celular derivada de riñón de mono verde (AGMK-CV1) que no expresa ningún receptor para hormonas esteroideas. El medio de cultivo utilizado fue D-MEM, y 5% de CO₂.

RESULTADOS

Evaluación de la actividad CAT de los Vectores UG-TK-CAT

Se introdujeron varios fragmentos de restricción correspondientes a la región 5' del promotor del gen de la UG/CC10 delante del promotor de la timidina cinasa (TK) del virus del Herpes, y en el vector CAT 8+ (Cato et al., 1986). De esta forma la transcripción del gen CAT, quedó bajo el control del conjunto de ambas secuencias. (La tasa de traducción del ARNm de la CAT es directamente proporcional a la tasa de transcripción). Las construcciones obtenidas con la clonación de las secuencias 5' del gen de la UG/CC10, las cuales contienen los PREs, (Figura 3), fueron tranfectadas en las líneas celulares CV1 y T-47D y posteriormente estimuladas con la progestina R 5020. En el caso de las Células CV1, las construcciones CAT fueron cotransfectadas con el plásmido pKRP que codifica para el RP (Guiochon-Mantel et al., 1989).

Las diferentes construcciones están representadas en la figura 3 y los resultados de los ensayos CAT en las figuras 4 - 7.

Con la construcción *EcoRI-BamHI*-CAT8+, se obtuvo una débil estimulación en presencia de R5020. Con el fin de obtener una mejor tasa de expresión dependiente de la hormona, se procedió a acercar las regiones que contenían los PREs (-2706 a -2372) al promotor TK. Se obtuvieron los vectores *EcoRI-AvaI*-CAT 8+ y *EcoRI-NaeI*-CAT 8+, de estas construcciones se obtuvo una tasa de expresión de la CAT más elevada así como un factor de inducción más alto en presencia de R5020, esto en ambas líneas celulares Figuras 4 - 5 y tablas 1 y 2. A pesar de que la aproximación de los PREs al promotor TK provocó un aumento en la expresión de CAT, esto también fue acompañado de un aumento en la expresión basal (expresión de CAT en ausencia de R 5020).

Para verificar la neutralidad de las secuencias entre *EcoRI* (-3245) y *AvrII* (-2735), y para definir la región mínima necesaria para la inducción de la transcripción por R5020, se construyó otro vector, *Au II-NaeI*-CAT 8+. El nivel basal de la expresión de la CAT resultó ser mas elevado que a partir de *AvrII-NaeI*-CAT 8+, y aunque el factor de inducción por el R 5020 es el mismo para las dos construcciones en las células T-47 D. En las células CV-1, el nivel de expresión

y el factor de inducción son idénticos para las dos construcciones (figuras 4 y 5).

El fragmento *AurII-NaeI*, es capaz por lo tanto de inducir un aumento en la transcripción de CAT en respuesta al tratamiento con R 5020, independientemente de su orientación con respecto al promotor TK (tabla 3).

Evaluación de la Actividad CAT bajo diferentes condiciones: cantidad de ADN transfectado y tiempo de incubación

Para definir las condiciones óptimas de la expresión de CAT R5020-dependiente en la construcción *AurII-NaeI-CAT 8+*, nosotros variamos las siguientes condiciones (tabla 4):

- a) La concentración de ADN transfectado (normalmente transfectamos 20 µg de nuestras construcciones) (Gráfica 1).
- b) El tiempo de incubación en presencia de la hormona. Figura 7b.
- c) La concentración de R5020 (Gráfica 2).

El factor de inducción mas adecuado se obtuvo con 5 µg, mientras que el mejor nivel de expresión es obtenido con 20 µg de ADN transfectado después de 48 h de tratamiento con el agonista.

La gama de concentraciones del R5020 demostró una inducción media en presencia con 5×10^{-9} M y una inducción máxima en presencia de 5×10^{-7} M. El RU486 bloqueó por completo la inducción por el R5020 cuando éste fue agregado en un exceso molar de 110 veces. El antagonista RU486 no presenta ninguna actividad agonista por sí mismo (no se presentan los datos).

Las diferencias en la inducción entre 5 y 20 µg de ADN transfectado son pequeñas (factor de 8 contra factor de 5) mientras que la respuesta es del doble de intensidad. Nosotros escogimos entonces hacer todas las transfecciones con 20 µg de cada construcción, ya que permite detectar también las inducciones

mas débiles, y una concentración de R5020 de 3×10^{-8} concentración a la cual nosotros obtuvimos el 80% de inducción máxima.

Evaluación de la actividad transcripcional de los PREs del gen de la UG/CC10 transfectados y estimulados con R5020.

Finalmente, para definir mejor las propiedades de los dos grupos de PREs, nosotros por una parte los separamos para ver si éstos funcionaban de manera independiente, y posteriormente los dimerizamos para ver si ellos eran reemplazables el uno por el otro.

Se llevaron a cabo las transfecciones transitorias con las construcciones que contenían los grupos PREs monomerizados, *StuI-NaeI-CAT 8+*, *AurII-BglII-CAT 8+* (ver figura 4) en las células CV-1 y en la T-47D. Los resultados con estas construcciones fueron como se esperaba, éstas fueron capaces de ser estimuladas de una manera dependiente de la hormona alcanzando una tasa de expresión cercana al doble de la alcanzada por los monómeros en las dos líneas celulares. (figuras 6 y 7, tablas 5 y 6).

Es interesante notar dímero distal (*AurII-BglII*)₂-CAT₈₊, corresponde a la región que contiene 6 regiones protegidas por el RP o "footprints" y es justamente la construcción que presentó un mayor factor de inducción (4-5 veces más elevado que aquel de la construcción *AurII-NaeI-CAT 8+* que solo contiene 5 footprints). Los resultados de los experimentos mostrados aquí, fueron realizados al mismo tiempo, y por consecuencia los niveles de expresión así como los factores de inducción son comparables.

En este estudio, nosotros obtuvimos una expresión basal clara, siendo mas baja y con factores de inducción importantes en las células CV-1 que en las células T-47D. La cotransfección del pKRP, vector que posee secuencias de regulación transcripcional y de replicación del virus SV40, en la células CV-1, parecen reproducir los efectos clásicos de estimulación general de la transcripción que han sido reportados cuando las células CV-1 son infectadas con SV-40 (Khandijian et al., 1980). También se pudo demostrar que la

dependencia transcripcional varía de una línea celular a otra y que éste fenómeno, muy probablemente es debido a las variaciones en el contenido y concentración de los diferentes factores de transcripción presentes en cada línea.

Región 5' del gen UG/CC10

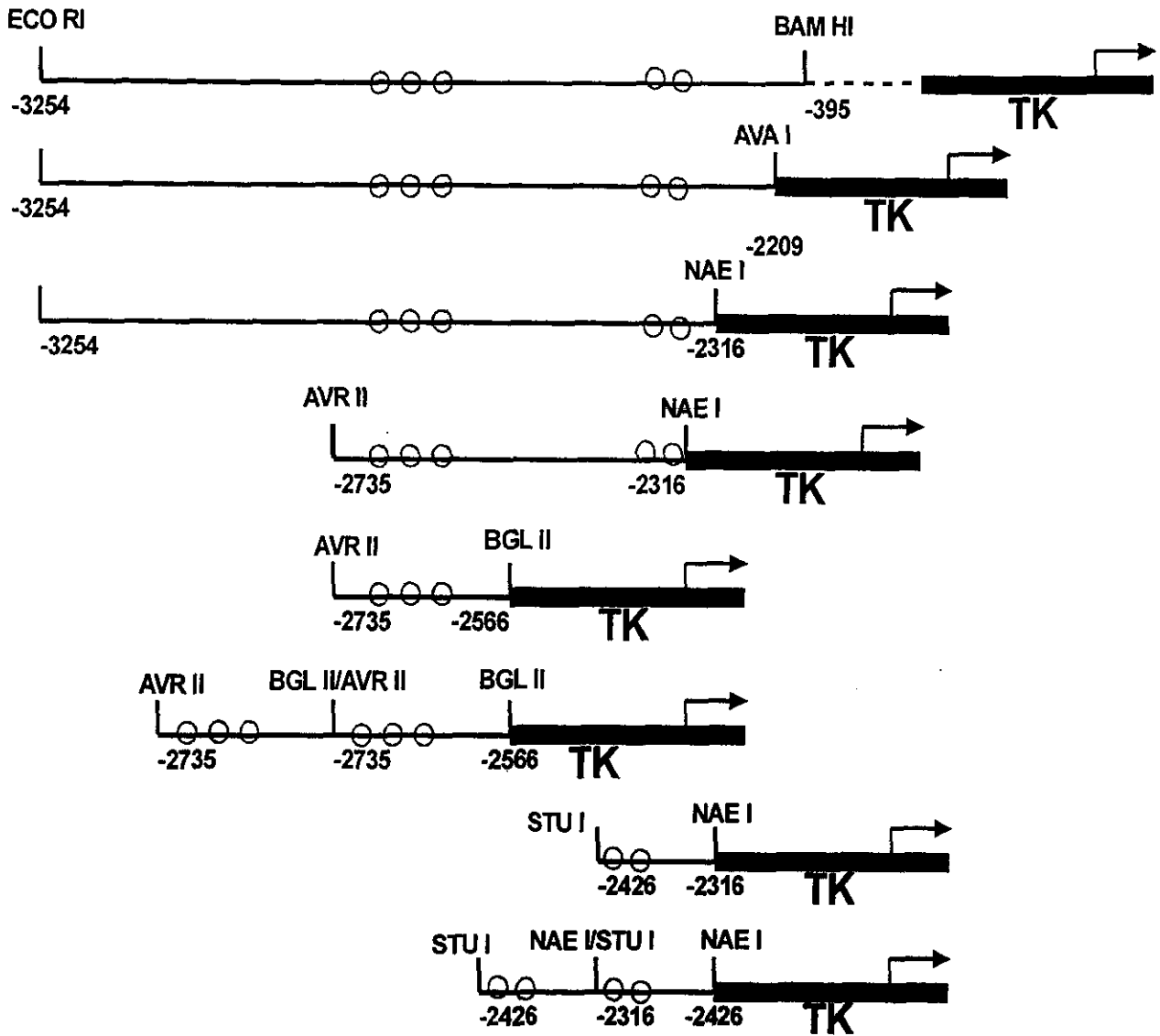


Figura 3. Contrucciones 5' UG/CC10- CAT 8+. Los fragmentos obtenidos por cortes de restricci3n de la regi3n 5' del promotor del gen UG/CC10, fueron clonados arriba del promotor TK del vector CAT 8+. Las posiciones de los sitios de corte por las enzimas est3n sealados, as3 como las enzimas utilizadas. Los c3rculos representan los sitios de uni3n del RP demostrados por protecci3n con DNAsa I, o PRES.

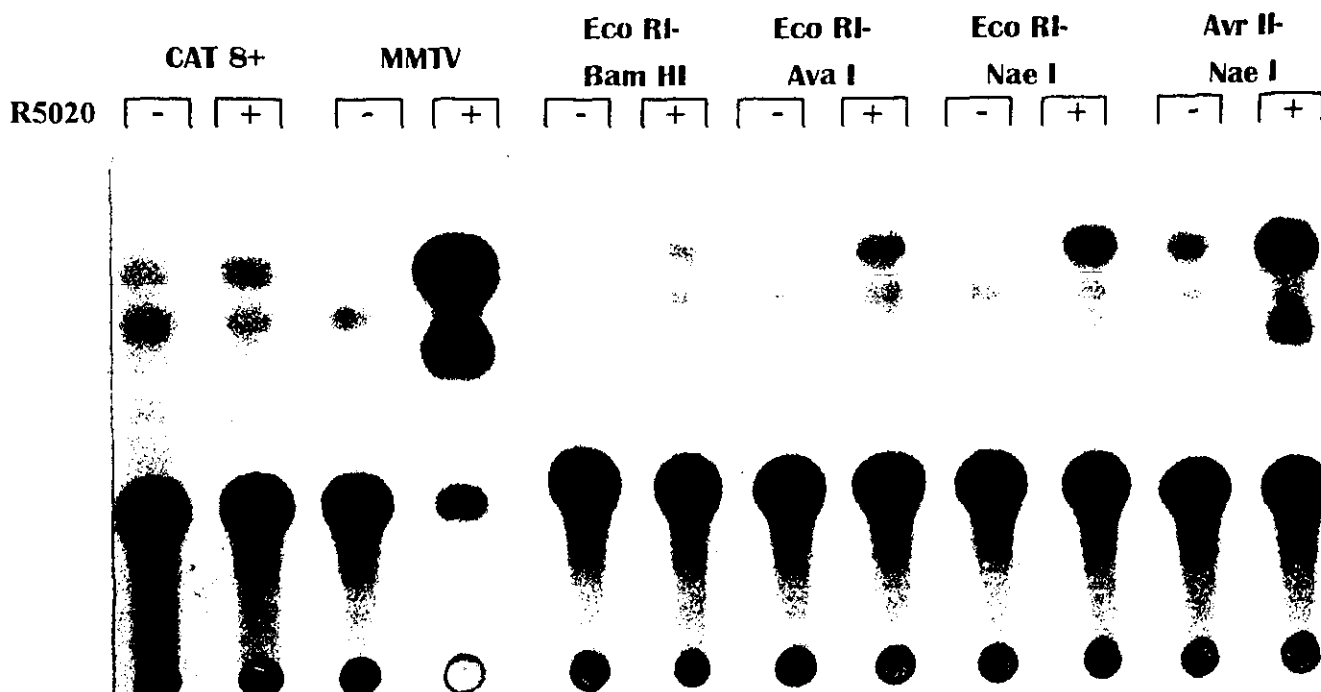


Figura 4. Resultados de los ensayos CAT de las transfecciones transitorias en las células T-47D. Las transfecciones se realizaron con 20 µg de ADN en el orden indicado. Las células fueron tratadas con R5020 10^{-6} M (3×10^{-8} M final) o 3 µl de etanol y 48 hrs después del tratamiento se hicieron los extractos celulares y ensayos CAT.

DNA	R 5020	u D.O arbitrarias/mg prot/ml	Factor de inducción
CAT 8+	-	0.8	
	+	1.0	1.3
MMTV	-	0.4	
	+	>13.2	>33.0
<i>EcoRI- BamHI</i>	-	0.7	
	+	1.3	1.9
<i>EcoRI- Aval</i>	-	0.7	
	+	2.2	3.1
<i>EcoRI- NaeI</i>	-	0.8	
	+	3.3	4.1
<i>AvrII- NaeI</i>	-	1.5	
	+	6.3	4.2

Tabla 1. Resultados de los ensayos de CAT después de las transfecciones transitorias de las células T-47D. Se presentan los niveles de actividad CAT los cuales están expresados en unidades arbitrarias densitométricas y fueron ajustadas a la cantidad de proteínas. Para obtener las unidades de D.O, se hizo una densitometría de las autorradiografías y cuantificar el cloranfenicol acetilado, y se utilizaron placas Kodak "non screen" las cuales dan una respuesta lineal de los valores de irradiación. Cada valor de D.O. se ajustó a la concentración de proteínas en la muestra. Los factores de inducción se obtuvieron del cociente de + ente - y fueron ajustados a cifras de una sola décima. Se presentan los niveles de actividad CAT los cuales están expresados en u D.O.

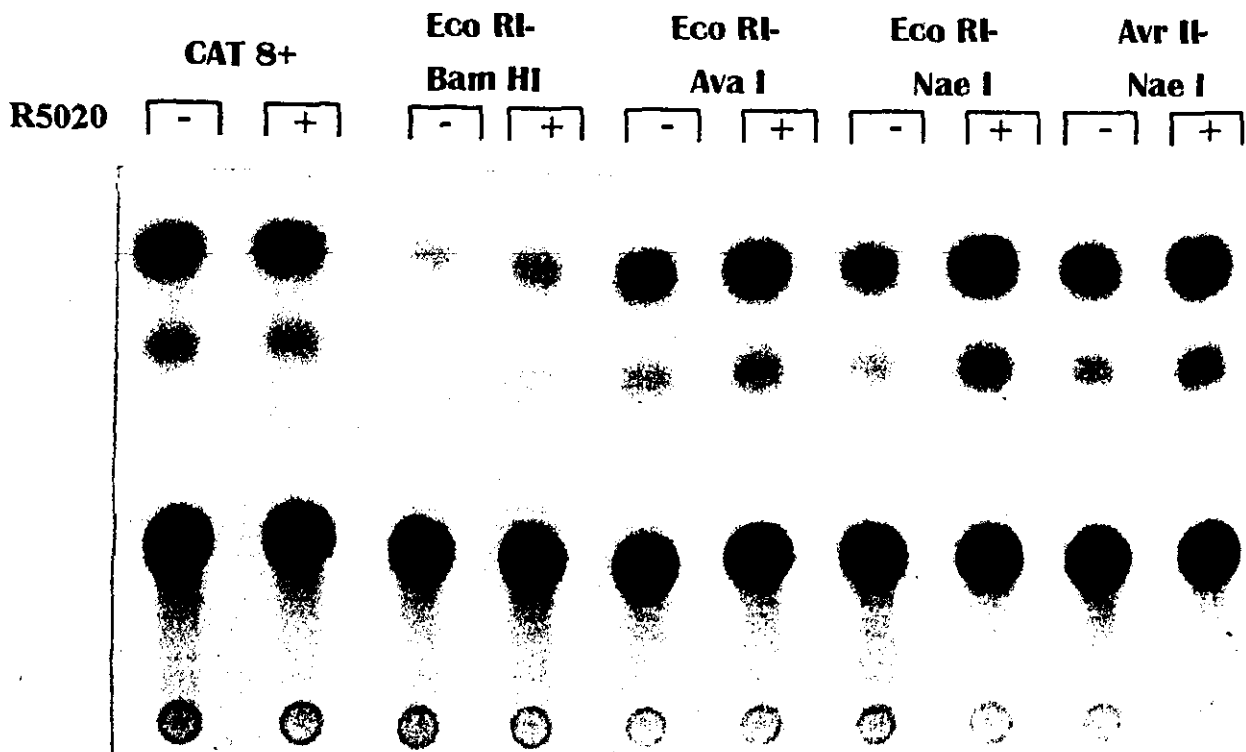


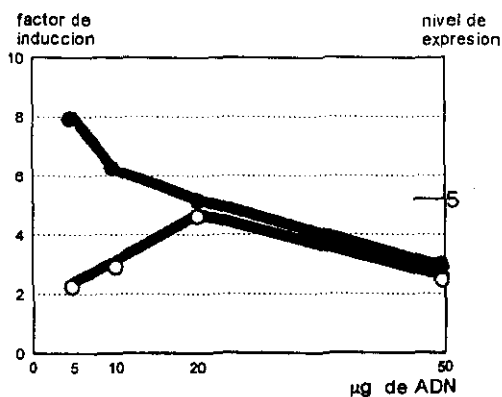
Figura 5. Resultados de los ensayos CAT de las transfecciones transitorias en las células CV-1. Las transfecciones se realizaron con 20 μ g de ADN en el orden indicado. Las células fueron tratadas con R5020 10^{-4} M (3×10^{-8} M final) o 3 μ l de etanol y 48 hrs después del tratamiento se hicieron los extractos celulares y ensayos CAT.

DNA	R 5020	u D.O arbitrarias/mg prot/ml	Factor de inducción
CAT 8+	-	4.3	0.9
	+	4.0	
<i>EcoRI- BamHI</i>	-	1.0	1.4
	+	1.4	
<i>EcoRI- Aval</i>	-	2.8	1.8
	+	4.7	
<i>EcoRI- NaeI</i>	-	2.9	2.0
	+	5.9	
<i>AvrII- NaeI</i>	-	3.0	2.0
	+	6.0	

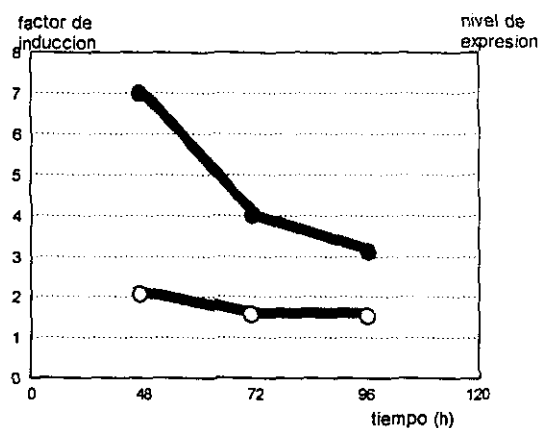
Tabla 2. Resultados de los ensayos de CAT después de las transfecciones transitorias de las células CV-1. Se presentan los niveles de actividad CAT los cuales están expresados en unidades arbitrarias densitométricas (u D.O.) y fueron ajustadas a la cantidad de proteínas. Para obtener las u D.O. se hizo una densitometría de las autorradiografías y así se cuantificó el cloranfenicol acetilado. Se utilizaron placas Kodak "non screen" las cuales dan una respuesta lineal de los valores de irradiación. Cada valor de D.O. se ajustó a la concentración de proteínas en la muestra. Los factores de inducción se obtuvieron del cociente de + entre - y fueron ajustados a cifras de una sola décima.

DNA	R 5020	u D.O arbitrarias/mg prot/ml	Factor de inducción
CAT 8+	-	1.2	0.8
	+	1.0	
<i>Aur II- Nae I</i>	-	0.8	6.5
	+	5.2	
<i>NaeI- AurII</i>	-	1.0	5.2
	+	5.2	

Tabla 3. Ensayos de CAT después de las transfecciones transitorias con 2 construcciones de fragmentos *NaeI-AurII* en las células CV-1. Las células fueron transfectadas con 20 µg de ADN e incubadas en presencia de R5020 10^{-4} M, (3×10^{-8} M final). El tiempo de incubación fue de 48 h en medio D-MEM. Se presentan las unidades arbitrarias de D.O y los factores de inducción resultantes.



Gráfica 1. Curva de inducción con respecto a la cantidad de ADN transfectado y la actividad CAT obtenida. Las construcciones utilizadas fueron *AurII-NaeI*. La serie inferior (círculos abiertos), indica el efecto de la concentración de ADN sobre el nivel de expresión de la actividad CAT. La serie superior (círculos cerrados) indica el efecto de la concentración de ADN sobre el factor de inducción en células CV-1.



Gráfica 2. Curva de inducción con respecto al tiempo de la actividad CAT con las construcciones *AurII-NaeI*. La serie inferior (círculos abiertos) nos indica el efecto del tiempo de incubación sobre el nivel de expresión de la actividad CAT, y la serie superior (Círculos cerrados), nos indica el efecto del tiempo de incubación sobre el factor de inducción en células CV-1.

DNA (<i>AurII-NaeI</i>)	R 5020	u D.O arbitrarias/mg prot/ml	Factor de inducción
5µg 48 h	- +	0.3 2.4	8.0
10µg 48 h	- +	0.5 3.1	6.2
20µg 48 h	- +	0.9 4.7	5.2
50µg 48 h	- +	0.9 2.6	2.9
5µg 48 h	- +	0.3 2.1	7.0
5µg 72 h	- +	0.4 1.6	4.0
5µg 96 h	- +	0.5 1.6	3.2

Tabla 4. Resultados del análisis de las curvas de inducción de la expresión a partir de los ensayos de CAT después de las transfecciones transitorias de *AurII-NaeI*, en las células CV-1. Las células fueron transfectadas con diferentes concentraciones de ADN (5-20 µg) e incubadas en presencia de R5020 10^{-4} M, (3×10^{-8} M final) o 3µl de etanol. El tiempo de incubación fue variado de 48 a 96 h, en medio D-MEM. Se presentan las unidades arbitrarias de D.O y los factores de inducción resultantes.

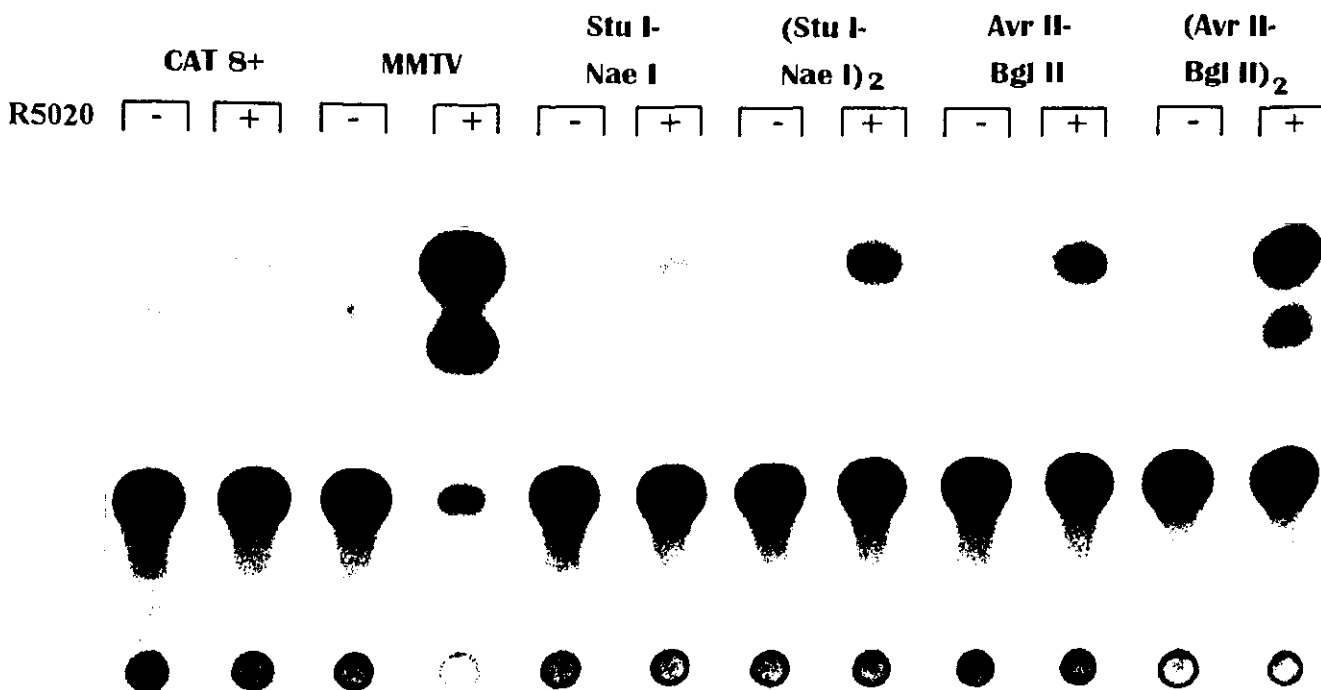


Figura 6. Resultados de los ensayos CAT de las transfecciones transitorias en células T47-D. Las transfecciones se realizaron con 20 μ g de ADN en el orden indicado. Las células fueron tratadas con 3 μ l de etanol o 3 μ l de R5020 10^{-4} durante 48 h. Posteriormente se hicieron los extractos celulares y los ensayos CAT. Las iniciales MMTV representan al promotor del virus mamario de ratón que posee PRES y se uso como un control positivo (Cato et al., 1981).

DNA	R 5020	U D.O arbitrarias/mg prot/ml	Factor de inducción
CAT 8+	-	0.7	1.4
	+	1.0	
MMTV	-	0.4	>30.0
	+	>12.2	
StuI-NaeI	-	0.6	2.2
	+	1.3	
(StuI-NaeI) ₂	-	0.6	6.3
	+	3.8	
AurII-BglII	-	0.5	6.8
	+	3.4	
(AurII-BglII) ₂	-	0.6	14.0
	+	8.4	

Tabla 5. Resultados de los ensayos de CAT después de las transfecciones transitorias de las células T47-D1. Se presentan los niveles de actividad CAT los cuales están expresados en unidades arbitrarias densitométricas y fueron ajustadas a la cantidad de proteínas. Para obtener las unidades de D.O, se hizo una densitometría de las autorradiografías y cuantificar el cloranfenicol acetilado, y se utilizaron placas Kodak "non screen" las cuales dan una respuesta lineal de los valores de irradiación. Cada valor de D.O. se ajusto a la concentración de proteínas en la muestra. Los factores de inducción se obtuvieron del cociente de + ente - y fueron ajustados a cifras de una sola décima. Se presentan los niveles de actividad CAT los cuales están expresados en unidades

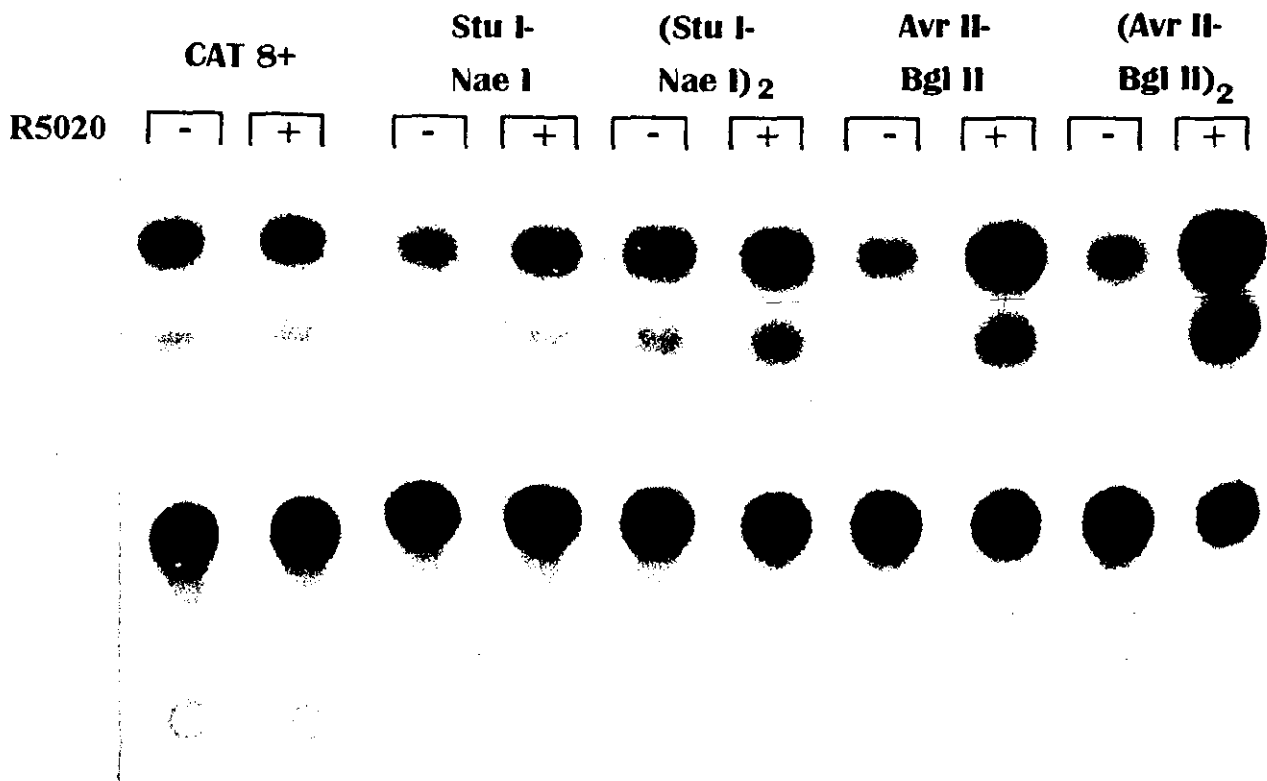


Figura 7. Resultados de los ensayos CAT de las transfecciones transitorias en células CV-1. Las transfecciones se realizaron con 20 μ g de ADN en el orden indicado. Las células fueron tratadas con 3 μ l de etanol o 3 μ l de R5020 10^4 durante 48 h. Posteriormente se hicieron los extractos celulares y los ensayos CAT.

DNA	R 5020	U D.O arbitrarias/mg prot/ml	Factor de inducción
CAT 8+	-	4.3	0.9
	+	4.0	
StuI-NaeI	-	3.2	1.2
	+	3.8	
(StuI-NaeI) ₂	-	2.5	2.2
	+	5.6	
AvrII-BglII	-	2.1	3.2
	+	6.8	
(AvrII-BglII) ₂	-	1.9	5.6
	+	10.7	

Tabla 6. Resultados de los ensayos de CAT después de las transfecciones transitorias de las células CV-1. Se presentan los niveles de actividad CAT los cuales están expresados en unidades arbitrarias densitométricas y fueron ajustadas a la cantidad de proteínas. Para obtener las unidades de D.O. se hizo una densitometría de las autorradiografías y cuantificar el cloranfenicol acetilado, y se utilizaron placas Kodak "non screen" las cuales dan una respuesta lineal de los valores de irradiación. Cada valor de D.O. se ajustó a la concentración de proteínas en la muestra. Los factores de inducción se obtuvieron del cociente de + ente - y fueron ajustados a cifras de una sola décima. Se presentan los niveles de actividad CAT los cuales están expresados en unidades de D.O.

DISCUSSION

La UG/CC10 es un gen del conejo que se expresa de manera constitutiva en el pulmón y de manera hormono-regulada en el endometrio durante los primeros días de la gestación así como bajo el estímulo con P_4 y estradiol. En este estudio hemos puesto en evidencia las regiones 5' del promotor de UG/CC10 que controlan la regulación de la transcripción por estímulo con el R5020.

La región -3254 a -395 estimula muy poco la transcripción en presencia de R5020. Es posible que esta región posea sitios de unión para factores específicos del endometrio, necesarios para la obtención de la estimulación por los complejos RP-R5020, los cuales probablemente no están presentes en las líneas celulares utilizadas. Otra posibilidad es que la región -395 a +10, no comprendida en nuestras construcciones y que corresponde al promotor propiamente dicho de la UG/CC10, una factores necesarios para el funcionamiento del complejo RP-R5020, tal como aquel descrito por Rider (1988). Para estudiar construcciones que portaran esta región se necesitaría entonces efectuar las transfecciones en diferentes líneas endometriales, creando de esta forma un sistema homólogo.

Para mejorar la estimulación de la transcripción por el R5020, nosotros acortamos la distancia que había entre el promotor TK y los PREs localizados en nuestra secuencia. Así constatamos, que mientras mas cerca se encuentran los PREs del promotor, mejor es la inducción, de tal manera que con este resultado confirmamos la regla general que dice que mientras más cerca se encuentra un "enhancer" o potenciador de un promotor, mayor será la inducción de la transcripción y que el factor de inducción esta en función de la distancia entre el enhancer y el promotor (Wasylyk et al., 1984). Nosotros encontramos que una aproximación de 2000 pares de bases, hace que el factor de inducción aumente de 2 a 3, mientras que una aproximación adicional de 300 pb, este factor aumenta de 3 a 4. La explicación clásica de éste fenómeno sería de que los complejos RP-R5020 unidos a los sitios que han sido acercados al promotor, tiene estadísticamente mas posibilidades de interactuar con el complejo transcripcional a nivel del promotor que los sitios que se encuentran lejos. Desde el punto de vista fisiológico, es la estructura de la cromatina la que se encarga propiamente de aproximar esos elementos de respuesta al promotor

(Wang et al., 1989, Katzellenbogen y Katzellenbogen, 1997). Ya había sido demostrado que las regiones más alejadas del promotor de la UG/CC10 también parecían estar involucradas en la regulación de la expresión de este gen, ya que la eliminación de la región comprendida entre -2300 y -1350 o -114 pb incrementa la actividad del promotor en las células H441. La eliminación de un fragmento del promotor del gen de UG/CC10 de conejo (-3200/-400) también incrementa su actividad en el útero de ratones transgénicos. Esto sugeriría la presencia de secuencias inhibitoras en el fragmento eliminado (Bingle y Gitlin, 1993; Bingle et al, 1995; Stripp et al, 1992; Gómez-Lahoz et al, 1992) encontradas en este estudio. Otros estudios de igual forma demostraron que la eliminación de la región protegida de la ADNasa I comprendida entre -1020 y -1070 pb, reduce la actividad del promotor en las células H441 (Bingle y Gitlin, 1993; Stripp et al, 1992). Aún no se han identificado las proteínas específicas involucradas en estas interacciones.

Los elementos mínimos necesarios para mantener la expresión del gen de la UG/CC10, en células específicas, no se han establecido con precisión. Una eliminación hasta -166 pb no afecta su expresión específica en ratones transgénicos; sin embargo una eliminación hasta -87 pb evita la expresión del transgen (Ray et al, 1995). Una eliminación en el promotor hasta -75 pb aun permite la expresión del gen reportero CAT en las células H441 (Bingle et al, 1995) y una eliminación hasta -29 pb permite una débil expresión del gen reportero luciferasa. Estas observaciones sugieren , que los elementos localizados abajo de la caja TATA son capaces de mantener una cierta expresión del gen de la UG/CC10 en células específicas (Sawaya y Lusee, 1994).

Cuando nosotros tratamos de localizar la región mínima que confiere la estimulación dependiente de la hormona de la actividad CAT, descubrimos la presencia de un represor específico en las células T-47D, el cual se encontraba contenido entre la región de -3254 a -2735, y de una manera más precisa, lo localizamos entre -2863 y -2735 (resultado que no se muestra). Esta región, disminuye de una manera importante la expresión basal de nuestras construcciones, sin alterar de ninguna manera nuestro factor de inducción. Es

importante señalar que esta región contiene un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) casi perfecto (sólo 2 disparidades) y que se encuentra arriba de una secuencia rica en A:T, lo que nos invitaría a pensar en un ADN curvado. Sería entonces muy interesante estudiar el papel de éste represor en diferentes líneas celulares y establecer si existe dicho factor en otras líneas diferentes de la T47-D. Aún resta elucidar la secuencia mínima necesaria para la represión, así como establecer cuales son la(s) proteína(s) que son responsables y el grado de tejido-especificidad y también identificar otros genes que pudieran contener dicha secuencia.

La región mínima necesaria para la inducción de la expresión de la CAT, esta contenida entre -2735 y -2316 y comprende los dos grupos de sitios de unión al RP (figura 2), y como sucede con muchos de los "enhancers", ésta región también es capaz de estimular la transcripción sin importar su orientación (Wasylyk, 1993). Cada uno de los grupos de esta región presenta una actividad transcripcional débil cuando éstos se encuentran como monómeros, sin embargo, de que ellos son dimerizados, la actividad transcripcional se ve aumentada, lo que implica una funcionalidad de los grupos dimerizados.

La región que presenta los mayores factores de inducción son aquellas que poseen efectivamente los sitios PREs previamente reportados. Es interesante hacer notar que el factor de inducción mas elevado se obtuvo en aquella construcción que posee en su secuencia las 5 regiones protegidas por el RP (*AurII-NaeI*), y que sin embargo, cuando se separan estos sitios, hay una importante disminución en el factor de inducción inducido por el R5020 (figura 8).

Es también interesante hacer notar que el grupo más distal, el que posee tres sitios , de -2706 a -2616 (fragmentos *AurII-NaeI* y *AurII-BglII*), presenta un mayor factor de inducción en presencia de R5020 cuando es acoplado consigo mismo, que cuando es acoplado con un elemento proximal (que es la situación fisiológica).

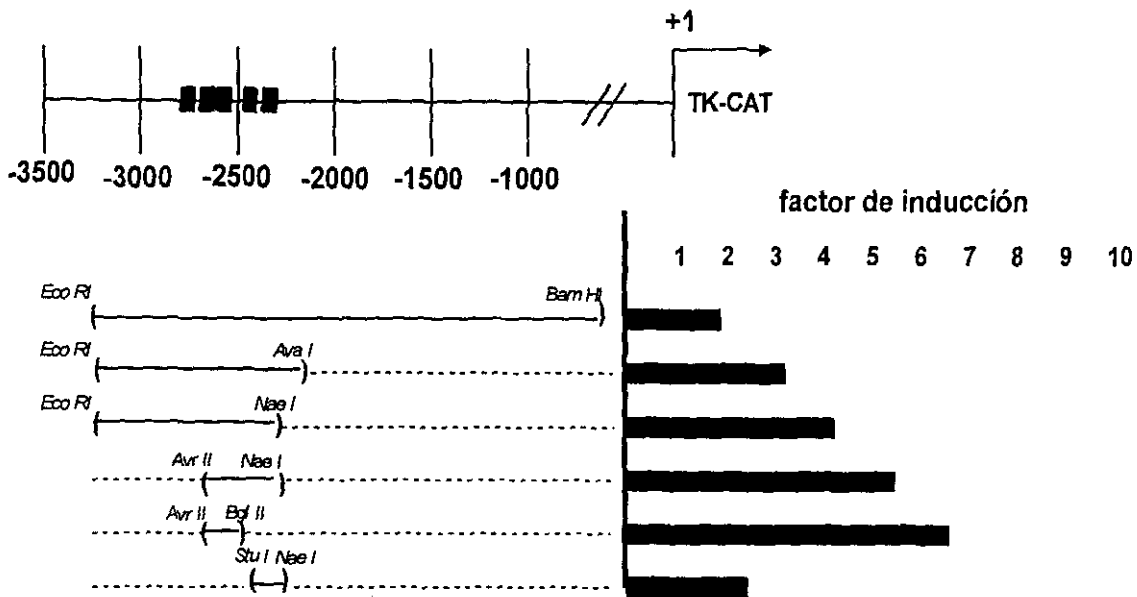


Figura 8. Representación gráfica de los factores de inducción obtenidos en los diferentes ensayos de transfección en la línea celular CV-1. La región superior de la gráfica representa las región 5' del promotor de la uUG/CC10 y los números representan la posición en pares de bases. Los cuadros representan las regiones protegidas por el RP en ensayos de "footprinting". En el costado izquierdo de la gráfica están representadas las diferentes construcciones, y en el derecho se representa el factor de inducción obtenido después de la transfección de cada una de ellas y estimuladas con la progestina R5020.

Para la evaluación de la actividad progestacional y/o antiprogestacional de NET y sus metabolitos, nosotros intentamos caracterizar un nuevo modelo que presentara secuencias PRES existentes en un gen de mamífero el cual es inducido por la progesterona como lo es la UG/CC10 en el útero de la coneja. Los datos en la literatura informan que los modelos hasta ahora caracterizados han sido sobre todo derivados del LTR del MMTV (Dean *et al.*, 1993), El promotor de la ovoalbúmina de pollo (Cato *et al.*, 1983), el promotor de la metallothioneina-IIa del hombre (Slater *et al.*, 1989) y el promotor de la de la lisozima del pollo entre otros (Hetch *et al.*, 1988) entre otros.

El propósito en este trabajo, de utilizar secuencias que presentan los PRES de un gen regulado por P_4 , acopladas a un gen reportero como un modelo "fisiológico" para la evaluación de la inducción la transcripción fue con la idea de evaluar la actividad progestacional de diferentes progestinas a través de la inducción del expresión del gen de la enzima CAT, y así evitar el uso del modelo basado en las secuencias del LTR del MMTV(Cato *et al.* 1985).

De las diferencias encontradas en los resultados obtenidos entre estos dos modelos utilizando los HREs, del LTR de MMTV son que en la ausencia de la hormona, tienen un efecto negativo sobre la expresión basal del promotor, (Kessel *et al.*, 1983), mientras que los PRES de la UG/CC10 colocados en la posición 5' del promotor TK parece aumentar el nivel basal. También se puede notar en nuestros resultados que una inducción media de LTR de MMTV, es alcanzada con una concentración de 5×10^{-11} M de R5020, mientras que esta misma inducción utilizando los PRES de la UG/CC10, es alcanzada con 5×10^{-9} M. También se sabe que la separación de los grupos de los sitios LTR de MMTV, a un estado monomérico, conduce a la desaparición de la inducción hormonal, situación inversa a los monómeros de UG/CC10, (Stul - Nael y Auril - BgIII) que presentan una actividad intrínseca que se dobla después de su dimerización.

Aún resta elucidar el papel que tiene el estradiol en la regulación de la expresión del gen de la UG/CC10. Los resultados preliminares muestran un sinergismo entre el estradiol y el R5020, a nivel de estimulación de la CAT, bajo el control de las regiones 5' que describimos. La hipótesis que nosotros propusimos es una inducción del RP por el estradiol en las células T-47D (May *et al.*, 1989). Sin embargo, hay otros estudios que también han puesto en evidencia una inducción del gen por el estradiol, cuando este mismo tipo de construcciones se hacen con el fragmento del promotor (-396 a -200) del gen UG/CC10.

Otro punto a esclarecer es el papel de los sitios de unión del RP en el primer intrón del gen. Es conocido que ciertos genes poseen regiones reguladoras intragénicas en sus intrones (Gillies *et al.*, 1983, Savouret *et al.*, 1994) por lo que es posible pensar que pudiera ocurrir un efecto sinérgico de la estimulación transcripcional por efecto de los PRES del promotor y los intrónicos. Se ha demostrado que los PRES intrónicos presentan una afinidad mas débil que los PRES de la región 5' (Bailly *et al.*, 1986). Otra hipótesis que se ha propuesto es que como la síntesis de la UG/CC10 se detiene el 12^{avo} día del embarazo, a pesar de las concentraciones crecientes de P_4 , sería posible entonces que el RP se pegara tardíamente a esos sitios, cuando las concentraciones de P_4 son muy elevadas, que conllevara a un bloqueo de la transcripción.

Por otra parte y de manera general, es muy importante señalar la importancia de la línea celular utilizada para este tipo de modelos, ya que nosotros hemos encontrado, como antes se mencionó, la presencia de factores que funcionan como represores así como secuencias que funcionan como silenciadores, por tal motivo, como nuestro objetivo es el crear un modelo que nos permita determinar la actividad progestacional de diversas progestinas, y este sistema presenta aún regiones reguladoras no caracterizadas, nosotros creímos conveniente construir un modelo sintético que portara en sus secuencias únicamente los elementos PREs descritos en la literatura y estudiar la inducción hormonal de diversas progestinas o antiprogestinas, en presencia únicamente de su factor regulador, el complejo RP-esteroide.

CAPITULO TERCERO:

CARACTERIZACION DE UN MODELO MOLECULAR *IN VITRO*,
PARA EVALUAR COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
PROGESTACIONAL Y/O ANTIPROGESTACIONAL.

**CHARACTERIZATION OF AN AGMK CV-1 CELL LINE STABLY
TRANSFECTED WITH PROGESTERONE RECEPTOR: A MODEL TO STUDY
PROGESTINS AND ANTIPROGESTINS AT THE TRANSCRIPTIONAL LEVEL.**

Pasapera AM[°], García-Becerra R[°], García de la Mora G[°], Pichon C* and Savouret J.F*.

[°] Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico City.

* Institute Nationale de la Santé et Recherche Medicale U135, Kremlin Becêtre, France.

Running title: A molecular model to evaluate progestins and antiprogestins at the transcriptional level.

Address correspondence:

Dr. Ana María Pasapera Limón.
U.I.M en Biología del Desarrollo
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Instituto Mexicano del Seguro Social
Av. Cuahutemoc No. 330 CP 06726
colonia Doctores, del Cuahutemoc
MEXICO
Tel: (525)6 27 69 00 ext. 3102
Fax: (525)7 61 09 52
e-mail: annapl@servidor.unam.mx

ABSTRACT

The need for new and potent progestins and antiprogestins suitable for use in reproductive therapy and contraception is still very urgent, but the research is in part impeded by the complex technology required for screening these compounds. In order to rapidly and easily characterize the effects of progestin or antiprogestin molecules, we developed a cellular model in which progestagenic action can be detected by using a PRE₂-TATA-CAT reporter vector introduced in a cellular line stably transfected with Progesterone Receptor (PR). The CV-1 monkey kidney cell line was chosen as an ideal model because these cells do not possess steroid receptors. The stably transfected CV-1 cell model was established by cotransfection of rabbit PR cDNA and a neomycin resistance gene and cloning under selective pressure given by geneticine. The cell line was maintained for more than one year without losing the PR and progestagenic response. The presence of PR in this cellular line was characterized by detecting the PR by immunohistochemical methods and the K_d determined by Scatchard analysis.

This cellular model allowed the study of progestational activity of several compounds in cell culture experiments by detection of the induced CAT activity. The results obtained from the characterization of this CV-1-PR line, showed that the PR is expressed at a concentration of 0.170 fmol/mg protein. The rPR detected is localized in the cell nucleus in presence or absence of hormone.

The hormonal/antihormonal effects of 19-nor progestins and their metabolites were analyzed by using this cellular model harboring PR and transfected by the calcium phosphate method with the PRE₂-TATA-CAT reporter vector. The induced CAT activity reached a maximum level as early as 24 hours after the cells were treated with the different compounds. The antiprogestin RU 486 inhibited the CAT activity induced by the potent synthetic progestin R5020. The PRE₂-TATA-CAT induction by estradiol, was also analyzed and no cross reactivity was found.

Data obtained demonstrate that Norethisterone (NET) and Levonorgestrel (LNG) induced the PRE₂-TATA-CAT activity at subnanomolar concentrations, lower than those required of R5020. NET and LNG metabolites induced CAT activity at a

lower level than that presented by the original compounds. Furthermore, the 5 α -NET derivative presents a potent antiprogestational activity by inhibiting CAT activity induced by R5020.

Whith this model we have obtained a suitable assay to test the progestational activity of different compounds avoiding the crossreactivity with other steroid receptors like the glucocorticoid receptor.

INTRODUCTION

The progestagenic action of progesterone and synthetic progestins is mediated by the progesterone receptor (PR) located intracellularly at target tissues (12). The PR belongs to a superfamily of nuclear transactivators (10). When these receptor proteins are ligand activated, they act as transcription factors which are able to induce target gene transcription after a cascade of events that include: allosteric change in the receptor, increase in the receptor phosphorylation rate, and liberation of heat shock proteins (18). After these events, the steroid receptor complex then interacts with the specific hormone responsive elements (HREs) located in the regulatory regions of the progesterone-responsive genes (1).

The progesterone receptor exists as two distinct molecular isoforms in cells: the form B which contain 933 aminoacids (~114 KD), and the truncated isoform A, which lacks the N-terminal 164 aminoacids (~ 94 KD). It seems that the rabbit PR is an exception among species, as the PR is found only as one isoform the long B form (21). Although the specific role of the different PR isoforms is unclear and the biological importance of the PR protein ratios has not been extensively explored (33,34), it is well known that both receptors come from a single copy gene (17).

The characterization of the mode of action of progestins is of great interest, because of their wide use as contragestational agents, and in the treatment of many diseases (28). Progestins exert their progestational activity by binding to the PR, and may also interact with other steroid receptors. Norethisterone (NET) and levonorgestrel (LNG) belong to the group of progestins used as contraceptives (). Both progestins are bioconverted to their 5 α - and 3 β ,5 α -reduced metabolites, which have been demonstrated to acquire new hormone agonistic or antagonistic capabilities (6,29).

The A-ring reduced metabolites of NET and LNG mainly interact with PRs and Estrogen Receptors (ERs) (8). The 5 α -reduced metabolites bind to the PR,

whereas the $3\beta,5\alpha$ -metabolites bind to the ER. These metabolites can exert different hormonal properties (29). The progestational and estrogenic properties of these progestins have been studied *in vivo* by assessing the uteroglobin gene expression (31). These studies indicate that 5α -NET, has a low progestational effect, while the further reduced metabolite, $3\beta,5\alpha$ -NET, exerts estrogenic actions upon uteroglobin and its mRNA synthesis (5). When these metabolites were tested in combination with progesterone, they showed potent antiprogestational and antiimplantation properties (3,26). However, the molecular mechanisms involved in the hormonal and antihormonal actions of these steroids have not been elucidated.

In this study we assessed the molecular effects of NET, LNG and their reduced metabolites by using a highly sensitive *in vitro* molecular assay in which progestational and antiprogestational effects can be detected by measuring the transactivation of the chloramphenicol acetyl-transferase (CAT) activity (11) from a reporter vector responsive to progesterone (PRE₂-TATA-CAT) (27).

MATERIALS AND METHODS.

Steroids.

Levonorgestrel (13β -ethyl- 17α -ethynyl- 17β -hydroxy-4-gonen-3-one) and R5020, a well studied synthetic progestin ($17\alpha,21$ -dimethyl- 19 -nor- $4,9$ pregnandiene- $3,20$ -dione) were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Norethisterone (17α -ethynyl- 17β -hydroxy- 19 -nor- 4 -androsten- 3 -one) was obtained from Schering Mexicana, Mexico. 5α -NET $3\beta,5\alpha$ -NET, 5α -LNG and $3\beta,5\alpha$ -LNG were obtained by chemical synthesis as previously described (1,8). RU486 (17β -hydroxy- 11β -[4 -dimethylamino-phenyl]- 17α [1 propynyl]estra- $4, 9$ -diene- 3 -one) was kindly provided by Roussel Uclaf (Romanville, France). The selective antibiotic geneticin was obtained from Gibco BRL.

Gene Constructs.

The rabbit PR cDNA and ER expression vectors pSKVrPR (22) and pSKVER (), were kindly provided by Professor E: Milgrom (Laboratoire des Hormones et Reproduction, Bicêtre, France) and has been described by Guiochon-Mantel *et al.* (15) and Savouret *et al.* (32) respectively. The ERE Vit A2 -TK-CAT was provided by -----The reporter gene construct PRE₂-TATA-CAT was constructed by using the plasmid pEMBL 8+ TK-CAT. The TK (thymidine kinase) promoter sequence (20) was excised with Bam H1/Bgl II restriction enzymes.

A double stranded oligonucleotide 5'-TAC AGG ATG TTC TAG CTA ACT GTA CAG GGA TGT TCT GGA TCT GAG GTC CAC TTC GC 3', containing the restriction sites for Bam H1 and Bgl II, the two progesterone responsive elements (PRE₂) and the TATA box, the restriction sites for Bam H1 and Bgl II was inserted in the plasmid. The control TATA-CAT construct was obtained in a similar manner but without the two PRE sequences (figure 1A,B).

Cell cultures and transfections.

AGMK CV-1 Cells from monkey kidney were cultured at 37°C in DMEM medium (Gibco-BRL, Inc., Gaithersburg, MD) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 0.1 U/ml insulin, 100 IU/ml penicillin in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were transfected by the calcium phosphate-DNA coprecipitation method as previously described (7). Briefly, the cells (5 X 10⁵) were plated in 9 cm Petri dishes in DMEM medium. After 24 h they were rinsed with PBS pH 7.4 and incubated with phenol red-free medium containing 10% dextran-charcoal stripped calf serum. Since AGMK CV-1 cells are devoid of steroid receptors, they were cotransfected with 2 µg of the expression vector encoding the rabbit PR, 0.1 µg of PCH 110 galactosidase vector as internal standard and 5 µg of PRE₂-TATA-CAT or TATA-CAT vector. Total transfected DNA in all experiments was normalized to 20 µg by the addition of herring sperm DNA. Twenty four hours after transfection, a 1 min shock of dimethylsulfoxide (10% in serum free medium) was given. The cells were rinsed with PBS pH 7.4 and reseeded with stripped medium. Then steroids were added in 0.001% ethanol. Twenty four hours after treatment the cells were

harvested in buffer A (15mM Tris-HCl, pH 8.0, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 2mM EDTA) (30) and processed for CAT assays.

Assay for reporter gene activity.

The whole cell extracts were obtained by five cycles of freezing/thawing and centrifugation. Protein concentration in cell extracts was determined by the BCA assay (Pierce Chemical Company), CAT activity was measured by the method described by Pothier et al. (30), with minor modifications. Cell extracts (100 µg) were incubated in buffer A with 5 µl of [¹⁴C]-chloramphenicol 53.1 mCi/mmol and Acetyl-Co A (4mM) for 1 h at 37°C. The acetylated and non-acetylated forms of [¹⁴C]-chloramphenicol were separated by thin layer chromatography (TLC) in chloroform/methanol (95:5) for 45 min. The TLC plates were exposed to Kodak X-OMAT-AR film for 24 h at room temperature and the radioactive spots were analyzed by densitometry. For each test three series of experiments were performed in triplicate.

Immunocytochemical assay for PR.

Immunocytochemical detection of rPR present in the stably transfected cells with the rabbit PR was performed as described by Guichon-Mantel *et al*, 1989. Briefly, approximately 5×10^5 cells were plated on fibronectin-precoated chamber slides (Nunc). Immunofluorescence studies were performed by using a fluorescein-conjugated rabbit anti-mouse antibody (Dakopatts, Glostrup, Denmark) at a dilution 1:40. Photographs were taken on a Leitz microscope, with Fujichrome 1600 ASA film. The subcellular localization of the PR was observed in 100 cells. Staining was considered nuclear (or cytoplasmic) when it was exclusively nuclear (or cytoplasmic) or stronger in the nucleus (or cytoplasm) than in the cytoplasm (or nucleus).

Western blot analysis for PR .

Western blot analysis was performed as described by Pasapera et al.(26) with minor modifications. Total protein extracts from stably transfected CV-1 cells were

obtained and 100 μg of proteins were separated by PAGE and then transferred to nylon membrane (overnight, 30 V, 4°C) in a buffer containing 25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3. Membranes were blocked with 10% (w/v) non fat dry milk in 10 mM PBS pH 7.2 for 1h at room temperature and then incubated with monoclonal antibodies MI 60, Let 126 and Let 81 (14) in 10mM PBS pH 7.2 with 10% (w/v) non fat dry milk at dilutions 1:300, 1:400, and 1:300 respectively. After 1h of incubation at room temperature, the membrane was washed 5 times in PBS and five in TBS (150mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.2). After the last washing, the membrane was incubated with peroxidase conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (1:1000) in TBS with 10% (w/v) non fat dry milk for one h at room temperature. Color development was performed by using a solution containing 0.6 mg/ml diaminobenzidine (Gibco-BRL, Inc. Gaithersburg, MD) in 10mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ of 30% H_2O_2 .

Dextran-coated charcoal PR assay.

Progesterin binding to PR was measured by modification of the charcoal-dextran method as previously described (8).

Briefly, cytosols were incubated with 20nM of the progesterin [^3H] R5020 in presence or absence of 2 μM of R5020. After an incubation of 16-20 h at 4°C, a charcoal-dextran suspension was added and incubated for 15 min the incubation was centrifuged and aliquots of the supernatant were counted. The data were normalized to the cytosol protein content.

The receptor level is expressed in terms of total protein present in the cytosols.

RESULTS.

CV-1 cells cotransfected with rPR and PR responsive reporter gene are responsive to treatment with progestins.

To determine the progestational and antiprogestational activity of RU 486, NET, LNG, and their A-ring reduced metabolites, AGMK CV-1-PR cells were transfected with either construct, PRE₂-TATA-CAT or TATA-CAT. Transcriptional activity of the PRE₂ reporter vector was under PR regulation, while the control TATA-CAT was insensitive to PR-mediated transcription. A high CAT activity was normally induced when the cells were cotransfected with PRE₂-TATA-CAT, and then treated with R5020, whereas the antiprogestin RU486 did not modify CAT activity (figure 1).

The PRE2-TATA CAT displays low background activity and high levels of induction by progestins when cotransfected with rPR in CV-1 rPR cell line.

Given that CV-1 cell line do not possess steroid receptors, and that some factors are required for transcriptional activation in presence of steroid receptor complexes, we wished to test the responsiveness of the PRE₂-TATA-CAT and ERE-Vit A2 TK-CAT reporters to synthetic progestins in presence of the rPR. As expected, CAT activity was strongly induced by the synthetic progestins (10^{-8} M) when CV-1 cells were cotransfected with the rPR cDNA (2 μ g) and PRE₂-TATA-CAT reporter (5 μ g), (Figure 2). In contrast no induction was detected in presence of estradiol when CV-1 cells were cotransfected with the ERE-Vit A2-TK-CAT reporter and rPR cDNA however, when this reporter ERE Vit A2-TK- CAT was cotransfected with the rabbit estrogen receptor, CAT activity was strongly inducible with estradiol 10^{-9} M but not by R5020. (Data not shown).

The low background of promoter activity and high levels of induction by progestins prompted us to use this cell line harboring the rPR for screening and analysis of the activity of synthetic steroids.

AGMK-CV-1 cells were stably transfected with rPR and the protein show the same characteristics as in vivo.

Given that the PREs interact not only with PR but also with glucocorticoid receptors, mineralocorticoid receptors and androgen receptors, and the synthetic progestins are capable to bind these receptors, we wished to obtain a model which only express the PR in order to determine the hormonal activity induce by activated PR. For this purpose we stably transfected the AGMK CV-1 steroid receptors negative cells with the rPR. The transient transfections were carried out as described by Savouret et al. (32)

A stably transfected cell line (Culture for 18 months without loss of PR nor progestagenic response) was established by cotransfection of the rabbit PR expression vector pKSVrPR together with the neomycin resistance gene and cloning under selective pressure by geneticine. After geneticin selection of rPR positive clones, cells were analyzed by immunocytochemical detection of PR (Figure 4A and B) and immunoblot analysis. The PR levels in this cell line were 170 fmol/mg cytosol protein.

AGMK CV-1 cells stably transfected with the rPR are responsive to progestin treatments.

It has been demonstrated that in cell culture induction of transcription is dependent upon the cell line to corroborate that our model is responsive to progestin treatment, transient transfections were made and dose response curves with increasing amounts of various 19-nor progestins and their A-ring reduced metabolites (10^{-11} - 10^{-6} M) were tested (figure 5). All data were normalized for variations in transfection efficiencies as determined with the internal control reference recombinant pCH110 expressing β -galactosidase.

19-Nor progestins and their metabolites interact with the CV-1 PR.

To evaluate the interaction of NET and its metabolites, with the PR, the cytosol preparations were incubated with 1 nM [3 H] ORG 2058 at 4 ° C in the presence of

absence of increasing concentrations of steroid competitors including ORG2058, Progesterone, NET, 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET, LNG, RU486 and estradiol. At the end of incubation, bound and free fractions were separated by the addition of a dextran-coated charcoal suspension. The results are expressed as percentage of [³H] ORG 2058 specific binding. Fig X shows that ORG 2058, P4, LNG, RU486, NET and 5 α -NET were efficient competitors for progesterone specific binding sites in the CV-1 rPR cell extracts, while 3 β , 5 α -NET and estradiol (figure 6). The binding affinity to the PR of NET and 5 α -NET founded in this study confirms and extend previous results in cytosols from rat uterus (8)

The 5 α -A-ring reduced metabolite of NET, have different transcriptional activities from NET in AGMK-CV1-PR cells.

In previous studies, we have shown that the A ring reduced metabolites of NET has different hormonal effects *in vivo*. To determine the progestational and antiprogestational activity of NET, LNG and their A-ring reduced metabolites, AGMK CV-1-PR cells were transfected with PRE₂-TATA-CAT. Thereafter, transfected cells were treated simultaneously with R5020 (3×10^{-8} M and 1×10^{-7} M) and 5 α -NET or RU486 (30-fold molar excess for each agonist dose) demonstrated that 5 α -NET inhibited the CAT activity induced by R5020 in a manner similar to that observed with the antiprogestin RU486 (Figure 7).

DISCUSSION

A transfection procedure was used to generate a CV-1 cell line stably transfected with the rPR, to evaluate the progestational and antiprogestational activities of several 19-nor progestins. These hormonal effects of NET, LNG and their metabolites were assessed after transfection of a PR-responsive reporter (24). The rPR (20) stably transfected cells were analyzed for rPR characteristics by binding and immunohistochemistry analysis. As suggested by these analyses and accurately quantitated by the hormone binding studies, the expression level of rPR among individual cell clones showed variations (data not shown). In this context, the analysis of several cell lines over prolonged period of cell culture (with the selective agent geneticin) did not result in any significant change in the expression level of the PR. Therefore, CV-1 -rPR clone 50, was chosen for this study due to that this cell line possesses stable levels of functional PR, with the typical molecular weight as demonstrated by western blot analysis (data not shown).

Using this model the progestational and antiprogestational activities of NET, LNG and their metabolites were assessed after transfection of the PRE₂-TATA-CAT reporter vector. The data obtained from this study confirms and extends previous reports that indicate that stimulation of transcription by progestins through PR requires the presence of PRE in the template to function as transactivating factors (19,33).

Testing the hormonal/antihormonal effects, transcription induced by NET, LNG and their A-ring reduced metabolites was observed. The 19-nor progestins, all differ in their affinity towards rPR as determined by competitive hormone-binding studies using cytosol from rabbit uterus (25). If analyzed for their transcriptional modulation potencies mediated by the rPR in a similar if not identical manner. This was illustrated not only by a comparable ranking order of the activity of compounds with respect to their relative binding values (RBA's), and dose administered.

As it was reported, NET and LNG exert a potent progestational action (28) while the dihydro-reduced metabolite, 5 α -NET, exerted both progestational and

antiprogestational effects since it induced a weak CAT activity compared with NET and R5020.

In this study we confirm that this reduced metabolite, also exerts antiprogestational activity *in vitro* since it blocked CAT activity induction produced by R5020 when they were simultaneously administered, this antiprogestational effect of 5 α -NET was similar to that observed with RU 486 (figure 5). Our data also suggest that the antiprogestational activity of 5 α -NET previously reported *in vivo* (26) is mediated through PR and occurs at the transcriptional level.

These studies confirm and extend previous data from Cerbón et al. (5) who demonstrated that 5 α -NET possesses weak progestational activity in prepubertal rabbits by assessing uteroglobin synthesis, which correlates with the relative binding affinity of this metabolite for PR (7).

As has been demonstrated for several synthetic steroids, 5 α -NET displays both agonistic and antagonistic activities, in this study we can not ascertain whether the quality of the response (agonistic or antagonistic) is related to the receptor affinity or to the chemical structure of the ligand, because it has been proposed that a pure antihormone may be considered as a compound which stabilizes exclusively the inactive conformation of the receptor, whereas a mixed antagonist would be able to stabilize both the active and inactive conformations to various extents (25), hence this 5 α -NET metabolite is demonstrative of this fact.

Interestingly, 3 β 5 α -NET induced CAT activity in our CV-1 model, these results disagree with previous studies since it has been reported that this metabolite has a low affinity for PR (7) and high affinity for estrogen receptors, however, in this system 3 β ,5 α -NET is able to stimulate CAT transcription through the activation of PR since it activates the transcription of a progesterone responsive gene in a manner similar to that of 5 α -NET. It will be interesting to test if this compound has antiprogestational activity in this model, since it has been reported that "in vivo" this NET metabolite inhibits the Uteroglobin synthesis (4), and this effect has been reported to be mediated by the estrogen receptor since the 3 β 5 α -NET binds to the estrogen receptor with high affinity.

From these studies we propose that the hormonal result of a given compound should be evaluated taken in consideration the metabolism process, thus the metabolites resulted from a given compound play an important role in the final biological effect of the progestin administered (23, 24).

In summary, our results indicate that NET, LNG and their A-ring reduced metabolites exert hormonal and antihormonal effects at the transcriptional level. NET, LNG and the metabolites of the latter induce progestational actions dose dependent manner similar to R5020. In fact, the finding that both LNG metabolites induced CAT activity through PR and the PREs suggests that these metabolites could present physiological effects *in vivo*, like those presented by 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET.

Finally is important to mention that the AGMK CV-1 cell line used in this study is a suitable model to evaluate hormonal and antihormonal activities since it lacks steroid receptors. In this way, we can introduce the desired steroid receptor and evaluate only the effects due to the interaction of the steroid with a specific and highly sensitive method without interference due to the presence of several steroid receptors as occurs at target tissues (32). Permanent transfected cell lines, have been widely used to test transcriptional responses with an efficient and accurate tool for the determination of hormonal action *in vitro* (9) and this study is a representative of this.

CONCLUSIONS

This study confirms and extends previous reports that indicate that the stimulation of transcription by progestins through PRs requires the presence of PRE(s) in the template to function as transactivating factors.

NET, LNG and their A-ring reduced metabolites exert diverse hormonal and antihormonal effects through PR. LNG and NET possess strong progestational

properties since they induced CAT activity in the presence of both the PRE₂-TATA-elements and the PR in AGMK CV-1 transfected cells at subnanomolar concentrations as low as 10⁻¹¹ M.

The dihydro-reduced NET metabolite, 5 α -NET, exerted both progestational and antiprogestational effects since it induced a weak CAT activity compared with NET and R5020. However, it blocked CAT activity induction produced by R5020 when they were simultaneously administered. This antiprogestational effect of 5 α -NET is similar to that observed with the antiprogestin RU 486.

With this model we have developed a suitable tissue culture-based assay to test *progestational activity of different compounds avoiding the crossreactivity of these compounds with other steroid receptors such as Glucocorticoid receptor.*

REFERENCES

1. **Beato M**, Chávez S, and Truss M. 1996 transcriptional regulation by steroid hormones. Steroids 61: 240-251
2. **Bowers A**, Ringold HJ, Denot E. 1958. Steroids C 19-nordihydro-testosterone derivatives. J. Am. Chem. Soc. 80:6115
3. **Castro I**, Cerbón MA, Pasapera AM, Gutiérrez-Sagal R, García GA, Orozco C, Camacho-Arroyo I, Anzaldúa R, Pérez-Palacios G. 1995. Molecular mechanisms of the antihormonal and antiimplantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. Mol Reprod Dev. 40:157-162.
4. **Cato ACB**, Miksiek R, Shutz G, Arnemann J, and Beato M. 1986. The hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus mediates progesterone induction. EMBO J. 5: 2237-2240.
5. **Cerbón MA**, Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, García GA, Pérez Palacios G. 1990. Variable expression of the Uteroglobin gene following the administration of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. J Steroid Biochem 36:1-6.
6. **Cerbón MA**, Lemus AE, Vilchis F, Pasapera AM, García GA, Pérez-palacios G,. 1991. A-ring reduced derivatives of norethisterone exert antihormonal effects. In Negro vilar A, Perez-palacios Eds. Reproduction, growth and development. New York. Raven Press. 175.
7. **Chauchereau A**, Loosfelt H, Milgrom M; 1991, Phosphorylation of transfected wild type and mutated progesterone receptors. J Biol. Chem. 266:18280
8. **Chávez B**, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca, Pérez-Palacio G. 1985. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. J Steroid Biochem 22: 121-126.
9. **Dijkema R**, Scoonen WGEJ, Teuwen R, Van der Struik E, de Ries RJH, van der Kar BAY, and Olijve W. 1998 Human progesterone receptor A and B Isoforms in CHO cells. I Stable transfection of receptor and receptor responsive genes: Transcription modulation by antiprogestins J. Steroid Biochem and Mol. Biol. 64, 147-156.
10. **Evans RM**; 1988, The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240: 889-895
11. **Gorman C**, Moffat L, Howard B; 1982, Recombinant genomes which express choramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. 2: 1044.

12. **Graham D, Clarke C.** 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. Endocrine reviews. 18: 502-519.
13. **Gronemeyer H.** 1991. Transcriptional activation by estrogen and progesterone receptors. Annu. Rev. Genet. 25: 89-123.
14. **Groyer-Picard MT, Vu-Hai MT, Jolivet A, Milgrom E, Perrot-Appianat M.** 1990. Monoclonal antibodies for immunocytochemistry of progesterone receptor (PR) in various laboratory rodents, livestock, humans and chickens : Identification of two epitopes conserved in PR of all these species. Endocrinol 126:1485-1491.
15. **Guiochon-Mantel A, Lossfelt H, Ragot T, Bailly A, Atger M, Misrahi M, Perricaudet M, Milgrom E;** 1988, Receptors bound to antiprogestin form abortive complexes with hormone responsive elements. Nature 336:695-698.
16. **Horwitz KB and Alexander PS.** 1983. In situ photo linked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunitmolecular weights after transformation and translocation. Endocrinol. 11, 2195-2201.
17. **Kastner P., Krust B., Turcotte U., Stropp L, Tora H, Gronemeyer H, Chambon P.** 1991. Two distinct estrogen regulated promoters generates transcripts encoding two functionally different human progesterone receptor forma A and B. EMBO J 9: 1603-1614.
18. **Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen B,** 1996. Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. Chemistry and Biology. 3: 529-536.
19. **Klein-Hitpass L, Tsai SY, Weigel NI, Allan GF, Riley D, Rodriguez R, Schrader WT, Tsai MJ, O'Malley BW;** 1990, The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. Cell 60:247.
20. **Klein-Hitpass,L., M. Schrorpp, V. Wagner and G.V. Ryffel.** 1986. An estrogen responsive element derived from 5'flanking region of the Xenopus Vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. Cell, 46: 1053-1061.
21. **Loosfelt H, Logeat F, Vu Hai M T and Milgrom E.** 1984. The rabbit progesterone receptor: evidence for a single steroid binding subunit and characterization of receptor mRNA. J. Biol. Chem. 259 14196-14202.
22. **Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, and Milgrom E.** 1986 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 9045-9049.

23. **Larrea F**, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores J, Pérez-Palacios GJ. 1987. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. J Steroid Biochem 27: 657- 663.
24. **Markiewicks L**, Hochberg RB, Gurpide E. 1992. Intrinsic estrogenicity of some progestagenic drugs. Journal of Steroid Biochem. and Mol. Biol. 41: 53-58
25. **Nique F**, Van de Velde P, Brénaud J, Hardy M, Philibert D, Teutsch G; 1994, 11- β amino alkoxy phenyl restradiol, a new series of pure antiestrogens. J. Steroid Biochem . Mol. Biol: 1:21.
26. **Pasapera AM**, Cerbón MA, Castro I, Gutierrez R, Camacho AI, García AG, Pérez Palacios G. 1995a. Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. Biol Reprod 52: 426-432.
27. **Pasapera AM**, Camacho-Arroyo I, Savouret JF, García GA, Perez-Palacios G, Pichon C and Cerbón MA. 1995b. In vitro molecular assessment of the mechanism of action of 19-nor progestins used as contraceptives agents. Archives of Medical Research 26, S203-S207.
28. **Pascualini JR**, Paris J, Struk-Ware R, Cherite G, and Botella J. 1998. Progestins and breast cancer. J. Steroid, Biochem. and Mol. Biol. 65: 225-235.
29. **Pérez-Palacios G**, Cerbón MA, Paspera AM, Castro I, Enríquez J, Vilchis f, García GA, Morali G, Lemus AE. 1992. Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. J Steroid Biochem Molec Biol. 41: 479-486.
30. **Pothier F**, Ouellet M, Julien JP, Guerin SL; 1992, An improved cat assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. ADN Cell. Biol. 11:83-90.
31. **Savouret JF**, Milgrom E. 1983. Uteroglobin: a model for the study of progesterone action in mammals. DNA 2: 99-104.
32. **Savouret JF**, Redeiulh G, Sokhavut Sar, Chauchereau A, Woodruff K, Parker GM, Milgrom E; 1994, Interplay between estrogens, progestins and A-P on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. J. Biol. Chem .269:28955.
33. **Tsai SY**, Tsai MJ, O'Malley BW; 1989, Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to a transcriptional synergism at target enhancer. Cell. 57:442.

34. **Vegeto E**, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman E, O'Malley BW, McDonnell DP. 1993. Human progesterone receptor A form is a cell-and promoter specific repressor of human receptor B function. Mol. Endocrinol. 7: 1244-1255.
35. **Wen DX**, Xu Y.F., Mais D.E., McDonnell D.P. 1994. The A and B isoforms of the hormone progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. Mol. Cell Biol. 14: 8356-8364.



Figure 2.

Immunocytochemical localization of stably transfected AGMK-CV1 cells with the rabbit PR.

Hormone induced nuclear translocation of PR in AGMK-CV1 cells stably transfected with the rPR. A) in absence of hormone rPR is partially cytoplasmic. B) in presence of hormone, R5020 30 nM, RP is localized in the nucleus.

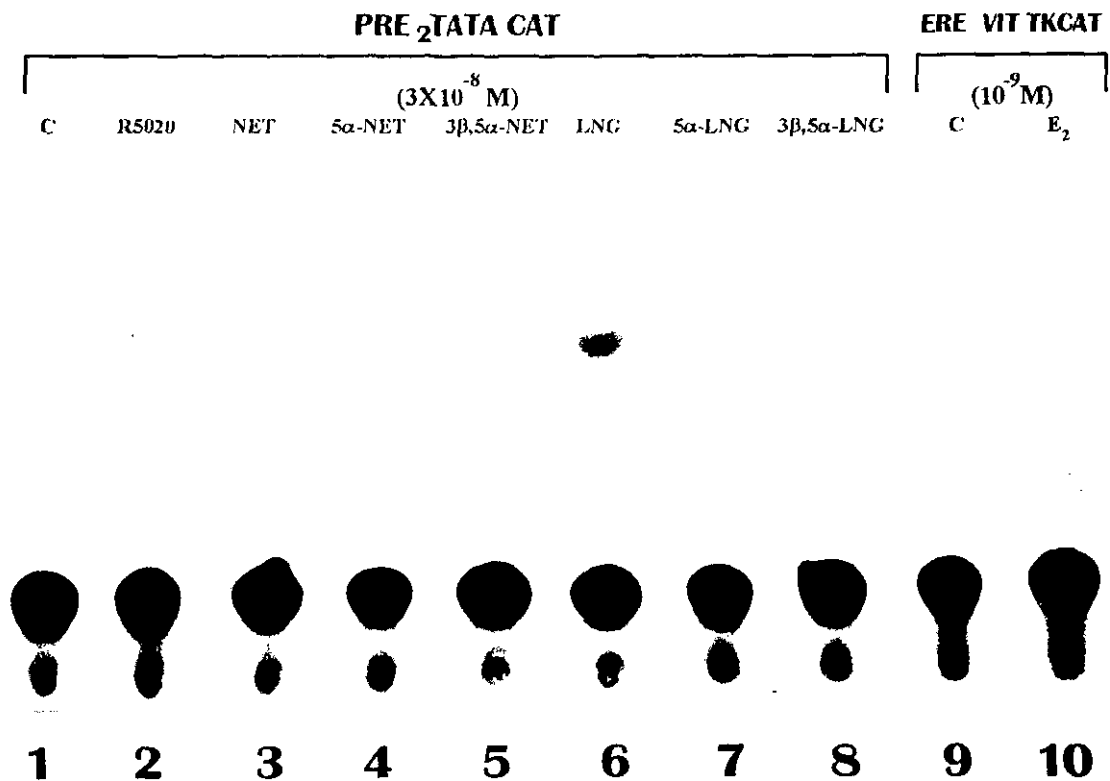


Figure 3.

Progestational activity induction by 19-Nor-progestin. AGMK CV-1 cells were cotransfected with the rabbit PR expression vector and the PRE₂-TATA-CAT plasmid. CAT activity was measured in cells treated with R5020 (3 X 10⁻⁸ M), NET and their derivatives (3 X 10⁻⁸ M), LNG and their derivatives (3 X 10⁻⁸ M), and 0.001 % ethanol as control. CAT activity was measured also with expression vector ERE-VIT-TKCAT treated with E₂.

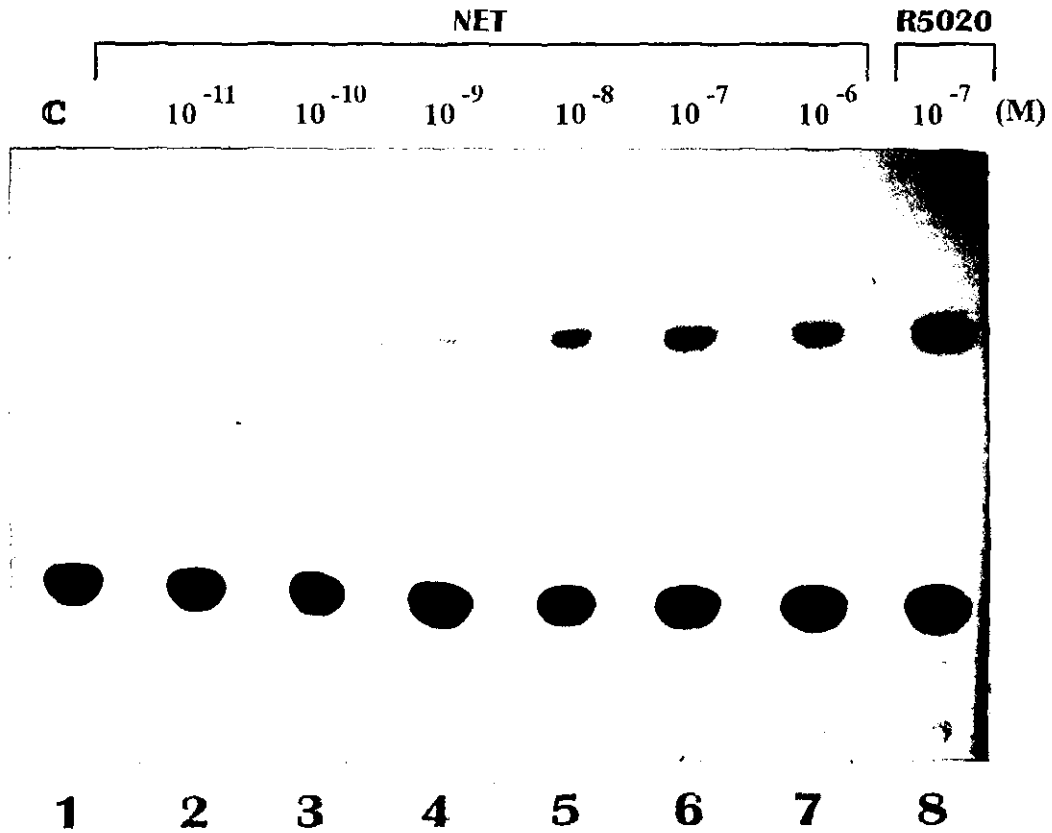


Figure 4.

Effect dose-response of NET administration. AGMK CV-1 cells were cotransfected with the rabbit PR expression vector and the PRE₂-TATA-CAT plasmid. CAT activity was measured in cells treated with different dose NET (10^{-11} to 10^{-6} M) and R5020 (10^{-7} M), ethanol as control.

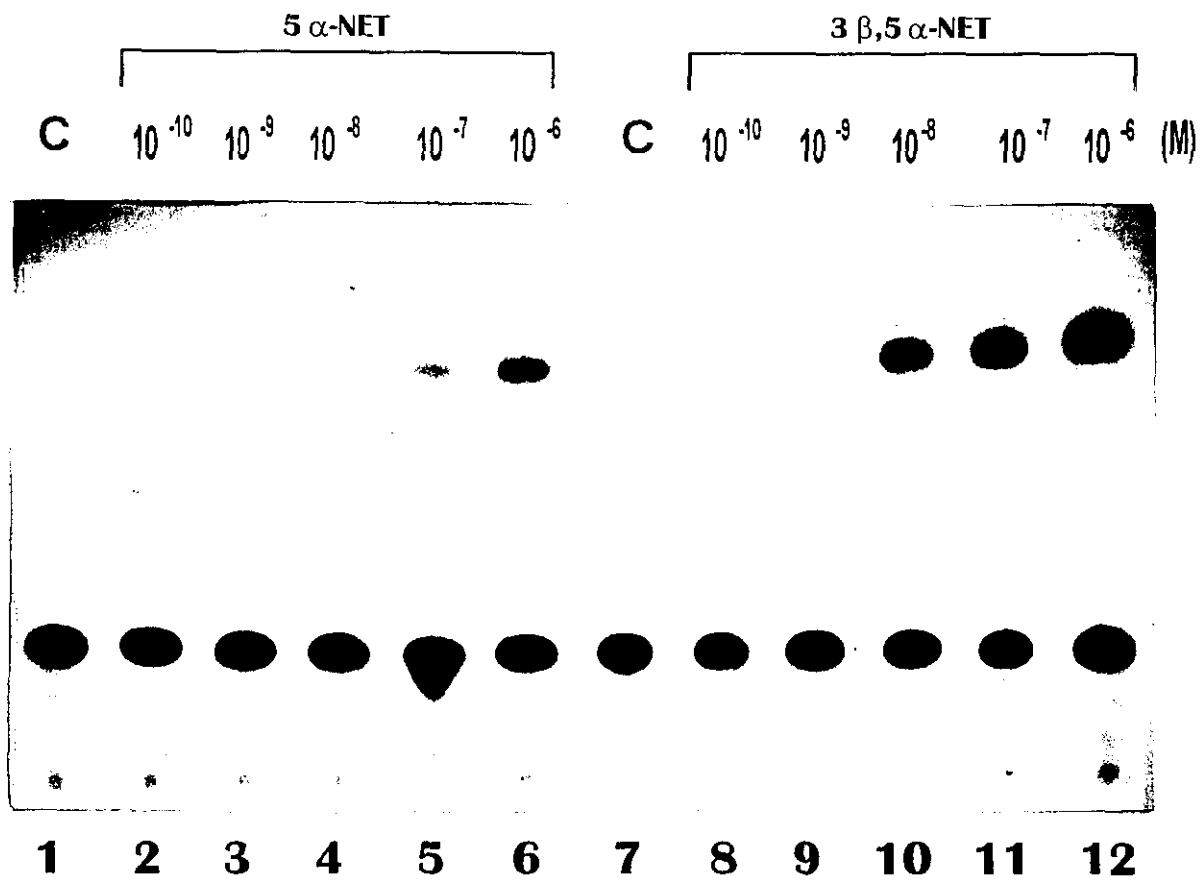


Figure 5..

Effect dose-response of reduced metabolites of NET. AGMK CV-1 cells were cotransfected with the rabbit PR expression vector and the PRE₂-TATA-CAT plasmid. CAT activity was measured in cells treated with different dose of reduced metabolites of NET (10^{-10} to 10^{-6} M) and ethanol as control.

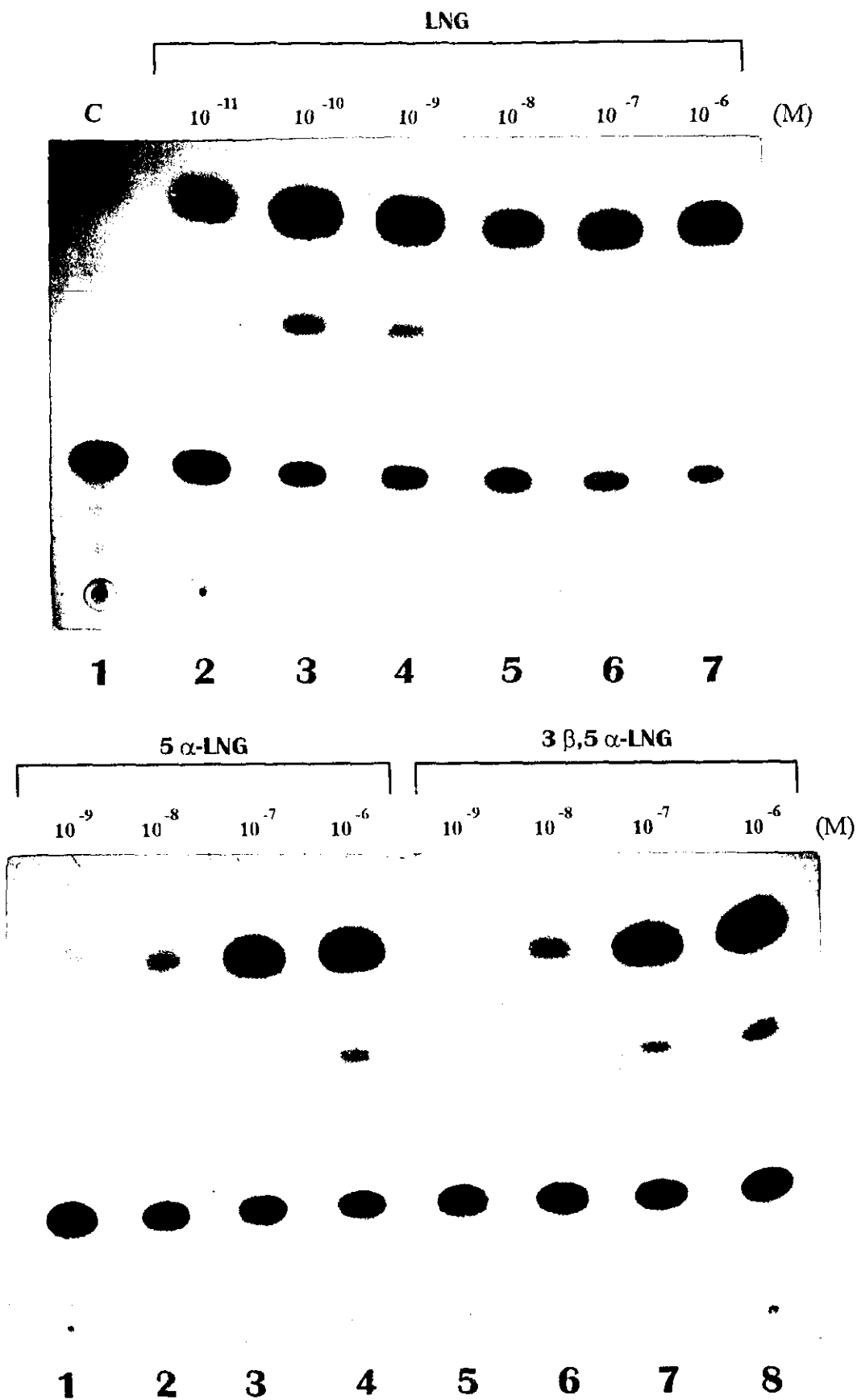


Figure 6.

Effect dose-response of LNG and its metabolites. AGMK CV-1 cells were cotransfected with the rabbit PR expression vector and the PRE₂-TATA-CAT plasmid. CAT activity was measured in cells treated with different dose of LNG (10^{-11} to 10^{-6} M) and its A ring reduced metabolites (10^{-10} to 10^{-6} M) and ethanol as control.

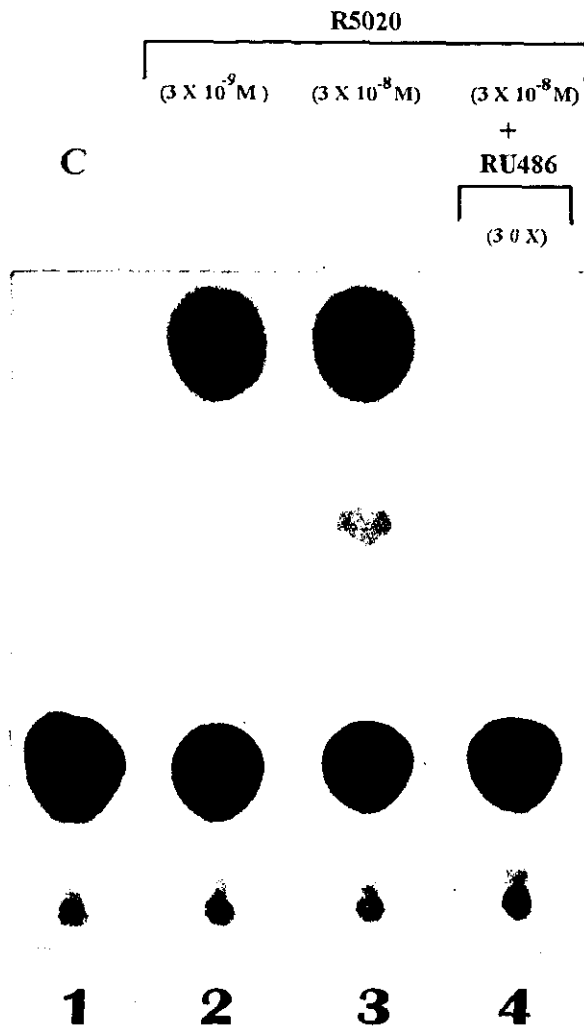


Figure 7.

Inhibitory effect of RU486 on the PRE₂-TATA-CAT induction by R5020. AGMK CV-1 cells cotransfected with the rabbit PR expression vector and PRE₂-TATA-CAT were treated with R5020 (3×10^{-9} M and 3×10^{-8} M) and RU486 (30-fold molar excess for each agonist dose). The CAT activity was measured. A representative autoradiography of TLC is shown.

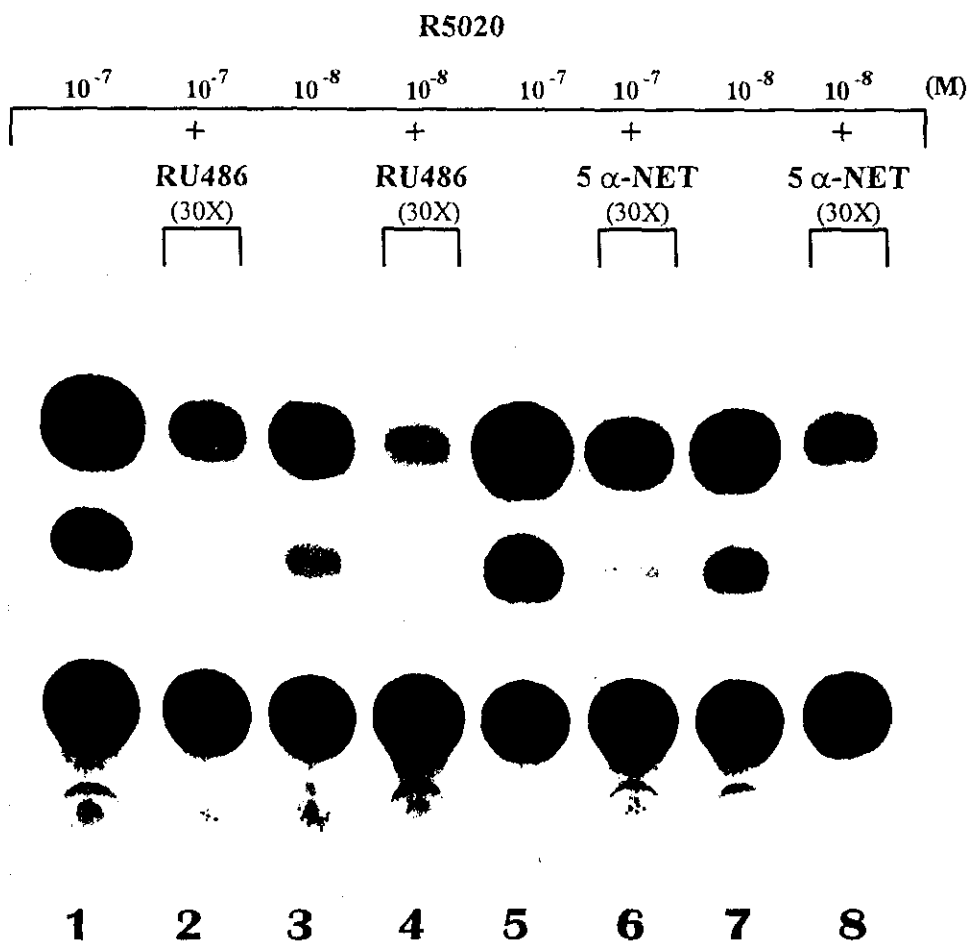


Figure 8.
 Inhibitory effect of 5α -NET and RU486 on the PRE₂-TATA-CAT induction by R5020. AGMK CV-1 cells cotransfected with the rabbit PR expression vector and PRE₂-TATA-CAT were simultaneously treated with R5020 (3×10^{-8} M and 3×10^{-9} M) and 5α -NET or RU486 (30-fold molar excess for each agonist dose). The CAT activity was measured. A representative autoradiography of TLC is shown.

PUBLICACIONES CONCERNIENTES A ESTE ESTUDIO

Norethisterone Metabolites Modulate the Uteroglobin and Progesterone Receptor Gene Expression in Prepubertal Rabbits¹

ANA MARIA PASAPERA,³ MARCO A. CERBÓN,^{2,3} IVONE CASTRO,³ RUBEN GUTIERREZ,³ IGNACIO CAMACHO-ARROYO,³ GUSTAVO A. GARCIA,⁴ and GREGORIO PEREZ-PALACIOS³

Molecular Biology Unit in Reproductive Health,³ National Institute of Nutrition S. Zubirán and FES-Zaragoza, School of Chemistry⁴, National Autonomous University of Mexico Mexico City, Mexico

ABSTRACT

Norethisterone (NET) is a synthetic progestin, used as a contraceptive agent, that is biotransformed at target tissues into 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET, which possess different pharmacological properties. The effects of these metabolites on the expression of uteroglobin (UG) and progesterone receptor (PR) genes, both regulated by progesterone (P₄), were evaluated in the uterus of prepubertal female rabbits that were simultaneously treated with P₄ (1.0 mg) for 5 consecutive days. As determined by Western and Northern blot analyses, 5 α -NET inhibited the P₄-induced UG gene expression in a dose-dependent manner. A similar inhibition was observed with the administration of RU-486. The estrogenic agent 3 β ,5 α -NET and estradiol at a dose of 1.0 mg also inhibited the UG gene expression induced by P₄. Both 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET blocked the PR down-regulation induced by P₄, as assessed by Western and Northern blot methods. The inhibition of UG synthesis and PR down-regulation by 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET indicates that these NET metabolites possess antiprogesterone properties.

INTRODUCTION

It has been demonstrated that 19-nor progestins are bioconverted into several metabolites at target tissues [1]. The progestin conversion products not only retain hormonal activities similar to those exhibited by the parent compound but may also acquire new hormone agonistic, antagonistic, or synergistic capabilities [2, 3].

Norethisterone (NET) is a synthetic 19 nor-progestin widely used as contraceptive agent [4]. Its administration to prepubertal female rabbits induces a significant increase in uterine uteroglobin (UG) and its mRNA content [5]. UG is the most abundant secretion protein in the uterus, where its synthesis is specifically induced by progesterone (P₄). This progestational effect of NET is mediated by the progesterone receptor (PR) [6].

The A-ring of NET is enzymatically reduced to 5 α -dihydro norethisterone (5 α -NET) and 3 β ,5 α -tetrahydro norethisterone (3 β ,5 α -NET) at target tissues [7]. This A-ring reduction of NET results in a significant diminution of its progestational activity. Thus the 5 α -NET metabolite interacts specifically with the PR, but it exerts very little, if any, progesterone-like effects as assessed by the induction of uterine UG [8]. The 3 β ,5 α -tetrahydro derivative of NET, while losing its progestational activity, displays a potent estrogenic-like effect [9].

The unexpected lack of progestational activity of 5 α -NET prompted us to evaluate whether or not this and one of its further derivatives, the 3 β ,5 α -NET, possess antiprogesterone properties by assessing the expression of UG and PR, two P₄-regulated genes, in the uterus of prepubertal female rabbits.

MATERIALS AND METHODS

Steroids

NET (17 α -ethynil-17 β -hydroxy-4-estren-3-one) was kindly provided by Schering Mexicana, S.A. (Mexico City, Mexico). 5 α -NET (17 α -ethynil-17 β -hydroxy-5 α -estran-3-one) was synthesized by lithium ammonia reduction of NET, as previously described [10]. The 3 β ,5 α -NET derivative was prepared from 5 α -NET by sodium borohydride reduction as reported by Chávez et al. [11]. Chemical purity of NET and its derivatives was assessed by their melting points, HPLC behavior, and H-nuclear magnetic resonance spectrometric analysis [9]. RU-486 (17 β -hydroxy-11 β -[4-dimethylamino-phenyl]-17 α [1-propynyl]estra-4,9-dien-3-one) was kindly provided by Roussel Uclaf (Paris, France). Estradiol-17 β (E₂) and P₄ were purchased from Steraloids (Pauling, NY).

Animals and Treatments

Prepubertal female New Zealand white rabbits (1.0 kg) were used throughout this study. Animals were randomly distributed in groups of six animals each. Animals received s.c. steroid treatments as follows: P₄ (1.0 mg); P₄ in combination with 5 α -NET at four increasing doses (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg); P₄ + 3 β ,5 α -NET (1.0 mg); P₄ + E₂ (1.0 mg); or P₄ + RU-486 (1.0 mg). All steroids were administered daily in 500 μ l of vehicle (propylenglycol-10% ethanol) for 5 con-

Accepted September 28, 1994.

Received July 28, 1994.

¹This work was supported by the Special Program in Human Reproduction, WHO (Geneva), the Rockefeller Foundation (New York), and the University Program on Health Research (PUIS) of the National Autonomous University of Mexico (UNAM).

²Correspondence: Marco A. Cerbón, PhD, Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán, Departamento de Biología de la Reproducción, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, México, D.F., 14 000, Mexico. FAX: (525) 6-55-98-59 or 6-55-10-76.

secutive days. At 20 h after the last injection the animals were deeply anesthetized with ketamine purchased from Rhoné Mérieux (Queretaro, Mexico) and bled. The uteri were immediately excised and processed as indicated below.

Tissue Collection

Uterine horns were rinsed with 500 μ l of 0.15 M NaCl supplemented with 5000 U aprotinin to obtain uterine flushings that were centrifuged at 5000 \times *g* for 10 min to remove cellular debris. Supernatant aliquots (100 μ l) were frozen in acetone-solid CO₂ slurry and stored at -70°C until assayed. One uterine horn was submitted immediately to Western blot analysis (see below), while the other was stored at -70°C until RNA extraction.

Electrophoresis and Western Blot of Uterine UG

Aliquots (10 μ g protein) of each individual uterine flushing were submitted to native gel electrophoresis [12], at a constant voltage (90 V), using recombinant rabbit UG (0.5 μ g) as standard. Proteins were stained with Coomassie blue. Protein content in uterine flushings and cytosol was determined as previously reported by Bradford [13].

Proteins from uterine flushings were transferred from nonstained slab gels to an Immobilon-P membrane (Millipore Corp., Bedford, MA) (30 V, 4°C) in a buffer containing 25 mM Tris and 192 mM glycine, pH 8.3. Membranes were blocked with 10% (w/v) nonfat dry milk in 10 mM PBS (pH 7.2) for 1 h at room temperature and then incubated with a specific polyclonal goat anti-rabbit UG antibody at a dilution of 1:400 [14] for 1 h at room temperature. Finally, membranes were washed in 10 mM PBS, equilibrated in TBS buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.2), and then incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG (1:1 200) in 10% nonfat dry milk in TBS for 1 h at room temperature. After additional filter washing (five times) with TBS, color was developed by using a solution containing 0.6 mg/ml diaminobenzidine (Gibco-BRL, Inc., Gaithersburg, MD) in 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 1 μ l/ml of 30% H₂O₂. Color reaction was stopped by immersion in water and PBS.

Western Blot of Uterine PR

Uterine samples were homogenized (1:1 w/v) in PBS with aprotinin (100 μ g/ml) and centrifuged at 105 000 \times *g* for 1 h. Aliquots of 10 μ g of total proteins from the cytosolic fractions were diluted 1:1 (v/v) in SDS gel-loading buffer (500 mM Tris-HCl [pH 6.8], 200 mM dithiothreitol [DTT], 10% SDS, and 10% glycerol [v/v]-8 M urea) and run through a 7.5% polyacrylamide-SDS gel [15]. Thereafter the proteins were transferred to Immobilon-P membrane (overnight, 30 V, 4°C) in a buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3. Membranes were blocked as described above. Monoclonal antibodies Mi 60, Let 126, and

Let 81 [16] were added together in 10 mM PBS (pH 7.2) with 10% (w/v) nonfat dry milk at dilutions of 1:300, 1:400, and 1:300, respectively, and incubated with the membrane for 1 h at room temperature. After five washes in PBS and five in TBS, the membrane was incubated with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (1:1000) in TBS with 10% (w/v) nonfat dry milk for 1 h at room temperature. Color development was performed as described above for UG Western blotting.

Northern Blot Analysis of UG and PR mRNAs

Total RNA was isolated from individual uterine samples by the guanidine isothiocyanate-LiCl method [17]. RNA samples were size-fractionated by electrophoresis on 1.1% agarose gels in the presence of 2.2 M formaldehyde and then transferred to Gene-Screen membranes (New England Nuclear Corp., Boston, MA). Blotted RNAs were hybridized separately to the probes, [α -³²P]dCTP-UG and -PR cDNAs (specific activities 1–2 \times 10⁸ cpm/ μ g), which were labeled by the random primer method [18]. The UG and PR cDNAs were kindly provided by Professor E. Milgrom, Laboratoire des Hormones et Reproduction, Hôpital de Bicêtre, France. Hybridizations were carried out under conditions previously described [19]. Membranes were then exposed to Kodak X-OMAT-AR film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) for 24 h (PR mRNA) or 6 h (UG mRNA). After exposure, the membranes were stripped and rehybridized with [α -³²P]dCTP-H4-histone for the expression control.

RESULTS

Effects of NET Metabolites on P₄-Induced Uterine UG

UG content in uterine flushings was analyzed by electrophoresis and Western blot methods. The administration of P₄ to prepubertal rabbits induced an increase of UG content in uterine flushings (Figs. 1 and 2). The administration of 5 α -NET reduced the P₄-induced UG synthesis in a dose-dependent manner. This reduction was evident in animals that received doses higher than 0.5 mg of 5 α -NET; animals that received 0.5 mg did not exhibit this inhibitory effect (Figs. 1 and 2). The administration of RU-486 (1.0 mg) also inhibited the UG synthesis induced by P₄ (Fig. 2).

The estrogenic-like agent 3 β ,5 α -NET, and E₂ at the dose of 1.0 mg, clearly inhibited P₄-induced UG synthesis as shown by electrophoresis and Western blot analyses (Figs. 1 and 2). When a control preimmune goat serum was used as the first antibody, no UG band was detected (data not shown).

Uterine UG mRNA Content in Prepubertal Rabbits Treated with NET Metabolites

Uterine UG mRNA content was determined by Northern blotting. A major band of 600 bp corresponding to UG mRNA [20] was detected in P₄-treated prepubertal rabbits (Fig. 3A, lane 1). The UG mRNA content in prepubertal rabbits treated

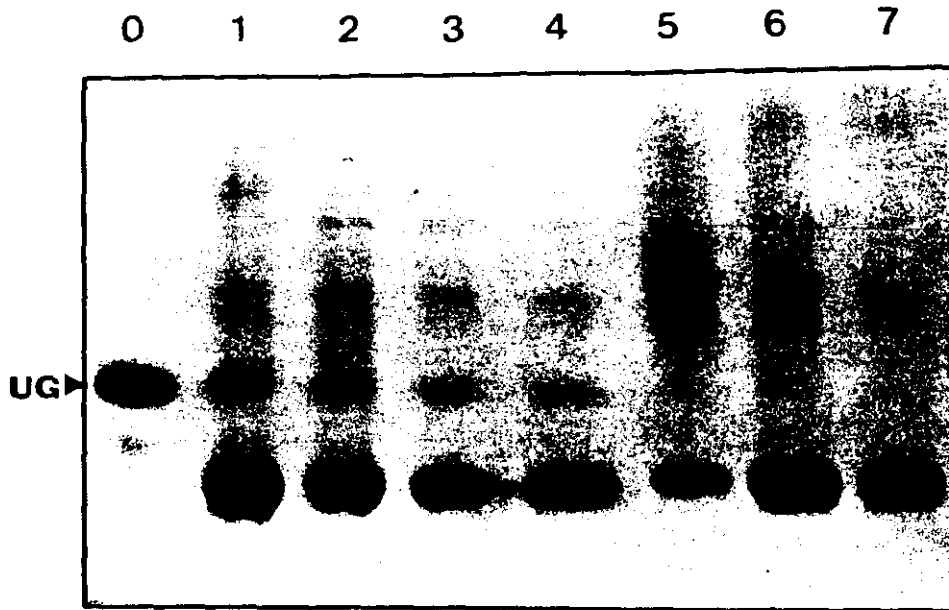


FIG. 1. Electrophoresis of UG from prepubertal rabbits treated with P_4 and NET metabolites. Aliquots from uterine flushing (10 μ g protein) of prepubertal rabbits ($n = 6$) treated for 5 consecutive days with P_4 (1.0 mg, lane 1), P_4 (1.0 mg) + 5 α -NET (0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 mg, lanes 2-5), P_4 + 3 β ,5 α -NET (1.0 mg, lane 6), or vehicle alone (lane 7) were submitted to nondenaturing PAGE and stained with Coomassie blue. UG standard is shown in lane 0.

with P_4 was reduced by simultaneous treatment with 5 α -NET and P_4 . At the lowest dose (0.5 mg) of 5 α -NET, no changes were observed in UG mRNA content; but at higher doses (1.0–5.0 mg), the UG mRNA content diminished (Fig. 3A, lanes 2–5) in a manner similar to that observed for the UG protein (Fig. 2). The administration of RU-486 (1.0 mg) depleted UG mRNA content (Fig. 3A, lane 8). Both E_2 and 3 β ,5 α -NET (1.0 mg) administered simultaneously with P_4 to prepubertal rabbits exerted a marked diminution in UG mRNA content as compared with that observed in P_4 -treated animals (Fig. 3A, lanes 6–7). All the membranes were stripped and rehybridized with H4-histone cDNA probe (Fig. 3B).

Effects of NET Metabolites on Uterine PR Down-Regulation

Western blot analysis of uterine PR content showed the major PR forms of 110, 79 and 65 kDa. (Fig. 4), as previously reported by Loosfelt et al. [21], in all cytosolic samples from the uterus of animals treated with NET metabolites, RU-486, and E_2 except those treated with P_4 , showing both the PR down-regulation induced by the hormone (Fig. 4, lane 1) and the inhibition of this process by the different steroids (Fig. 4, lanes 2–8). In this case a dose-dependent effect of 5 α -NET was noticed from 1.0 to 5.0 mg. Interestingly, at the lowest dose (0.5 mg), a marked PR down-reg-

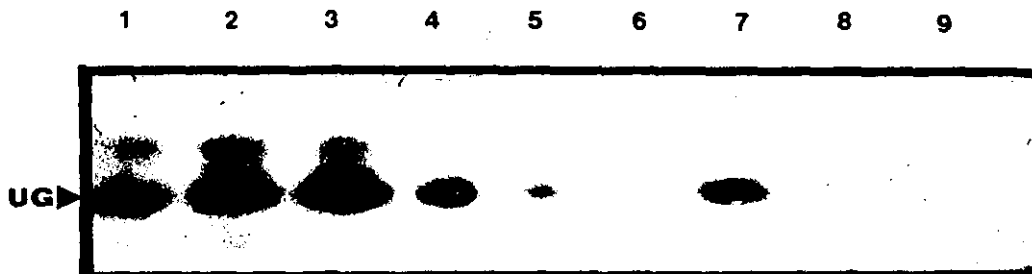


FIG. 2. Representative Western blot of UG in uterine flushings from steroid-treated prepubertal rabbits. Aliquots (10 μ g protein) from uterine flushing of prepubertal rabbits ($n = 6$) treated for 5 consecutive days with P_4 (1.0 mg, lane 2), P_4 + 5 α -NET (0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 mg, lanes 3–6), P_4 + E_2 (1.0 mg, lane 7), P_4 + 3 β ,5 α -NET (1.0 mg, lane 8), or P_4 + RU-486 (1.0 mg, lane 9) were submitted to PAGE and transferred to Immobilon-P membranes, which were blocked and incubated with a polyclonal goat anti-rabbit UG antibody and then detected with peroxidase-conjugated rabbit anti-goat immunoglobulins. UG standard is shown in lane 1.

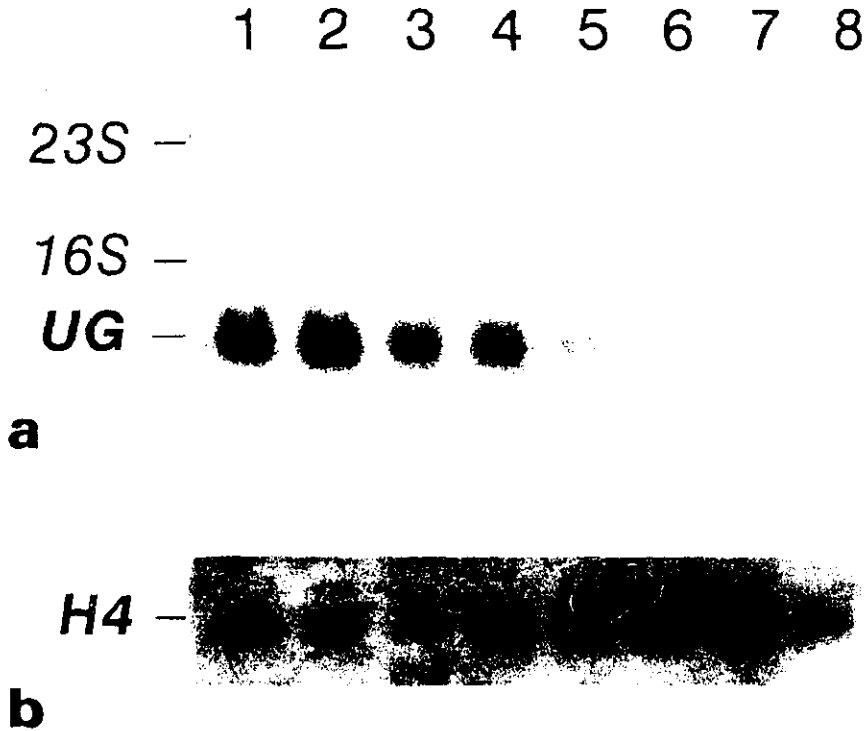


FIG. 3. Representative Northern blot of uterine UG mRNA from steroid-treated prepubertal rabbits. a) Aliquots of total RNA (20 μ g) from the uterus of prepubertal rabbits (n = 6) treated for 5 consecutive days with P₄ (1.0 mg, lane 1), P₄ + 5 α -NET (0.5, 1.0, 2.5, and 5.0 mg, lanes 2-5), P₄ + E₂ (1.0 mg, lane 6), P₄ + 3 β ,5 α -NET (1.0 mg, lane 7), and P₄ + RU-486 (1.0 mg, lane 8) were fractionated on formaldehyde denaturing agarose gels, transferred to Gene-Screen membranes, and hybridized with [α -³²P]UG cDNA or (b) H4-histone cDNA probes. The membranes were exposed for 16 h using Kodak X-OMAT-AR film. In (a), rRNAs were used as molecular size markers (16 S and 23 S).

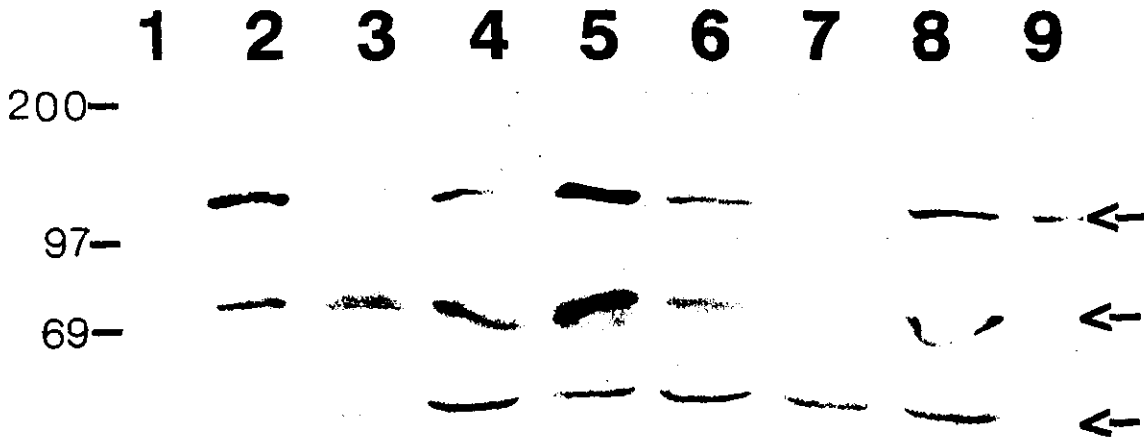


FIG. 4. Representative Western blot of uterine progesterone receptor (PR) from steroid-treated prepubertal rabbits. Uterine cytosol aliquots (10 μ g protein) from prepubertal rabbits (n = 6) treated for 5 consecutive days with P₄ (1.0 mg, lane 1), P₄ + 5 α -NET (0.5, 1.0, 2.5, and 5.0 mg, lanes 2-5), P₄ + E₂ (1.0 mg, lane 6), P₄ + 3 β ,5 α -NET (1.0 mg, lane 7), P₄ + RU-486 (1.0 mg, lane 8), or vehicle alone (lane 9) were submitted to SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes, which were blocked and incubated with a mixture of monoclonal anti-PR antibodies and then detected with peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins. Immunodetected PR bands migrated at 110, 79 and 65 kDa.

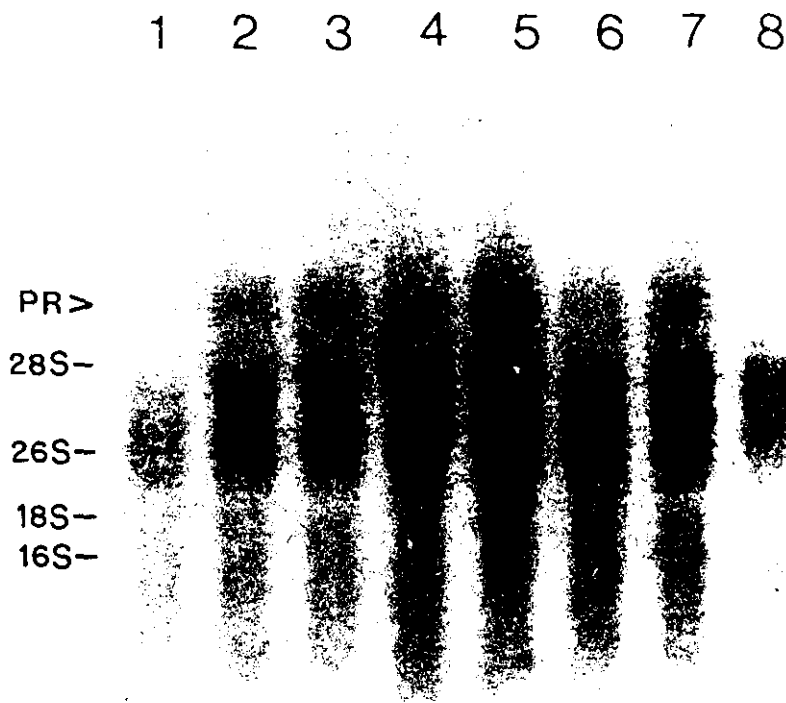


FIG. 5. Representative Northern blot of uterine PR mRNA from steroid-treated prepubertal rabbits. Aliquots of total RNA (20 μ g) from the uterus of prepubertal rabbits ($n = 6$) treated for 5 consecutive days with P_4 (1.0 mg, lane 1), $P_4 + 5\alpha$ -NET (0.5, 1.0, 2.5, and 5.0 mg, lanes 2-5), $P_4 + E_2$ (1.0 mg, lane 6), $P_4 + 3\beta,5\alpha$ -NET (1.0 mg, lane 7), or vehicle alone (lane 8) were fractionated on formaldehyde denaturing agarose gels, transferred to Gene-Screen membranes, and hybridized with [α^{32} P]PR cDNA probe. The membranes were exposed for 16 h using Kodak X-OMAT-AR film. The arrow indicates PR mRNA; rRNAs were used as molecular size markers.

ulation inhibition was also observed. PR content in the animals treated with vehicle is shown in lane 9. When a control preimmune mouse serum was used as the first antibody, no PR band was detected (data not shown).

Uterine PR mRNA content in animals treated with NET metabolites was determined by Northern blot analysis using [32 P]PR cDNA as probe. A representative Northern blot is shown in Figure 5. A major band of 5900 bp, corresponding to rabbit PR mRNA [22], was evident in all total RNA samples except in those from P_4 -treated animals. A clear dose-dependent effect of 5α -NET on PR down-regulation inhibition was observed (Fig. 5, lanes 2-5). Additional PR transcripts of lower molecular weight were detected in all samples (between 28 S and 18 S rRNAs), as has been previously reported [19, 23]. It is interesting to note that in the animals treated with vehicle, these bands represented the main transcripts.

DISCUSSION

The present study shows that the main metabolites of NET, 5α -NET and $3\beta,5\alpha$ -NET [1], regulate the expression of UG and PR genes in the uterus of prepubertal rabbits. The administration of a low dose (0.5 mg) of 5α -NET + P_4 (1.0 mg) did not significantly modify the levels of P_4 -induced UG; however, higher doses (1.0-5.0 mg) of 5α -NET decreased UG content in a dose-dependent manner, indicating that the A-ring reduction of NET results in a compound with intrinsic antiprogesterational properties. This result was comparable to that observed in animals treated with RU-486 (1.0 mg).

The antiprogesterational effect of 5α -NET and RU-486 was evident both at transcriptional and translational levels (Figs. 1-3). The inhibition of UG gene expression by 5α -NET and RU-486 reported in this study, as well as their interaction

with PR [6, 24], suggests that the effects of these compounds on UG content are mediated by PR. Thus, both 5 α -NET and RU-486 bind to PR but specifically block the UG gene transcription induced by P₄.

The further reduction of 5 α -NET into 3 β ,5 α -NET resulted in a more potent antiproggestational agent, since at a lower dose (1.0 mg) the estrogenic-like agent 3 β ,5 α -NET was able to completely inhibit UG synthesis. Both 3 β ,5 α -NET and E₂ (1.0 mg) diminished UG synthesis and its mRNA content, suggesting that 3 β ,5 α -NET could inhibit UG gene expression through its interaction with estrogen receptors. These results confirm and extend previous data on the estrogenic properties of 3 β ,5 α -NET in prepubertal rabbits [5].

Although the negative regulation of UG by estrogens has been described [25], the molecular mechanisms involved in these processes are unknown. Further research is needed to explore whether the interaction of estrogen receptors with a noncanonical estrogen-responsive element located in the UG promoter region (-265/-288) [26], or the binding of specific estrogen-regulated proteins to UG promoter, are implicated in the inhibition of UG gene expression by estrogenic-like agents such as 3 β ,5 α -NET.

Kleis-San Francisco et al. have demonstrated that after a P₄ treatment, E₂ diminishes the concentration of four P₄-dependent promoter binding proteins that are important for the transcriptional activation of UG gene [27]. Thus, it could be possible that estrogens inhibit the synthesis or enhance the degradation of proteins like the 100 000 M_r UG promoter binding protein [27]. Alternatively, estrogen treatment may provoke a protein conformation change that eliminates promoter binding ability or stimulates the synthesis of a promoter binding inhibitor.

As has been described in the case of UG gene expression, NET reduction resulted in the blocking of P₄-induced PR down-regulation by two antiproggestational agents. This inhibition of PR down-regulation by 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET was observed both in Western and Northern blots. In the case of 5 α -NET, a dose-dependent effect was observed on PR mRNA (Fig. 5, lanes 2-5). However, the effect on protein synthesis was variable, since the lowest dose of 5 α -NET induced a marked increase in PR mRNA that was comparable to that obtained with the highest dose. This differential effect of 5 α -NET upon PR mRNA and PR protein requires further research.

The inhibition of PR P₄-induced down-regulation by 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET is mediated by different molecular mechanisms, since the former specifically interacts with PR and the latter interacts with estrogen receptors [6, 9]. Thus, 5 α -NET and RU-486 can block down-regulation induced by P₄ through their direct interaction with PR, while 3 β ,5 α -NET and E₂ indirectly inhibit this process since these steroids interact specifically with estrogen receptors. It is well documented that in the uterus, estrogens increase PR mRNA. Indeed, stimulation of PR gene transcription is mediated

through an estrogen-responsive element found in an intragenic region (+698/+723) of rabbit PR gene [28].

The overall results indicate that the A-ring reduction of NET results in two main metabolites (5 α -NET and 3 β ,5 α -NET) that acquire antiproggestational properties as assessed by the expression of UG and PR genes. In conclusion, the postcoital contraceptive properties attributed to NET could be explained by its bioconversion into 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET metabolites at target tissues.

Understanding the molecular mechanisms of actions of NET metabolites helps not only to clarify the effects of synthetic steroid metabolism in reproductive processes, but suggests other possibilities for the design of new postcoital contragestational agents with antiproggestational and estrogenic properties [29].

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Professor E. Milgrom from the Laboratoire des Hormones et Reproduction, Hôpital de Bicêtre, France, for the generous supply of the antibodies and cDNAs used in this study. We thank Ms. Juana Gonzales for her technical assistance in the experiments. We also thank Pedro Hiriart for his help in photography.

REFERENCES

- Larrea F, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G. The metabolism of 19-Nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J Steroid Biochem* 1987; 27:657-663.
- Pérez-Palacios G, Chávez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M, Pérez AE. Mechanisms of action of contraceptive synthetic progestins. *J Steroid Biochem* 1981; 15:125-130.
- Revez C, Chappel CI, Gaudry R. Masculinization of female fetuses in the rat by progestational compounds. *Endocrinology* 1960; 66:140-144.
- Van Look PFA. Post ovulatory methods of fertility regulation. In: *Research in Human Reproduction Biennial Report 1986-1987*. Geneva: World Health Organization; 1988: 153-173.
- Cerbón MA, Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, García GA, Pérez-Palacios G. Variable expression of the uteroglobin gene following the administration of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 1990; 36:1-6.
- Reel JR, Humphrey RR, Shih Y, Windsor BL, Sakowski R, Creger PL, Edgren RA. Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biological activity of testosterone and 19-nor-testosterone derivatives. *Fertil Steril* 1979; 31:522-561.
- Cerbón MA, Lemus AE, Vilchis F, Pasapera AM, García GA, Pérez-Palacios G. A-ring reduced derivatives of norethisterone exert antihormonal effects. In: Negro-Vilar A, Pérez-Palacios G (eds.), *Reproduction, Growth and Development*. New York: Raven Press; 1991: 175-187.
- Pérez-Palacios G, Cerbón MA, Pasapera AM, Castro I, Enriquez J, Vilchis F, García GA, Morali G, Lemus AE. Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41:479-485.
- Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, García GA, Angeles A, Pérez-Palacios G. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *J Steroid Biochem* 1986; 24:525-531.
- Bowers A, Ringold HJ, Denot E. Steroids C1 19-nordihydro-testosterone derivatives. *J Am Chem Soc* 1958; 80:6115-6121.
- Chávez B, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca Y, Pérez-Palacios G. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 1985; 22:121-126.
- Davis BJ. Disc Electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 1964; 121:404-427.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- Aiger M, Milgrom E. Progesterone induced messenger RNA. Translation, purification and preliminary characterization of uteroglobin-mRNA. *J Biol Chem* 1977; 252:5412-5418.

15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₁. *Nature* 1970; 227:680-685.
16. Groyer-Picard MT, Vu-Hai MT, Jolivet A, Milgrom E, Perrot-Appianat M. Monoclonal antibodies for immunocytochemistry of progesterone receptor (PR) in various laboratory rodents, livestock, humans and chickens: identification of two epitopes conserved in PR of all these species. *Endocrinology* 1990; 126:1485-1491.
17. Cathala G, Savouret JF, Mendez B, West BL, Karin M, Martial JA, Baxter JD. A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acid. *DNA* 1983; 2:329-335.
18. Feinberg A, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983; 137:6-13.
19. Gutierrez-Sagal R, Pérez-Palacios G, Langley E, Pasapera AM, Castro I, Cerbón MA. Endometrial expression of progesterone receptor and uteroglobin genes during early pregnancy in the rabbit. *Mol Reprod Dev* 1993; 34:244-249.
20. Bailly A, Atger M, Arger P, Cerbón MA, Alison M, Vu-Hai MT, Logeat F, Milgrom E. The rabbit uteroglobin gene: structure and interaction with the progesterone receptor. *J Biol Chem* 1983; 258:10384-10389.
21. Loosfelt H, Logeat F, Vu-Hai MT, Milgrom E. The rabbit progesterone receptor. Evidence for a single steroid-binding subunit and characterization of receptor mRNA. *J Biol Chem* 1984; 259:14196-14202.
22. Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:9045-9049.
23. Shymala G, Schneider W, School D. Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology* 1990; 126:2882-2889.
24. Rauch M, Loosfelt H, Philibert D, Milgrom E. Mechanisms of action of an anti-progesterone, RU-486 in the rabbit endometrium. *Eur J Biochem* 1985; 148:213-218.
25. Kopu HT, Hemminki SM, Torkkeli TK, Jänne O. Hormonal control of uteroglobin secretion in rabbit uterus. *Biochem J* 1979; 180:491-500.
26. Slater E, Redeuilh G, Theis K, Suske G, Beato M. The uteroglobin promoter contains a noncanonical estrogen responsive element. *Mol Endocrinol* 1990; 6:604-610.
27. Kleis-San Francisco S, Hewetsum A, Chilton BS. Prolactin augments progesterone dependent uteroglobin gene expression by modulating promoter binding proteins. *Mol Endocrinol* 1993; 7:214-223.
28. Savouret JF, Bailly A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A, Milgrom E. Characterization of hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor. *EMBO J* 1991; 10:1875-1883.
29. Castro I, Cerbón MA, Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, Orozco C, Garcia GA, Camacho-Arroyo I, Anzaldúa R, Pérez-Palacios G. Molecular mechanisms of the anti-hormonal and anti-implantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Mol Reprod Dev* 1994; (in press).

Physiology and Endocrinology

Molecular Mechanisms of the Antihormonal and Antiimplantation Effects of Norethisterone and Its A-Ring Reduced Metabolites

IVONE CASTRO,¹ MARCO ANTONIO CERBÓN,¹ ANA MARIA PASAPERA,¹ RUBEN GUTIÉRREZ-SAGAL,¹ GUSTAVO A. GARCIA,² CARLOS OROZCO,³ IGNACIO CAMACHO-ARROYO,¹ RENE ANZALDUA,¹ AND GREGORIO PÉREZ-PALACIOS¹

¹Molecular Biology Unit in Reproductive Health, National Institute of Nutrition S. Zubirán and FES-Zaragoza, and ²School of Chemistry, National University of Mexico, Mexico City, Mexico; and ³Division of Science and Technology, Griffith University, Nathan, Australia

ABSTRACT Norethisterone (NET) has been used as a contragestational postcoital agent. It is biotransformed to 5 α dihydro-NET (5 α -NET) and 3 β ,5 α tetrahydro-NET (3 β ,5 α -NET) in target tissues. The participation of these metabolites in NET effects is unknown. We have examined the antiimplantation and antiprogesterone effects of NET and its metabolites, in adult mated female rabbits, by assessing the number of implantation sites and the expression products of the uteroglobin (UTG) gene in the uterus, and by comparing them with those of RU-486 and estradiol. Steroids were daily administered s.c. at several doses for 7 consecutive days, starting 24 hr after coitus. To assure that fertilization occurred in all animals, the presence of early pregnancy factor was determined. The results demonstrated that high doses (5 mg/kg) of NET reduced both implantation and the expression of the UTG gene. On the other hand, lower doses (1.5 mg/kg) of 5 α -NET produced an antiimplantation effect and suppressed UTG synthesis and its mRNA. These effects were similar to those of RU-486. At lower doses (1 mg/kg), both estradiol and the estrogenic metabolite 3 β ,5 α -NET were also effective in inhibiting implantation and UTG gene expression. The overall results suggest that NET metabolites exert antiimplantation and antiprogesterone effects through their interaction with progesterone and estrogen receptors, and provide an explanation for the molecular mechanisms involved in the postcoital contraceptive action of NET. © 1995 Wiley-Liss, Inc.

Key Words: Synthetic progestins, Uteroglobin, Pregnancy, Rabbit endometrium

understood. It has been demonstrated that synthetic progestins and their metabolites regulate the expression of the uteroglobin (UTG) gene in rabbit endometrium (Isomaa, 1981; Jänne et al., 1983; Pérez-Palacios et al., 1992). It has been suggested that UTG plays an important role in the implantation process (Gutiérrez-Sagal et al., 1993).

We have shown that administration of NET induces a significant increase of uterine UTG and its mRNA content in prepubertal rabbits, in a manner similar to that observed with progesterone (Cerbón et al., 1990). Interestingly, it has been reported that 5 α -reduction of NET precludes its progesterone effects upon UTG gene expression. Indeed, when one of the NET metabolites, 5 α -dihydro-NET (5 α -NET), was administered simultaneously with progesterone, a clear antiprogesterone effect was noticed (Cerbón et al., 1991). A further reduction of 5 α -NET to the estrogenic compound 3 β ,5 α tetrahydro-NET (3 β ,5 α -NET) in target tissues has been reported (Larrea et al., 1987).

To elucidate the molecular mechanisms involved in the contragestational actions of NET, we have studied the antiimplantation and antiprogesterone effects of NET and its metabolites 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET in mated adult female rabbits. Fertilized rabbits treated with RU-486 and estradiol were used as control contragestational agents. Fertilization was determined by the presence of the early pregnancy factor (EPF) in serum, using a rosette inhibition test, while the recording of implantation sites and the content of uterine UTG and its mRNA were used to evaluate the antiim-

INTRODUCTION

Norethisterone (NET), a synthetic 19-norprogesterone, has been widely used as a potent postcoital contraceptive agent (Lei and Hu, 1981; Van Look, 1988). However, its mechanism of action has not been completely

Received April 13, 1994; accepted July 13, 1994.

Address reprint requests to Marco A. Cerbón, Ph.D., Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán, Departamento de Biología de la Reproducción, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, México, D.F., 14000, México.

TABLE 1. Effects of NET and its metabolites on implantation and EPF signal

Treatments	Daily Dose* (mg/kg)	No. rabbits pregnant/mated	Implantation sites	EPF signal
Vehicle	-	6/6	9-10	+
NET	1.0	6/6	9-10	+
	5.0	0/3	0	-
5 α -NET	1.0	7/9	3-4	+
	1.5	0/6	0	-
	2.5	0/6	0	-
	5.0	0/6	0	-
3 β ,5 α -NET	1.0	0/6	0	-
17 β -E ₂	1.0	0/6	0	-
RU-486	1.0	0/6	0	-
	2.5	0/6	0	-

*7 consecutive days. All samples were analyzed on day 8 after mating.

When 5 α -NET (1.0 mg/kg) was administered to fertilized rabbits, a slight reduction in the number of implantation sites was observed as compared with animals treated with vehicle (Table 1). Administration of 5 α -NET at the daily dose of 1.5 mg/kg and above resulted in a complete inhibition of implantation as it is shown in Table 1. A close correlation between the anti-implantation effects of 5 α -NET and the absence of EPF signal during different days of the treatment was observed. In contrast to NET, the administration of 5 α -NET did not disrupt uterus morphology.

Both the administration of estrogenic agent 3 β ,5 α -NET (1 mg/kg) and estradiol at the same dose induced the complete inhibition of the implantation process (Table 1), and reduction of the EPF signal. Administration of the antiprogesterin RU-486 to fertilized animals at daily doses of 1.0 mg/kg and above resulted in the inhibition of implantation with the corresponding absence of EPF signal.

Effects of NET and Its Metabolites Upon Uterine UTG Content in Fertilized Female Rabbits

UTG content in uterine flushings from fertilized rabbits under different treatments was measured by RIA on day 8 after mating. Nonmated and pregnant rabbits treated with vehicle were used as negative and positive controls, respectively. UTG content in uterine flushings from adult nonmated female rabbits was very low (7.7 μ g/mg protein), whereas in mated animals on day 8 of gestation a high content (163 μ g/mg protein) of UTG was detected (Fig. 1).

Administration of NET to fertilized rabbits at the daily dose of 1.0 mg/kg diminished UTG content 53%, as compared with vehicle treatment. In addition, a higher dose of NET (5.0 mg/kg) reduced UTG content 90% (Fig. 1). Fertilized animals treated with 5 α -NET (1 mg/kg) exhibited a significant diminution (50%) in UTG content as compared with vehicle. This effect was similar to that observed in animals treated with NET at the same dose. A daily dose of 5 α -NET (1.5 mg/kg) diminished UTG content more than 85%. Furthermore, doses of 2.5 and 5.0 mg/kg reduced UTG content to

levels lower than those found in nonmated adult rabbits (Fig. 1).

Fertilized animals treated with the synthetic antiprogesterin RU-486 at the daily dose of 1.0 mg/kg significantly decreased UTG content (73%) in uterine flushings. Moreover, a dose of 2.5 mg/kg resulted in a further diminution (88%) of UTG (Fig. 1).

Because of the potency of antiprogesterin effects of estradiol, the scheme of treatment with this steroid and 3 β ,5 α -NET was modified. Animals were treated daily for different periods of time (3, 5, and 7 days after fertilization) with a dose of 1 mg/kg in all cases. Both estradiol and 3 β ,5 α -NET depleted UTG content from the third day of treatment (Fig. 2).

Effects of NET Metabolites Upon Endometrial UTG mRNA Content in Fertilized Female Rabbits

Endometrial UTG mRNA content was determined by Northern blot analysis. A major band of 0.6 Kb corresponding to UTG mRNA was detected (Fig. 3) in pregnant rabbits, as previously described (Bailey et al., 1983). As indicated in Figure 3, the endometrial UTG mRNA in adult fertilized animals treated with vehicle on day 5 after mating (lane 2) was significantly more abundant than that of nonmated rabbits treated with vehicle (lane 1). Interestingly, on day 8 after mating, the endometrial UTG mRNA exhibited a slight diminution (lane 3).

Fertilized animals treated with 5 α -NET (1.0 mg/kg) presented a significant diminution in UTG mRNA content on day 8 after mating (Fig. 3, lane 4), as compared with mated animals on the same day of gestation. Furthermore, UTG mRNA content in animals treated with 5 α -NET was lower than in nonmated control rabbits. Daily doses of 1.5 mg/kg and above of 5 α -NET completely abolished the endometrial content of UTG mRNA (Fig. 3, lanes 5-7).

The administration of RU-486 (1.0 mg/kg) significantly diminished endometrial UTG mRNA content as compared with that of pregnant rabbits (Fig. 3, lane 8). Interestingly, UTG mRNA was relatively more abun-

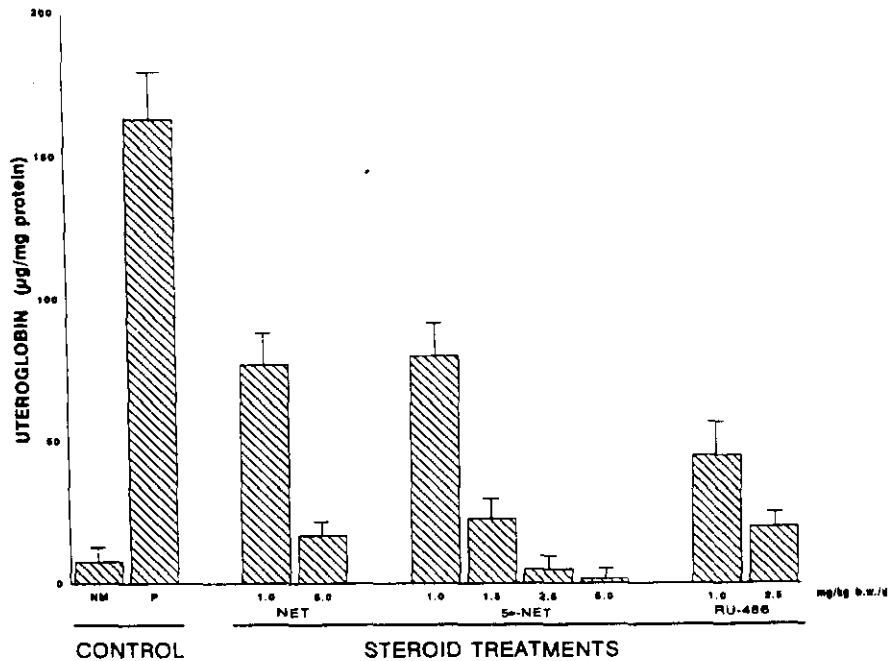


Fig. 1. Uteroglobin content in uterine flushings from fertilized rabbits treated with synthetic steroids. Animals (n = 6) were daily treated with NET, 5α-NET, and RU-486, for 7 consecutive days. Samples were analyzed on day 8 after mating by a specific double antibody radioimmunoassay. The results are expressed as µg of uteroglobin/mg protein (mean ± SD). Nonmated rabbits (NM) and pregnant rabbits (P) on the eighth day of pregnancy were used as negative and positive controls, respectively.

dant in animals receiving 2.5 mg/kg of RU-486 (lane 9) than in those treated with 1.0 mg/kg.

Pregnant rabbits treated with estradiol (1 mg/kg) for 3, 5, or 7 consecutive days showed a significant diminution in endometrial UTG mRNA content as compared with their respective controls on the same days of gestation. Indeed, no detectable UTG mRNA content was observed after estradiol treatment (Fig. 4). The daily administration of 3β,5α-NET (1 mg/kg) also significantly reduced UTG mRNA content in fertilized rabbits. In contrast with estradiol, an important diminution of UTG mRNA was noticed only after 5 days of treatment, and the suppression of UTG mRNA was observed after the seventh administration of 3β,5α-NET (Fig. 4).

All the membranes were stripped and rehybridized with H₄-histone cDNA. The lack of variation in the nonhormone-regulated H₄-histone mRNA content (Figs. 3 and 4) supported the view that the changes observed in UTG mRNA content were due to the different steroid treatments.

DISCUSSION

The present study shows the molecular effects of NET and its A-ring reduced metabolites, 5α-NET and 3β,5α-NET, as related to their antiimplantation and antiprogesterational properties in pregnant rabbits. The re-

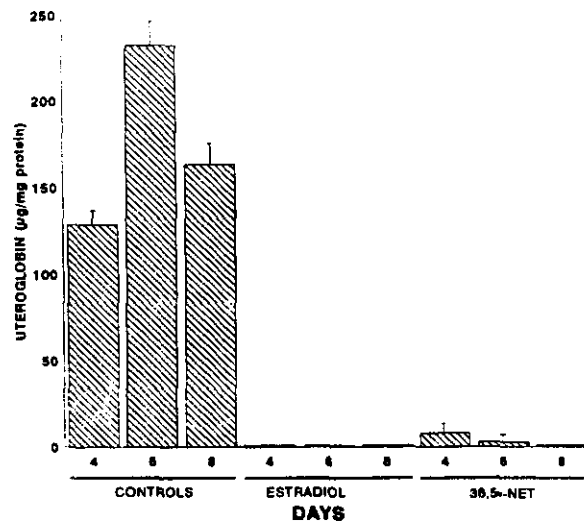


Fig. 2. Uteroglobin content in uterine flushings from fertilized rabbits treated with estradiol and 3β,5α-NET. Mated animals (n = 6) were treated daily with estradiol or 3β,5α-NET at a dose of 1 mg/kg for 3, 5, and 7 consecutive days. Uterine flushings were collected and analyzed 24 hr after the last dose on days 4, 6, and 8. The results are expressed as µg of uteroglobin/mg protein (mean ± SD). Rabbits treated with vehicle for 3, 5, and 7 days were used as controls.

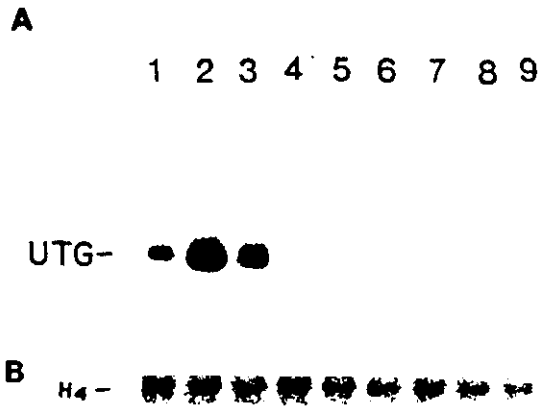


Fig. 3. Representative Northern blot of endometrial uteroglobin (UTG) mRNA from fertilized rabbits treated with synthetic steroids. Aliquots of total RNA (20 μg) from endometrium of fertilized animals treated daily with 5α-NET (1.0, 1.5, 2.5, and 5.0 mg/kg, lanes 4-7), RU-486 (1.0 and 2.5 mg/kg, lanes 8 and 9) for 7 consecutive days, and from nonmated (lane 1) and pregnant rabbits on days 5 and 8 after mating (lanes 2 and 3), were fractionated on denaturing agarose gels, transferred to Gene-Screen membranes, and hybridized with [³²P]-UTG cDNA (A) and Histone H₄ cDNA (B) probes. The membranes were exposed for 16 hr using Kodak X-OMAT-AR film.

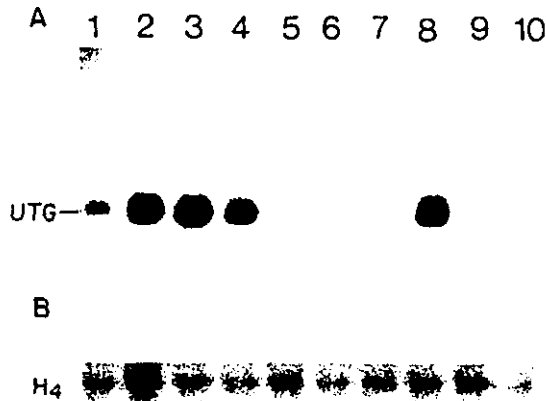


Fig. 4. Effects of estradiol and 3β,5α-NET on endometrial uteroglobin (UTG) mRNA from fertilized rabbits. Northern blot analysis of total RNA (20 μg) from endometrium of nonmated (lane 1) and pregnant animals treated daily for 3, 5, or 7 consecutive days with vehicle (lanes 2-4), estradiol (1 mg/kg, lanes 5-7), and 3β-5α-NET at the same dose (lanes 8-10), was performed as indicated in Figure 3. A: Hybridization with UTG cDNA. B: Hybridization with histone H₄ cDNA probes.

cordings of implantation sites as well as of UTG gene expression products were used as markers of the contraceptive effects of NET and its metabolites. In all cases, pregnancy was corroborated by the determination of serum EPF presence. We observed a close correlation

between the antiimplantation effects of the different steroids and the reduction of EPF signal (Table 1).

The chronic treatment (7 days) of NET at a dose of 1.0 mg/kg did not reduce the number of implantation sites in fertilized rabbits. However, at a higher dose (5.0 mg/kg), NET induced a clear antiimplantation effect, since no implantation sites were found in the animals treated with this dose (Table 1). Both the chronic administration of 5α-NET and of 3β,5α-NET resulted in a more potent antiimplantation effect, since doses lower (1.5 and 1.0 mg/kg, respectively) than those of NET were able to completely inhibit the implantation process (Table 1), thus indicating that A-ring metabolites of NET were markedly more effective than their precursor molecule. Indeed, the antiimplantation effects of NET metabolites were similar to those of the antiprogestative RU-486.

In order to correlate the antiimplantation effects of NET and its metabolites with their antihormonal action, we analyzed the expression of the UTG gene, whose regulation by progesterone and estrogens is well known (Bullock and Willen, 1974; Loosfelt et al., 1981). We found that the administration of NET (5 mg/kg) reduced UTG content 90% from uterine flushings. As in the case of the inhibition of implantation, lower doses of NET metabolites were required to deplete UTG production (Figs. 1 and 2), suggesting that the biological effects of NET could be mediated by the action of its metabolites. The effects of RU-486 upon UTG synthesis were similar to those observed with 5α-NET.

The reduction of UTG content produced by NET metabolites was strongly related to a diminution in endometrial UTG mRNA content (Figs. 3 and 4). 5α-NET at doses of 1.5 mg and above completely abolished the expression of UTG mRNA. These data indicate that the inhibition of UTG gene expression by 5α-NET is exerted at the transcriptional level, although a postranscriptional effect such as the increase of mRNA degradation cannot be ruled out. Previous studies in prepubertal rabbits performed in our laboratory have also demonstrated an inhibition on progesterone-induced UTG transcription by NET metabolites (Pérez-Palacios et al., 1992). UTG mRNA content was also reduced by RU-486 treatment. The comparable effects of RU-486 and those of 5αNET observed in this study, as well as their specific binding to progesterone receptors (Reel et al., 1979; Rauch et al., 1985), suggest that these steroid receptors mediate the antihormonal effects of both compounds.

It is interesting to mention that in this study the effect of RU-486 upon UTG mRNA was greater at a low dose (1 mg/kg) than at a higher one (2.5 mg/kg). However, this pattern did not correspond to that observed in UTG content in uterine flushings, where the high dose of RU-486 induced the largest UTG diminution. The finding of a differential effect of RU-486 upon UTG mRNA and UTG protein was not unexpected since similar effects have been reported for progesterone, which exerts a dual effect upon UTG gene expression, induc-

- Induction of uteroglobin and its messenger RNA. *J Biol Chem* 256: 3465-3470.
- Mayol RF, Longenecker DE (1974): Development of a radioimmunoassay for blastokinin. *Endocrinology* 95:1534-1542.
- Orozco C, Perkins AV, Clarke FM (1986): Platelet activating factor induces the expression of early pregnancy factor activity in female mice. *J Reprod Fertil* 78:549-555.
- Orozco C, Cock I, Perkins AV, Clarke FM (1990): Platelet-activating factor and serum components from oestrous mice co-operate to mimic the activity of early pregnancy factor in the rosette inhibition assay. *J Reprod Fertil* 88:447-457.
- Pérez-Palacios G, Cerbón MA, Pasapera AM, Castro I, Enriquez J, Vilchis F, García GA, Morali G, Lemus AE (1992): Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41:479-485.
- Rauch M, Loosfelt H, Philibert D, Milgrom E (1985): Mechanisms of action of an antiprogestone, RU-486, in the rabbit endometrium. *Eur J Biochem* 148:213-218.
- Reel JR, Humphrey RR, Shih Y, Windsor BL, Sakowski R, Creger PL, Edgren RA (1979): Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biological activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives. *Fertil Steril* 31:552-561.
- Slater E, Redeuih G, Theis K, Suske G, Beato M (1990): The uteroglobin promoter contains a noncanonical estrogen responsive element. *Mol Endocrinol* 6:604-610.
- Van Look PFA (1988): Post ovulatory methods of fertility regulation. In "Research in Human Reproduction Biennial Report 1986-1987." Geneva: World Health Organization, pp 153-173.
- Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, García GA, Angeles A, Pérez-Palacios G (1986): Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *J Steroid Biochem* 24:525-531.
- Von Schenck H, Larson I, Thorell JI (1976): Improved radioiodination of glucagon with lactoperoxidase method: influence of pH on iodine substitution. *Clin Chim Acta* 69:225-232.

Original Article

In Vitro Molecular Assessment of the Mechanisms of Action of 19-Nor Progestins Used as Contraceptives¹

ANA MARIA PASAPERA, IGNACIO CAMACHO-ARROYO, JEAN FRANÇOIS SAVOURET,* GUSTAVO A. GARCIA, GREGORIO PEREZ-PALACIOS, CHRISTOPHE PICHON,* and MARCO A. CERBÓN

Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán, Facultad de Química and FES-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

**INSERM Unité 135, Hôpital de Bicêtre, France*

Abstract

Norethisterone (NET) and levonorgestrel (LNG) are synthetic progestins used as contraceptive agents. Both compounds are biotransformed at target tissues into A-ring reduced metabolites which possess different pharmacological properties. The aim of this study was to determine the molecular mechanisms of the progestational and antiprogestational effects of NET, LNG and their metabolites by using a highly efficient, sensitive *in vitro* molecular assay based on the detection of a reporter gene expression (the bacterial chloramphenicol acetyltransferase (CAT) inserted downstream of a minimal promoter containing two progesterone responsive elements (PRE₂) and the TATA box. For this purpose we used CV-1 monkey kidney cells, which do not possess steroid receptors. These cells were cotrans-

ected with a progesterone receptor expression vector and the reporter vector PRE₂-TATA-CAT. Data obtained using this model showed that NET and LNG induced CAT activity in a manner similar to that of the potent progestin R5020. NET and LNG metabolites exhibited a weak progestational activity; however, when 5 α -NET metabolite was simultaneously administered with R5020, a clear antiprogestational effect similar to that of the antiprogestin RU486 was observed. Therefore, the results clearly demonstrate that the use of the reporter CAT vector containing hormone responsive elements is a suitable assay for the screening and evaluation of new synthetic steroids with agonist or antagonist progestational activities in transfected CV-1 cell line. (*Arch Med Res* 1995; 26:S203).

KEY WORDS: 19-nor progestins; Steroid responsive elements; Progesterone receptors; Antiprogestins; Hormonal and antihormonal test.

Introduction

Norethisterone (NET) and levonorgestrel (LNG) are synthetic 19-norprogestins used as contraceptive agents (1,2). Both steroids are 5 α - and 3 β ,5 α -reduced at

target tissues to produce metabolites which may acquire new hormone agonistic or antagonistic capabilities (3,4). The A-ring reduced metabolites of NET and LNG mainly interact with progesterone receptors (PR) and estrogen

Correspondence to:

Dr. Marco A. Cerbón, Depto. Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición S. Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, 14000 México, D.F. Tel: (525) 573-1160; FAX: (525) 655-9859.

¹This study was supported by the Human Reproduction Programme, World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland and CONACyT, Mexico (to A.M.P.), and by the Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM, Mexico (to M.A.C.).

receptors (5,6). The dihydro-reduced metabolites bind to PR whereas tetrahydro-reduced derivatives bind to estrogen receptors. These metabolites can exhibit different hormonal properties (2,5).

The progestational and estrogenic properties of these steroids have been largely studied *in vivo* by assessing the uteroglobin gene expression. These studies indicate that 5 α -NET has low progestational agonistic effects whereas 3 β ,5 α -NET exerts estrogenic actions on uteroglobin synthesis (7), which is regulated by progesterone and estradiol in the uterus of prepubertal and pregnant rabbits (8,9).

When these metabolites were tested in combination with progesterone, they exhibited potent antiprogestational and antiimplantation properties (3,10,11). However, the molecular mechanisms involved in the hormonal and antihormonal actions of these steroids have not been completely elucidated.

In this study we proposed to assess the molecular effects of NET, LNG and their reduced metabolites by using a highly sensitive *in vitro* molecular assay in which progestational and antiprogestational effects can be detected by measuring the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity (12) of a reporter vector responsive to progesterone (PRE₂-TATA-CAT).

Materials and Methods

Steroids. Levonorgestrel (13 β -ethyl-17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-4-gonen-3-one) and R5020 (17 α ,21-dimethyl-19-nor-4,9-pregnadiene-3,20-dione) were obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Norethisterone (17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-19-nor-4-androsten-3-one) was obtained from Schering Mexicana, Mexico. 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET, 5 α -LNG and 3 β ,5 α -LNG were obtained by chemical synthesis as previously described (5,13). RU486 (17 β -hydroxy-11 β -[4-dimethylamino-phenyl]-17 α [1-propynyl]estra-4,9-diene-3-one) was kindly provided by Roussel Uclaf (Romanville, France).

Gene Constructs. The rabbit PR cDNA expression vector was kindly provided by Professor E. Milgrom (Laboratoire des Hormones et Reproduction, Bicêtre, France) and has been described by Guiochon-Mantel et al. (14). The reporter gene construct PRE₂-TATA-CAT was performed by using the plasmid pEMBL 8+ TK-CAT. The TK (thymidine kinase) promoter sequence (15) was excised with Bam H1/Bgl II restriction enzymes. A double strand synthetic oligonucleotide, containing the restriction sites for Bam H1 and Bgl II, the two progesterone responsive elements (PRE₂) and the TATA box, was inserted in the plasmid. The control TATA-CAT construct was obtained in a manner similar to the PRE₂-TATA-CAT but without the two PRE sequences (Figure 1A,B).

Cell Cultures and Transfections. CV-1 cells from monkey kidney were cultured at 37°C in DMEM medium (Gibco-BRL, Inc., Gaithersburg, MD) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 0.1 U/ml insulin, 100 IU/ml penicillin in a 5% CO₂ atmosphere. Cells were transfected by the calcium phosphate-DNA coprecipitation method previously described (16). In brief, the cells (5 x 10⁵) were plated in 9 cm Petri dishes in DMEM medium. After 24 h they were rinsed with PBS pH 7.4 and incubated with phenol red-free medium containing 10% dextran-charcoal stripped calf serum. Since CV-1 cells are devoid of steroid receptors, they

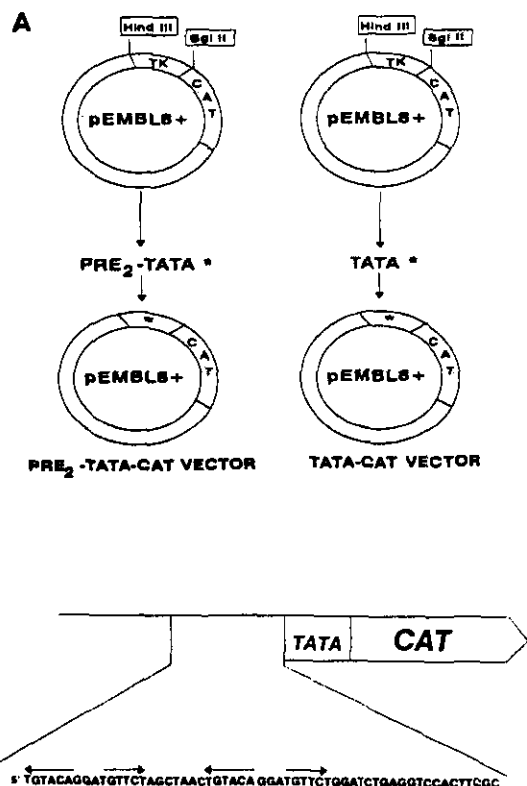


Figure 1. Schematic representations of CAT reporter vectors. A) The reporter gene constructions PRE₂-TATA-CAT and TATA-CAT were performed in the plasmid pEMBL 8+ TK-CAT. The thymidine kinase (TK) promoter sequence [-105, -18] was excised with Bam H1/Bgl II restriction enzymes. A synthetic oligonucleotide containing the restriction sites for Bam H1 and Bgl II and the PRE₂-TATA sequence was inserted in the plasmid (1B). The TATA-CAT vector does not contain the PRE₂ sequences (right). B) Schematic representation of the PRE₂-TATA-CAT construct and the full sequence of the synthetic oligonucleotide inserted upstream of the CAT cDNA. Arrows overlining the oligonucleotides indicate the palindromic structure of the response elements.

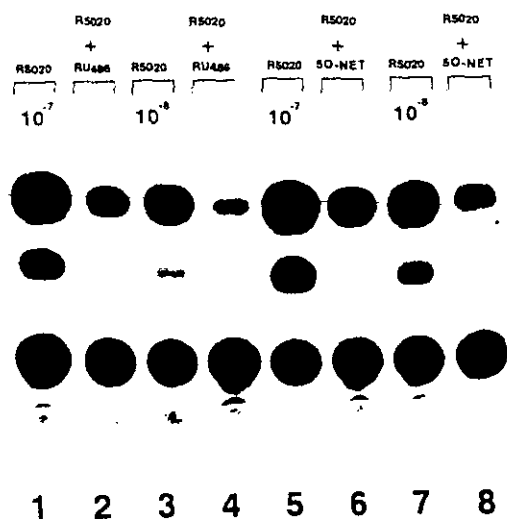


Figure 4. Inhibitory effects of 5α -NET and RU486 on the PRE_2 -TATA-CAT induction by R5020. CV-1 cells cotransfected with the rabbit PR expression vector and PRE_2 -TATA-CAT were simultaneously treated with R5020 (3×10^{-8} M and 1×10^{-7} M) and 5α -NET or RU486 (30-fold molar excess for each agonist dose). The CAT activity was measured (see Materials and Methods). A representative autoradiography of the TLC is shown.

dihydro and tetrahydro-derivatives of LNG possessed similar progestational effects to those of NET derivatives (data not shown).

The simultaneous treatment of transfected cells with R5020 (3×10^{-8} M and 1×10^{-7} M) and 5α -NET or RU486 (30-fold molar excess for each agonist dose) demonstrated that 5α -NET inhibited the CAT activity induced by R5020 in a manner similar to that observed with the antiprogesterin RU486 (Figure 4).

Discussion

In this study the progestational and antiprogesterone activities of NET, LNG and their metabolites were assessed in CV-1 cells cotransfected with an expression vector encoding the rabbit PR and the reporter gene construct PRE_2 -TATA-CAT. Our study confirms and extends previous reports that indicate that stimulation of transcription by progestins through PR requires the presence of PRE in the template to function as transactivating factors. It has been shown that one PRE copy enhances fivefold the PR dependent-transcription, whereas two PRE copies enhance it 27-fold, indicating that the two PRE copies cooperatively function *in vivo* (19,20).

This study shows that NET, LNG and their A-ring reduced metabolites exert diverse hormonal and

antihormonal effects through PR. LNG and NET possess progestational properties since they induced CAT activity in the presence of both the reporter gene PRE_2 -TATA-CAT and PR in CV-1 cells. The dihydro-reduced metabolite 5α -NET exerted both progestational and antiprogesterone effects since it induced a weak CAT activity compared with NET and R5020. However, it blocked CAT activity induction produced by R5020 when they were simultaneously administered. This antiprogesterone effect of 5α -NET was similar to that observed with RU486 (Figure 4). Our data also suggest that the antiprogesterone activity of 5α -NET previously reported *in vivo* (10) is mediated through PR and occurs at the transcriptional level.

Our results confirm and extend previous data from Cerbón et al. who demonstrated that 5α -NET possesses weak progestational activity in prepubertal rabbits by assessing uteroglobin synthesis (7). Several studies have demonstrated that the simultaneous treatment of progesterone with 5α -NET to prepubertal rabbits results in a potent inhibition of uteroglobin gene expression induced by progesterone, suggesting the antiprogesterone properties of 5α -NET (10). Similar results were observed in pregnant rabbits, where 5α -NET exerted both antiprogesterone and antiimplantation effects (11).

As has been demonstrated for several synthetic steroids (21,22), 5α -NET displays both agonistic and antagonistic activities. In this study we cannot ascertain whether the quality of the response (agonistic or antagonistic) is related to the receptor affinity or to the chemical structure of the ligand. Nique et al. proposed that a pure antihormone may be considered as a compound which stabilizes exclusively the inactive conformation of the receptor, whereas a mixed antagonist would be able to stabilize both the active and inactive conformations to various extents (22). Hence this 5α -NET metabolite is demonstrative of this fact.

It is important to mention that the CV-1 cell line used in this study is a suitable model to evaluate hormonal and antihormonal activities since it lacks steroid receptors. In this way, we can introduce the desired steroid receptor and evaluate only the effects due to the interaction of the steroid with the receptor. Thus, it was possible to determine the molecular mechanisms of action of each compound with a specific and highly sensitive method without interference due to the presence of several steroid receptors as occurs at target tissues (17).

In summary, our results indicate that NET, LNG and their A-ring reduced metabolites exert hormonal and antihormonal effects at the transcriptional level. NET, LNG and the metabolites of the latter induce progestational actions in a manner similar to R5020. In fact, the finding that both LNG metabolites induced CAT activity through PR and the PREs suggests that these metabolites could present physiological effects *in vivo*, like those presented by 5α -NET and $3\beta,5\alpha$ -NET.

were cotransfected with 2 µg of the expression vector encoding the rabbit PR, 0.1 µg of PCH 110 galactosidase vector as internal standard (17) and 5 µg of PRE₂-TATA-CAT or TATA-CAT vector. Total transfected DNA in all experiments was normalized to 20 µg by the addition of herring sperm DNA. Twenty four hours after transfection a 1 min shock of dimethylsulfoxide (10% in serum free medium) was given. The cells were rinsed with PBS pH 7.4 and refed with stripped medium. Then steroids were added in 0.001% ethanol. Twenty four hours after treatment the cells were harvested in buffer A (15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 2 mM EDTA) (18) and processed for CAT assays.

CAT Assays. The whole cell extracts were obtained by five cycles of freezing/thawing and centrifugation. Protein concentration in cell extracts was determined by the BCA assay (Pierce Lab). CAT activity was measured by the method described by Pothier et al. (18), with minor modifications. Cell extracts (100 µg) were incubated in buffer A with 5 µl of [¹⁴C]-chloramphenicol 53.1 mCi/mmol (New England Nuclear Corp., Boston, MA) and Acetyl-Co A (4 mM) for 1 h at 37°C. The acetylated and non-acetylated forms of [¹⁴C]-chloramphenicol were separated by thin layer chromatography (TLC) in chloroform/methanol (95:5) for 45 min. The TLC plates were exposed to Kodak X-OMAT-AR film (Eastman Kodak Co., Rochester, NY)

for 24 h at room temperature and the radioactive spots were analyzed by densitometry. For each test three series of experiments were performed in triplicate.

Results

To determine the progestational and antiprogestational activity of NET, LNG and their A-ring reduced metabolites, CV-1 cells were cotransfected with the construct PRE₂-TATA-CAT and the rabbit PR cDNA. Transcriptional activity of the reporter vector was under PR regulation, while the control TATA-CAT was insensitive to PR-mediated transcription (Figure 2). A high CAT activity was normally induced when the cells were cotransfected with PR and PRE₂-TATA-CAT, and then treated with R5020, whereas the antiprogestin RU486 did not modify CAT activity (Figure 2).

Transfected cells were treated with two different doses (3 x 10⁻⁸ M and 1 x 10⁻⁷ M) of the following synthetic steroids: NET, 5α-NET, 3β,5α-NET, LNG, 5α-LNG, and 3β,5α-LNG. Compared with the control (lanes 1, 2), NET and LNG exerted a high progestational effect (52, 50 and 59, 54-fold induction for each dose, Figure 3, lanes 3, 4). 5α-NET and 3β,5α-NET exhibited a low progestational activity (18, 11 and 45, 26-fold induction each dose, Figure 3, lanes 7 - 10). Interestingly, the

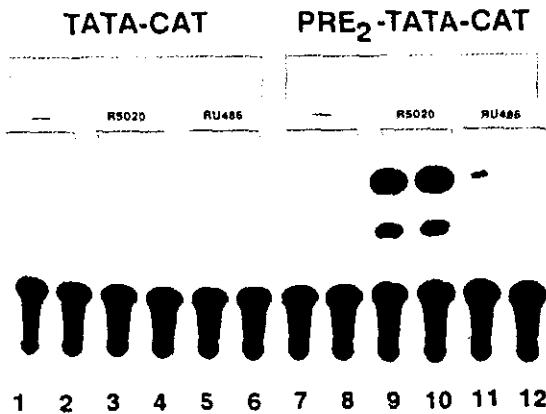


Figure 2. PRE₂-TATA-CAT induction by R5020 and RU486. CV-1 cells were cotransfected with the rabbit PR expression vector and the TATA-CAT reporter (left) or PRE₂-TATA-CAT (right). CAT activity was measured in cells treated with R5020 (3 x 10⁻⁸ M), RU486 (3 x 10⁻⁸ M), and 0.001% ethanol as control. Representative results of three independent experiments are shown. The minimal promoter TATA without PRE sequences had the same basal CAT activity as that of PRE₂-TATA-CAT, but it was not insensitive to R5020 or RU486.

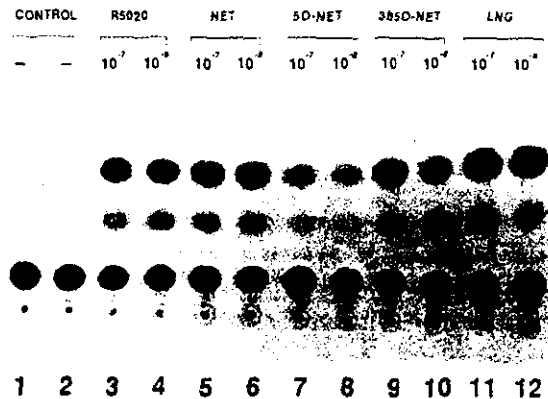


Figure 3. Progestins inducibility of the PRE₂-TATA-CAT. CV-1 cells were cotransfected with PR rabbit expression vector and PRE₂-TATA-CAT (see Materials and Methods). Transfected cells were treated with different progestins (3 x 10⁻⁸ M and 1 x 10⁻⁷ M) as indicated in the figure. The transfections were performed in triplicate. A representative autoradiography of the TLC is shown.

Our results also support the use of CAT constructions harboring steroid responsive elements as suitable models for the evaluation of new contraceptives in tissue culture.

Acknowledgments

The authors thank Professor E. Milgrom from the Laboratoire des Hormones et Reproduction Hôpital de Bicêtre for the expression PR vector used in this study. We also thank M.L.A. Flora García-Formentí for the review of the English manuscript.

References

1. Van Look PFA. Postovulatory methods of fertility regulation. In World Health Organization, Ed. Research in Human Reproduction Biennial Report 1986 - 1987. 1988:153.
2. Shoupe D, Mishell DR. Norplant: subdermal implant system for long-term contraception. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160:1286.
3. Pérez-Palacios G, Cerbón MA, Pasapera AM, Castro I, Enríquez J, Vilchis F, García GA, Moralí G, Lemus AE. Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41:479.
4. Cerbón MA, Lemus AE, Vilchis F, Pasapera AM, García GA, Pérez-Palacios G. A-ring reduced derivatives of norethisterone exert antihormonal effects. In Negro Vilar A, Pérez-Palacios G, Eds. Reproduction, Growth and Development. New York: Raven Press, 1991:175.
5. Chávez B, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca Y, Pérez-Palacios G. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 1985; 22:121.
6. Pérez-Palacios G, Chávez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M, Pérez AE. Mechanisms of action of contraceptive synthetic progestins. *J Steroid Biochem* 1981; 15:125.
7. Cerbón MA, Pasapera AM, Gutiérrez-Sagal R, García GA, Pérez-Palacios G. Variable expression of the uteroglobin gene following the administration of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 1990; 36:1.
8. Loosfelt H, Fridlansky F, Savouret JF, Atger M, Milgrom E. Mechanism of action of progesterone in the rabbit endometrium: induction of uteroglobin and its RNA. *J Biol Chem* 1981; 256:3465.
9. Isoma V, Isotalo H, Orava M, Torkeli T, Jane O. Changes in cytosol and nuclear progesterone receptor concentrations in the rabbit uterus and their relation of progesterone regulated uteroglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 1979; 88:1237.
10. Pasapera AM, Cerbón MA, Castro I, Gutiérrez R, Camacho-Arroyo I, García GA, Pérez-Palacios G. Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. *Biol Reprod* 1995; 52:426.
11. Castro I, Cerbón MA, Pasapera AM, Gutiérrez-Sagal R, García GA, Orozco C, Camacho-Arroyo I, Anzaldúa R, Pérez-Palacios G. Molecular mechanisms of the antihormonal and antiimplantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *Mol Reprod Dev* 1995; 40:157.
12. Gorman C, Moffat L, Howard B. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1982; 2:1044.
13. Bowers A, Ringold HJ, Denot E. Steroids C1 19-nordihydro-testosterone derivatives. *J Am Chem Soc* 1958; 80:6115.
14. Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Ragot T, Bailly A, Atger M, Misrahi M, Perricaudet M, Milgrom E. Receptors bound to antiprogesterin form abortive complexes with hormone responsive elements. *Nature* 1988; 336:695.
15. Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen responsive element derived from the 5' flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 1986; 46:1053.
16. Chauchereau A, Loosfelt H, Milgrom M. Phosphorylation of transfected wild type and mutated progesterone receptors. *J Biol Chem* 1991; 266:18280.
17. Savouret JF, Rauch C, Redeuilh G, Sokhavit Sar, Chauchereau A, Woodruff K, Parker GM, Milgrom E. Interplay between estrogens, progestins and AP-1 on a single regulatory site in the progesterone receptor gene. *J Biol Chem* 1994; 269:28955.
18. Pothier F, Ouellet M, Julien JP, Guérin SL. An improved CAT assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. *DNA Cell Biol* 1992; 11:83.
19. Klein-Hitpass L, Tsai SY, Weigel NL, Allan GF, Riley D, Rodriguez R, Schrader WT, Tsai MJ, O'Malley BW. The progesterone receptor stimulates cell-free transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. *Cell* 1990; 60:247.
20. Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to a transcriptional synergism at target enhancer elements. *Cell* 1989; 57:443.
21. Teutsch G, Costerousse G, Philibert D, Deraed R. Steroids derivatives, U.S. Patent US 4, 447 424(08/05/89) C.A. 101 1984 130575 m.
22. Nique F, Van de Velde P, Brémaud J, Hardy M, Philibert D, Teutsch G. 11- β amido alkoxy phenyl estradiol, a new series of pure antiestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1994; 1:21.

FALTA PAGINA

No.

122

BIBLIOGRAFIA

- Akerblom IW, Slater EP, Beato M, Baxter JD, Mellon PL; 1988, Negative regulation by glucocorticoids through interference with a cAMP responsive enhancer. Science 241:350-353.
- Alexander IE, Clarke CL, Shine J, Sutherland RL. 1989. Progesterone inhibition of progesterone receptor gene expression in human breast cancer cells. Mol. Endocrinol. 3:1377-1386.
- Alexander IE, Shine J, Sutherland RL. 1990. Progesterone regulation of estrogen receptor messenger in human breast cancer cells. Mol. Endocrinol. 4: 821-828.
- Alkhalaf M, Murphy LC. 1992. Regulation of c-jun and jun-b by progestins in T-47D human breast cancer cells. Mol. Endocrinol. 6: 1625-1633.
- Allan GF, Leng X, Tsai SY, Weigel NL, Edwards DP, Tsai MJ, O'Malley B.W. 1992. Hormone and antihormone induce distinct conformational changes which are central to steroid activation. J. Biol. Chem. 267: 1951-1920.
- Andersson O, Nordlund-Möller, L, Barnes HJ, Lund J. 1994. Heterologous expression of human uteroglobin/polychlorinated biphenyl-binding protein. Determination of ligand binding parameters and mechanism of phospholipase A2 inhibition *in vitro*. J. Biol. Chem. 269: 19081-19087.
- Aufere MB, Benson H. 1976. Progesterone: An overview and recent advances. J. Pharm Sci. 65: 783-800.
- Bailly A, Le PC, Rauch M, Milgrom E. 1986. Sequence-specific DNA binding of the progesterone receptor to the uteroglobin gene: effects of hormone, antihormone and receptor phosphorylation. EMBO J. 5: 3235-3241.
- Bardin W,C, Milgrom E, Mauvais-Jauris P Eds. 1983. Progesterone and Progestins, Raven Press. NY.
- Baulieu EE, Kelly P. 1990. Hormones. From molecules to disease. Ed. Herman, publishers in Arts and Sciences, NY.

- Baulieu EE; 1970. The action of hormone metabolites a new concept in Endocrinology. Rev Eur Etod Clin Biol. 15: 723-726.
- Bayard F, Damillano S, Robel P, Baulieu EE. 1978. Cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium. J. Clin. Endocrinol. Metab. 46. 635-648.
- Beato M, Chalepakis G, Shauer M, Slater EP. 1989, DNA regulatory elements for steroid hormones. J Steroid Biochem 32: 737-748.
- Beato M, Sánchez-Pacheco A. 1996. Interaction of steroid hormone receptors with the Transcription initiation complex. Endocrine Reviews 17: 587-608.
- Beato M , Baier R. 1975. Binding of progesterone to the proteins of the uterine luminal fluid. Identification of the uteroglobin as the binding protein. Biochim. Biophys. Acta, 392: 346-356.
- Beier HM. 1968. Uteroglobin: a hormone sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. Biochim.Biophys.Acta, 160: 289-291.
- Benhamou B, Garcia T, Lerouge T, Vergezar A, Goffl D, Bigogne C, Chambon P, Gronemeyer H. 1992. A single aminoacid that determines the sensitivity of progesterone receptors to RU486. Science. 255, 206-209.
- Bingle CD, Giltin JD. 1993. Identification of hepatocyte nuclear factor-3 binding sites in the Clara cell secretory protein gene. Biochem J. 295: 227-232.
- Bingle CD Hackett BP, Moxley, M, Longmore W, Giltin JD. 1995. Role of hepatocyte nuclear factor-3 β in clara cell secretory protein gene expression in the bronchioloar epithelium. Biochem J. 308: 197-202.
- Black LS, Fraay Y. 1973. Evaluation of two types of estrogen inhibition with regard to effects on uptake and binding of 3H-estradiol in the uterus. J. Steroid. Biochem. 4: 467-475.
- Botella J, Duranti E, Duc I, Cognet AM, Delansorne R, Paris J. 1994. Inhibition by nomegestrol acetate and other synthetic progestins on proliferation and

progesterone receptor content of T47-D human breast cancer cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 50: 41-47.

Braselton WE, Lin TJ, Ellegood JO, Mills TM, Mahesh VB. 1979. Accumulation of norethisterone and individual metabolites in human plasma during short and long term administration of contraceptive dosage. Am J Obstet Gynecol. 133: 154-160.

Bullock DW, Willen GF. 1974. Regulation of a specific uterine protein by estrogen and progesterone in ovariectomized rabbits. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146: 294-298.

Cadepond F, Schweizer-Groyer G, Segard-Maurel I, Jibard N, Hollenberg SM, Giguere V, Evans RM, Baulieu EE. 1991. Heat shock protein 90 as a critical factor in maintaining glucocorticoid receptor in a nonfunctional state. J Biol Chem 266: 5834-5841.

Callebaut I, Renoir JM, Lebeau MC, Massol N, Burny A, Baulieu EE, Mornon JP. 1992. An immunophilin that binds 90,000 heat shock protein: main structural features of mammalian p59 protein. Proc Natl Acad Sci USA 89: 6270-6274.

Camacho-Arroyo I, Pasapera A, Pérez-Palacios G, Cerbón M. 1995. La progesterona y sus metabolitos en el funcionamiento del sistema nervioso central. Rev Invest Clin 47: 329-340.

Carson-Jurica MA, William T, Schrader, Bert W, O'Malley. 1990. Steroid Receptor Family: Structure and Functions. Endocrine Reviews. 11: 201-220.

Castro I, Cerbón MA, Pasapera AM, Gutiérrez-Sagal R, García GA, Orozco C, Camacho-Arroyo I, Anzaldúa R, Pérez-Palacios G. 1995. Molecular mechanisms of the antihormonal and antiimplantation effects of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. Mol. Reprod. Dev. 40: 157-162.

Cato AC, Geisse S, Wens M, Westphal HM, Beato M. 1984. The nucleotide sequence recognized by the glucocorticoid receptor in the rabbit uteroglobin

gene region are located far up stream from the initiation of transcription. EMBO J. 3: 2771-2778.

Cato ACB, Herderson D, Fonta H. 1987. The hormone response element of the mouse mammary tumour virus DNA mediates the progestin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. EMBO J 6: 363-368.

Cato ACB, Miksicek R, Schutz G, Arnemann J, Beato M. 1986. The hormone regulatory element of mouse mammary tumour virus mediates progesterone induction. EMBO J 5:2237-2240.

Cerbón MA, Lemus AE, Vilchis F, Pasapera AM, García GA, Pérez Palacios G. 1991. A-ring reduced derivatives of Norethisterone exert antihormonal effects. In: Negro Vilar A, Pérez-Palacios G, Eds. Reproduction Growth and Development. New York: Raven Press. Vol. 71:175-187.

Cerbón MA, Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, García GA, Pérez Palacios G. 1990. Variable expression of the Uteroglobin gene following the administration of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. J Steroid Biochem 36:1-6.

Cerbón MA, Castro I, Pasapera AM, Gutierrez-Sagal R, Anzaldúa R, and Pérez-Palacios G. 1992, Molecular mechanisms involved in the antihormonal and anti-implantation of 5 α -dihydronorethisterone (5 α -NET) in rabbits. Ninth International Congress of Endocrinology. Abs. p. 14.04.099. pp 501.

Classen S, Possinger K., Pelka-Fleisher R, Williams W. 1993. Effects on unapristone and medroxyprogesterone acetate on the proliferation and hormone receptor concentrations of human breast cancer cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 45: 315-319.

Claubergh C. 1933. In: Die weiblichen sexual hormone. pp 88-100. Springer-Verlag, Berlin.

Colletta AA, Howell FV, Baraam MA. 1989. A novel binding site for a synthetic progestagen in breast cancer cells. J. Steroid Biochem. 33: 1055-1061.

- Conneely OM, Sullivan WP, Toft DO, Birnbaumer M, Cook RG, Maxwell BL, Zaruki-Schultz T, Greene GL, Schrader WT, O'Malley BW. *Science*. 233: 767-770.
- Chadwick D, Widdows K (Eds.) 1990. *Steroids and Neural activity*. John Wiley and sons. CIBA Found. Symp. 153. Alemania.
- Chandra T, Bullock DW, Woo, SL. 1981. Hormonally regulated mammalian gene expression: steady-state level and nucleotide sequence of rabbit uteroglobin mRNA. DNA, 1: 19-26.
- Chaucherau A. 1993. Etude des mecanismes de phosphorylation du recepteur de la progesterone. Tesis de Doctorado de la Universidad de Paris XI.
- Chávez B, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca, Pérez-Palacio G. 1985. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. J Steroid Biochem. 22: 121-126.
- Christiansen K, Estes PA, Onate SA, Beck CA, DeMarzo A, Altman M, Lieberman BA, St John J, Nordeen SK, Edwards DP. 1991. Characterization and functional properties of the A and B forms of human progesterone receptors synthesized in a baculovirus system. Mol. Endocrinol. 5: 1755-1770.
- Chen H, Lin RJ, Schitz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. Cell 90, 569-580.
- Daniel JC. 1976. Blastokinin and analogous proteins. *J. Reprod. Fertil.* (suppl.), 25: 71-83.
- Delabre K, Guichon-Mantel A, Milgrom E. 1993. In vivo evidence against the existence of antirogestin disrupting receptor binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4421-4425.

- DeMarzo AM, Beck CA, Oñate SA, Edwards DP. 1991. Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of 90-Kda heat shock protein. Proc Natl Acad Sci USA 88: 72-76.
- Denning J, Hagen, G., Beato M, Suske G. 1995. Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. J.Biol. Chem. 270: 12737-12744.
- Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK, Yamamoto KR. 1990. Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation form a single DNA element. Science 249: 1266-1272.
- Díaz-González K, Nieto A. 1995. Binding of uteroglobin to microsomes and plasmatic membranes. FEBS Lett. 361: 255-258.
- Ding XF, Anderson CM, Ma H, Hong H, Uth RM, Kushner PJ, Stallcup MR. 1998. Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid activating protein 1 (GRIP 1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. Mol. Endocrinol. 12, 302-313.
- Edgren RA, Stretvant F.M. 1976. Potencies of oral contraceptives. Am. J.Obstet Gynecol. 128: 1029-1038.
- Editorial Progestins 1996: Present and Future. J. Steroid Biochem Molec Biol Vol. 59 No. 5/6 pp. 357-363.
- EL-Ashry D, Onate SA, Nordeeu SK, Edwards DP. 1989. Human progesterone receptor complexed with the antagonist RU486 binds to human response elements in structurally altered form. Mol Endocrinol 3:1545-1558.
- Enríquez J. 1997. Efecto de la 5 α -reducción enzimática de derivados de 19-nor y 17 α etinilo de la testosterona sobre sus actividades androgénicas . Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Evans RM; 1988, The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science 240: 889-895.

- Fawell SE, White R, Hoare S, Sydenham M, Page M, Parker MG. 1990. Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164, 384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. Proc Natl Acad Sci USA 87: 6883-6887.
- Fernández-Renau D, Lombardero M, Nieto A. 1984. Glucocorticoid-dependent uteroglobin synthesis and uteroglobulin mRNA levels in rabbit lung explants cultured *in vitro*. Eur.J.Biochem. 144, 523-527.
- Frederick M, Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith, Struhl. 1987. Current Protocols in Molecular Biology. Vol 1. N.Y. (The Red Book Bulletin)
- Fridlansky F, Milgrom E. 1976 Interaction of uteroglobin with progesterone, 5 α -pregnane-3,20-dione and estrogens. Endocrinology 99: 1244-1251.
- Furr BJA, Wakeling AE. 1987. Pharmacological and clinical uses of inhibitor of hormone action and secretion. ED. Baillière-Tindall, Eastbourne.
- García C, Pincus G. 1964. Ovulation inhibition by progestin-estrogen combination. Int. J. Fertil. 9: 98-105.
- Garfield RE, Baulieu EE. 1987, The antiprogesterone steroid RU486: a short pharmacological and clinical review, with emphasis on the interruption of pregnancy. Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab. 1:207-221.
- Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa S. 1983. A tissue specific transcription enhancer element is located in the mayor intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. Cell. 33: 717-728.
- Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. 1997. Nuclear receptor coactivators. Curr. Opin. Cell. Biol. 9, 222-232.
- Goldfine ID, Papa V., Vignerie R, Siiteri PK, Rosenthal S. 1992. Progestin regulation of insulin and insulin-like growth factor binding protein by T47-D human breast cancer cells: regulation by progestins and antiestrogens. Breast Cancer Res. and Treatment. 22: 69-79.

- Gómez-Lahoz E., López de Haro MS, Esponda P, Nieto A. 1992. Tissue-specific and hormonally regulated expression of the puromycin N-acetyltransferase-encoding gene under control of the rabbit uteroglobin promoter in transgenic mice. Gene, 117: 255-258.
- Gorman C, Moffat L, Howard B. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyl transferase in mammalian cells. Mol Cell Biol 2: 1044-1054.
- Goswami A, Feigelson M. 1974. Differential regulation of a low molecular weight protein in oviductal and uterine fluids by ovarian hormones. Endocrinology. 95: 669-675.
- Graham D, Clarke C. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. Endocrine reviews. 18: 502-519.
- Gronemeyer H, Turcotte B, Quirin-Stricker C, Boquel MT, Meyer ME, Koroosky Z, Jeltsch JM, Lerouge T, Garnier JM, Chambon P. 1987. The chicken progesterone receptor: sequence expression and functional analysis. EMBO J. 6: 3985-3994.
- Gronemeyer H. 1991. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. Annu Rev Genet 25: 89-123.
- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Lescop P, Sar S, Atger M, Perrt-Appianat M, Milgrom E. 1989. Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: Evidence for interaction between monomers. Cell 57: 1147-1154.
- Guiochon-Mantel A, Loosfelt H, Ragot T, Bailly A, Atger M, Misrahi M, Perricaudet M, Milgrom E. 1988. Receptors bound to antiprogesterin form abortive complexes with hormone responsive elements. Nature 336: 695-698.
- Gutierrez-Sagal R, Pérez-Palacios G, Langley E, Pasapera AM, Castro I, Cerbón MA. 1993. Endometrial Expression of Progesterone Receptor and Uteroglobin Genes During Early Pregnancy in the Rabbit. Molecular Reproduction and Development 34: 244-149.

- Hackett BP, Bingle CD, Gitlin JD. 1996. Mechanism of gene expression and cell fate determination in the developing pulmonary epithelium. Annu. Rev. Physiol. 58: 51-71.
- Hagen G, Wolf M, Katyal S L, Singh G, Beato M, Suske G. 1990. Tissue specific expression, hormonal regulation and 5'-flanking gene region of the rat clara cell 10 kDa protein: comparison to rabbit uteroglobin. Nucleic Acids Res. 18: 2939-2946.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Mol Biol 166: 557-558.
- Hicks-Goméz JJ, Díaz Zagoya JC. 1988. Bioquímica e Inmunología II. Ed. Fac. Medicina UNAM. México D.F.
- Hilliard J, Croxatto HB, Hayward JN, Sawyer CH. 1966. Norethindrone blockade of LH release to intrapituitary infusion of hypothalamic extract. Endocrinology. 79: 411-419.
- Horwitz K. 1993, Mechanism of hormone resistance in breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 26: 119-130.
- Hurd C, Khattree N, Alban P, Nag K, Jhanwar SC, Dinda S, Moudgil VK. 1995. Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47-D human breast carcinoma cell line. J. Biol. Chem. 270: 28507-28510.
- Ing NH, Beekman JM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1992. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). J Biol Chem 267: 17617-17623.
- Jeltsch JM, Korozowski Z, Quirin-Striker C, Gronemeyer H, Simpson RJ, Chambon P. 1986. Cloning of the chicken progesterone receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 5424-5428.
- Jeng MH, Jordan V. 1991. Growth stimulation and differential regulation of transforming growth factor β 1 (TGF β 1) TGF β 2, and TGF β 3 messenger RNA

levels by norethindrone in MCF-7 human breast cancer cells. Mol. Endocrinol. 5: 1120-1128.

Kalff M, Gross B, Beato M. 1990. Progesterone receptor stimulates transcription of mouse mammary tumor virus in a cell-free system. Nature 344: 360-362.

Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambom P. 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. EMBO J. 9: 1603-1614.

Katzellenbogen JA, Katzenellenbogen B, 1996. Nuclear hormone receptors: ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. Chemistry and Biology. 3: 529-536.

Keydar, I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarca J, Radu M, Chaitrik S, Brenner HJ. 1979. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. Eur. J. Cancer 15: 659-670.

Khandjian EW, Matter JM, Leonard N, Weil R. 1981. Simian Virus 40 and polyoma virus stimulate overall cellular RNA and protein synthesis. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 77: 1476-1480.

Kikukawa T, Cowan BD, Tejada RI, Mukherjee AB. 1988. Partial characterization of a uteroglobin like protein in the human uterus and its temporal relationship to prostaglandin levels in this organ. J.Clin. Endocrinol. Metab. 67: 315-321.

Kim K, Lee BJ, Park Y, Cho WK. 1989. Progesterone increases messenger ribonucleic acid mRNA encoding luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) level in the hypothalamus of ovariectomized estradiol-primed prepubertal rats. Mol. Brain, Res. 6: 151-158.

King WJ, Greene GL. 1984. Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells. Nature 307: 745-747.

Klein-Hitpass L, Tsai SY, Weigel NI, Allan GF, Riley D, Rodriguez R, Schrader WT, Tsai MJ, O'Malley BW. 1990. The progesterone receptor stimulates cell-free

transcription by enhancing the formation of a stable preinitiation complex. Cell 60: 247-251.

Krishnan RS, Daniel JC. 1967. "Blastokinin" inducer and regulator of blastocyst development in the rabbit uterus. Sci 158: 490-492.

Kumar V, Chambon P. 1988. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. Cell 55: 145-156.

Kundu GC, Mantile G, Miele L, Cordella-Miele E, Mukherjee A B. 1996. Recombinant human uteroglobin suppress cellular invasiveness via a novel class of high affinity cell surface binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 2915-2919.

Landers JP, Spelsberg TC; 1992, New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. Crit. Rev. Euk. Gene Express. 2: 19-22

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

Leavitt WW, Toft DO, Strott CH, O'Malley BW. 1974. A specific progesterone receptor in the hamster uterus.: Physiological properties and regulation during the estrous cycle. Endocrinology. 94: 1041-1053.

Lessey BA, Alexander PS, Horwitz KB 1983. The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: Characterization by chromatography and photoaffinity labeling. Endocrinology. 112: 12667-1274.

Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R, Milgrom E. 1986. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone receptor complementary DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 9045-9049.

Loosfelt H, Fridlansky F, Savouret JF, Atger M, Milgrom E. 1981. Mechanism of action of progesterone in the rabbit endometrium: induction of uteroglobin and its RNA. J Biol Chem 256: 3465-3470.

- López de Haro MS, Alvarez L y Nieto A. 1988, Testosterone induce the expression of the uteroglobin gene in rabbit epididymus. Biochem. J. 250: 647-651.
- López de Haro MS, García C, Nieto A. 1990. Localization of an estrogen receptor binding site near the promoter of the uteroglobin gene. FEBS Lett. 265: 20-22.
- López de Haro MS, Nieto A. 1985. A primary structure of rabbit uteroglobin as deduced from the nucleotide sequence of a cDNA. FEBS Lett. 193: 247-249.
- López de Haro MS, Nieto A. 1986. Nucleotide and derived aminoacid sequences of a cDNA coding for pre-uteroglobin from the lung of the hare (*lepus capnesis*) Biochem J. 235: 895-898.
- López de Haro MS, Pérez-Martínez, M, García C, Nieto A. 1994. Binding of retinoids to uteroglobin. FEBS Lett. 349: 249-251.
- Manyak MJ, Kikukawa, T, Mukherjee, AB. 1988. Expression of a uteroglobin like protein in human prostate. J. Urol. 140: 176-182.
- Margraf LR, Finegold, M., Stanley, L.A., Mayor A, Hawkins, HK DeMayo FJ. 1993. Cloning and tissue specific expression of the cDNA for the mouse Clara cell 10 kDa protein: comparison of the endogenous expression to rabbit uteroglobin promoter-driven transgene expression. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 9: 231-238.
- Markiewicks L, Hochberg RB, Gurside E. 1992. Intrinsic estrogenicity of some progestagenic drugs. Journal of Steroid Biochem. and Mol. Biol. 41: 53-58.
- Mayol R.F, Longenecker DE. 1974. Development of a radioimmunoassay for blastokinin. Endocrinol. 95: 1534-1542.
- McDonnell DP, Vegeto E, O'Malley W. 1992. Identification of a negative regulatory function for steroid receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 10563-10567.
- McGynty DA, Djeressi C. 1958, Some chemical and biological properties of 19-nor-17-ethynyltestosterone. Ann N Y Acad Sci 71: 500-515.

- McPhail MK. 1934, The assay of progesterin. J Physiol (London) 83: 146-149.
- Meei-Huey J, Langan-Fahey SM, Craig J. 1993. Estrogenic Actions of RU486 in Hormone-Responsive MCF-7 Human Breast Cancer cells Endocrinology 132: 2622-2630.
- Meyer ME, Pornon A, Ji J, Chambon P, Gronemeyer H. 1990. Agonistic and antagonistic activities of RU486 on the functions of the human progesterone receptor. EMBO J 9: 3923-3932.
- Meyer ME, Quirin-Strcker C, Lerouge T, Bocquel MT, Gronemeyer H. 1992. A limiting factor mediates the differential activation of promoters by the mediates. The differential activation of promoters by the human progesterone receptor isoforms. J. Biol. Chem. 267: 1082-1087.
- Miele L, Cordella-Mielle E, Mantile, G, Peri, A y Muckherjee, AB. 1994. Uteroglobin and uteroglobin like proteins. J. Endocrinol. Invest. 17: 690-692.
- Milgrom E, Atger M, Baulieu EE, 1970. Progesterone in uterus and plasma IV. Progesterone receptors in guinea pig uterus cytosols. Steroids. 16: 741-744.
- Milgrom E, Baulieu AA. 1970. Progesterone in uterus and plasma I. Binding in rat uterus 105,000g supernatant. Endocrinology. 87: 276-287.
- Milgrom E, LouThi M, Atger M, Baulieu EE. 1973. Mechanisms regulating the concentration and the confirmation of progesterone receptor(s) in the uterus. J. Biol. Chem. 248: 6366-6374.
- Milgrom E. 1985. Monoclonal antibodies to steroid hormone receptors. Pharmac. Ther. J. 28: 389-415.
- Milgrom E, Atger M, Baulieu EE. 1978. Mechanisms regulating the concentration and conformation of progesterone receptors in the uterus. J. Biol. Chem. 248: 6366-6374.
- Misrahi M, Atger M., D'Auriol L, Loosfelt H, Mériel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F. Milgrom E. 1987. Complete aminoacid sequence of the

human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 143, 740-748.

Moore MR, Zhou JL, Blankenship KA, Strobl JS, Edwards D, Gentry RN. 1997. A sequence in the 5'flanking region confers progestin responsiveness on the human c-myc gene. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 62: 243-252.

Muller GG, Herranen AM, Jervell KF. 1950. Studies on the mechanism of action of estrogens. *Recent Prog Horm Res* 14: 95-139.

Murphy LC, Dotzlaw H. 1989. Regulation of transforming growth factor α and transforming growth factor β messenger ribonucleic acid abundance in T47-D human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 3: 611-617.

Murphy LC, Murphy LJ, Shiu RPC. 1988. Progesterone regulation of EGF-receptor mRNA accumulation in T-47-D human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150: 192-196.

Murphy LC, Murphy LJ, Dibik D, Bell GI, Shiu RPC. 1988. Epidermal growth factor gene expression in human breast cancer cells: regulation of expression by progestins. *Cancer research* 48. 4555-4560.

Musgrove EA, Lee CS, Sutherland RL. 1991. Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing expression of transforming growth receptor, c-fos and c-myc genes. *Mol Cell. Biol.* 11, 5032-5043.

Nardulli AM, Katzenellenbogen BS. 1988. Progesterone receptor regulation in T47-D human breast cancer cells: Analysis by density labeling progesterone receptor synthesis and degradation and their modulation by progestins. *Endocrinology* 88: 1532-1540.

Neri RV, Peets AE. 1975. Biological aspects of antiandrogens. *J. Steroid Biochem.* 6: 815-819.

- Neuman F, Von Berswordt-Aallrabe R, Elger W, Stein-Beck JD, Kramer M. 1970. Aspects of androgen-dependent events as studied by antiandrogens. Rec. Prog. Horm. Res. 26: 337-410.
- Nieto A, Beato M. 1980. Synthesis and secretion of uteroglobin in rabbit endometrial explants cultured *in vitro*. Mol. Cell Endocrinol. 17: 25-39.
- Nique F, Van de Velde P, Brémaud J, Hardy M, Philibert D, Teutsch G. 1994. 11- β amino alkoxy phenyl estradiol, a new series of pure antiestrogens. J Steroid Biochem Mol Biol 1: 21-26.
- Nordlund-Möller L, Andersson O, Ahlgren R, Schilling J, Gillner M, Gustafsson J A, Lund J. 1990. Cloning, structure and expression of a rat binding protein for polichorinated buphenyls. Homology to th hormonaly regulated preogesterone binding protein uteroglobin. J.Biol.chem. 265: 12690-12693.
- Oro AE, Hollenger SM, Evans RM. 1988. Transcriptional inhibition by a glucocorticoid receptor- β -galactosidase fusion protein. Cell. 55: 1109-1114.
- Papa V, Hartmann KKP, Rosenthal SM, Madux BA, Siiteri PK, Godfine ID. 1991. Progestins induced down-regulation of insulin-like growth factor (IGF-I) receptors in human breast cancer cells: potential autocrine role of IGF-II. Mol. Endocrinol. 5: 709-717.
- Papa V, Reese CC, Brunetti A, Vigneri R, Sitteri PK, Goldfine ID. 1990. Progestins increase insulin receptor content and insulin stimulation of growth in human breast carcinoma cells. Cancer Research. 50: 7858-7862.
- Pasapera AM, Cerbón MA, Castro I, Gutierrez R, Camacho AI, García AG, Pérez Palacios G. 1995. Norethisterone metabolites modulate the uteroglobin and progesterone receptor gene expression in prepubertal rabbits. Biol. Reprod. 52: 426-432.
- Pascualini JR, Paris J, Struk-Ware R, Cherite G, and Botella J. 1998. Progestins and breast cancer. J.Steroid. Biochem. and Mol. Biol. 65: 225-235.

- Pérez-Martínez M., García C., López de Haro, M.S. y Nieto A. 1996. Interactions of progesterone dependent endometrial nuclear factors with the promoter of the rabbit uteroglobin gene. Arch. Biochem. Biophys. 333: 12-18.
- Pérez-Palacios G, Cerbón MA, Paspera AM, Castro I, Enríquez J, Vilchis f, García GA, Moralí G, Lemus AE. 1992. Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level. J Steroid Biochem Molec Biol. 41: 479-486.
- Pérez-Palacios G, Chavez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M, Pérez AE. 1981. Mechanisms of action of contraceptive synthetic progestins. J Steroid Biochem. 15: 125-130.
- Pérez-Palacios G, Fernández-Aparicio MA, Medina M, Zacarías-Villareal J, Ulloa Aguirre A. 1981. On the mechanism of action of progestins. Acta Endocrinol (Copenh) 97: 320-328.
- Peri A, Cowan BD, Miele L, Nieman LK, Nwaeze IO, Mukherjee AB. 1994. Expression of Clara cell 10 KDa gene in the human endometrium and its relationship to ovarian menstrual cycle. DNA Cell Biol. 13: 495-503.
- Philibert D, Moguilewsky M, Mary I, Lecaque D, Tournemine C, Secchi J, Deraedt R. 1985. Pharmacological profile of RU486 in animals. In: Baulieu EE, Segal SJ (eds) The Antiprogestin Steroid RU486 and Human Fertility Control. Plenum Press, NY pp 49-68.
- Pothier F, Ouellet M, Julien JP, Guerin SL. 1992. An improved cat assay for promoter analysis in either transgenic mice or tissue culture cells. ADN Cell Biol. 11: 83-90.
- Rauch M, Loosfelt H, Philibert D, Milgrom E. 1985. Mechanism of action of an antiprogestone RU-486, in rabbit endometrium. Eur. J. Biochem. 148: 213-218.
- Ray Chen C Y, Schwartz RJ, De Mayo FJ. 1996. Transcriptional regulation of a mouse Clara cell-specific protein (mCC10) gene by NKx transcription factor

family members thyroid transcription factor 1 and cardiac-muscle homeobox protein (CSX). Mol. Cell Biol. 16: 2056-2064.

Ray MK, Magdaleno, SW, O'Malley BW, De Mayo FJ. 1993. Cloning and characterization of the mouse Clara cell specific 10 kDa protein gene. *In vitro* and *In vivo* analysis. J.Biol. Chem. 270: 2689-2694.

Redeuilh G, Moncharmont B, Secco C, Baulieu EE. 1987. Subunit composition of the molybdate-stabilized "8-9 S" nontransformed estradiol receptor purified from calf uterus. J Biol Chem 262: 6969-6975.

Reekm SR, Humpherey RR, Windson BL, Sakowski R, Creger PL, Edgreen RA; 1979, Competitive progesterone antagonists: Receptor Binding and biologic activity of testosterone and 19-nor-testosterone derivatives. Fertil Steril 31: 552-561.

Reel S R, Humpherey RR, Shih Y, Windsor BL, Sakowski R, Creger PL, Edgren RA. 1979. Competitive progesterone antagonists: Receptor binding and biologic activity of testosterone and 19-nor-testosterone derivatives. Fertil Steril 31: 552-561.

Revez C, Chappel CI, Gaudry R. 1960. Masculinization of female foetuses in the rat by gestational compounds. Endocrinology. 66: 140-144.

Romano GJ, Mobbs CV, Howells RD, Pfaff DW. 1989. Estrogen regulation of proenkephalin gene expression in ventromedial hypothalamus of the rat. Temporal qualities and synergisms with progesterone. Mol. Brain. Res. 5: 51-58.

Saez S, Martin PM, Chouxet CD. 1978. Estradiol and progesterone receptor levels in human adenocarcinoma in relation to plasma estrogen and progesterone levels. Cancer research 28: 3468-3473.

Saka D, Helms DD, Helms S, Carlsted-Duke J, Gustafsson JA, Rottman FM, Yamamoto KR. 1988. Hormone-mediated repression of transcription: a negative glucocorticoid responsive element from the bovine prolactin gene. Genes Dev. 2: 1144-1154.

- Sambrook EF, Fritsch T, Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. N.Y.
- Sartorius CA, Tung L., Takimoto GS, Horwitz KB. 1993. Antagonist occupied human progesterone receptors bound to DNA are functionally switched to transcriptional agonists by cAMP. J. Biol. Chem. 268: 9262-9266.
- Sartorius CA, Tung L, Takimoto GS, Horwitz KB. 1993. Antagonist-occupied human progesterone receptors bound to DNA are functionally switched to transcriptional antagonists by cAMP. J. Biol. Chem. 268: 9262-9266.
- Savouret JF, Loosfelt H, Atger M, Milgrom E. 1980. Differential hormonal control of a messenger RNA in two tissues. Uteroglobin mRNA in the lung and the endometrium. J. Biol. Chem. 255: 4131-4136.
- Savouret JF, Milgrom E. 1983. Uteroglobin: a model for the study of progesterone action in mammals. DNA 2: 99-104.
- Sawaya PL, Luse DS. 1994 Two members of the HNF-3 family have opposite effects on the lung transcriptional element; HNF 3 α stimulates and HNF 3 β inhibits activity of region I from the Clara cell secretory protein (CCSP) promoter. J. Biol. Chem. 269: 22211-22216.
- Schumacher M, Baulieu EE. (Eds.) 1995. Non-reproductive actions of sex steroids. Wiley and sons. CIBA Foundation Symposium 191. Alemania.
- Shen XZ, Tsai MS, Bullock DW, Woo SL. 1983. Hormonal regulation of rabbit uteroglobin gene transcription. Endocrinol 112: 871-876.
- Sherman MR, Crrvol PL, O'Malley BW. 1970. Progesterone-binding components oviduct. I. Preliminary Characterization of cytoplasmic components. J. Biol. Chem. 245: 6085-6096.
- Silvestre L, Dubais C, Renault M, Rezuani Y, Baulieu EE, Ulman A. 1990. Voluntary interruption of pregnancy with mifepristone (RU486) and a

prostaglandine analogue: a large scale french experience. N. Engl. J. Med. 322: 645-632.

Singh G, Katyal SL, Brown WE, Phillips S, Kennedy AL, Anthony J, Squeglia N. 1988. Aminoacid and cDNA nucleotide sequences of human Clara cell specific 10 kDa protein. Biochim. Biophys. Acta, 950: 329-337.

Slater EP, Redeuilh G, Beato M. 1991. Hormonal regulation of vitellogenin genes: an estrogen-responsive element in the *Xenopus A2* gene and a multihormonal regulatory region in the chicken II gene. Mol Endocrinol 5: 386-396.

Slater EP, Redevihl G, Theis K, Suske G, Beato M. 1990. The uteroglobin promoter contains a non canonical estrogen responsive element. Mol Endocrinol 4: 604-610.

Smith DF, Faber LE, Toft DO. 1990. Purification of unactivated progesterone receptor and identification of novel receptor-associated proteins. J. Biol. Chem 265: 3996-4003.

Smith SS. 1991. Progesterone administration attenuates axitatory aminoacid responses of cerebellar Purkinje cells. Neuroscience. 42: 309-20.

Smith SS, Waterhouse BD, Woodward DJ. 1987. Sex steroid effects on extrahypothalamic CNS. II. Progesterone, alone and in combination with estrogen, modulates cerebral responses to aminoacid neurotransmitters. Brain Res. 422: 52-62.

Spanjaard RA, Chin WW. 1993. Reconstitution of ligand mediated glucocorticoid receptor activity by trans-acting functional domains. Mol. Endocrinol. 7: 12-16.

Spanjaard RA, Chin WW. 1993. Reconstitution of ligand mediated glucocorticoid receptor activity by trans-acting funtional domains. Mol. Endocrinol. 7: 12-16.

Spelberg TC, Steggles AW, Chytl F, O'Malley BW. 1972 Progesterone binding components of chik oviduct. I. Preliminary cjharacterization of cytoplasmic components. J. Biol. Chem. 245: 6085-6096.

- Strahle U, Boshart M, Klock G, Stewart F, Schutz G. 1989. Glucocorticoid- and progesterone-specific effects are determined by differential expression of the respective hormone receptors. Nature 339: 629-632.
- Strahle U, Schmid W, Schutz G. 1988, Synergistic action of the glucocorticoid receptor with transcription factors. EMBO J 7: 3389-3395.
- Strickland S, Richards WG. 1992. Invasion of trophoblasts. Cell, 71: 355-357.
- Stripp BR, Huffman JA, Bohinski RJ. 1994. Structure and regulation of the murine Clara cell secretory protein gene. Genomics, 20: 27-35.
- Stripp BR, Sawaya PL, Luse SJ, Wkenheiser KA, Wert SE, Huffman JA, Latter DL, Singh G, Katyal SL, Whisset JA. 1992. Cis-acting elements that confer lung epithelial cell expression of the CC-10 gene. J. Biol. Chem. 267: 14703-14713.
- Suske G, Wenz M, Cato AC, Beato M. 1983 The uteroglobin gene region: hormonal regulation repetitive elements and complete nucleotide sequence of the gene. Nucleic Acids Res. 11: 2257-2271.
- Tai PKK, Albers MW, Chang H, Faber LE, Schreiber SL; 1992, Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. Science 256: 1315-1318.
- Tancredi T, Temussi, PA, Beato M. 1982. Interaction of oxidized and reduced uteroglobin with progesterone. Eur. J. Biochem. 122: 101-104.
- Thènevy B, Bailly A, Rauch C, Rauch M, Delain E, Milgrom E. 1987. Association of DNA-Bound progesterone receptors. Nature. 329: 79-81.
- Toft DO, O'Malley BW. 1972. Target tissue receptors for progesterone: the influence of estrogen treatment. Endocrinology. 90: 1041-1045.
- Tora L, Gronemeyer H, Turcotte B, Gaub MP, Chambon P. 1988. The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. Nature 333: 185-188.

- Torkkeli T, Krusius T, Jänne O. 1978. Uterine and lung uteroglobins in the rabbit. Two similar proteins with differential hormonal regulation. Biochim.Biophys.Acta. 544: 578-592.
- Tsai Sy, Tsai MJ, O'Malley BW. 1989. Cooperative binding of steroid hormone receptors contributes to a transcriptional synergism at target enhancer. Cell. 57:442-445
- Tung L, Mohamed MK, Hoeffler JP, Takimoto GS, Horwitz KB. 1993. Antagonist-occupied human progesterone B receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and dominantly inhibited by A-receptors. Mol. Endocrinol. 7: 1256-1265.
- Ulmann A, Teutsch G, Philibert D. 1990, RU486. Sci Am. 262: 42-48.
- Umland TC, Sax, M. 1995. Twixt form and function. Nature Struc. Biol.2: 919-922.
- Van Look PFA. 1988, Postovulatory methods of fertility regulation. In World Health Organization, Ed. Research in Human Reproduction. Biennial Report 1986-1987. pp 153-173.
- Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonell DP, O'Malley BW. 1992. The mechanism of RU486 antagonism is independent of the conformation of the carboxiterminal tail of the human progesterone receptor. Cell. 192: 703-713.
- Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonell DP, O'Malley BW. 1992. The mechanism of RU486 antagonism is independent of the conformation of the carboxi-terminal tail of the human progesterone receptor. Cell. 192: 103-713.
- Vegeto E, Shabag MM, Wen DX, Goldman M.E, O'Malley BW, McDonell D.P. 1993. Human progesterone receptor A form is a cell and promoter specific repressor of human progesterone receptor B function. Mol. Endocrinol. 7: 1244-1255.

- Vilchis F, Chavés B, Pérez AE, García GA, Angeles A, Pérez Palacios G. 1986. Evidence that a non-aromatizable metabolite of Norethisterone induce estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. J Steroid Biochem. 24: 525-531.
- Walls C, Vose CW, Horth CF, Palmer RF. 1977. Radioimmunoassay of plasma norethisterone after ethinodiol diacetate administration. J. Steroid. Biochem. 8, 167-171.
- Wasylyk B, Wasylyk C, Chambon P. 1984. Short and long range activation by the SV40 enhancer. Nucl. Acid. Res. 12, 5589-5608.
- Wen DX, Xu Y.F., Mais D.E., McDonnell D.P. 1994. The A and B isoforms of the hormone progesterone receptor operate through distinct signaling pathways within target cells. Mol. Cell Biol. 14: 8356-8364.
- Wolf M, Klug, J, Hackenberg R, Gessels M, Grezeschik, KH, Beato M, Suske G. 1992. Human CC0, the homologue of rabbit uteroglobin: genomic cloning chromosomal localization and expression in endometrial cell lines. Hum. Mol. Genet. 1: 371-378.
- Wong MMSJ, Murphy LC. 1991. Differential regulation of c-myc by progestins and anti-estrogens in T-47D human breast cancer cells. Journal of Steroid. Biochem. and Mol. Biol. 39: 39-44.
- Yee D, 1994. The insulin-like growth factor system as target in breast cancer. Breast Cancer Res. and Treatment. 32: 85-95.