

## Tesis de Posgrado

# Acción y mecanismo de acción glucocorticoide de algunos derivados de progesterona

Vicent, Guillermo Pablo

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Vicent, Guillermo Pablo. (1998). Acción y mecanismo de acción glucocorticoide de algunos derivados de progesterona. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3037\\_Vicent.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3037_Vicent.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Vicent, Guillermo Pablo. "Acción y mecanismo de acción glucocorticoide de algunos derivados de progesterona". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3037\\_Vicent.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3037_Vicent.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tesis Doctoral para optar al Título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires

“Acción y Mecanismo de Acción  
Glucocorticoide de Algunos Derivados de  
Progesterona”

por Guillermo Pablo Vicent

Director de Tesis: Dr Mario D. Galigniana  
Co-Director: Dr Carlos P. Lantos

Nº 3037 1

52

Lugar de realización: Laboratorio de Esteroides-PRHOM-CONICET,  
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y  
Naturales, Ciudad Universitaria, Buenos Aires.

1998

UNIVERSITY OF BUENOS AIRES  
Faculty of Natural Sciences

Thesis in fulfilment of the Degree of a Doctor of the  
University of Buenos Aires

“Glucocorticoid Action and Mechanism of  
Action in Certain Progesterone Derivatives”

by Guillermo Pablo Vicent

Director of Thesis: Dr Mario D. Galigniana  
Codirector of Thesis: Dr Carlos P. Lantos

Carried out at: Laboratorio de Esteroides-PRHOM-CONICET,  
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y  
Naturales, Ciudad Universitaria, Buenos Aires.

1998

***Silvina e Ignacio***

*Persevera...es la orden (J.J.P.V.)*

## RESUMEN

Esta Tesis estudia: 1) la influencia de la  $11\beta$ hidroxilación así como de la introducción de un doble enlace  $\Delta_1$  en la molécula de la progesterona, en las respuestas glucocorticoides (GC); 2) la relación entre conformaciones moleculares de éstas y otras 20 moléculas derivadas, con estas respuestas.

Con notorias excepciones (dexametasona (DEX), RU28362 y  $5\beta$ -dihidroprogesterona), las afinidades de los 22 esteroides estudiados obedecen con una muy buena linealidad a la correlación afinidad por el receptor de glucocorticoides (GR) vs afinidad por transcortina (CBG). Existe una correlación inversa, simétrica con respecto a la observada para propiedades MC, del ángulo A/BCD de la mayoría de los esteroides estudiados con su afinidad por GR (y por consiguiente, por CBG). A estos efectos los esteroides se pueden dividir en cuatro grupos: I) de alta afinidad; II) grupo conformacionalmente plano, de baja afinidad; III) los  $\Delta_1$  esteroides, correlacionados en una paralela a sus esteroides madres, que significa menor afinidad por GR o CBG de la que se esperaría de acuerdo con su ángulo de torsión; IV) grupo de esteroides muy torsionados (con baja unión). El conjunto de correlaciones sugiere una torsión óptima para unión a dichas proteínas (entre  $-20$  y  $-28$  para el grupo I. Entre  $-20$  y  $-36$  para el conjunto de los grupos I y III). Contrariamente a lo observado por Duax et al para efecto antiinflamatorio, no se observa correlación de ángulo de torsión vs inducción de TAT (ni utilizando A/BCD ni C3/D).

Las propiedades de  $11\beta$ hidroxiprogesterona (HOP) y  $\Delta_1$ - $11\beta$ hidroxiprogesterona ( $\Delta$ HOP): este par de esteroides posee propiedades glucocorticoides apreciables, a veces muy intensas y carece de otras. Entre las primeras se cuentan la unión a GR y/o CBG, la disociación del complejo GR-lsp90, la gran capacidad de inducción de la TAT y la inhibición de la incorporación de nucleótidos y aminoácidos a timocitos (*respuestas A*).

Por el contrario, ninguno de los dos esteroides afecta el peso del timo, ni sensiblemente las propiedades apoptóticas habitualmente demostradas por otros GC. Tampoco indujeron sensiblemente un gen reporter en una línea celular que expresa el receptor de GC. (*respuestas B*).

Finalmente, a diferencia de las respuestas a todos los demás corticoides ensayados, incluyendo HOP, la respuesta inhibitoria a  $\Delta$ HOP de la incorporación de nucleótidos y aminoácidos a timocitos no es bloqueada totalmente por el inhibidor RU486.

Si consideramos las respuestas B, ni la progesterona ni sus derivados  $\Delta_1$  u  $11\beta$ hidroxilados las expresan.

Experimentos con cultivos de timocitos o hepatocitos dependen de la presencia de suero de ternero para que los esteroides no  $11\beta$ hidroxilados no expresen respuestas A. En ausencia de dicho suero no existen diferencias de estos derivados con progesterona o su  $\Delta_1$  derivado: todos expresan respuestas A.

Pero ¿es la diferencia observada puramente artificial o acaso encierra un trasfondo fisiológico?

El experimento in vivo, que relaciona orden de potencia esteroidea para depósitos de glucógeno con unión a GR así como CBG, sugiere que las proteínas del suero homólogo ejercerían un rol fisiológico "dirigido" como uno de los factores que confieren especificidad GC a la  $11\beta$  hidroxilación.

Los razonamientos sobre ausencia de efectos MC y de unión a MR de moléculas muy torsionadas (grupo IV) permitieron desarrollar el primer antiglicocorticoide (competitivo por GR) específico, ya que carece de afinidad por MR o receptores a progesterona.

## SUMMARY

In this Thesis we study 1) The influence of 11 $\beta$ hydroxylation as well as a  $\Delta_1$  double bond on the glucocorticoid (GC) responses to progesterone.

With noticeable exceptions (dexamethasone (DEX), RU28362, 5 $\beta$ dihydroprogesterone) the affinities of 22 steroids under investigation exhibit with optimal linearity a correlation binding to glucocorticoid receptor (GR) vs binding to CBG. Most of them also exhibit an inverse correlation of their A/BCD angle vs their affinity for glucocorticoid receptors and hence, CBG, this correlation being symmetrical to the one observed for the mineralocorticoid (MC) properties. For the first correlation steroids may be divided into 4 groups: 1)high affinity, 2)conformationally planar steroids with low affinity, 3) $\Delta_1$  steroids correlating in a parallel with respect to their mother-steroids, amounting to smaller affinities for GR or CBG as those expected from their torsion angles, 4)Highly torsioned steroids with low affinity. Taken together, these correlations suggest an optimal torsion angle for steroid binding for GR, equalling approx.  $-20^\circ$  to  $-28^\circ$  for group 1 or  $-20^\circ$  to  $-36^\circ$  for groups 1 plus 3. In contrast to the similar correlation observed by Duax et al. for antiinflammatory properties of glucocorticoids, those here studied failed to exhibit any correlation of TAT induction vs A/BCD or C<sub>3</sub>/D.

Properties of 11 $\beta$ hydroxyprogesterone (HOP) and  $\Delta_1$ -11 $\beta$ hydroxyprogesterone ( $\Delta$ HOP): This steroid pair exhibits certain noticeable, occasionally intense GC properties but lacks others. Among the first group, binding to GR and/or CBG dissociation of the GR-hsp90 complex and an intense ability to induce TAT, as well as the inhibition of nucleotide and aminoacid uptake by thymocytes (*responses A*).

In contrast, none of these steroids affects thymus weight, nor significantly exhibits apoptotic properties. Neither did they induce a reporter gene in a cellular line known to express GR (*responses B*).

Finally, at variance with responses to all other steroids, including HOP, the inhibitory response to  $\Delta$ HOP of nucleotide or aminoacid uptake by thymocytes is not blocked by the inhibitor RU486.

Neither progesterone nor its  $\Delta_1$  or 11 $\beta$ hydroxyderivatives express responses B. Experiments with thymocyte or hepatocyte cultures depend on the presence of calf serum for non-11 $\beta$ hydroxylated steroids not to express responses A. In the absence of this serum, all steroids express responses A. However, is this difference merely artifactual, or, to a certain degree, physiological? An *in vivo* experiment relating potency order of steroids for glycogen deposits to their affinity for GR as well as CBG suggests proteins of homologous serum to possess a physiological role as "target directing factors". They might indeed be one of several factors conferring GC specificity to 11 $\beta$ hydroxylation. The findings on the absence of MC effects and MR binding for very torsioned molecules allowed us to develop the first specific antiglucocorticoid, competitive for GR but lacking affinity for MR or progesterone receptors.

Los experimentos y resultados de esta Tesis fueron publicados parcialmente, y forman parte, de los siguientes artículos:

- 1) M. D. Galigniana, G. P. Vicent, C. P. Lantos and G. Burton  
"Features of the shuttle pair 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone/11-ketoprogesterone"  
Steroids 62, 358-364 (1997).
  
- 2) G. P. Vicent, M. C. Monteserín, A. S. Veleiro, G. Burton, C. P. Lantos and M. D. Galigniana  
"21-hydroxy-6,19-oxidoprogesterone: A novel synthetic steroid with specific antigluocorticoid properties in the rat"  
Mol. Pharm 52, 749-753 (1997).
  
- 3) G. P. Vicent, G. Burton, A. Ghini, C. P. Lantos and M. D. Galigniana  
"Influence of Calf Serum on Glucocorticoid Responses to certain progesterone derivatives"  
Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology En prensa (1998).
  
- 4) G. P. Vicent, A. Pecci, A. Ghini, G. Burton, C. P. Lantos and M. D. Galigniana  
"The glucocorticoid properties of the synthetic steroid Pregna-1,4-diene-11 $\beta$ ol-3,20-dione ( $\Delta$ HOP) are not entirely correlated with the steroid binding to the glucocorticoid receptor"  
Mol Cell Endocrinol. En revisión (1998).



Experiments and results of this Thesis are partially included in the following articles:

- 1) M. D. Galigniana, G. P. Vicent, C. P. Lantos and G. Burton  
"Features of the shuttle pair 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone/11-ketoprogestrone"  
Steroids 62, 358-364 (1997).
  
- 2) G. P. Vicent, M. C. Monteserín, A. S. Veleiro, G. Burton, C. P. Lantos and M. D. Galigniana  
"21-hydroxy-6,19-oxidoprogestrone: A novel synthetic steroid with specific antiglucocorticoid properties in the rat"  
Mol. Pharm 52, 749-753 (1997).
  
- 3) G. P. Vicent, G. Burton, A. Ghini, C. P. Lantos and M. D. Galigniana  
"Influence of Calf Serum on Glucocorticoid Responses to certain progesterone derivatives"  
Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology En prensa (1998).
  
- 4) G. P. Vicent, A. Pecci, A. Ghini, G. Burton, C. P. Lantos and M. D. Galigniana  
"The glucocorticoid properties of the synthetic steroid Pregna-1,4-diene-11 $\beta$ ol-3,20-dione ( $\Delta$ HOP) are not entirely correlated with the steroid binding to the glucocorticoid receptor"  
Mol Cell Endocrinol. En revisión (1998).

# INDICE

	<b>Pág</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>I</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>II</b>
<b><u>CAPITULO 1-INTRODUCCION</u></b>	
<i>1- Generalidades</i>	1
<i>2- Estructura y acción: importancia del modo de representar las estructuras moleculares</i>	3
<i>3- Reconocimiento. Tipos y falta de especificidad de los receptores</i>	11
<i>4- Control multifactorial de las respuestas hormonales a corticoides</i>	13
<i>5- Los eventos en la mediación. El receptor a glucocorticoides ("tipo 2") como integrante de la "Superfamilia"</i>	16
<i>6- Respuestas finales a los glucocorticoides</i>	19
<i>6.1 Gluconeogénesis: degradación oxidativa de los aminoácidos. Glucogenogénesis</i>	19
<i>6.2 Acción temprana de los GC sobre el timo: incorporación de precursores de la síntesis de ARN y proteínas</i>	24
<i>6.3 Apoptosis</i>	25
<i>7- Antihormonas</i>	32
<i>8- Efectos no genómicos de las hormonas esteroideas</i>	33
<b><u>OBJETIVOS</u></b>	
<b><u>CAPITULO 2- ESTUDIOS TRIANGULARES. ACTIVIDAD GC- ESTRUCTURA- UNION A DOS PROTEINAS</u></b>	
<i>Introducción</i>	37
<i>Materiales y Métodos</i>	39
<i>Resultados</i>	44
<i>Discusión</i>	49
<b><u>CAPITULO 3- INFLUENCIA DE LA INTRODUCCION DE UN DOBLE ENLACE 1:2 Y DE LA 11<math>\beta</math>HIDROXILACIÓN EN LA RESPUESTA GC DE LA PROGESTERONA</u></b>	
<i>3.1- Propiedades biológicas y moleculares HOP y su <math>\Delta 1</math> derivado <math>\Delta</math>HOP</i>	
<i>Introducción</i>	53
<i>Materiales y Métodos</i>	55
<i>Resultados</i>	67
<i>Discusión</i>	80

**3.2- La influencia del suero de ternero en la respuesta glucocorticoide de ciertos derivados de progesterona**

<b>Introducción</b>	85
<b>Materiales y Métodos</b>	86
<b>Resultados</b>	90
<b>Discusión</b>	99

**CAPITULO 4-GLUCOCORTICOIDES Y APOPTOSIS**

<b>Introducción</b>	103
<b>Materiales y Métodos</b>	106
<b>Resultados</b>	110
<b>Discusión</b>	122

**CAPITULO 5-21-HIDROXI-6,19-OXIDOPROGESTERONA: UN NUEVO ESTEROIDE SINTETICO CON PROPIEDADES ANTIGLUCOCORTICOIDES**

<b>Introducción</b>	125
<b>Materiales y Métodos</b>	127
<b>Resultados</b>	129
<b>Discusión</b>	138

<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	141
----------------------------	-----

<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b>	144
----------------------------	-----

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr Carlos P. Lantos, por brindarme la posibilidad de realizar el presente trabajo y por sus enseñanzas permanentes que trascienden el ámbito laboral.
- Al Dr Mario Galigniana, por confiar en un inexperto estudiante de Química Fisiológica, por su fuerza y perseverancia sin límites, por sus enseñanzas en la mesada y en la docencia.
- A la Dra Adalí Pecci, por permitirme pensar en voz alta y por la libertad de la que gocé en el tiempo que desarrollé los experimentos correspondientes al capítulo "Glucocorticoides y apoptosis". Gracias por la oportunidad !
- Al Dr Gerardo Burton por el financiamiento económico y los esteroides de síntesis utilizados en el presente trabajo.
- Al Dr Miguel Beato por las facilidades para el desarrollo de los experimentos del capítulo 4.
- A la Dra Silvia Moreno, al Dr Alberto Kornblihtt y al Dr Lino Barañao por su excelencia académica de la que disfruté en los años de estudiante.
- A la Prof Nora Ceballos por su compañerismo y disposición a responder mis preguntas.
- Al Dr Luciano DiCroce por su amistad y las discusiones fructíferas que hemos mantenido en Marburg.
- A la Lic Andrea Pozzi, Lic Fabián Canosa y Lic Damián Romero por su compañerismo y eterna paciencia.
- Al Dr Eduardo Cozza, Lic Laura Matchkovic, Dra Cristina Damasco y Lic. Pilar Igarreta.
- Al Sr Rubén Di Paola y la Sra María Elisa Otero por su colaboración en los experimentos *in vivo*.
- A la Sra Norma Nazar por su buen trato y cordialidad.
- Al Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) por ser el ámbito en el que desarrollé el presente trabajo y en el que encontré excelentes compañeros.
- A mi familia, por todo el amor que me han brindado.

## ABREVIATURAS

<b>11<math>\beta</math>-HSD</b>	<b>11<math>\beta</math>-hidroxiesteroide deshidrogenasa</b>
<b><sup>13</sup>C-nmr</b>	<b><sup>13</sup>C resonancia magnética nuclear</b>
<b>ACTH</b>	<b>hormona adrenocorticotrópica</b>
<b>ADX</b>	<b>adrenalectomizado</b>
<b>AE</b>	<b>actividad específica</b>
<b>ALDO</b>	<b>aldosterona</b>
<b>B</b>	<b>corticosterona</b>
<b>BCS</b>	<b>suero de ternero</b>
<b>B<sub>max</sub></b>	<b>unido máximo</b>
<b>C:D</b>	<b>carbón activado: dextrano</b>
<b>CAT</b>	<b>cloranfenicol acetiltransferasa</b>
<b>CBG</b>	<b>transcortina</b>
<b>CBX</b>	<b>carbenexolona</b>
<b>CE<sub>50</sub></b>	<b>concentración efectiva 50</b>
<b>CS-FCS</b>	<b>suero fetal delipidado</b>
<b>CHAPS</b>	<b>3-[ (3-cholamido propil)-dimetilamonio]-1-propano-sulfonato</b>
<b>DEX</b>	<b>dexametasona</b>
<b>DTT</b>	<b>ditiotreitól</b>
<b>EDTA</b>	<b>ácido etilendiaminotetracético</b>
<b>EGTA</b>	<b>ácido etilenglicol-bis-(<math>\beta</math>-aminoetil éter) N, N, N', N'-tetraacético</b>
<b>GAPDH</b>	<b>gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa</b>
<b>GC</b>	<b>glucocorticoide</b>
<b>GR</b>	<b>receptor de glucocorticoides</b>
<b>GRE</b>	<b>elemento de respuesta a glucocorticoides</b>
<b>HAP</b>	<b>hidroxilapatita</b>
<b>HRE</b>	<b>elemento de respuesta a hormona</b>
<b>hsp</b>	<b>proteína heat shock</b>
<b>i.m</b>	<b>vía de inoculación intramuscular</b>
<b>i.p.</b>	<b>vía de inoculación intraperitoneal</b>
<b>ICE</b>	<b>enzima que convierte interleuquina-1</b>
<b>IU</b>	<b>unidad internacional</b>
<b>K<sub>a</sub></b>	<b>constante de afinidad</b>
<b>K<sub>d</sub></b>	<b>constante de disociación</b>
<b>K<sub>i</sub></b>	<b>constante de inhibición</b>
<b>MC</b>	<b>mineralocorticoide</b>
<b>MR</b>	<b>receptor de mineralocorticoides</b>
<b>NADP</b>	<b>dinucleótido de nicotinamida y de adenina fosfato</b>
<b>P</b>	<b>progesterona</b>
<b>PAGE</b>	<b>electroforesis en gel de poliacrilamida</b>
<b>PMSF</b>	<b>fenilmetilsulfonilfluoruro</b>
<b>PR</b>	<b>receptor de progesterona</b>
<b>R-I</b>	<b>receptor de tipo I</b>
<b>R-II</b>	<b>receptor de tipo II</b>
<b>RBA</b>	<b>afinidad de unión relativa</b>

**SDS**  
**TAT**  
**TBS**  
**TCA**  
**TLC**

**sodio dodecilsulfato**  
**tirosina aminotransferasa**  
**buffer salino conteniendo Tris**  
**ácido tricloroacético**  
**cromatografía en placa delgada**



## 1-Generalidades

La corteza suprarrenal es -mediante la secreción de sus hormonas esteroideas, los *corticoides*- la principal glándula de adaptación. Es así como produce los mineralocorticoides (en la zona glomerulosa), cuyo principal papel es la regulación del equilibrio hidrosalino, los glucocorticoides (en las zonas fasciculada y reticular), los andrógenos (en esta última o en zonas especiales contiguas a la médula, según las especies y estados de desarrollo), y otras hormonas cuyo rol está en pleno estudio.

Las funciones de los mineralocorticoides y andrógenos son relativamente claras y se prestan a definiciones concretas. En cambio, las correspondientes a los glucocorticoides se refieren a acciones hormonales de diversa categoría y de naturalezas aparentemente inconexas. Su nombre se debe a que una de las primeras funciones que se les adjudicó fue la de regular el metabolismo de los hidratos de carbono, postulados como hormonas “para enfrentar las situaciones de stress” (1), pero no se tardó en encontrarles papeles tanto o más importantes como factores de maduración, inmunosupresores, antiinflamatorios o los “dañinos” causantes de la osteoporosis y anticicatrizantes. Como en mi tesis se empiezan a distinguir compuestos en los que predomina una u otra de estas acciones, o que pueden situarse en su origen, daré aquí un resumen de las múltiples funciones glucocorticoideas a las que se suele englobar en un *efecto pleiotrópico*.

Clasificaremos a las acciones de los glucocorticoides en *anabólicas* y *catabólicas* (Figura

1)



*Acciones anabólicas:* son ejercidas principalmente en el hígado, riñón y pulmón. En el hígado estas hormonas elaboran glucosa a partir de precursores no hidrocarbonados (gluconeogénesis), principalmente aminoácidos. Promueven la captación hepática de aminoácidos circulantes, la inducción de enzimas (aminotransferasas) que convierten a estos aminoácidos en  $\alpha$ -cetoácidos precursores de glucosa. Estos efectos conducen al depósito hepático de glucógeno, así como también a la descarga de glucosa neoformada a la sangre. Este último fenómeno, unido a la inhibición de la captación periférica de glucosa (acción antiinsulínica) que producen los glucocorticoides en los órganos donde actúan como agentes catabólicos, causa hiperglucemia.

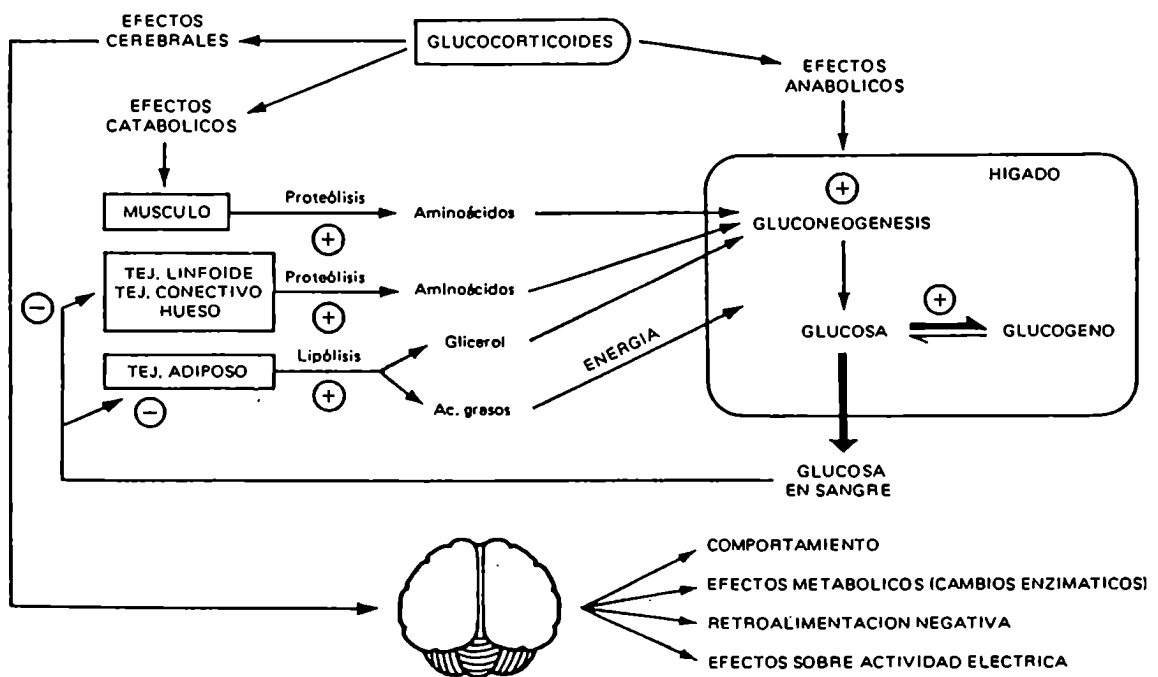


Figura 1: Efectos anabólicos, catabólicos y nerviosos de los glucocorticoides

En el riñón los glucocorticoides también son gluconeogénicos, aumentan la producción amoníaco y activan la filtración glomerular. En el pulmón, aceleran la maduración del pulmón fetal y la biosíntesis de fosfolípidos que contienen fosfatidil colina.

*Acciones catabólicas:* En las células adiposas, tejido linfoide, tejido conectivo, hueso y músculo, los glucocorticoides determinan la destrucción de proteínas y lípidos, liberando sus constituyentes a la sangre: aminoácidos, glicerol y ácidos grasos. Los dos primeros son captados por el hígado y el riñón y convertidos en glucosa por la gluconeogénesis. Los ácidos grasos son fuente de energía en el hígado.

## **2-Estructura y Acción: importancia del modo de representar las estructuras moleculares.**

En lo que antecede se establece cierta relación, aunque imperfecta, entre estructuras anatómicas (zonas de la corteza), y el papel biológico de los corticoides, asignándose las zonas fasciculada y reticular al heterogéneo rol de los glucocorticoides. Hasta qué punto existe un relación paralela entre este rol y representaciones planas de las estructuras moleculares, o en otras palabras, en qué medida las sucesivas introducciones enzimáticas de hidroxilos en diversas posiciones del esqueleto generan *de por si* funciones biológicas diferentes?

La otra duda, relacionada a la anterior, se refiere al -hasta hace poco- generalmente aceptado “dogma” según el cual la especificidad de una función hormonal dependía exclusivamente de su receptor. Se explican las funciones antedichas exclusivamente teniendo en cuenta la afinidad por receptores específicos (o sea, las propiedades fisicoquímicas de las uniones receptor-esteroide)?

Como gran parte de mi tesis depende de la respuesta a estos puntos, entraré a analizarlos en cierto detalle poniendo énfasis en el cambio de nuestras ideas en estos dos aspectos, ocurridos en las últimas dos décadas.

Hasta hace relativamente poco se admitían esquemas de representación plana para definir a los glucocorticoides y para diferenciarlos en gluco-y mineralocorticoides. Es así como - según parecía- la acción enzimática que catalizaba una hidroxilación en 21, específica de corteza suprarrenal, era imprescindible para conferir cualquiera de las dos principales funciones hormonocorticoideas al esteroide precursor principal, la progesterona. Se sostenía también que los 21 hidroxilados que carecen de un hidroxilo en posición 11 eran mineralocorticoides, mientras que la hidroxilación en C<sub>11</sub> los convertía en glucocorticoides. Sin embargo, se dijo, la ulterior introducción a estas moléculas 21,11 hidroxiladas de un hidroxilo en C<sub>18</sub> suprime esta última función y realza la mineralocorticoide. La Figura 2 resume los diferentes pasos biosintéticos que llevan a eslabones cada vez más hidroxilados, de funciones diversas, crecientemente especializadas, y da una idea acerca de la distribución zonal de las enzimas correspondientes.

Si bien estos primeros intentos empíricos satisfacían, a grandes rasgos, los criterios hasta entonces aceptados de relaciones estructura-acción, quedaban algunas interrogantes y aparentes incoherencias. Es así como, desde el punto de vista molecular, no parecía lógica una vía biosintética en que dos estructuras mineralocorticoideas (ALDO y DOC) tenían menos en común que cada una de ellas con el GC intermedio, la corticosterona.

Este interrogante quedó aclarado cuando estudios espectrométricos y los primeros

modelados moleculares demostraron la funcionalización del hidroxilo en C<sub>11</sub> en la aldosterona a través de un puente hemiacetalico que este establece con el aldehido en C<sub>18</sub> (Figura 3) La figura demuestra que queda en pie el requerimiento de un hidroxilo en C<sub>11</sub>, pero que éste debía ser *libre*, para que la respuesta glucocorticoide se exprese.

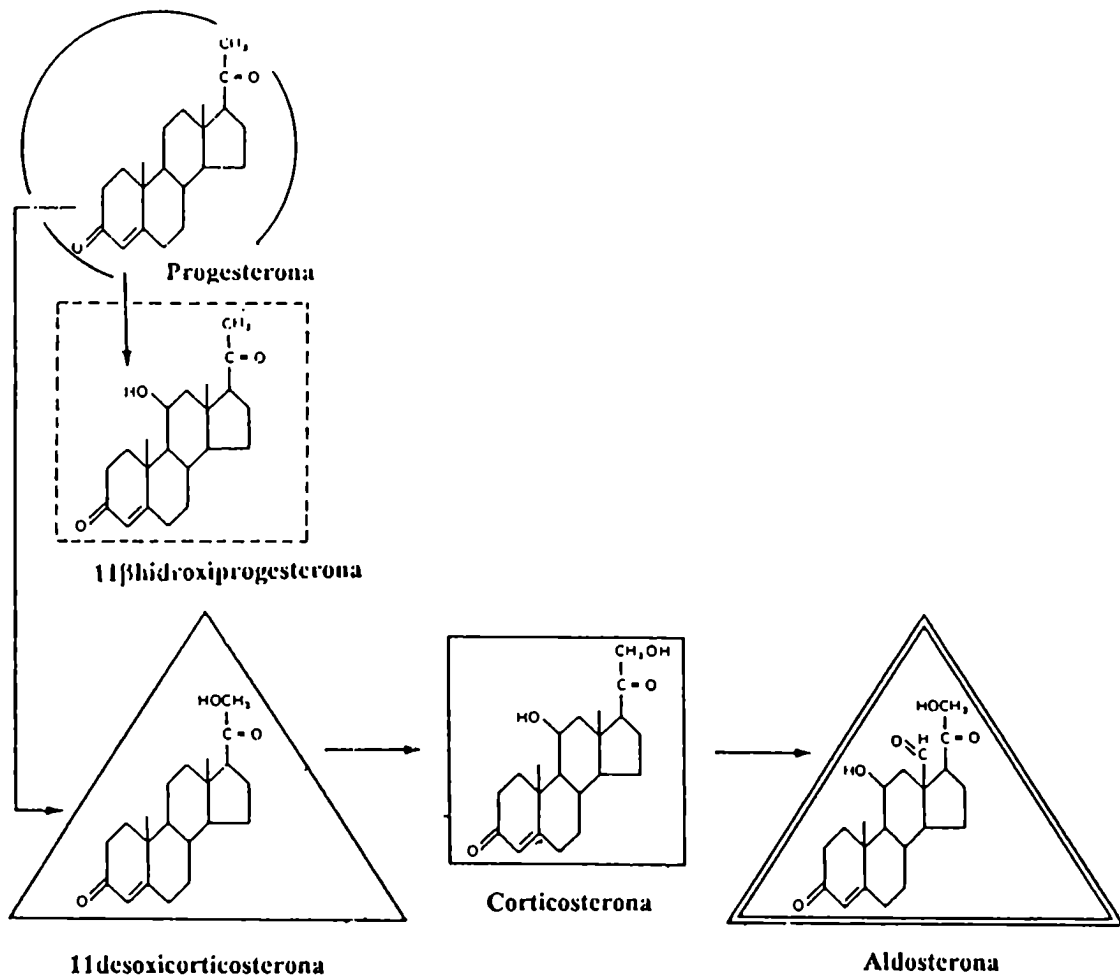
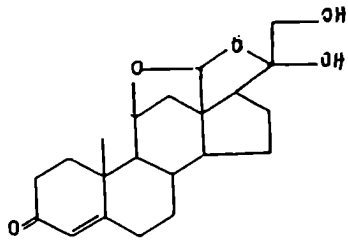
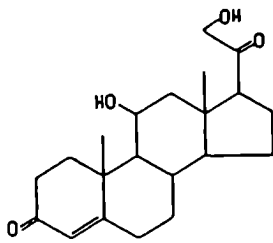
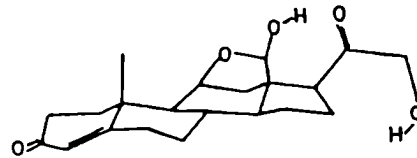


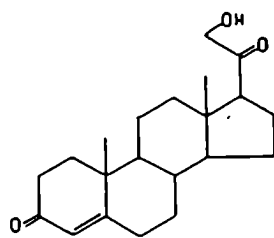
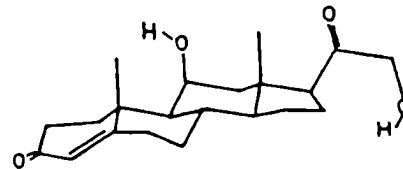
Figura 2: Algunos pasos de la biosíntesis de corticosteroides en la rata. □ glucocorticoide, □ quebrado glucocorticoide en determinadas condiciones estudiadas en esta tesis, Δ mineralocorticoide, O progestágeno. Dos marcos significan mayor acción (2)



Aldosterona



Corticosterona



Desoxicorticosterona

Figura 3: Requerimiento de un hidroxilo en C<sub>11</sub> libre para la respuesta glucocorticoide. Tomado de (3)

Los corticoides carentes de este hidroxilo, o en los que el mismo se halla funcionalizado, carecen de propiedades GC. Una de las tareas de esta tesis se relaciona con los mecanismos que median entre las diversas respuestas GC y el requerimiento del hidroxilo en C<sub>11</sub>, tanto para la activación como para la especificidad de la respuesta GC.

Paralelamente a estas ideas, el grupo de W. Duax efectúa espectros de rayos X de una serie de GC conocidos tanto naturales como sintéticos, y encuentra cierta correlación entre *conformaciones moleculares* y una de las propiedades características de los GC, su potencia antiinflamatoria (4) y Figura 4

Este modo de representación, que respeta la arquitectura tridimensional de la molécula esteroidea, muestra que una torsión creciente del ángulo entre los anillos A y B correlaciona con un creciente poder antiinflamatorio. Fué esta la primera demostración de la existencia de una correlación estructura-acción GC que intentaba abarcar el universo de los GC. (Figura 4) De esta época datan estudios <sup>13</sup>C RNM del grupo de Burton que denotan la influencia del hidroxilo en C<sub>11</sub> en la torsión A/B como así también una cierta simetría con la correlación conformación-propiedades MC.

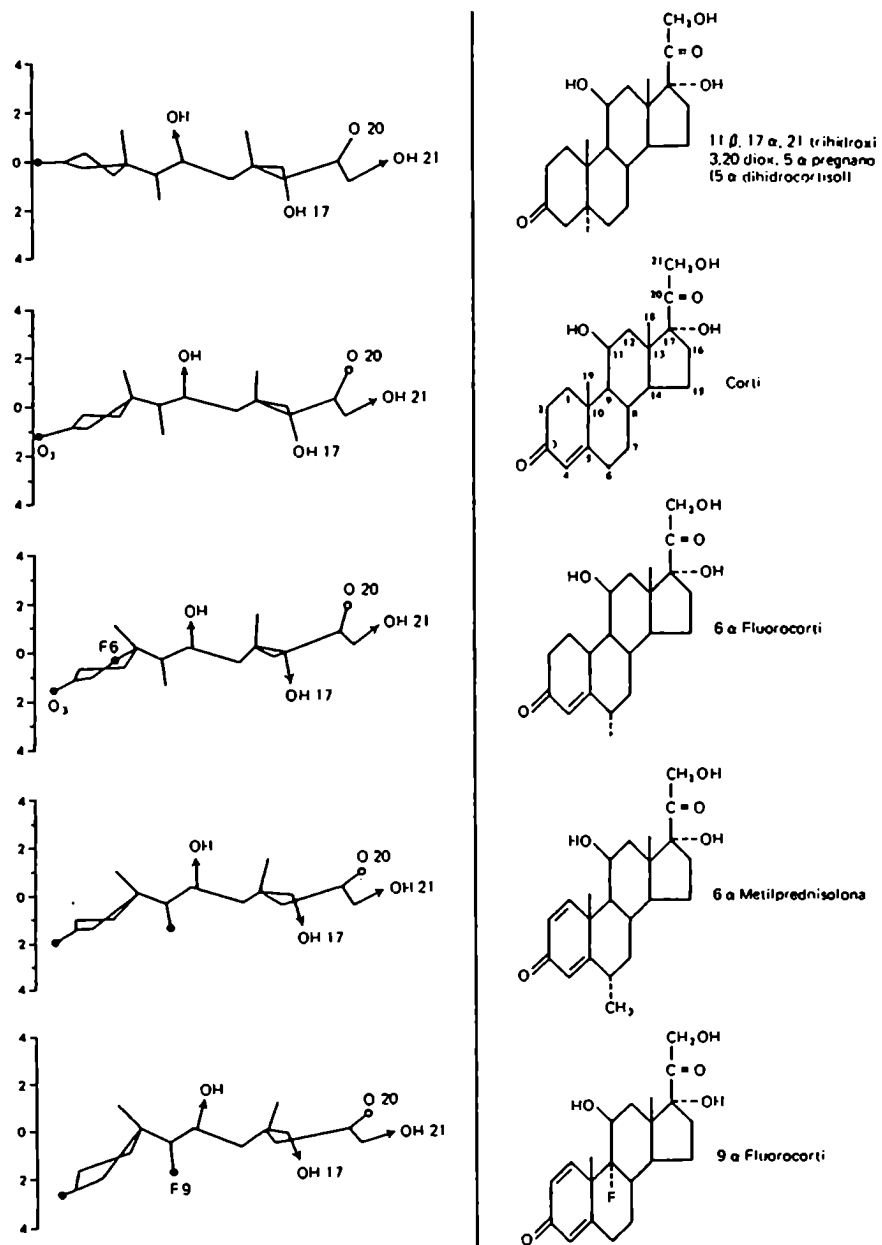
El doble enlace entre C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> tuerce el anillo A hacia la cara alfa en un ángulo de 27 grados. Cuando se introduce otro doble enlace, ahora entre C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>, lo tuerce aproximadamente 10 grados más, lo cual explica, en parte, el aumento de la actividad GC (Ver más arriba) (5). Pero también hay que tener en cuenta que esta introducción confiere a todo el anillo una estructura quinónica que otorga mayor estabilidad a la molécula. Ambas propiedades se conjugan para aumentar el efecto del esteroide, y es de hacer notar que los esteroides sintetizados por los investigadores de los laboratorios

Squibb en los años '50-prednisona, prednisolona, dexametasona y triamcinolona-  
presentan estas propiedades.

La acción sodiorretentora, -a diferencia de las acciones GC- disminuye a medida que la molécula se torsiona en A/B. En un reciente trabajo (6) y en la tesis de M. Galigniana (7) se obtienen muy buenas correlaciones en dicho parámetro cuando se trabaja con MC. En la Figura 5 se muestran las estructuras y los conformeros más estables de los esteroides estudiados en dichos trabajos, que también serán analizados aquí. Una de las metas de mi tesis es aplicarlas a varias respuestas GC, una propuesta evidentemente más complicada que la anterior, pero que permitirá por primera vez discriminar entre funciones individuales de este complejo efecto pleiotrópico y categorizar a nuevos esteroides de síntesis según estas respuestas. Este tipo de correlaciones sería de aquí en más un parámetro repetido en los estudios por los que nuestro grupo intenta asignar uno u otro rol hormonal (corticoideo) a un determinado esteroide.

Sin embargo, en mi tesis aparecen algunas características que parecen ser propias del derivado  $\Delta^1$  de  $11\beta$ -hidroxiprogesterona ( $\Delta$ HOP) si se lo compara con la estructura madre. Como hemos dicho, la introducción de un doble enlace entre  $C_1$  y  $C_2$  a la molécula de cortisol produce la *prednisolona*. En el anillo B las fluoraciones aumentan aún más la actividad biológica de los corticosteroides; la prednisolona con el flúor en posición 9 y la metilación en el  $C_{16}$  es la *dexametasona* y si a ésta se le agrega un OH en el  $C_{16}$  produce la *triamcinolona*.

Estos tres esteroides de síntesis son 4, 5 y 25 veces más potentes que el cortisol como antiinflamatorios.



**Figura 4: Proyecciones conformacionales de cinco esteroides con actividad antiinflamatoria creciente. Tomado de (4)**



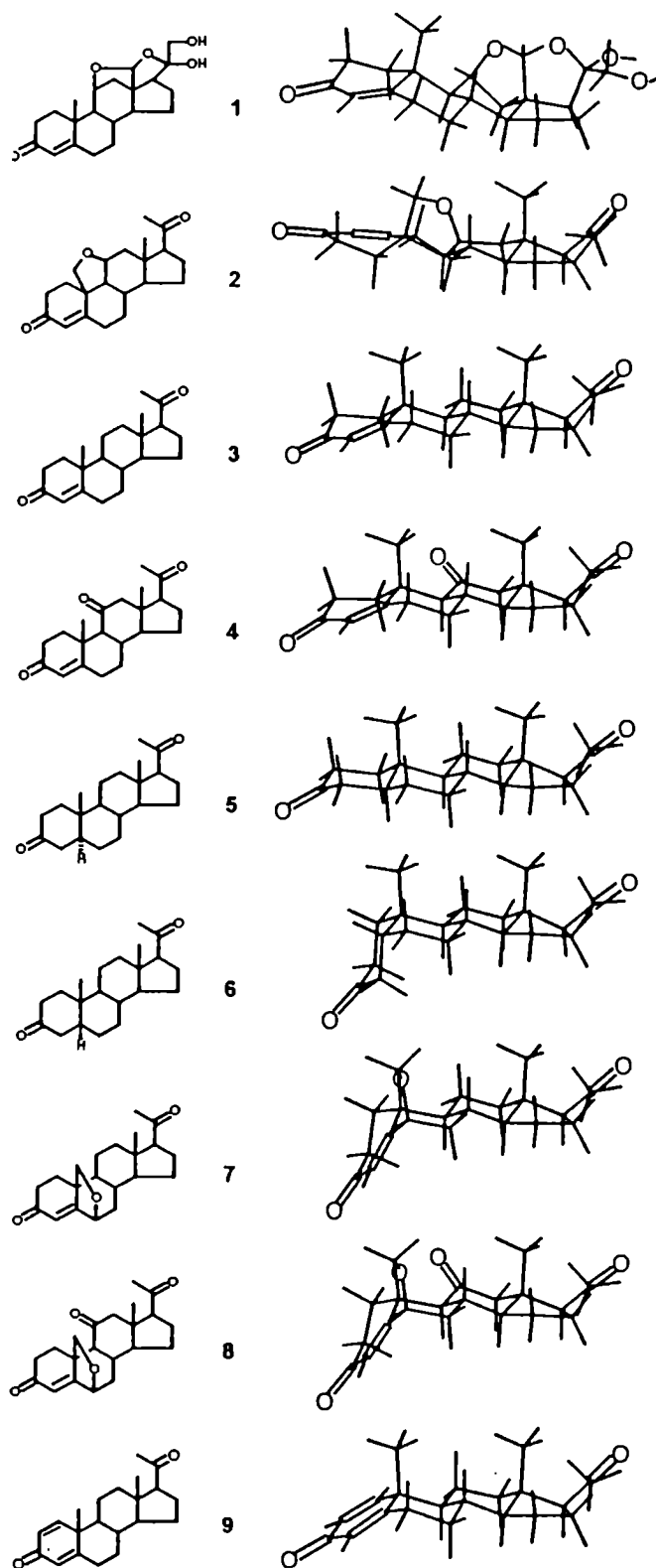


Figura 5: Estructuras (izquierda) y confórmers más estables (derecha) de: 1) Aldosterona, 2) 11,19 oxidoprogesterona, 3) progesterona, 4) 11cetoprogesterona, 5) 5 $\alpha$ H-pregnan-3,20-diona, 6) 5 $\beta$ H-pregnan-3,20-diona, 7) 6,19 oxidoprogesterona, 8) 11ceto-6,19 oxidoprogesterona, 9)  $\Delta^1$  progesterona. (6,7)

Las categóricas diferencias conformacionales entre GC y MC nos permitieron diseñar moléculas nuevas, con un ángulo de torsión A/B que los alejaba tanto de la afinidad por receptores a MC, como por aquéllos a progesterona, miembros de una “superfamilia” de alta homología (Ver más abajo). Esta línea de razonamiento dió lugar al primer antiglucocorticoide “puro”, también informado en esta tesis.

### **3-Reconocimiento. Tipos y falta de especificidad de los receptores.**

En la década del '80 Evans y su grupo clonaron el receptor a mineralocorticoides humano y encontraron que éste tenía un alto grado de homología con el receptor a glucocorticoides. Esta homología llegaba al 94% en la región que se une al ADN y un 57% en la que se une al ligando (8). Por otra parte Watson y col. clonaron el receptor a MC de rata a partir de una biblioteca de hipocampo, usando como sonda la secuencia del MR renal humano (9). Estas posibilidades de la biología molecular reciente demuestran dos hechos: la alta semejanza entre receptores a los esteroides adrenales con distintas funciones y la falta de especificidad del receptor a MC. En realidad, esta última anomalía se conoce desde años anteriores, a través de hallazgos de la enzimología, la patología y la neuroquímica clásicas.

Un primer indicio de la mencionada falta de especificidad se obtuvo en 1973, cuando el grupo de Edelman postula un rol para las proteínas del plasma que incidiría en la especificidad de los receptores a MC (10). Años más tarde, autores de tres laboratorios demuestran definitivamente la falta de tal especificidad. Sin embargo, a diferencia de los postulados anteriores, la asignan a la co-localización de los MR con una enzima, la  $11\beta$ -

hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $11\beta$ HSD), que en su hemirreacción oxidativa transforma a los GC *-no así a los MC debido a la ausencia de  $C_{11}$ -OH libre-* en 11cetoderivados biológicamente inactivos. Ejercería esta enzima un verdadero rol “protector” sobre los receptores a MR contra un dañino exceso de GC, ya que, una vez inhibida la acción enzimática, estas hormonas se unen a los MR con la misma afinidad que los MC. Funder resume estos trabajos en una publicación que lleva el llamativo título de *Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated* (11).

Sin embargo, los indicios iniciales de la “protección” de los receptores a MC por la  $11\beta$ -HSD no fueron experimentales sino patológicos. Es así como New y col. describieron ya en 1977 un raro síndrome que lleva con relativa rapidez a la muerte, el **Apparent Mineralocorticoid Excess** (12). Niños portadores de este síndrome padecen de retención salina y elevada presión arterial. Exhiben aldosteronemias normales pero excesivamente alta relación cortisol/cortisona en sangre, manifestando la incapacidad de sus riñones de transformar el primero en la segunda.

Existen dos isoformas de la enzima  $11\beta$ -HSD: La isoforma-1 (HSD-1) o  $NADP^+$  - dependiente es la más ampliamente distribuida (13): hígado, riñón (túbulo proximal), testículo, pulmón, cerebro, corazón, duodeno, colon, piel y estómago. Esta isoforma posee actividad reductasa y oxidasa. La isoforma-2 (HSD-2) o  $NAD^+$ -dependiente es específica del túbulo contorneado distal, del túbulo colector (14,15) y de la placenta (16,17). Esta isoforma es unidireccional en el sentido oxidativo por lo que adquiere una

gran importancia biológica. En efecto, colocaliza con el receptor a mineralocorticoides (MR) protegiendo dichos receptores de la acción  $\text{Na}^+$  retentora ejercida por los GC.

La HSD-2 mantiene la selectividad a aldosterona de los MR. Veremos más adelante otro factor que se propone como responsable de la protección de los receptores a MC de la acción de los GC.

Entretanto, otros grupos pudieron demostrar la falta de especificidad de los MR a través de una curiosa observación en SNC. En 1975, los grupos de McEwen y de Kloet describen, en hipocampo y septum de rata, dos tipos de receptores a glucocorticoides, uno al esteroide sintético  $^3\text{H}$ -dexametasona, otro, de alta afinidad, que prefiere a la  $^3\text{H}$ -corticosterona. (18-20) Lo que interesaba desde el punto de vista de la “inespecificidad” era que los receptores “que preferían a la corticosterona” y los receptores a mineralocorticoides resultaban ser idénticos, y que la “especificidad” tendría que ser investigada en (y asignada a) proteínas competidoras y/o enzimas desactivantes (21,22).

Las tres series de experimentos no sólo originaron un cambio de doctrina, sino también de denominación para los receptores. De aquí en más se denominaron de “tipo 1” los antiguos, altamente afines pero inespecíficos “receptores a mineralocorticoides”, y de “tipo 2”, los que fueron “receptores a glucocorticoides”, aunque esta última denominación se sigue usando.

#### **4-Control multifactorial de las respuestas hormonales a corticoides.**

Si bien los trabajos arriba citados marcan un cambio radical en nuestras ideas acerca de la intermediación en el eje hormona-receptor-acción hormonal, el mismo título de (11)

sugieren que aún no habían terminado las interpretaciones reduccionistas de aquélla; sólo que el “protagonista receptor” se encontraba desplazado por el “protagonista enzima”. Recuérdese (ver antes) que el trabajo fue la culminación de una serie de publicaciones de este y otros grupos que demuestran la falta de especificidad de los receptores de tipo 1 para aquellas hormonas y la importancia de una enzima inactivante, la  $11\beta$ -HSD para esta especificidad. Sin embargo, sólo llegan a las conclusiones mencionadas después de haber asignado durante años su falta a la competencia por proteínas “secuestradoras” relacionadas con el transporte de los esteroides, que describiremos a continuación.

Las hormonas esteroideas circulan por el torrente sanguíneo unidas a proteínas séricas que aumentan su solubilidad. Así, para los glucocorticoides, las proteínas que unen GC son: albúmina,  $\alpha$ -1-glicoproteína ácida y transcortina también llamada CBG, “corticosteroid binding globulin”. Las fuerzas involucradas en estas uniones son del tipo no covalente. El complejo entre las proteínas séricas y los GC está en equilibrio dinámico; su asociación es espontánea y se disocia fácilmente en medio fisiológico.

CBG es una proteína de 52.000 de peso molecular y es producida en el hígado, siendo regulada su síntesis por los GC, estrógenos y hormona tiroidea. Los GC en altas concentraciones disminuyen la síntesis de CBG hepática. Aproximadamente el 80 % de los glucocorticoides circulantes son transportados por CBG. Hasta hace unos diez años se creía que la importancia de este hecho residía en que la hormona que se encuentra libre es la biológicamente activa; Así, los esteroides que interactúan en menor medida con las proteínas plasmáticas estarían disponibles para entrar en la célula blanco, unirse al GR y ejercer su efecto. Este es el caso del poderoso glucocorticoide sintético Dexametasona (DEX) que presenta una unión relativa a CBG al menos 100 veces menor

que la que presenta el ligando natural, Corticosterona. La hipótesis actual más aceptada, sin embargo, propone la existencia de receptores a CBG en la membrana de las células blanco (23,24) Luego de la interacción con su receptor, la CBG unida al glucocorticoide desencadenaría la liberación en el espacio extracelular de proteasas que destruyen a CBG y liberan la hormona *in situ*. Por lo tanto, la unión a CBG debe ser considerada -según esta hipótesis- un factor necesario y promotor de la respuesta glucocorticoide.

Quedó flotando la idea de que, desde sus orígenes, los “dogmas” unicistas que postulaban relaciones lineales entre el reconocimiento por receptores, la traslocación de estos a núcleo y la expresión del gen en el fenómeno biológico resultaban insuficientes para explicar las especificidades de los dos principales grupos de hormonas corticoideas. Más recientemente Funder admite la coexistencia de varios factores paralelos para explicar tales selectividades (25).

Desde hace unos años, nuestro grupo destaca la multiplicidad de factores convergentes en la mediación de las respuestas a MC y GC. En el trabajo citado de Burton et al, por ejemplo, se obtienen muy buenas correlaciones de conformaciones planas con parámetros sodiorretentores. Estas correlaciones, sin embargo, empeoran si se intenta establecerlas con afinidad por receptores del tipo 1, peor aún si estos receptores se “purifican” librándolos de proteínas secuestradoras (6).

En mi tesis el criterio de la “intermediación multifactorial” es clave y uno de sus capítulos se refiere específicamente a la manera en que determinadas proteínas afectan a las respuestas glucocorticoideas de la progesterona y algunos de sus derivados, así como al efecto de la 11  $\beta$  hidroxilación, un paso biosintético temprano, sobre estas influencias.

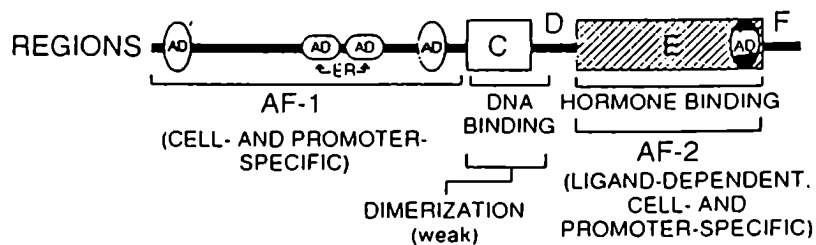
## **5-Los eventos en la mediación. El receptor a glucocorticoides (“tipo 2”) como integrante de la “Superfamilia”**

A nivel celular, la mayoría de los efectos producidos por los glucocorticoides están mediados por una proteína de aproximadamente 94 KDa: el receptor de glucocorticoides (GR). El GR pertenece a una superfamilia filogenéticamente conservada de receptores nucleares, que incluye a los receptores de andrógenos, mineralocorticoides, progestágenos, estrógenos, vitamina D, ácido retinoico y los llamados “receptores huérfanos” cuyo ligando aún no ha sido identificado (26,27). La alta homología entre los miembros de esta superfamilia de receptores se encuentra principalmente en la región de unión al ADN (GR: 100%, MR: 94%, PR: 90%) y en la región de unión a la hormona (GR: 100% MR y PR: 60%), encontrándose la especificidad en la región amino-terminal (<15%). El alto grado de homología de los receptores a GC, a MC y a progesterona explica las dificultades en la síntesis y selección de una molécula con afinidad selectiva por los receptores tipo 2, tenga ésta propiedades glucocorticoideas o antiglucocorticoideas.

Cuando el receptor se encuentra unido a la hormona modula la actividad de los promotores de los genes que responden a glucocorticoides en un proceso denominado *transactivación*. Así también se conoce a los receptores como factores de transcripción ligando-dependiente. (26,27)

El GR, como todo miembro de la familia de los receptores a hormonas esteroides, presenta una estructura con tres dominios. Como se observa en la Figura 6, el extremo N-terminal contiene las secuencias responsables de la activación de los genes que

responden a glucocorticoides y, presumiblemente, interactúa con la maquinaria basal de transcripción y/o factores de transcripción (28-30). La región central de la molécula de GR constituye el dominio de unión al ADN (31,32) que también participa en la dimerización del receptor (33), translocación al núcleo (34) y transactivación (35). El extremo C-terminal es el dominio responsable de la unión al ligando, pero además, contiene las secuencias responsables de la unión a las heat shock proteins o proteínas activadas por shock de calor (hsp) (36), la translocación al núcleo (34), dimerización (37) y transactivación (38).



**Figura 6: Organización estructural y funcional del receptor de glucocorticoides**

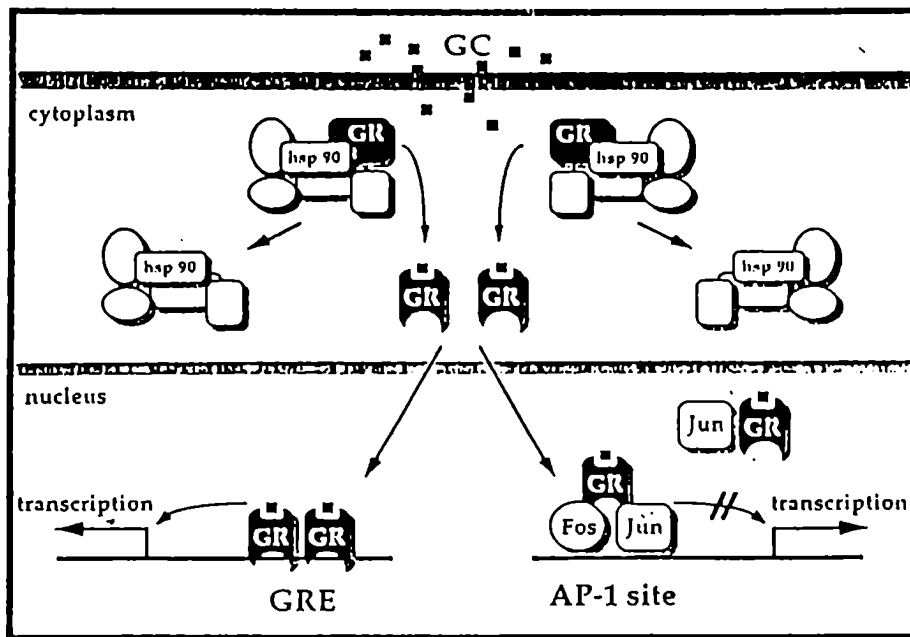
Cuando el receptor de glucocorticoides no está unido a la hormona, se encuentra formando parte de un complejo multiprotéico que consiste en: el receptor, dos moléculas de hsp 90; y en ciertos sistemas celulares, una molécula de hsp 70, una de p23 y una inmunofilina (hsp 56 o pp5 o Cyp 40 que son mutuamente excluyentes) (36,39). En ausencia de hormona, este complejo se encuentra en constantes ciclos de disociación y asociación. (40). El complejo GR/hsp no es estático sino que, dependiendo de su composición, se localiza preferentemente en citosol o en el núcleo. (41). La principal función del complejo GR/hsp es la de mantener al GR en un estado transcripcionalmente inactivo. La hsp 90 se une a una región en el dominio de unión a la hormona bloqueando



la función de dimerización y de unión al ADN del GR. (42). También se ha propuesto que hsp 90 estaría asociada al transporte del GR hacia el núcleo (43)

Como todas las sustancias lipofílicas, los glucocorticoides pueden atravesar la membrana celular e interactuar con el receptor. Esta unión produce un cambio conformacional en la molécula de GR provocando su disociación del complejo con hsp. Una vez libre, el GR es incapaz de reasociarse (44). El receptor unido a la hormona sufre ahora una hiperfosforilación y se transloca al núcleo (44). Ya en el núcleo, el receptor puede actuar por dos mecanismos diferentes conocidos como de tipo 1 y 2. (Figura 7)

El mecanismo de tipo 1 representa el modelo clásico de acción del GR en el que interactúa con secuencias palindrómicas específicas de ADN llamadas GREs (elementos que responden a los glucocorticoides) que se encuentran en las secuencias promotoras de los genes que responden a los glucocorticoides. El GR, como un homodímero, se une a la secuencia GRE e interactúa con los componentes de la maquinaria basal de transcripción, ya sea directamente mediante interacciones físicas o indirectamente por factores "bridging" o puente, tales como el coactivador del receptor de esteroides-1 (SRC-1) (45). Esta interacción estabiliza al complejo de pre-iniciación en el promotor y por lo tanto permite la transcripción por la ARN polimerasa II (46). Muchos de los efectos glucocorticoides están caracterizados por una inhibición de ciertos genes más que por una activación. Dentro de estos efectos podemos citar a la acción antiinflamatoria e inmunosupresora de los glucocorticoides que *-por lo menos a parte-* incluye una regulación transcripcional negativa de los genes inmunes, tales como el gen de la colagenasa y el gen de la interleuquina 2. Estos genes son regulados positivamente por factores de crecimiento a través de la vía de las MAP (mitogenic activating proteins)



**Figura 7: Modelo simplificado de la modulación transcripcional mediada por GR** kinasas (47). El factor AP-1 (proteína activadora-1), compuesto por dímeros de los oncogenes jun-fos, participa positivamente en esta vía. El mecanismo de tipo II consiste en el rol que ejercería el GR inhibiendo AP-1 a través de interacciones proteína-proteína. (48).

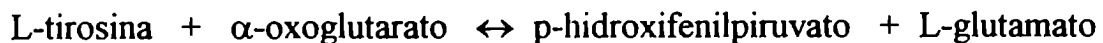
## 6-Respuestas finales a los glucocorticoides.

### 6.1 Gluconeogénesis: degradación oxidativa de los aminoácidos. Glucogenogénesis

Los aminoácidos actúan de sillares constituyentes de las proteínas, así como de precursores de otras importantes biomoléculas tales como hormonas, purinas, pirimidinas, porfirinas y algunas vitaminas. Sin embargo, pueden servir también de fuente energética, particularmente cuando son ingeridos en exceso sobre las cantidades necesarias para reemplazar a las proteínas corporales. Empleados como combustibles, los

aminoácidos experimentan la pérdida de sus grupos amino; sus esqueletos carbonados residuales tienen entonces dos destinos principales: 1) la gluconeogénesis, o bien 2) la oxidación a CO<sub>2</sub>. Los aminoácidos convertidos en glucosa por los mamíferos deben experimentar primero la transformación enzimática en intermediarios que se incorporen a la ruta directa para la síntesis de la glucosa, tales como el ácido pirúvico o intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

En el catabolismo de la mayor parte de los aminoácidos, el grupo α-amino es transferido al átomo de carbono α de un α-oxoácido, en la mayor parte de los casos el α-oxoglutarato, quedando el correspondiente el α-oxoácido análogo del aminoácido y originando la aminación del α-oxoglutarato para dar ácido L-glutámico. Tales reacciones son catalizadas por enzimas conocidas genéricamente como *aminotransferasas* o *transaminasas*. La mayor parte de ellas necesitan α-oxoglutarato como aceptor del grupo amino y presentan una localización mitocondrial y citosólica en las células eucariotas. Así, encontramos a la aspartato-aminotransferasa, la leucín-transaminasa y la tirosina-aminotransferasa (TAT). Aunque de relativa importancia fisiológica, esta última, se utiliza rutinariamente como parámetro de acción GC, por ser representativa de otras transaminasas y porque se puede cuantificar con buena reproducibilidad. la TAT cataliza la reacción:



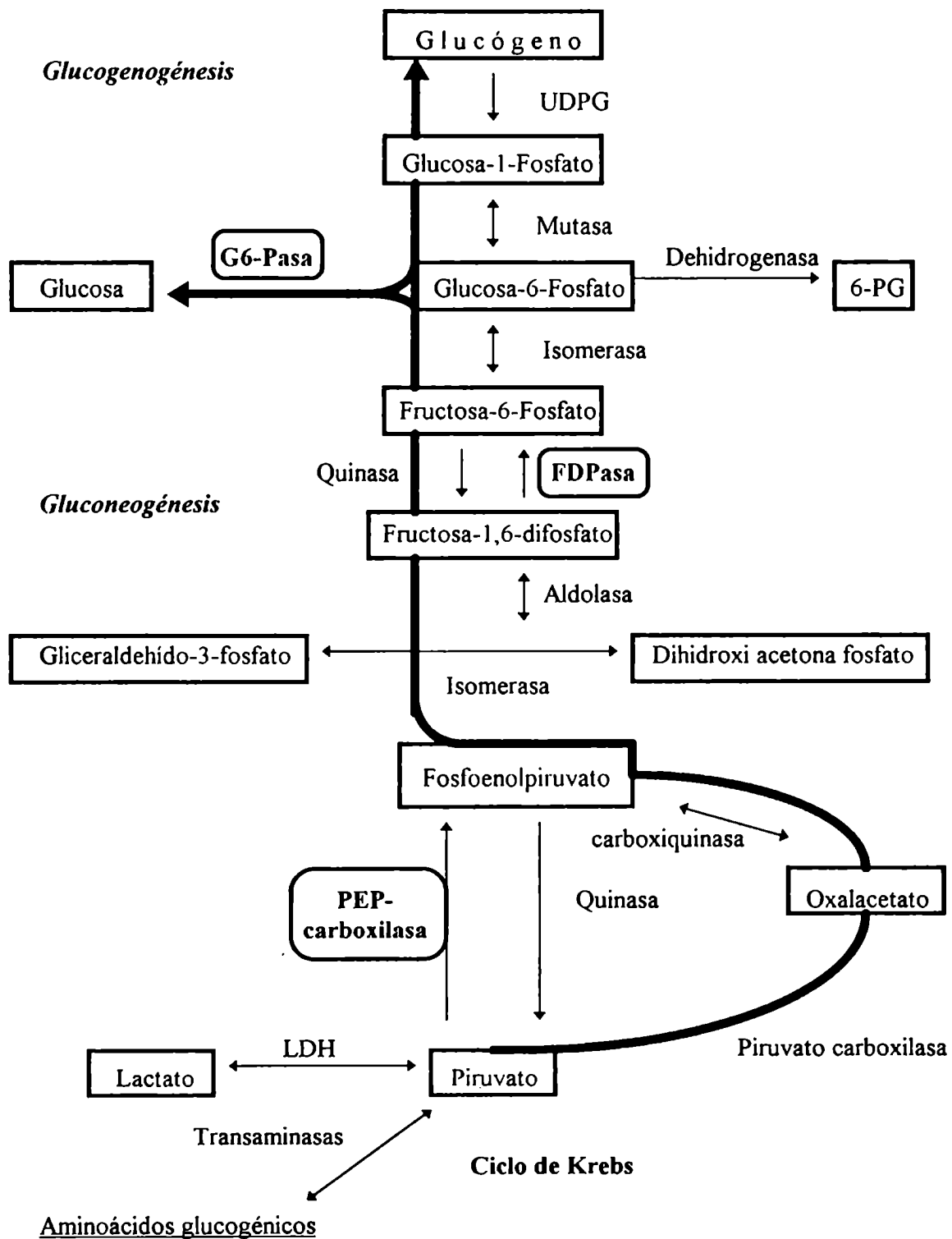
**TAT**

Cofactor: Fosfato de Piridoxal

Esta es la primera reacción en la vía por la cual la tirosina es degradada finalmente a acetoacetato y fumarato. El fumarato ingresa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y es convertido finalmente en fosfoenolpiruvato, el cual a través de la gluconeogénesis es convertido en glucosa (Figura 8). Los GC inducen las transaminasas aumentando la conversión de los aminoácidos en  $\alpha$ -cetoácidos que llevarán a la síntesis de glucosa. (49). Mediante la acción de las transaminasas los grupos amino de diversos aminoácidos se recogen en forma de un solo aminoácido, generalmente el ácido glutámico. Luego el glutamato actúa como dador de una serie de reacciones cuyo grupo amino se ve convertido en productos de excreción nitrogenados.

En 1985, la TAT fue clonada por Grange et al. lo que permitió deducir que es una enzima dimérica con un peso molecular de 50 kDa (50) y que presenta varios sitios posibles de proteólisis en el extremo amino terminal, lo que explica la heterogeneidad observada en el tamaño de la enzima en distintos sistemas. La secuencia promotora de la TAT posee dos GREs o secuencias que responden a los glucocorticoides que son esenciales para la activación de la transcripción.

Como hemos dicho, la transaminación, transformación de un aminoácido en cetoácido, puede ocurrir utilizando distintos sustratos (alanina, glutámico, etc). Desde el punto de vista analítico y dada la buena reproducibilidad y sensibilidad del ensayo se utiliza la transformación de: L-tirosina +  $\alpha$ -oxoglutarato a p-hidroxifenilpiruvato + L-glutamato. Esta transformación particular, de relativa importancia biológica, es representativa de las transaminaciones en general y su producto final transformado en aldehído es fácilmente cuantificable mediante la formación de una base de Schiff (Ver Materiales y Métodos)



**Figura 8: Pasos enzimáticos clave en la gluconeogénesis y la glucogenogénesis hepática**

En la Figura 8 se observan las vías correspondientes a la segunda etapa de la gluconeogénesis y a la glucogenogénesis hepática. Las enzimas gluconeogénicas clave en esta segunda etapa son: la Fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa (PEP-carboxiquinasa), la Fructosa difosfatasa (FDPasa) y la Glucosa-6 fosfatasa (G6-Pasa). La actividad de estas enzimas se ve incrementada con el tratamiento *in vivo* con glucocorticoides y lo hace de una manera dosis-dependiente (51). El aumento de esta actividad es debido a un aumento en la síntesis de estas enzimas clave de la gluconeogénesis, ya que el incremento en la actividad es inhibido por bloqueantes de la síntesis de ARN y proteínas.(51)

Las enzimas involucradas en la glucogenogénesis son, además de las aminotransferasas, la *fosfoglucomutasa* que cataliza el paso de Glucosa-6P → Glucosa-1P, y la *glucosa-1P-uridil-transferasa (glucógeno sintetasa)* que cataliza la conversión final a glucógeno. Esta enzima se encuentra en dos formas: la defosforilada y activa forma *a* y la forma *b* fosforilada e inactiva.

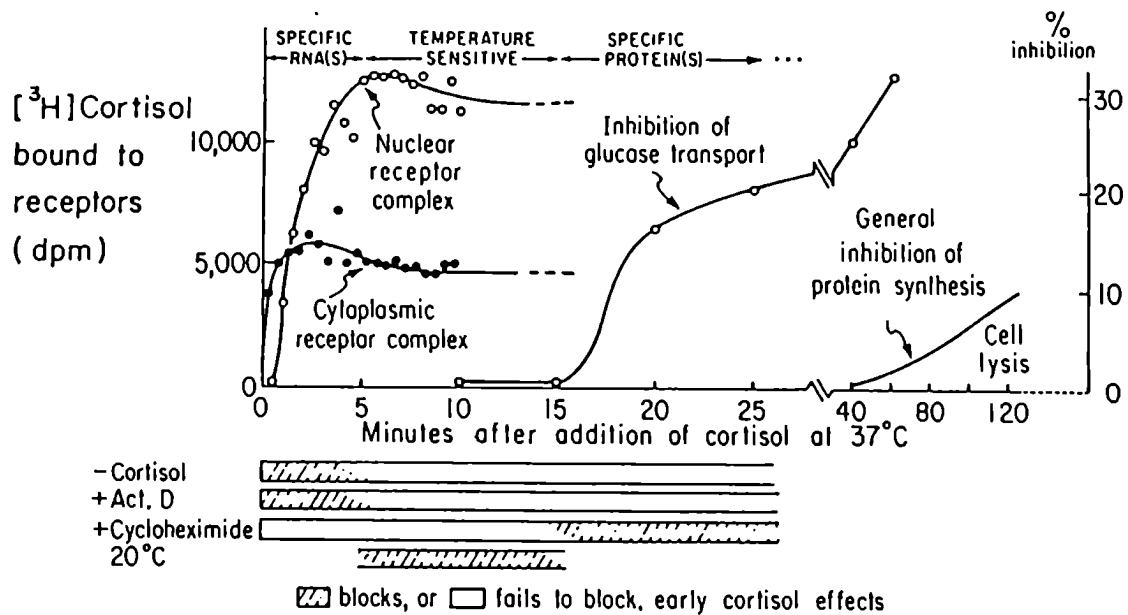
En 1967, Kreutner et al (52) describieron que los glucocorticoides provocan la conversión de la forma *b* → *a* mediante una reacción de desfosforilación, sin cambios en la cantidad total de enzima, encontrando que la tasa de síntesis de glucógeno en respuesta a los GC era proporcional a la cantidad de glucógeno sintetasa en la forma *a* (52-55).

Con todo, no se puede afirmar que la activación de la glucógeno sintetasa sea el único o el más importante efecto de los GC sobre el metabolismo del glucógeno.

## **6.2 Acción temprana de los GC sobre el timo: incorporación de precursores de la síntesis de ARN y proteínas**

Los GC producen la atrofia de todo el tejido linfoide, lo que se traduce en una disminución de las células T y de anticuerpos en este tejido. En consecuencia, el nivel de inmunidad frente a los patógenos se encuentra disminuido.

Los GC reducen la viabilidad de los linfocitos (56). Entre los 15 y 20 minutos luego del agregado de cortisol al medio, se produce la inhibición de la captación de glucosa seguida de una disminución en la captación de los precursores de proteínas y ácidos nucleicos que se hace visible a los 40 minutos. La muerte celular entre las 8-12 hs (Figura 9). La hipótesis que estos dos fenómenos se encuentran asociados fue planteada por A. Munck en 1977 (57), quien propuso la síntesis de una “proteína temprana” responsable de la inhibición de la captación de glucosa en respuesta a la incubación con cortisol. La falta de energía desencadenaría una disminución en la captación de los precursores de proteínas y ácidos nucleicos. (57). Esta hipótesis, fue desechada por el mismo grupo tres años más tarde con la confirmación que el fenómeno temprano de inhibición de la incorporación de glucosa está asociado a la síntesis de lípidos y determinaría la estructura y función de la membrana plasmática (58). El mecanismo por el cual los GC inhiben la incorporación de precursores de proteínas y ácidos nucleicos queda aún por ser dilucidado. De todos modos, el timo responde a los GC inhibiendo la síntesis de proteínas y activando la proteólisis, lo que conduce a un aumento en la liberación de aminoácidos a la circulación, que servirán de sustrato para la gluconeogénesis.



**Figura 9: Curvas de tiempo para la formación del complejo Cortisol-GR, la inhibición del transporte de glucosa inducido por Cortisol e inhibición de la síntesis de proteínas en suspensión de células de timo de rata a 37°C. Tomado de (3)**

La capacidad de los GC para suprimir la inmunidad los sitúa entre los fármacos más útiles para prevenir el rechazo inmunológico en los trasplantes de corazón, riñón y otros tejidos.

### 6.3 Apoptosis

La *apoptosis* o “muerte celular programada” juega un rol importante en el desarrollo temprano y en el crecimiento de los tejidos normales de un adulto. La misma es regulada por estímulos fisiológicos y ocurre en gran variedad de tejidos en las distintas especies. La decisión de la célula para proliferar, diferenciarse o morir está basada en la información que proviene del ambiente que la rodea (la interacción célula-célula, la interacción célula-sustrato, las moléculas solubles como hormonas o factores de crecimiento) y la información interna (el estado metabólico, el genotipo y el tipo celular)



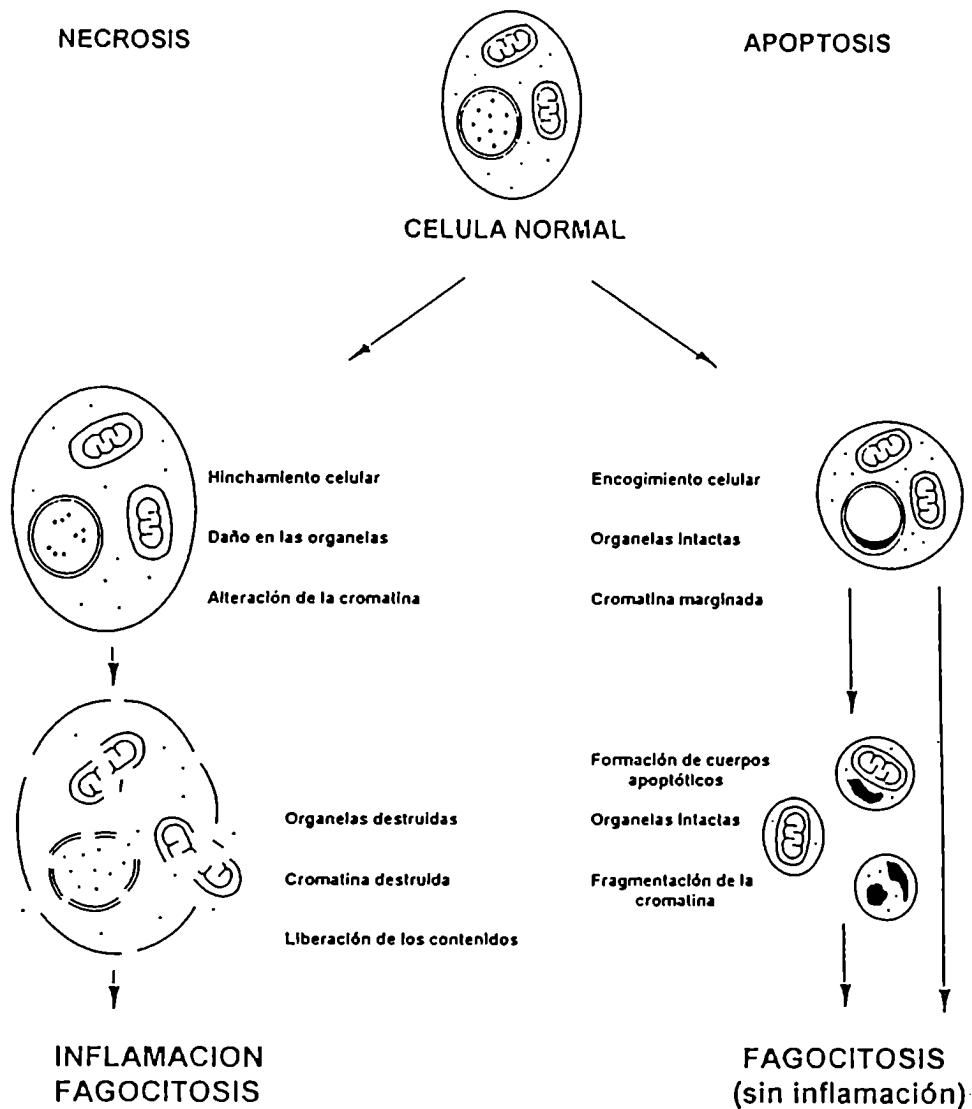
Por otro lado, la *necrosis* es un proceso que por la magnitud del daño que produce no depende de estos factores: siempre dirige a la célula hacia la muerte.

Como se observa en la Figura 10, las células que sufren apoptosis se caracterizan por presentar: encogimiento celular, organelas intactas, la ruptura celular en forma de cuerpos apoptóticos discretos que retienen el contenido y, en el núcleo, condensación de cromatina y la ruptura del ADN en fragmentos de 180-200 pb correspondiente a nucleosomas. Por otro lado, la células que sufren el proceso de necrosis presentan: hinchamiento, daño en las organelas, la cromatina destruida, lisis celular, liberación de su contenido y posterior inflamación. En contraste con el proceso de necrosis, durante la apoptosis celular no existe una marcada reacción inflamatoria debido a que ciertos componentes celulares, principalmente histamina, enzimas hidrolíticas y proteínas del complemento responsables de la inflamación no toman contacto con el sistema inmune.

Distintos factores inducen apoptosis, incluyendo hormonas, toxinas, antígenos, carcinógenos, interacciones célula-célula, falta de factores de crecimiento y trastornos físicos.

Uno de los primeros eventos que fueron descritos en relación con apoptosis fue la involución del timo mediada por GC, debido a la acción directa de los mismos sobre los linfocitos (59). El tratamiento *in vivo* con glucocorticoides produce la muerte del 90 % de las células del timo por apoptosis entre las 48 y las 72 horas; las células que mueren son principalmente inmaduras y ubicadas en la corteza.

Las células restantes luego de las 72 horas no muestran el patrón en escalera característico de apoptosis y son principalmente células maduras (CD-4 y CD-8) lo que



**Figura 10: Cambios morfológicos en los procesos de necrosis y apoptosis**

sugiere la existencia de una población de células resistentes a la apoptosis (60). Los estudios tendientes a dilucidar la naturaleza de esta resistencia (nivel de transportadores de glucosa, nivel de receptores, incorporación de precursores, etc.) permitirán determinar la relación que existe entre los fenómenos tempranos y la apoptosis inducida por los GC en el timo. A continuación, se detallarán algunos de los procesos que

intervienen en apoptosis en respuesta a diferentes agentes inductores, incluyendo a los GC. Estos procesos son: la fragmentación del ADN y la regulación de la expresión de genes involucrados en la respuesta apoptótica.

### *Fragmentación del ADN*

Se ha propuesto que durante el fenómeno de apoptosis, el ADN se cliva como consecuencia de la activación de una endonucleasa que actúa en la región internucleosomal liberando fragmentos de 180-200 pb de longitud (61). La fragmentación del ADN es una característica bioquímica importante para determinar la muerte celular programada. En la práctica, los múltiplos de 180-200 pb se observan como una “escalera” cuando el ADN apoptótico es corrido en geles de agarosa. Sin embargo, recientemente, se han reportado que no siempre el ADN es cortado de esa forma, sino que existen otros tipos de clivaje del ADN asociados a apoptosis i. e. ruptura en fragmentos entre 50-300 pb y eventos en los cuales se cliva una sola cadena del ADN (62).

En timocitos de roedores, los GC inducen influjo de  $Ca^{++}$ , lo que llevó a plantear que la apoptosis, en este sistema, es el resultado del aumento de la concentración de  $Ca^{++}$  intracelular y la posterior activación y/o inducción de una endonucleasa dependiente de  $Ca^{++}$  (63). También se observó que cambios en la concentración intracelular de  $Ca^{++}$  son importantes en la acción de los GC sobre ciertas células linfoides (64). Estos datos y la supuesta asociación inequívoca entre apoptosis y la fragmentación del ADN en distintos sistemas, llevaron a la búsqueda de una única endonucleasa involucrada en la apoptosis (59,65-68). Sin embargo, si bien fue caracterizada, para ciertos sistemas, una

endonucleasa única y específica en la inducción de apoptosis, pero este requerimiento no es esencial, ya que han aparecido ejemplos de apoptosis sin clivaje del ADN (69-73). Tampoco es específico ya que existen, hasta la actualidad, dos ejemplos reportados de necrosis con clivaje del ADN que presentan el patrón característico de apoptosis (74,75). En el presente trabajo se determinó como índice de apoptosis la aparición de fragmentación del ADN. Por todo lo anteriormente expuesto este análisis fue acompañado de otros parámetros, índices de muerte celular como: el conteo de células vivas y el análisis de la expresión de genes involucrados en el fenómeno de apoptosis.

### *Genes involucrados en apoptosis*

Varios genes conocidos por ser importantes en el crecimiento celular y por mantener el ciclo celular en altos niveles de expresión, llevan también a apoptosis (61).

Un ejemplo es el gen *c-myc*, para el cual se ha propuesto que estimula señales intracelulares específicas para el crecimiento y la muerte. En ausencia de factores de crecimiento la sobreexpresión del gen *c-myc* se vuelve letal (76,77) y sólo puede ser revertido por la expresión de ciertos genes bajo el control de los factores de crecimiento. Así también, la expresión del gen represor de tumores, *p-53*, ha sido asociado con la propensión de las células a sufrir apoptosis (78,79).

El oncogen *bcl-2* fue identificado por primera vez en un tumor humano de células B que presentaba una translocación cromosomal en el locus de las inmunoglobulinas. *Bcl-2* es el gen que dió origen a una familia de genes que presentan homología en tres regiones conocidas como los “dominios homólogos a *Bcl-2*”, *BH1*, *BH2* y *BH3*. (80) Dichos genes controlan la apoptosis. *Bcl-2* protege a las células contra la apoptosis, pero no

induce proliferación celular (81). Otro miembro de la familia es el gen *bcl-x*, que genera distintas isoformas producto de un splicing alternativo: la isoforma larga, *bcl-xL*, que contiene BH1 y BH2 y protege a las células de la apoptosis y la isoforma corta, *bcl-xC*, que promueve la apoptosis inhibiendo la acción de *bcl-2* y *bcl-xL* (82). Los productos de los genes de la familia del gen *bcl-2* son proteínas a las cuales aún no se ha podido asignar una función directa asociada a la apoptosis. Así, *bcl-2* es una proteína presente en la membrana interna de la mitocondria (83) pero, estudios recientes realizados con inmuno-electromicroscopía, permitieron localizarla también en la membrana externa de la mitocondria, en el retículo endoplásmico y en la superficie citoplásmica de la membrana nuclear (84-86). Recientemente, Shiraiwa et al han descrito la presencia de una forma adicional de *bcl-x*, el *bcl-x $\beta$* , que se expresa preferentemente en corazón, cerebelo y timo, induciendo apoptosis (87).

Otro miembro de la familia es *bax*, que promueve la apoptosis y codifica para una proteína que puede formar homodímeros o heterodímeros con *bcl-2* bloqueando el efecto inhibidor de apoptosis de *bcl-xL* (80). El cociente *bcl-2/bax* actuaría de esta manera como un reóstato que controla la decisión de la célula de morir o sobrevivir.

Otros integrantes de la familia de genes relacionados a *bcl-2* son: *bak* y *bad*, que al igual que *bax* y *bcl-xC*, aceleran la muerte por apoptosis. De esta manera se puede subagrupar a los miembros de la familia de acuerdo a sus funciones. Así, existen inhibidores (*bcl-2*, *bcl-xL*) y promotores (*bax*, *bak*, *bad*, *bcl-xC*) de la apoptosis; la proporción relativa de unos y otros determinará la sensibilidad de la célula al estímulo apoptótico.

La regulación de la apoptosis por la expresión de estos genes constituye el primer “check point” que posee la célula. El segundo “check point” se encuentra controlado por

proteínas de la familia de las interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (ICE) o enzimas que convierten interleuquina 1 $\beta$ . Estas proteínas son proteasas que clivan en secuencias específicas (Asp-Ala o Asp-Gln) y su sobreexpresión conduce a la apoptosis. Bcl-2 y ICE parecerían intervenir en la misma vía debido a que la apoptosis inducida por una sobreexpresión de la ICE puede ser suprimida por una sobreexpresión de bcl-2. Así, la ICE actuaría en un paso anterior o al mismo nivel que bcl-2.

*Possible mecanismo de acción de los miembros de la familia del gen bcl-2*

Dentro de la familia de los genes relacionados a bcl-2 fue, justamente, éste el gen más estudiado desde el punto de vista funcional en relación con la apoptosis.

Debido a su localización predominantemente mitocondrial se planteó la hipótesis que bcl-2 actuaría regulando la función mitocondrial, pero el hecho que ocurra apoptosis en células que carecen de la mayoría de las funciones mitocondriales y que la apoptosis pueda ser bloqueada por bcl-2, lleva a que estas teorías sean replanteadas. (84). También ha sido propuesto bcl-2 como regulador de los niveles de las especies de oxígeno reactivo a través de una acción antioxidante (88), pero se observó posteriormente que la apoptosis y su bloqueo por bcl-2 y bcl-xL podrían ocurrir en condiciones anaeróbicas que minimiza la formación de especies de oxígenos reactivas. (89). Se planteó un rol de bcl-2 sobre la cromatinización del ADN que evitaría la fragmentación característica de apoptosis, pero bcl-2 también bloqueó la apoptosis en citoplastos enucleados (90).

Recientemente, Liu et al. han descrito el requerimiento del citocromo C, componente esencial de la cadena respiratoria, en el proceso de apoptosis en extractos libres de células. De esta manera, las mitocondrias participarían en el proceso de apoptosis

liberando el citocromo C al citoplasma, esta liberación podría ser un sitio blanco para la regulación de la apoptosis, posiblemente por la familia de proteínas relacionadas a bcl-2 (91)

Como se puede observar, aún no se ha podido encontrar el mecanismo de acción de bcl-2 y actualmente se plantea su acción por varias vías llevando al efecto final inhibitorio de la apoptosis (92).

### 7-Antihormonas

Hasta el presente punto hemos hablado de la unión de la hormona al receptor, en el caso de los GC, Corticosterona y Cortisol. Estos GC son *agonistas totales* del GR, ya que se unen con una alta afinidad al receptor y desencadenan una respuesta biológica máxima. Los *agonistas parciales* son compuestos que se unen al receptor, pero lo hacen con una afinidad menor que la del ligando natural, no alcanzando el efecto biológico máximo. Ante la presencia de un agonista total y uno parcial se observa que el efecto biológico final es menor comparado con el que desarrolla el agonista total sólo, ya que el agonista parcial “molesta” al total compitiendo por el sitio de unión al receptor.

Podemos definir al *antagonista* como el compuesto que se une al receptor y no desencadena efecto biológico alguno. En presencia de un agonista total y un antagonista la respuesta biológica se anula. Los antagonistas pueden actuar a distintos niveles dentro de la cascada de eventos que hemos visto llevan a la activación de los genes que responden a la hormona. Así, algunos autores (93,94), plantean que tanto antagonistas

(ICI 164384) como agonistas parciales (tamoxifeno) de estrógenos actúan impidiendo la dimerización y posterior unión a las secuencias que responden a estrógenos (ERE).

El tamoxifeno produce en el receptor de estrógenos un cambio conformacional que interfiere en el dominio de unión a la hormona dejando el dominio de transactivación activo. El antagonista ICI 164384 produce una inactivación de ambos dominios indicando que la inhibición parcial o total del efecto respondería a la interferencia en un dominio o los dos, respectivamente.

Los antiprogéstágenos también pueden ser clasificados en antagonistas puros, como el ZK98299, y agonistas parciales, como el RU 486 (95). Generalmente es asumido que el primero previene la unión del receptor al ADN, mientras que el segundo permite la unión al ADN pero en una forma incapaz de activar los genes que responden a la hormona. El mecanismo preciso de acción de las antihormonas debe ser aún elucidado.

## **8-Efectos no genómicos de las hormonas esteroideas**

De acuerdo a la teoría tradicional sobre la acción de las hormonas esteroideas, los esteroides afectan la transcripción del mRNA y, seguidamente, la síntesis de proteínas; la duración de estos procesos está en el orden de horas. La forma de caracterizar experimentalmente estas acciones genómicas fue establecida por su sensibilidad a inhibidores de la transcripción (actinomicina D) y traducción (cicloheximida).

En los últimos años, gran cantidad de estudios han brindado evidencia sobre la existencia de receptores de membrana a esteroides que ejercen sus efectos a tiempos cortos, por



ejemplo, los efectos rápidos de aldosterona sobre células no epiteliales y en linfocitos humanos.

*Criterios para la clasificación de un efecto como no-genómico*

La duración del efecto genómico es generalmente explicada por el requerimiento de una serie de eventos que comienzan con la producción y modificación de mRNA, seguidos por la síntesis de proteínas, su translocación, transporte y finalmente su acción. Sin embargo, uno de los primeros efectos que se observó y brindó sospechas sobre una posible acción no genómica fué el aumento en la tasa de transcripción del tumor mamario murino (MMTV LTR) a los 7.5 minutos luego del tratamiento con glucocorticoides (96), siendo insensible a cicloheximida. Por lo tanto, no se podría justificar que los efectos genómicos poseen una duración mayor por la necesidad de interactuar con el genoma ya que, como en el caso de la transcripción del MMTV, existen eventos rápidos en los que se ve involucrado el genoma. Se ha postulado que el retardo que sufre el mecanismo genómico podría deberse al procesamiento de la proteína recientemente sintetizada desde su lugar de síntesis a su ubicación final en la célula. (97)

A la luz de estas consideraciones, un efecto de los esteroides es considerado no genómico si éste ocurre en forma rápida después de la aplicación del esteroide y su acción no es bloqueable por inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas.

*Efectos no genómicos específicos y no específicos*

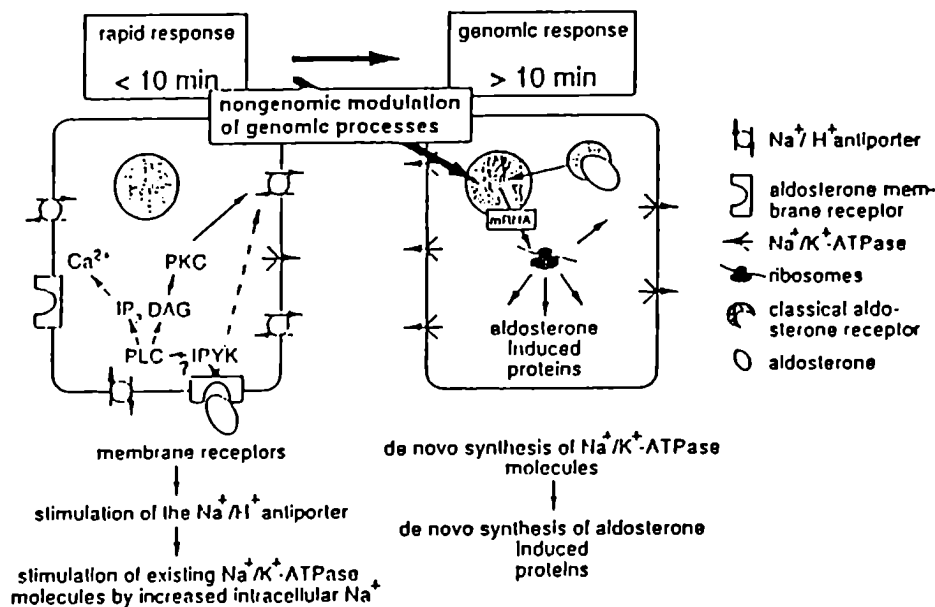
Los efectos no genómicos pueden ocurrir por dos mecanismos: a) interacción de los esteroides con receptores específicos y b) interacción con proteínas o lípidos de

membrana no específicos. La hipótesis de los receptores específicos debe ser corroborada mediante los criterios de: alta afinidad y baja capacidad de los sitios de unión, selectividad por un agonista particular, inhibición por un antagonista y saturabilidad de la unión.

Los efectos no genómicos no específicos de los esteroides ocurren a altas concentraciones y producen cambios en las propiedades fisicoquímicas de la membrana como la fluidez y la composición de proteínas (98-100). Sin embargo, en muchas situaciones las concentraciones requeridas para observar los efectos no genómicos no específicos no se correlacionan con las concentraciones fisiológicas.

En 1942, Hans Selye describió los efectos anestésicos de la progesterona que ocurrían inmediatamente luego de la exposición a la hormona (101), un efecto no genómico específico, de los mejor caracterizados. En 1964, Spach et al (102) describen la acción de la aldosterona *in vitro* a concentraciones fisiológicas sobre el intercambio de sodio en eritrocitos de perro. Debido a que estas células carecen de núcleo y, por lo tanto, de la vía genómica, los efectos dependen de un mecanismo no genómico. Como hemos dicho, esta acción no genómica específica está mediada por receptores para los GC. Se han descrito tales receptores de membrana en neuronas de anfibios (103,104) y en hígado de rata (105,106). Los receptores de anfibios presentan una alta afinidad ( $K_d=0.5$  nM) y están acoplados a una proteína G (107); los de hígado de rata presentan baja afinidad ( $K_d=400$  nM) (105). Mediante el uso de anticuerpos que detectan el receptor intracelular se ha detectado un antígeno en la membrana de células de un linfoma (108), lo que nos indicaría que ambos receptores están estrechamente relacionados.

Así, para la acción de la aldosterona, se propone un *modelo en dos pasos* (Two-step model, Figura 11) (97) a través del cual se añade, a la teoría tradicional, la parte no genómica.



**Figura 11: Modelo en dos pasos propuesto para la acción de la aldosterona tomado de Wehling et al, 1994 (97).**

A tiempos cortos, el esteroide se une a un receptor de membrana y desencadena allí una serie de eventos que incluyen: una proteína tirosín quinasa intermediaria, la fosfolipasa C, el inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), el diacilglicerol (DAG), la activación de la proteína quinasa C (PKC) y el aumento en el Ca<sup>2+</sup> intracelular.

Hemos citado anteriormente a la enzima 11βHSD-2 como la responsable de la especificidad que presentan los receptores de tipo 1 por la aldosterona. El efecto no genómico producido por los MC sobre riñón puede justificar fisiológicamente, junto con la actividad de la enzima 11βHSD, la acción sodio-retentora de los MC.

## OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis surgen de las consideraciones anteriores acerca de la influencia de grupos funcionales y de conformaciones moleculares sobre el efecto pleiotrópico glucocorticoide. Se deduce de la Introducción de esta tesis que ambas consideraciones exigen una actualización con respecto a los planteos históricos, en su mayoría descriptivos y empíricos, y esto es lo que aquí se pretende.

Entre las modificaciones químicas, consideramos en primer lugar la clásica introducción de un hidroxilo en posición 11 de la molécula de progesterona., a todas luces un primer paso del camino biosintético hacia los corticoides que hasta ahora se ha estimado como insuficiente para las respuestas glucocorticoideas, por lo menos si estas se debían expresar en toda su potencia. La tesis estudia si, en qué condiciones y cuáles de las respuestas glucocorticoideas son satisfechas con esta introducción funcional biosintéticamente temprana. La tesis también estudia en qué puede modificar dicha respuesta la introducción en la molécula de la 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona de un factor estabilizador y de creciente torsión como lo es un doble enlace 1-2.

A continuación, la tesis investiga algunos de los efectos que, adicionalmente, puede producir la otra introducción "clásicamente" aceptada para la función corticoide en general, a saber, la de un hidroxilo en C<sub>21</sub>.

Paralelamente la tesis pretende establecer correlaciones de conformaciones moleculares (de geometría tridimensional) de una serie relativamente grande de derivados de progesterona, (tanto sintéticos como naturales, tanto 21 hidroxilados, 11hidroxilados u

otros, sin tener en cuenta su funcionalización) con dichas propiedades, especialmente, con las que se refieren a unión a proteínas.

En cuanto a la serie de respuestas “anabólicas” y “catabólicas” que la tesis investiga en función de las anteriores características moleculares, consideré en primer lugar estos “reconocimientos” moleculares, tanto por GR como por CBG o proteínas del suero en conjunto. Es de hacer notar especialmente que lo hice con un criterio integrativo y regulatorio, que categoriza a las proteínas involucradas en “antagonistas” (o “secuestradoras”) o “cooperadoras” (o sea, que llevan al blanco).

En segundo lugar consideré la influencia de las modificaciones moleculares sobre la “activación” del GR, por disociación del heterocomplejo que forma con la hsp90, paso que se estima esencial para la expresión de las respuestas hormonales finales.

En tercer lugar consideré el estudio del complejo y aparentemente heterogéneo conjunto de estas respuestas.

En particular me propuse estudiar los efectos de las modificaciones mencionadas sobre:

- Inducción de la enzima tirosina-aminotransferasa en hepatocitos de rata.
- El aumento de los depósitos de glucógeno hepático.
- Inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -Uridina,  $^3\text{H}$ -Timidina,  $^3\text{H}$ -Metionina y  $^3\text{H}$ -Leucina a timocitos de rata.
- La apoptosis en timo y en células de endometrio (clivaje del ADN, marcadores de apoptosis de la familia del gen bcl-2).
- Posibles efectos antigluocorticoides.

***Estudios Triangulares.***  
***Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas.***

## Introducción

A diferencia de los MC, que exhiben una conformación plana, los GC parecen requerir cierta torsión del ángulo A/BCD para una actividad óptima (109-111). Ya vimos que se obtienen constantes de afinidad mayores por el receptor de mineralocorticoides (MR) con los esteroides que presentan sustituyentes que impiden la torsión del anillo A hacia la cara  $\alpha$ , tales como 19-nor y 11-desoxiesteroides (111). La tesis estudia si para los GC los requerimientos son simétricos.

Duax et al (110), han descrito los requerimientos estructurales, de las hormonas esteroides, para la unión óptima a distintos receptores. Se propone que la estructura del anillo A determinaría la unión del esteroide a la proteína, mientras que el anillo D controlaría la actividad biológica. Sin embargo, se han encontrado excepciones como las 17 $\beta$ -carboxiamidas (112) de los GC que carecen de grupo en C<sub>21</sub> y algunos C<sub>17</sub> y C<sub>21</sub> acetónidos (113) que son antiglucocorticoides. En 1995, Burton et al (6) han descrito los requerimientos estructurales, para la actividad Na<sup>+</sup> retentora, de 21-desoxiesteroides naturales y sintéticos. En ese trabajo, 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona y 11,19-oxidoprogesteroona presentaron gran actividad Na<sup>+</sup> retentora y ambos carecen de C<sub>21</sub> -OH. Los parámetros geométricos que se utilizaron fueron: el ángulo A/BCD y el ángulo C<sub>3</sub>=O /D resultando, éste último, el más apto para los estudios de relación estructura-actividad sugiriendo que la orientación C<sub>3</sub>=O /D es relevante para la función mineralocorticoide (MC).

## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

En el presente capítulo se realiza el primer intento en extender los estudios anteriormente realizados con mineralocorticoides al campo de los glucocorticoides, lo que constituye una meta más difícil debido a la acción pleiotrópica de los GC y a la existencia de otros factores, además de la afinidad por el receptor, que están involucrados en la respuesta biológica (114-116).

Para evaluar los requerimientos estructurales, se sintetizaron esteroides que presentan distintos grados de torsión en la unión de los anillos A/B con mínimos cambios en los grupos funcionales en el esqueleto de la progesterona. La introducción de un puente éter fue usada para obtener la más plana (11,19-oxidoprogesterona) y la más torsionada (6,19-oxidoprogesterona) de las estructuras sin cambios en los grupos funcionales. Ambas estructuras se caracterizan por su rigidez. La planaridad vs la torsión fue también comparada usando los derivados reducidos de progesterona:  $5\alpha H$  y  $5\beta H$ . Se incluyeron 4-eno-3-ceto esteroides, que poseen distintos grupos funcionales como  $C_{11}-OH$  y  $C_{21}-OH$ , y los correspondientes  $\Delta_1$  derivados, moléculas en las cuales la torsión se ve aumentada aproximadamente en  $10^\circ$  por la presencia del doble enlace en posición 1.

Los esteroides que se han estudiado son los siguientes:

5-alfa-dihidroprogesterona ( $5\alpha-P$ ), 5-beta-dihidroprogesterona ( $5\beta-P$ ), 6,19-oxidoprogesterona (6OP), 11,19-oxidoprogesterona (11,19OP), 6,19-11ceto-progesterona (11=6OP). Los derivados 21 hidroxilados de 11,19-oxidoprogesterona (21-11,19OP) y 6,19-oxidoprogesterona (21-6OP). 11beta-hidroxiprogesterona (HOP) y su derivado delta 1,2 ( $\Delta HOP$ ) y 11 ceto-progesterona (KP). Progesterona (P),



## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

Corticosterona (B), Cortisol (F), Desoxicorticosterona (DOC) y sus derivados delta 1,2 ( $\Delta$ P,  $\Delta$ B,  $\Delta$ F y  $\Delta$ DOC).

Se estudió la afinidad de los esteroides con ángulos A/BCD y C3=O/D crecientes por los receptores de GC (GR) y por la proteína plasmática transcortina (CBG). Se eligió la medición de la capacidad de incrementar los depósitos de glucógeno y la inducción de la enzima tirosín amino transferasa (TAT) como parámetros GC para comparar la unión al GR y la geometría, con la acción hormonal.

*Antecedentes inmediatos:* Mario Galigniana en su tesis encontró correlaciones entre ángulos de algunos esteroides y uniones a CBG y GR. En mi tesis incluyo en la serie esteroides con *mayor actividad GC* (17 hidroxilados, derivados 1:2 ene y otros): B,  $\Delta$ B, HOP,  $\Delta$ HOP, F,  $\Delta$ F. También se incluyen: P,  $\Delta$ P, DOC,  $\Delta$ DOC, 6,19-11,17dihidroxiprogesterona y 6,19-tioprogesterona como complemento adicional de generalización de estas correlaciones. Con el fin de evitar la comparación con un corticoide afin a la CBG, los ensayos, a diferencia de los previamente descritos, se realizaron con  $^3\text{H}$ -DEX como trazador.

### Materiales y Métodos

#### Esteroides y reactivos:

11,19-oxidoprogesterona, 6,19-oxidoprogesterona fueron sintetizadas por el Dr Gerardo Burton.  $5\alpha\text{H}$ -3,20-Pregnanediona fue obtenida por hidrogenación del acetato de

## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

pregnenolona sobre 10 % paladio/carbón, seguido por saponificación y la oxidación de Jones. Progesterona, Corticosterona, Cortisol y Desoxicorticosterona fueron obtenidos de Sigma Chemical Co.  $11\beta$ -OH-progesterona y su  $\Delta_1$  derivado fueron sintetizados por el Laboratorio del Dr Gerardo Burton, FCE y N. UBA

### Ensayos de Unión:

**Al receptor de glucocorticoides:** Los GR fueron obtenidos a partir de los timos de ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) adrenalectomizadas desde 48 horas antes del día del experimento. Los animales fueron sangrados por punción cardíaca. Se perfundió a través de la aorta NaCl 0.9 % frío hasta que los órganos se blanquearon totalmente. Los timos se homogeneizaron en buffer TEGI (0.1 M Tris, 10 mM EDTA, 25 % glicerol, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 20 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.1 mM PMSF, pH=7.4). Los homogenatos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante fue utilizado como fuente de GR. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (117). Las incubaciones se realizaron con 10 nM de  $^3\text{H}$ -DEX (AE= 43.9 Ci/mmol) y con 6 mg de proteína/ml durante 12 horas a 0°C, en presencia de cantidades crecientes de hormona no radioactiva para desplazar la marca del trazador por competencia y evaluar así sus afinidades relativas. Luego de la incubación se separó la hormona libre de la unida mediante el agregado de un volumen de carbón activado-dextrano (2% : 0.2 %) frío, se centrifugó durante 10 minutos a 3000rpm en frío y se toma del sobrenadante 400  $\mu\text{l}$  para contar. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido.

## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

Las razones hormona fría  $^3\text{H}$ -DEX utilizadas fueron: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 y 1000.

Para el caso de la curva de desplazamiento de  $^3\text{H}$ -DEX con DEX fría, las dpm correspondientes a la razón frío  $^3\text{H}$ -DEX=1000 fueron descontadas como unión inespecífica en todas las demás incubaciones, mientras que la de razón 0, y luego de ser descontado el inespecífico, fue considerado el 100% de unión. Las  $\text{CE}_{50}$ , o sea las concentraciones de esteroide necesarias para desplazar el 50 % del trazador, fueron calculadas con el programa PCRIA v 4.1.

**A Transcortina (CBG) parcialmente purificada:** Las curvas de desplazamiento se realizaron con transcortina parcialmente purificada a partir de plasma de rata (118). Los plasmas de las ratas ADX fueron fraccionados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : primero se llevó a 30 % de saturación en frío, luego de 30 minutos en reposo el sobrenadante se llevó a 60 % de saturación. El precipitado, libre de albúmina (BSA), fue redisoluto en buffer fosfato 10 mM a pH=7.4 y dializado contra igual buffer durante una noche a 5°C. El dializado fue diluido convenientemente en buffer 0.1 M Tris, 10 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ mercaptoetanol, a pH=7.4). La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (117). Las incubaciones se realizaron con 5 nM  $^3\text{H}$ -corticosterona (AE= 87.1 Ci/mmol) a 0°C durante 12 horas y fueron detenidas por el agregado de un volumen de carbón activado - dextrano (2% : 0.2%). La unión inespecífica fue siempre menor al 10 %.

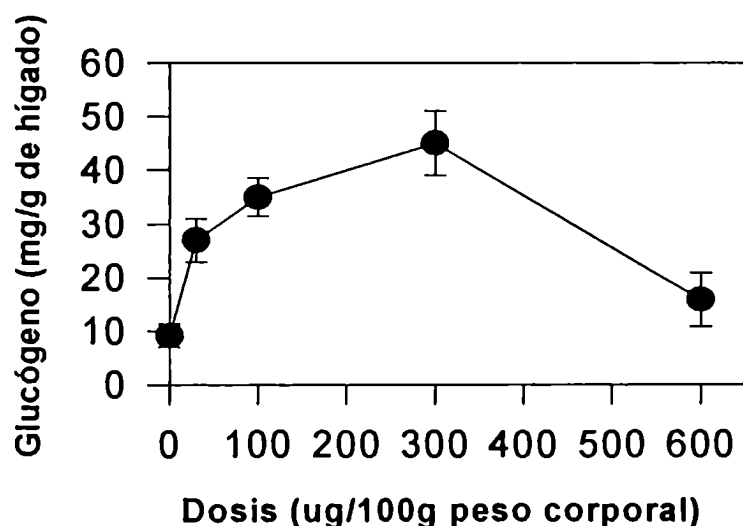
### **Bioensayos**

**Depósitos de glucógeno** Se usaron ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) adrenalectomizadas (ADX) 48 horas antes del día del experimento. Los esteroides fueron

## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

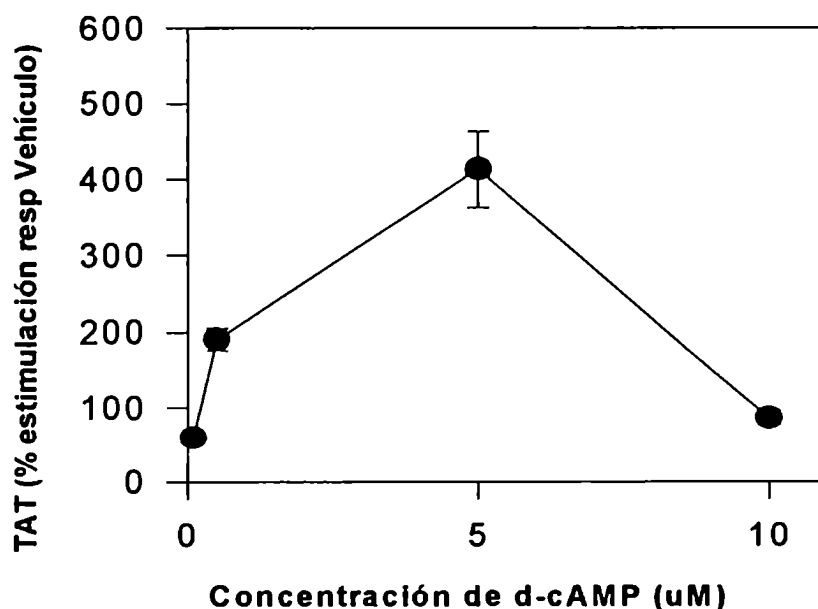
disueltos en etanol: propilenglicol: 0.9 % NaCl (3 : 3 : 34) y la noche previa al día del experimento fueron inyectados (i.m) 100µg del esteroide/100 g de peso corporal. La mañana del experimento se repitió la dosis, en este caso, (i.p), tres horas después las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y los hígados fueron inmediatamente removidos. La purificación del glucógeno se realizó por el método de Hopkins (119): se homogeneizaron 5 g de hígado con 8 ml de TCA frío al 10 %, se descartó el precipitado y se agregó un volumen de etanol al sobrenadante, el precipitado fue redisolto con agua y reprecipitado con un volumen de etanol. El precipitado fue deshidratado con dos lavados de acetona y uno de éter etílico. Luego fue cuantificado colorimétricamente por el método de Krisman (120). Los animales control fueron inyectados con vehículo. En la Figura se muestra la curva dosis-respuesta para corticosterona sobre los depósitos de glucógeno.

**La inducción de la Tirosina aminotransferasa (TAT):** Se aislaron hepatocitos por colagenización de hígado de ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) ADX según el método de Fry (121). Luego de controlar la viabilidad celular por el test de exclusión de



## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

Azul de Tripán, se incubaron  $2 \cdot 10^6$  células/ml de medio Ham F12 a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 horas (la viabilidad celular decayó luego de las 6 horas de incubación) con 100 nM del esteroide en cuestión. El medio de incubación fue suplementado con 10.000 U% de penicilina, 10 mg% de estreptomina, 0.8 mg % de Tylosin, 0.15 g% de  $\text{NaHCO}_3$  y  $5\mu\text{M}$  de dibutilil-AMP<sub>c</sub> (122). En la Figura se muestra la curva dosis-respuesta para la actividad TAT en función de distintas concentraciones de dibutilil-AMP<sub>c</sub>, observándose máxima actividad a  $5\mu\text{M}$  que corresponde a la concentración posteriormente utilizada en los ensayos. La incubación se hizo con agitación permanente bajo una atmosfera gaseada



con 95 %  $\text{O}_2$ / 5 %  $\text{CO}_2$ .

Al cosechar las células la viabilidad fue siempre mayor al 95 %. Se ensayó la actividad de TAT en los sobrenadantes de las células sonicadas según el método de Diamondstone (123): se agregaron 30  $\mu\text{g}$  de proteínas a un medio de incubación de 3 ml en fosfato de

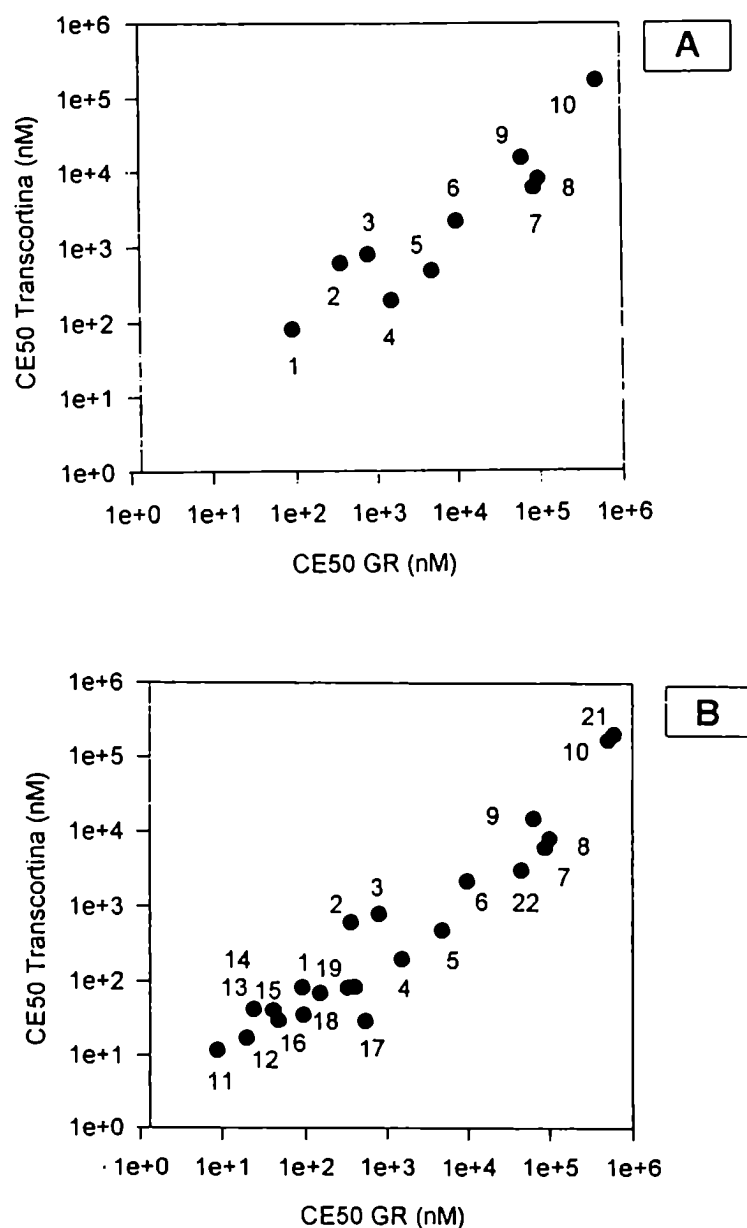
## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

potasio 0.2 M a pH=7.4 conteniendo 19.2  $\mu$ moles de L-tirosina , 30  $\mu$ moles de  $\alpha$ -cetoglutarato, 0.12  $\mu$ moles de fosfato de piridoxal. Luego de 30 minutos, la reacción fue detenida por el agregado de 0.2 ml de NaOH 10 N y agitada inmediatamente. En el medio alcalino, el ácido *p*-hidroxifenilpirúvico formado se transforma en *p*-hidroxibenzaldehído cuantificable por absorción a 331 nm ( $E_M=27.200 M^{-1}$ ). La reacción fue lineal para ese tiempo de incubación hasta los 350  $\mu$ g de proteína. Una unidad de enzima fue definida como  $\mu$ mol tirosina/min a 37°C. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (117).

**Cálculos computacionales:** Los cálculos de mecánica molecular fueron realizados por el Dr Gerardo Burton con el programa PCMODEL 386 4.0 (Serena Software). Los cálculos semiempíricos se realizaron con HyperChem 2.0 usando el método AM-1 y el algoritmo de optimización de Polak-Ribiere. Todas las geometrías fueron optimizadas dos veces para asegurar convergencia. Búsquedas conformacionales fueron desarrolladas para asegurar que fue obtenido el conformero más estable.

### Resultados

En la Figura 12 se observan las correlaciones entre la unión al GR y a CBG. Estos parecen ser similares cuando el esteroide tiene la capacidad de unirse a ambas proteínas, observándose una muy buena correlación con diez esteroides (21-desoxi-F, 21-hidroxi-6,19 oxidoprogesterona, Aldosterona, 5 $\alpha$ -dihidro-DOC, Cortisona, 5 $\alpha$ -dihidroprogesterona, 11-ceto-6,19oxidoprogesterona, 11,19 oxidoprogesterona,



**Figura 12: Correlación entre la unión al GR y a CBG. El Panel A muestra la línea recta descrita por Galigniana para 5 pares de esteroides: 1) 21-desoxi-F, 2) 21-hidroxi-6,19 oxidoprogesterona, 3) Aldosterona, 4) 5 $\alpha$ -dihidro-DOC, 5) Cortisona, 6) 5 $\alpha$ -dihidro-progesterona, 7) 11-ceto-6,19oxidoprogesterona, 8) 11,19 oxidoprogesterona,9)6,19-oxidoprogesterona,10)21-hidroxi-11,19oxidoprogesterona. En el Panel B, correspondiente a esta tesis, se agregan 10 esteroides a los anteriores: 11) B, 12)  $\Delta$ B, 13) F, 14)  $\Delta$ F, 15) DOC, 16) HOP, 17)  $\Delta$ HOP, 18) P, 19)  $\Delta$ P, 20)  $\Delta$ DOC, 21) 6,19-tioprogesterona, 22) 6,19-11,17dihidroxioprogesterona (Ver texto para la racionalización de esta selección).**

## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

6,19-oxidoprogesterona, 21-hidroxi-11,19 oxidoprogesterona) (Panel A). Con el fin de confirmar esta tendencia, se midieron las afinidades relativas de otros diez esteroides elegidos según el criterio descrito en Introducción general, algunos de los cuales presentan actividad GC (B,  $\Delta$ B, F,  $\Delta$ F, HOP,  $\Delta$ HOP, P,  $\Delta$ P, DOC,  $\Delta$ DOC). Los datos obtenidos fueron incorporados a los mostrados en el Panel A (Panel B): se observó una excelente correlación ( $r=0.96$ ) entre las afinidades a ambas proteínas. A continuación, se analizó la relación entre el ángulo A/BCD y la unión a CBG, expresada como su  $EC_{50}$  (Figura 13) y se observó que se podían dividir, los esteroides en estudio, en cuatro grupos: I) grupo de alta afinidad, II) grupo conformacionalmente plano y de baja afinidad, III) grupo de  $\Delta$ 1 esteroides y IV) grupo de los esteroides conformacionalmente muy torsionados. En el grupo de alta afinidad se puede observar que, a medida que aumenta el ángulo aumenta la unión a CBG dentro de un rango acotado de ángulos que va desde los  $-20^\circ$  a  $-28^\circ$ . Por encima y por debajo del rango determinado por los grupos I y III ( $-20^\circ$  a  $-36^\circ$ ) se produce una drástica disminución de la unión. En la Figura 14, se analiza la relación entre el ángulo A/BCD y la unión a GR donde, nuevamente, se pueden dividir los esteroides en cuatro grupos: I) grupo de alta afinidad, II) grupo conformacionalmente plano y de baja afinidad, III) grupo de  $\Delta$ 1 esteroides y IV) grupo de los esteroides conformacionalmente muy torsionados. A diferencia de la unión a CBG, en el grupo IV se observó una mayor dispersión llamando la atención 21OH-6,19OP que, a pesar de ser un esteroide muy torsionado, presentó una moderada unión al GR. El grupo I, de alta afinidad, no presenta una correlación muy clara, indicando que los valores de las  $EC_{50}$  han alcanzado un plateau.



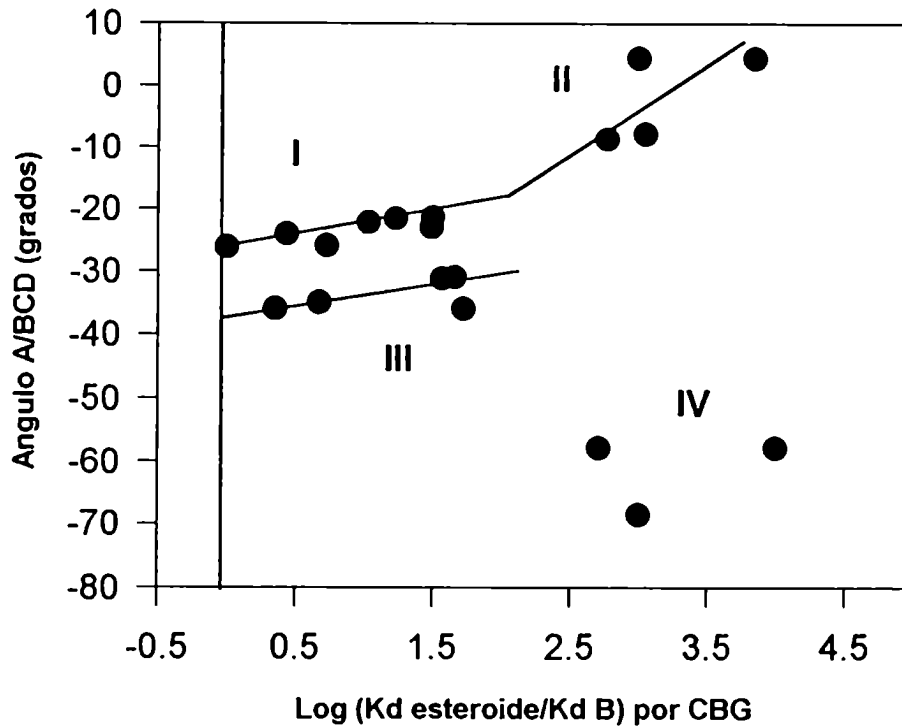


Figura 13: : Relación entre el ángulo A/BCD y la unión a CBG. I) grupo de alta afinidad, II) grupo conformacionalmente plano y de baja afinidad, III) grupo de  $\Delta 1$  esteroides y IV) grupo de los esteroides conformacionalmente muy torsionados.

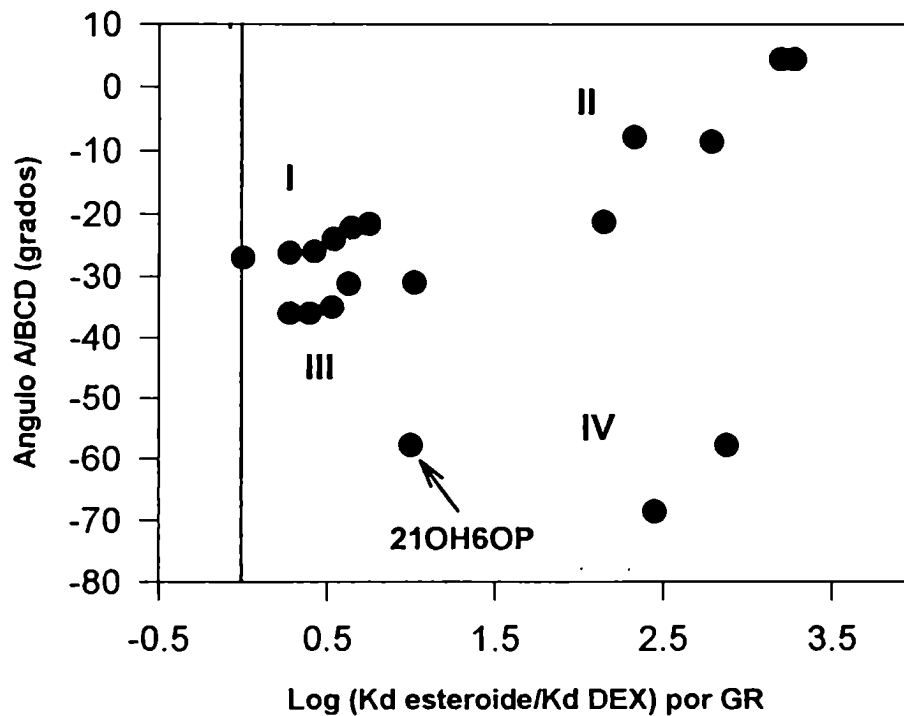
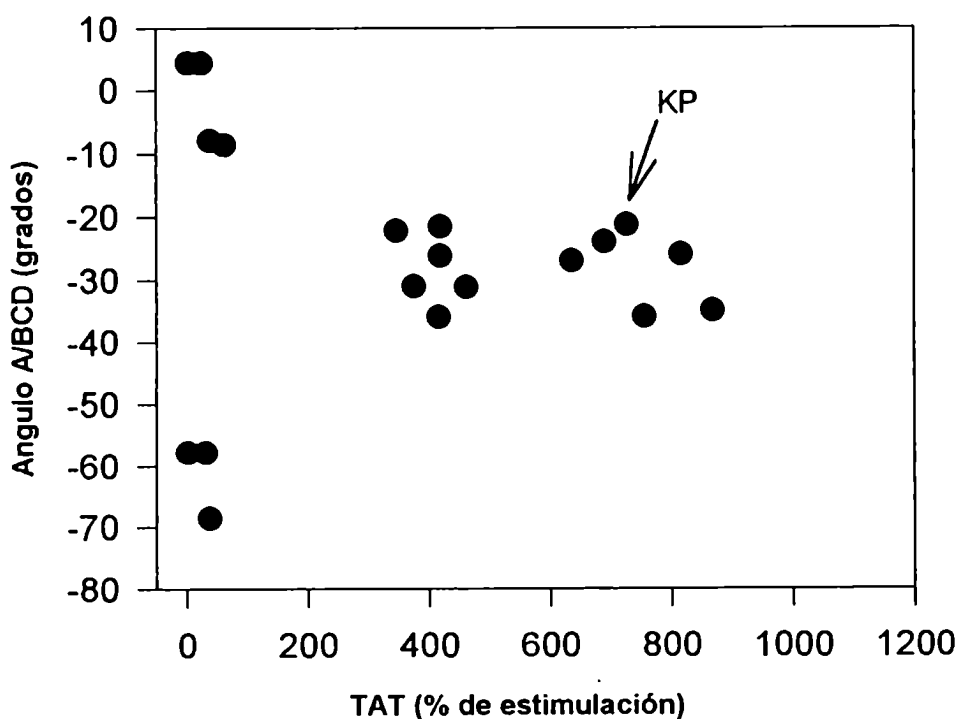


Figura 14: Relación entre el ángulo A/BCD y la unión a GR. I) grupo de alta afinidad, II) grupo conformacionalmente plano y de baja afinidad, III) grupo de  $\Delta 1$  esteroides y IV) grupo de los esteroides conformacionalmente muy torsionados.

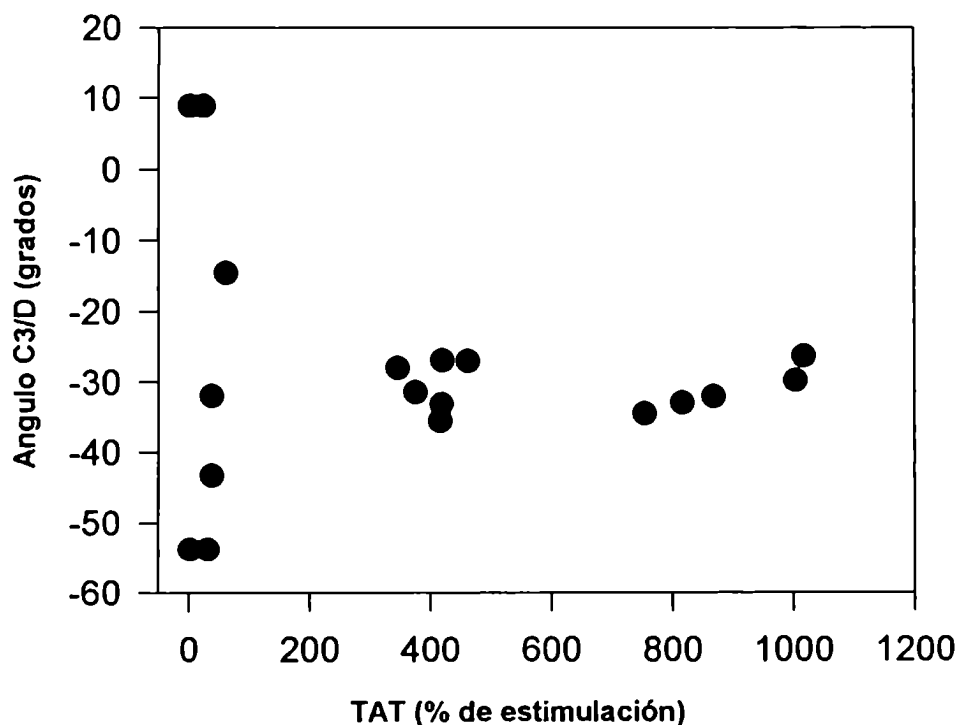
## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

Dos esteroides que se destacaron por su unión a GR fueron  $11\beta$ OH-progesterona (HOP) y su  $\Delta_1$  derivado ( $\Delta$ HOP). Cuando se intentó buscar una correlación entre el ángulo A/BCD y el efecto biológico, entendido como el incremento en la inducción de la TAT, no se encontró correlación alguna (Figura 15).

Llamó la atención la actividad GC desarrollada por 11-cetoprogesterona (KP) que, careciendo del  $C_{11}$ -OH, estimuló con la misma potencia que HOP (Figura 15). Se intentó con otro parámetro geométrico como el ángulo  $C_3=O$  /D vs TAT y tampoco se observó correlación (Figura 16).



**Figura 15: Falta de correlación entre el ángulo A/BCD del esteroide vs actividad TAT medida en suspensiones de hepatocitos de rata incubadas con 100 nM de los esteroides en estudio.**



**Figura 16: Falta de correlación entre el ángulo C<sub>3</sub>/D vs actividad TAT medida en suspensiones de hepatocitos de rata incubadas con 100 nM de los esteroides en estudio, *en parte* adaptado de (7)**

### Discusión

Ya vimos que, a diferencia de lo que ocurre con el efecto mineralocorticoide que se traduce principalmente en la retención de Na<sup>+</sup>, la respuesta GC es un fenómeno pleiotrópico, que existe en gran variedad de tejidos. Así, basándonos en la definición genética, podríamos definir al fenómeno pleiotrópico, como la respuesta que afecta más

## Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas

de una característica del fenotipo, entendida como la variedad de parámetros que gatilla (124).

La afinidad aparente entre GR y CBG siguió una función lineal ( $r=0.96$ ), sugiriendo que los requerimientos estructurales para unirse a ambas proteínas serían similares.

Un compuesto que resultó de interés fue 21OH $\Delta^6,19$ -oxidoprogesterona. Este esteroide carece de efectos GC y presenta una moderada afinidad por el receptor de glucocorticoides ( $EC_{50}=125$  nM).

Entre los esteroides que se destacaron por su actividad GC, encontramos a HOP y  $\Delta$ HOP que mostraron un efecto biológico *in vitro* similar al corticoide natural de la rata: corticosterona.  $\Delta$ HOP presentó una afinidad 5 veces menor que corticosterona por GR sugiriendo la posibilidad que su efecto biológico este relacionado con otro/s factor/es que le son propios.  $\Delta$ HOP resulta así un compuesto interesante para ser estudiado y sobre el que volveremos en el siguiente capítulo.

En el mismo orden de razonamiento, nos podemos preguntar porqué siendo HOP y  $\Delta$ HOP buenos inductores de la TAT, escapan a la correlación observada en la Figura 15. Una respuesta altamente especulativa haría responsable de esta aparente paradoja al protagonismo de factores extra-receptor en el medio de incubación (para una discusión de este nuevo criterio ver sección 3.3 y conclusiones).

11 ceto-progesterona (KP) estimuló los parámetros GC estudiados a pesar de carecer de condiciones estructurales óptimas y, lo que es más importante, de grupos funcionales considerados críticos para la respuesta GC ( $C_{11}$ -OH). Esto, según Galigniana et al, se

## **Capítulo 2-Estudios Triangulares. Actividad GC-Estructura-Unión a dos proteínas**

debe a la conversión de KP a HOP por la enzima  $11\beta$ HSD-1. HOP gatilla la respuesta GC (125).

A diferencia de lo que ocurre con el efecto MC (126), la complicada naturaleza de la respuesta GC atenta contra la búsqueda de correlaciones entre la estructura del esteroide y el efecto biológico final. Sin embargo, no se debe descartar la posibilidad que con otros parámetros, aún no estudiados, se encuentren correlaciones como las halladas para la respuesta MC (Ver Figura 4 Introducción general).

***Influencia de la introducción de un doble enlace  
1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de  
la Progesterona***

La 11 $\beta$ hidroxilación de la progesterona es un paso particularmente interesante, ya que es la primera reacción enzimática que se considera específica, tanto en la biosíntesis corticoadrenal como en las funciones glucocorticoideas (Ver Introducción general). Sin embargo, si bien las propiedades GC de la 11 $\beta$ hidroxiprogesterona han sido estudiadas brevemente en forma comparativa en el pasado (127,128), no existe en la literatura un análisis a fondo de los verdaderos alcances fisiológicos de esta reacción enzimática. En otras palabras: ¿Cuáles de las respuestas corticoideas específicas se expresan como consecuencia de la 11 $\beta$ hidroxilación *fisiológica* de la progesterona? ¿en qué medida y en qué condiciones? Este estudio se hace en paralelo con otro que consiste en una modificación más *farmacológica* de la molécula, y que en general aumenta la acción hormonal: la introducción del doble enlace 1:2.

### **3.1 “Algunas Propiedades biológicas de 11 $\beta$ hidroxiprogesterona (HOP) y su $\Delta$ 1 derivado ( $\Delta$ HOP)”**

#### **Introducción**

En el presente capítulo se han comparado las propiedades biológicas y bioquímicas de HOP y  $\Delta$ HOP con las correspondientes a corticosterona (B), dexametasona (DEX) y progesterona (P). También, se han analizado algunos aspectos relacionados con el mecanismo de acción de HOP y  $\Delta$ HOP tales como la disociación del complejo GR-hsp90. Respecto a la biología de HOP y  $\Delta$ HOP se analizó el posible rol de estos esteroides en la inducción de apoptosis y la habilidad de inducir la expresión de un gen reporter en una línea celular de endometrio de rata que expresa receptores a glucocorticoides. Este gen contiene en su secuencia promotora GREs (elementos que responden a los glucocorticoides) a los que el GR se une como homodímero (Ver Introducción) y estimula la transcripción.

Roldán et al (128) han demostrado que la presencia de un grupo OH en C<sub>11</sub> afecta el ángulo A/B debido a una interacción con el metilo en C<sub>19</sub>. Por otra parte, Gonzalez et al (129) demostraron que la introducción de un doble enlace en la posición 1,2 provoca la



### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

distorsión del esqueleto del 4-eno-3-ceto-esteroide. La presencia del doble enlace también mejora la estabilidad química (molecular) y enzimática.

Algunas propiedades GC fueron demostradas para  $\Delta$ HOP, como la inhibición de la síntesis de ARN por timocitos murinos (128), la inhibición de la proliferación celular en cultivo de linfocitos humanos (130) y la actividad antiinflamatoria *in vivo* (131).

La necesidad de incorporar uridina a timocitos se debe a la necesidad de mensajes específicos mediados por ARN mensajero. La necesidad de incorporar timidina a estas células es menos clara ya que su proliferación es limitada. Por una hipótesis, los timocitos podrían requerir síntesis de ADN por razones de reparación y uno de los efectos dañinos de los GC bien podría consistir en evitar dicha reparación. Homo et al encontraron que los GC *in vitro* inhibían la captación de este precursor por timocitos de una manera comparable a la captación de uridina (132) Es por estos antecedentes y aquellas razones que agregué a la serie de experimentos uno consistente en la medición de los efectos de HOP y  $\Delta$ HOP sobre la incorporación de timidina a timocitos.

A diferencia a los esteroides que exhiben propiedades GC,  $\Delta$ HOP no mostró, en tratamientos *in vivo* crónicos y agudos, modificación en los niveles de corticosterona (B) plasmática (133). Esta propiedad resulta interesante en el estudio de la correlación entre los cambios conformacionales con los aspectos moleculares y biofarmacológicos de la respuesta GC.

## **Materiales y Métodos**

### **Bioensayos**

**Depósitos de glucógeno** Se usaron ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) adrenalectomizadas (ADX) 48 horas antes del día del experimento. Los esteroides fueron disueltos en etanol: propilenglicol: 0.9 % NaCl (3 : 3 : 34) y la noche previa al día del experimento fueron inyectados (i.m) 100 $\mu$ g del esteroide/100 g de peso corporal. La mañana del experimento se repitió la dosis, en este caso, (i.p), tres horas después las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y los hígados fueron inmediatamente removidos. La purificación del glucógeno se realizó por el método de Hopkins (119): se homogeneizaron 5 g de hígado con 8 ml de TCA frío al 10 %, se descartó el precipitado y se agregó un volumen de etanol al sobrenadante, el precipitado fue redisolto con agua y reprecipitado con un volumen de etanol. El precipitado fue deshidratado con dos lavados de acetona y uno de éter etílico. Luego fue cuantificado colorimetricamente por el método de Krisman (120). Los animales controles fueron inyectados con vehículo.

**La inducción de la Tirosina aminotransferasa (TAT):** Se aislaron hepatocitos por colagenización de hígado de ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) ADX según el método de Fry (121). luego de controlar la viabilidad celular por el test de exclusión de Azul de Tripán, se incubaron 2.10<sup>6</sup> células/ml de medio Ham F12 a 37°C durante 5 horas (la viabilidad celular decayó luego de las 6 horas de incubación) con 100 nM del esteroide en cuestión. El medio de incubación fue suplementado con 10.000 U% de

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11βhidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

penicilina, 10 mg% de estreptomicina, 0.8 mg %de Tylosin, 0.15 g%de NaHCO<sub>3</sub> y 5μM de dibutiril-AMP<sub>c</sub> (122). La incubación se hizo con agitación permanente (80 rpm) bajo una atmósfera gaseada con 95 % O<sub>2</sub>/ 5 %CO<sub>2</sub>. Al cosechar las células la viabilidad fue siempre mayor que 95 %. Se ensayó la actividad de TAT en los sobrenadantes de las células sonicadas según el método de Diamondstone (123): se agregó tejido equivalente a 30 μg de proteínas a un medio de incubación de 3 ml en fosfato de potasio 0.2 M a pH=7.4 conteniendo 19.2 μmoles de L-tirosina , 30 μmoles de α-cetoglutarato, 0.12 μmoles de fosfato de piridoxal. Luego de 30 minutos, la reacción fue detenida por el agregado de 0.2 ml de NaOH 10 N y agitada inmediatamente. En el medio alcalino, el ácido *p*-hidroxifenilpirúvico formado se transforma en *p*-hidroxibenzaldehído cuantificable por absorción a 331 nm ( $E_M=27.200 M^{-1}$ ). La reacción fue lineal para ese tiempo de incubación hasta los 350 μg de proteína. Una unidad de enzima fue definida como μmol tirosina/min a 37°C. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (117).

**Excreción de Na<sup>+</sup>**: Se usaron ratas macho Sprague-Dawley (250g) adrenalectomizadas (ADX) 48 horas antes del día del experimento. Los esteroides fueron disueltos en etanol. Para inyectarlos se los diluyó con 0.9 % de NaCl y propilenglicol a una proporción final de vehículo 3 : 3 : 34 (etanol: propilenglicol: solución fisiológica). La actividad Na<sup>+</sup> retentora fue medida por una modificación del método original de Kagawa (134). Brevemente, las ratas fueron anestesiadas bajo atmosfera de éter y sus vejigas vaciadas por presión suprapúbica. Los esteroides se inocularon i.m. (x μg/0.1 ml/100 g de peso), se anudó el pene y se inyectaron 3 ml adicionales de 0.9 % NaCl por vía s.c. Los

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

controles fueron inyectados con vehículo. A las 3 horas se extrajo orina por punción suprapúbica. También se les extrajo sangre con una jeringa heparinizada por punción de la vena cava. El Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> urinarios y plasmáticos fueron medidos con un fotómetro de llama. Los resultados se expresaron como el cociente entre la tasa de excreción de sodio de las ratas inyectadas con el esteroide en estudio y el control ADX inyectado con vehículo.

**Inhibición de la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina y <sup>3</sup>H-Leucina a timocitos:** fue medida en timocitos obtenidos a partir de ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) adrenalectomizadas (ADX) 48 horas antes del día del experimento. Luego de extraídos los timos, se limpiaron y, se cortó el timo con tijera en pequeños trozos en medio RPMI-1640, se obtuvieron los timocitos. Esta suspensión se filtró a través de 8-10 capas de gasa y las células fueron lavadas con medio RPMI-1640. Se resuspendieron las células en aprox. 2 ml de medio /timo y se contaron luego con cámara de Neubauer en una dilución 1/100 con Azul de Tripán para analizar su viabilidad. Se utilizó para las incubaciones medio RPMI 15 % Suero Fetal Bovino preadsorbido con C:D y suplementado con: 500 ng/ml hormona de crecimiento + 100 $\mu$ g/ml transferrina + 2 $\mu$ g/ml concanavalina-A + 10 U/ml insulina + 200 $\mu$ g/ml T3 + 20pg/ml calcitonina. El medio se esterilizó por filtración (mesh 0.45 nm). Se incubaron 45.000.000 células/ml durante 13 horas a 37°C en atmósfera de 95 % O<sub>2</sub> y 5 % CO<sub>2</sub>, a las 10 horas de incubación se les agregó el esteroide correspondiente (tiempo en presencia del esteroide: 3 horas), 2 horas y 15 minutos después se les dió el pulso con 3  $\mu$ Ci/ml de <sup>3</sup>H-Timidina (AE: 27.5 Ci/mmol) o 10  $\mu$ Ci <sup>3</sup>H-Leucina (AE: 55 Ci/mmol) (tiempo de pulso: 45 minutos). Luego de la incubación, y

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11βhidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

siempre trabajando en frío, las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS 20 % suero normal y 4 g/l de glucosa. Se analizó la viabilidad, siendo ésta mayor al 95%. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 0.5 ml H<sub>2</sub>O destilada fría. Se agregó un volumen de ácido perclórico al 10 % y se dejó reposar durante 20 minutos en frío, luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos a 2°C, se aspiró el sobrenadante y el pellet + 0.2 ml de 10 M KOH se incubó durante 10 minutos con agitación. Se contó disolviendo en líquido de centelleo. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido Mark III (con corrección automática de quenching) con una eficiencia del 60 % para el <sup>3</sup>H. Los valores se expresaron en cpm/10<sup>6</sup> células.

#### **Ensayos de Unión:**

**Al receptor de glucocorticoides:** Los GR fueron obtenidos a partir de los timos de ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) adrenalectomizadas 48 horas antes del día del experimento. Los animales fueron sangrados por punción cardíaca. Se perfundió a través de la arteria aorta NaCl 0.9 % frío hasta que los órganos se blanquearon totalmente. Los timos se homogeneizaron en buffer TEGI (0.1 M Tris, 10 mM EDTA, 25 % glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol, 20 mM Na<sub>2</sub> MoO<sub>4</sub>, 0.1 mM PMSF, pH=7.4). Los homogenatos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante fue utilizado como fuente de GR. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (117). Las incubaciones se realizaron con 10 nM de <sup>3</sup>H-DEX (AE= 43.9 Ci/mmol) y con 6 mg/ml de proteína durante 12 horas a 0°C, en presencia de cantidades crecientes de hormona no radiactiva para desplazar la marca del trazador por competencia y evaluar

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11βhidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

así sus afinidades relativas. Luego de la incubación se separó la hormona libre de la unida mediante el agregado de un volumen de carbón activado-dextrano (2% : 0.2 %) frío, se centrifugó durante 10 minutos a 3000rpm en frío y se toma del sobrenadante 400 µl para contar. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido

Los cocientes hormona fría /<sup>3</sup>H-DEX utilizadas fueron: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 y 1000. Para el caso de la curva de competencia de <sup>3</sup>H-DEX con DEX radioinerte, las dpm correspondientes al cociente frío/<sup>3</sup>H-DEX=1000 fueron descontadas como unión inespecífica a todas las demás incubaciones, mientras que la de razón 0 , y luego de ser descontado el inespecífico, fue considerado el 100% de unión. Las concentraciones de esteroide necesarias para desplazar el 50 % del trazador (CE<sub>50</sub>) fueron calculadas con el programa PCRIA v 4.1.

En el ensayo de la unión de <sup>3</sup>H-triamcinolona (AE= 32 Ci/mmol) a fibroblastos se incubaron 50 µl de citosol de fibroblastos, 45 µl de HEM (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 20 mM Molibdato) y 5 µl de <sup>3</sup>H-TA (en Etanol 20 % [TA]=100 nM) durante 4-5 horas en hielo. La reacción se detuvo con el agregado de 150µl carbón-dextrano (2% : 0.2 %) frío, se centrifugó durante 2 minutos a 12000 rpm y se contó 100µl del sobrenadante. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido. El Scatchard se realizó por saturación con cantidades crecientes de radioactivo desde 10<sup>-10</sup> M a 10<sup>-7</sup> M. El unido no específico se calculó con el agregado de 1000 veces hormona radioinerte para cada concentración.

**A Transcortina (CBG) parcialmente purificada:** Las curvas de competencia se realizaron con transcortina parcialmente purificada a partir de plasma de rata. (118) Los

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11βhidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

plasmas de las ratas ADX fueron fraccionados con  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$  : primero se llevó a 30 % de saturación en frío, luego de 30 minutos en reposo, el sobrenadante se llevó a un 60 % de saturación. El precipitado, libre de albúmina (BSA), fue redisoluto en buffer fosfato 10 mM a pH=7.4 y dializado contra igual buffer durante una noche a 5°C. El dializado fue diluído convenientemente en buffer 0.1 M Tris, 10 mM EDTA, 10 mM βmercaptoetanol, a pH=7.4). La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (117). Las incubaciones se realizaron con 5 nM  $^3\text{H}$ -corticosterona (AE= 87.1 Ci/mmol) a 0°C durante 12 horas y fueron detenidas por el agregado de un volumen de carbón activado -dextrano (2%: 0.2%). La unión inespecífica fue siempre menor al 10 %. Los cocientes hormona fría / $^3\text{H}$ -B utilizadas fueron: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 y 1000. Para el caso de la curva de competencia de B con B radioinerte; las dpm correspondientes al cociente frío/ $^3\text{H}$ -B =1000 fueron descontadas como unión inespecífica a todas las demás incubaciones, mientras que la de razón 0 , y luego de ser descontado el inespecífico, fue considerado el 100% de unión. Las concentraciones de esteroide necesarias para desplazar el 50 % del trazador ( $\text{CE}_{50}$ ) fueron calculadas con el programa PCRJA v 4.1.

**Al receptor de mineralocorticoides:** Los MR fueron obtenidos a partir de los riñones de ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) adrenalectomizadas desde 48 horas antes del día del experimento. Los animales fueron sangrados por punción cardíaca. Se perfundió a través de la arteria aorta NaCl 0.9 % frío hasta que los órganos se blanquearon totalmente. Los riñones se homogeneizaron en buffer TEGI (0.1 M Tris, 10 mM EDTA, 25 % glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol, 20 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.1 mM PMSF, 2 UI/ml

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11βhidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

aprotinina, 30 µg/ml inhibidor de tripsina-quimotripsina, pH=7.4). Los homogenatos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante fue utilizado como fuente de MR. Las incubaciones se realizaron con 5 nM de <sup>3</sup>H-Aldosterona (AE= 59 Ci/mmol), con 1 µM RU 28362 y con 11 mg de proteína/ml durante 12 horas a 0°C, en presencia de cantidades crecientes de hormona no radioactiva para desplazar la marca del trazador por competencia y evaluar así sus afinidades relativas. Luego de la incubación se separó la hormona libre de la unida mediante el agregado de un volumen de carbón activado-dextrano (2% : 0.2 %) frío, se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm en frío y se toma del sobrenadante 400 µl para contar. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido

Las razones hormona radioinerte /<sup>3</sup>H-ALDO utilizadas fueron: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 y 1000. Para el caso de la curva de competencia de ALDO con ALDO radioinerte, las dpm correspondientes al cociente ALDO radioinerte/<sup>3</sup>H-ALDO =1000 fueron descontadas como unión inespecífica a todas las demás incubaciones, mientras que la de razón 0 , y luego de ser descontado el inespecifico, fue considerado el 100% de unión. Las concentraciones de esteroide necesarias para desplazar el 50 % del trazador (CE<sub>50</sub>) fueron calculadas con el programa PCRIA v 4.1.

**Disociación GR-hsp90:** Fibroblastos WCL-2 de rata crecidos en monocapa con medio Dulbecco's (suplementado con 10 % suero de ternero, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) fueron incubados con 1 µM del esteroide por 90 minutos a 0° C. La temperatura fue incrementada a 37 °C durante 30 minutos para permitir la disociación GR-hsp90. Las células fueron cosechadas con solución salina Earle's,



### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11βhidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

resuspendidas en 1.5 vol. de buffer HE (10 mM Hepes, 1mM EDTA, pH=7.4) y se rompieron por homogeneización. Los homogenatos fueron centrifugados por 1 hora a 100.000 x g (el sobrenadante es referido como "citosol"). El GR proveniente de 200 µl de citosol fue inmunoabsorbido con el anticuerpo BuGR-2, o cantidades equivalentes de IgG no inmune, por rotación durante 3 horas a 4 °C. Se unió previamente a proteína A-Sepharosa que liga el Fc de las inmunoglobulinas, se resuspendió en 200 µl de buffer TEG (10 mM TES, 50 mM NaCl, 4 mM EDTA, 10 % glicerol, pH=7.6). Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con 1 ml de buffer TEGM (TEG con 20 mM Na<sub>2</sub> MoO<sub>4</sub>) y las proteínas se resolvieron en un gel 12 % PAGE-SDS seguido por un Western blot con: 2µg/ml BuGR para GR, 1µg/ml AC88 para hsp90, 1 µg/ml N27F3-4 para hsp70, 0.1 % UPI56 para hsp56, y 0.1 % anti-Cyp40 para la proteína que une ciclosporina A. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas Immobilon-P. Los inmunoblots se incubaron con el correspondiente anti-Anticuerpo-<sup>125</sup>I y se realizaron las autorradiografías.

**Apoptosis en timo:** Ratas macho Sprague-Dawley (180-200 g) adrenalectomizadas desde 48 horas antes del día del experimento fueron inyectadas i.p. con 0.5 mg esteroide/100 g peso corporal. 5 horas después se sacrificaron los animales y se obtuvieron los timocitos. Brevemente, luego de extraídos los timos, se limpiaron y cortando el timo con tijera en pequeños trozos en medio RPMI-1640. Esta suspensión se filtró a través de 8-10 capas de gasa y las células fueron lavadas con medio RPMI-1640. Se resuspendieron las células en aprox. 2 ml de medio/timo y fueron contadas con cámara de Neubauer en una dilución 1/100 con Azul de Tripán para analizar su viabilidad. El ADN de las células fue obtenido

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

de acuerdo al método de Herrmann et al (135). Brevemente, las células fueron lisadas con el buffer de extracción (50 mM HCl-Tris, 20 mM EDTA, 1 % NP-40, pH=7.4) durante 30 segundos. Inmediatamente se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm, el ADN apoptótico se encuentra en el sobrenadante mientras que el ADN genómico en el pellet. Se repitió una vez más la extracción. A los pellets se les agregaron 100  $\mu$ l de buffer extracción. Los pellets y sobrenadantes fueron tratados con 5 mg/ml de Rnasa A y 1 % SDS durante 2 horas a 56° C seguidos por una digestión con 2.5 mg/ml de Proteínasa K durante 18 horas a 37 °C. El ADN fue precipitado y resuelto en un gel de agarosa 1.65% que contenía 0.5 % de bromuro de etidio. Una escalera de 100 pb fue usada como marcador de peso molecular. El área correspondiente a los fragmentos de ADN fue cuantificada por densitometría y usada para estimar los cambios en la proporción de ADN apoptótico luego del tratamiento hormonal.

**Inducción de la actividad CAT por los esteroides:** Células RENTRO-1 fueron crecidas de acuerdo a lo señalado para las células WCL-2. Fueron escogidas de acuerdo a su capacidad de responder a los GC (136). Se realizaron transfecciones transientes mediante el método de fosfato de calcio con pGRE<sub>2</sub>-tk-CAT de acuerdo a Chen et al (137). Este plásmido contiene dos secuencias canónicas GRE que responden a los GC en frente a un promotor del gen de la timidina kinasa del virus *Herpes simplex* y el gen reporter CAT (cloroamfenicol acetyl transferasa). Luego de las transfecciones, las células fueron incubadas durante 10 horas con medio DMEM que contenía 10 % suero fetal delipidado con carbón, posteriormente se incubaron por 36 horas con los esteroides a 37° C. La actividad enzimática fue medida de acuerdo a Chalepakis et al (138). 3  $\mu$ g

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

pRSV-LUC fue cotransfectado como referencia interna. Para normalizar la actividad CAT, la actividad luciferasa (LUC) fue medida de acuerdo a Gould et al (139).

**Transfecciones transientes:** Se utilizó el método de fosfato de calcio. El día 1 se cultivaron las células a razón de 500.000 células por plato de transfección. El día 2 se realizaron las transfecciones. Se prepararon dos soluciones A y B; la solución A contenía por placa: 3  $\mu$ g del plásmido pGRE<sub>2</sub>-tk-CAT, 3  $\mu$ g pRSV-LUC, 4  $\mu$ g de ADN de timo de ternero y 25  $\mu$ l Cl<sub>2</sub> Ca 2.5 M; la solución B contenía: buffer Hepes con fosfato 2X pH: 7. Se mezclaron las soluciones en igual proporción agregando por goteo la solución A a la solución B burbujeada con una propipeta. Se agitó fuertemente y se dejó 1 hora a temperatura ambiente. Durante esa hora se les cambió el medio a las células. Se agregaron por goteo con agitación manual de la placa de transfección 500  $\mu$ l se la solución A+B.

Día 3: luego de 14 horas se agregó cloroquina (concentración final: 0.1 mM) y 4.5 horas después se realizó el shock de glicerol: se aspiró el medio de los platos de transfección y se agregaron 2 ml de glicerol 10 % en TBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Fosfato de potasio monobásico 0.9 mM, Fosfato de sodio dibásico 6.4 mM, 25 mM Tris) por placa durante 5 minutos. Se aspiró la solución y rápidamente se lavó con 2 ml de TBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Fosfato de potasio monobásico 0.9 mM, Fosfato de sodio dibásico 6.4 mM, 25 mM Tris). Se repitió el lavado y se agregó medio nuevo con las hormonas. Día 4: Luego de 36 horas se cosecharon las células.

**Medición de la actividad cloroanfenicol acetil transferasa (CAT):** Se aspiró el medio de las placas de transfección y se agregó 1 ml de TBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

Fosfato de potasio monobásico 0.9 mM, Fosfato de sodio dibásico 6.4 mM, 25 mM Tris) Se cosecharon las células con rubber policeman dentro de tubos de 1 ml. A partir de este momento se trabajó en frío. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y se aspiró el TBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Fosfato de potasio monobásico 0.9 mM, Fosfato de sodio dibásico 6.4 mM, 25 mM Tris). Se agregaron 200 $\mu$ l de solución A (0.25 M Tris-HCl, 2 mM DTT, 5 $\mu$ M PMSF, pH=7.8). Luego, los tubos, fueron sometidos a tres ciclos de congelamiento con nitrógeno líquido y descongelamiento en baño a 37° C. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue utilizado como fuente de enzima para la medición de la actividad CAT. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (117). Se incubaron 70  $\mu$ g de proteína. con 50  $\mu$ l de la solución B ( 1  $\mu$ l de  $^{14}$ C-cloroamfenicol (0.2  $\mu$ Ci), 20  $\mu$ l de acetil CoA (3.5 mg/ml en 0.25 M Tris) y 29  $\mu$ l de 0.25 M Tris-HCl, pH=7.8) por 2 horas a 37° C. Se detuvo la reacción con 4 volúmenes de acetato de etilo. Se agitó y se centrifugó para separar las fases. La fase superior se secó con SpeedVac durante 15 minutos. Se resuspendió en 10  $\mu$ l de acetato de etilo y se sembró en placas de cromatografía en capa delgada (TLC). Se corrió con cloroformo: metanol (95:5). Los productos acetilados se cuantificaron mediante scanner.

**Medición de la actividad luciferasa (LUC):** Se aspiró el medio de las placas de transfección y se agregó 1 ml de TBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Fosfato de potasio monobásico 0.9 mM, Fosfato de sodio dibásico 6.4 mM, 25 mM Tris). Se cosecharon las células con rubber policeman dentro de tubos de 1 ml. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y se aspiró el TBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Fosfato de potasio

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11βhidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

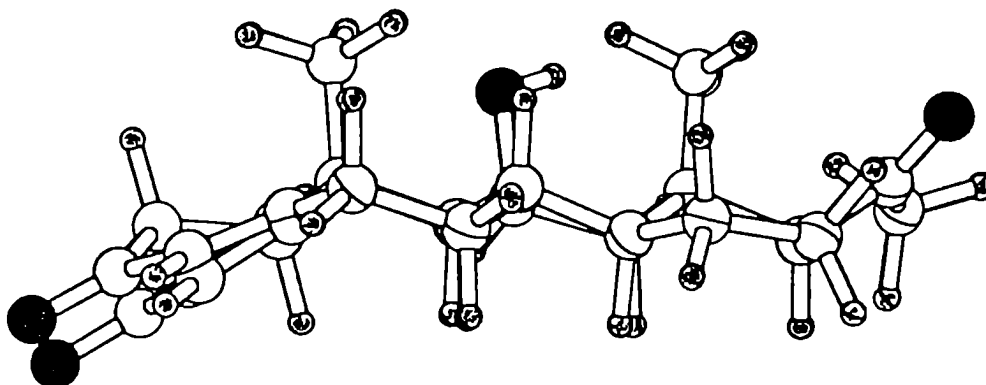
monobásico 0.9 mM, Fosfato de sodio dibásico 6.4 mM, 25 mM Tris). Se agregaron 100 µl de buffer Fosfato-LUC (100 mM K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 1 mM DTT y 100 µM PMSF). Luego, los tubos fueron sometidos a tres ciclos de congelamiento con nitrógeno líquido y descongelamiento en baño a 37° C. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue utilizado como fuente de enzima para medir LUC. Se midieron las proteínas por el método de Bradford (117) y se utilizaron 30 µg para el ensayo LUC. Se combinaron los 30 µg con 350 µl de buffer reacción-LUC (25 mM gly-gly, 15 mM K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 15 mM sulfato de magnesio, 4 mM EGTA, 2 mM ATP, 1mM DTT). A esta solución se le agregan 100 µl de luciferina (concentración final: 60 µM) e inmediatamente se lee en fluorímetro.

**Peso de órganos:** Ratas macho Sprague-Dawley (180-200 g) adrenalectomizadas 48 horas antes del día del experimento fueron inyectadas i.p. con 0.5 mg esteroide/100 g peso corporal. 5, 16 y 72 horas después se sacrificaron los animales y se obtuvieron los timos. Se limpiaron y se pesaron en una balanza de precisión. Se utilizaron como control ratas inyectadas con vehículo: 3 : 3 : 34 (etanol: propilenglicol: solución fisiológica).

**Adsorción del suero Fetal con carbón:** Se incubaron 500 ml de suero fetal bovino con 1000 U de sulfatasa (Sigma) durante 2 horas a 37 C. Se ajustó el pH a 4.2 y se dejó reposar durante 30 minutos en hielo. Se agregaron 5 g de carbón + 0.5 g de dextrano y se incubó durante 30 minutos con agitación a 55° C. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se suplementó el suero con: 500 ng/ml hormona de crecimiento + 100µg/ml transferrina + 2µg/ml concanavalina-A + 10 U/ml insulina + 200µg/ml T3 + 20pg/ml calcitonina.

### Resultados

La Figura 17 presenta las estructuras de los esteroides HOP y  $\Delta$ HOP realizadas por el Dr Burton con el programa AMPAC 5.0 (Semichem) mediante el uso del método semiempírico AM 1. Con motivos comparativos, se superpusieron las estructuras de HOP y  $\Delta$ HOP para visualizar el ángulo de torsión del anillo A respecto del anillo D: -24.0° y -34.5° respectivamente. La introducción del doble enlace entre el C<sub>1</sub> y el C<sub>2</sub> produce un aumento de aproximadamente 10 ° en este ángulo que parecería ser



**Figura 17: Estructuras de HOP y  $\Delta$ HOP (el de mayor torsión).**

importante en la actividad GC.

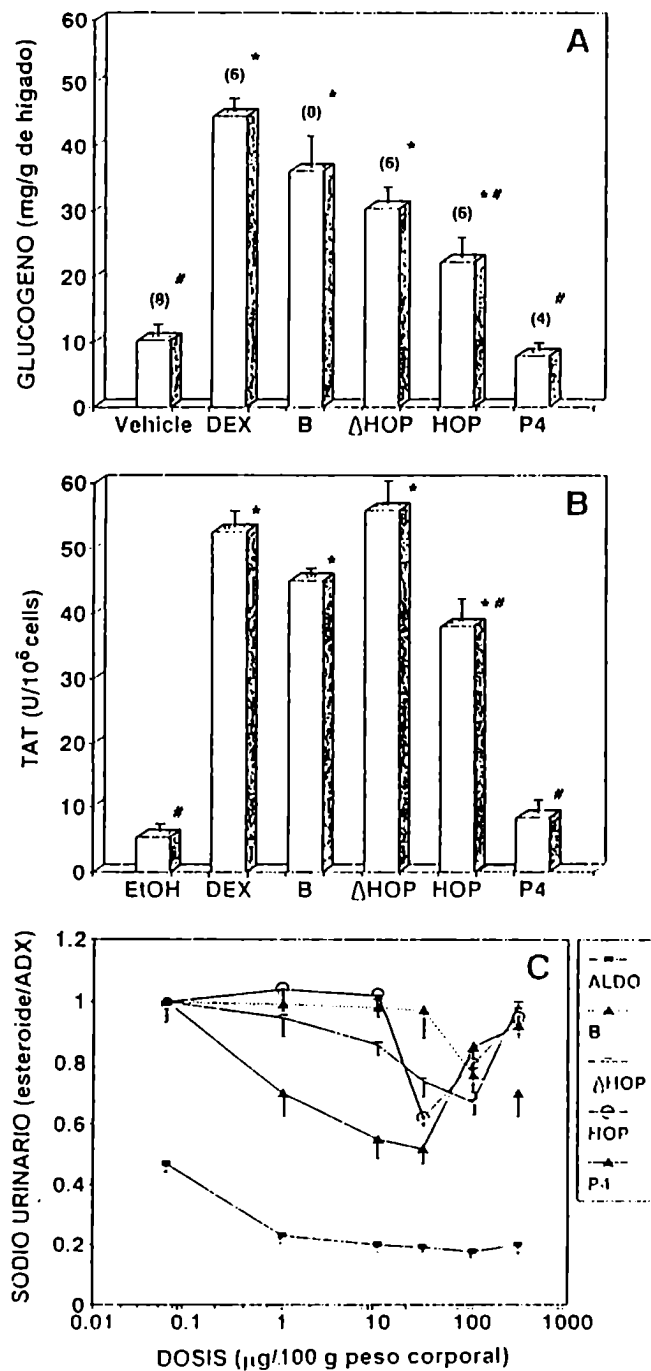
La Figura 18 nos muestra las propiedades biológicas de  $\Delta$ HOP, comparadas con HOP, el potente GC dexametasona (DEX), el principal GC en la rata corticosterona (B) y progesterona (P) que presenta la estructura pregnano básica. El panel A muestra que tratamientos *in vivo* con 100 $\mu$ g/100 g rata de  $\Delta$ HOP incrementaron tres veces el depósito de glucógeno, actividad que resultó ser ligera (pero significativamente)

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

menor que la misma dosis de DEX.  $\Delta$ HOP resultó ser tan efectivo como el GC fisiológico corticosterona en el depósito de glucógeno. Progesterona, esteroide que carece del C<sub>11</sub> OH y que conformacionalmente es más plano, no se diferenció del lote inyectado con vehículo. En el panel B se analizó la inducción de la enzima TAT en suspensión de hepatocitos. Una concentración de 100 nM  $\Delta$ HOP produjo una estimulación de la TAT de 10 veces (de 5 U/10<sup>6</sup> células a 55 U/ 10<sup>6</sup> células) respecto de los controles incubados en presencia de 0.05 % etanol. Esta inducción es, al menos, tan potente como la observada con 100 nM corticosterona (45 U/10<sup>6</sup> células) y 100 nM dexametasona (52 U/10<sup>6</sup> células). HOP es significativamente menos activa (38 U/10<sup>6</sup> células) que  $\Delta$ HOP y dexametasona pero igualmente provocó una inducción de 7 veces respecto de los controles. Nuevamente, progesterona careció de actividad GC. A continuación (panel C), se analizaron las capacidades MC de los esteroides en estudio:  $\Delta$ HOP y HOP, a las dosis analizadas, no mostraron capacidad para retener Na<sup>+</sup> en forma significativa (comparar los animales inyectados con HOP y  $\Delta$ HOP con los inyectados con aldosterona).

En la Figura 19 se observan las curvas de desplazamiento que nos brindan las afinidades relativas (RBA) de los esteroides por: receptores de GC obtenidos de citosol de timo (Panel A), receptores de GC obtenidos de fibroblastos (Panel B), transcortina (CBG) parcialmente purificada (Panel C) y receptores de MR obtenidos de citosoles de riñón (Panel D). Las afinidades relativas fueron calculadas usando como referencia el trazador radioactivo y la capacidad de los competidores radioinertes de desplazarlo (Tabla 1).

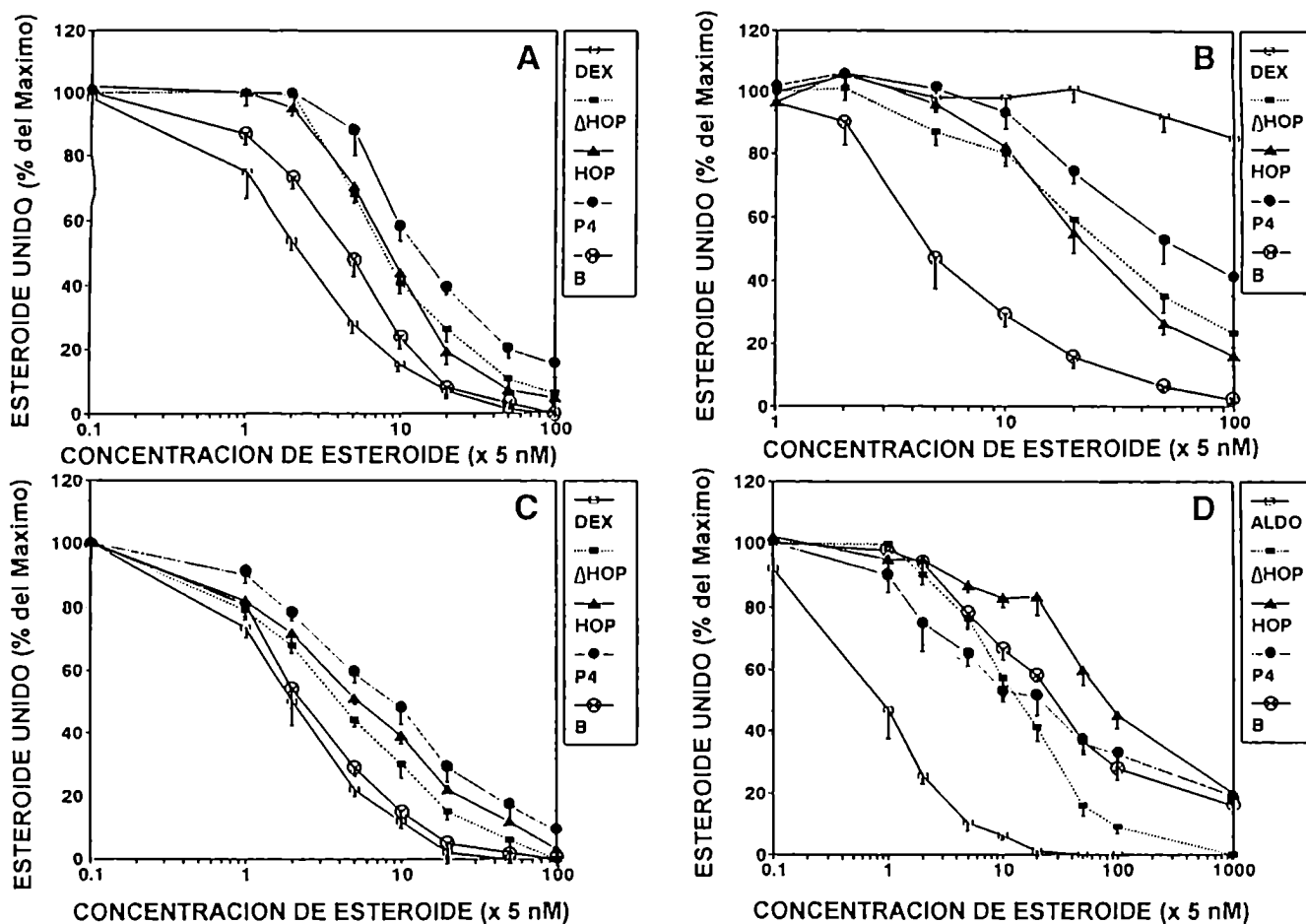
**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**



**Figura 18: Propiedades biológicas.** A) Depósitos de glucógeno B) Inducción de la enzima Tirosín amino transferasa (TAT), las diferencias entre HOP y  $\Delta$ HOP fueron significativas  $p < 0.03$ . C) Actividad Na<sup>+</sup> retentora. En ningún caso el clearance de creatinina fue afectado por el tratamiento con los esteroides ( $0.34 \pm 0.15$  ml/min). \* diferente de los controles tratados con Vehículo ( $p < 0.001$ ) y # diferente de las ratas tratadas con DEX ( $p < 0.001$ ). Los números entre paréntesis indican la cantidad de animales para cada grupo.



**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**



**Figura 19: Propiedades de unión.** Citosoles de timo (Panel A), fibroblastos (Panel B) y riñón (Panel D), o transcortina (CBG) parcialmente purificada (Panel C). Los valores fueron corregidos por el unido no específico y expresados como % del unido máximo observado en ausencia de competidor. Las afinidades relativas fueron calculadas con la función logística de los cuatro parámetros

El valor que se indica es la concentración del esteroide radioinerte que es necesario para desplazar el 50 % de la radioactividad. La RBA de  $\Delta$ HOP por el receptor de GC, independientemente de la fuente (Panel A y B), fue la mitad que la observada para corticosterona. En ambos citosoles se observó el mismo orden de afinidad:  $DEX \geq B > \Delta HOP = HOP > P$ .  $\Delta$ HOP y los esteroides naturales mostraron menores afinidades

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

aparentes en citosoles de timo que en citosoles de fibroblastos sugiriendo la presencia de proteínas competidoras en el primero. Así, se analizó la unión de los esteroides a la proteína plasmática transcortina (CBG) y, efectivamente, todos los esteroides naturales y  $\Delta$ HOP se unieron a la transcortina. En el Panel A las RBA han sido subvaluadas debido a la contaminación con CBG. El Panel D muestra la competencia de los esteroides con  $^3$ H-Aldosterona por el receptor de mineralocorticoides. Consistentemente con la pobre actividad MC desarrollada *in vivo* por los esteroides,  $\Delta$ HOP y HOP (Figura 18, Panel C), presentaron 70 y 500 veces respectivamente menor afinidad relativa por MR que aldosterona (Tabla 1). Si la transcortina es eliminada de la preparación de MR mediante la adsorción a hidroxilapatita,  $\Delta$ HOP aún muestra 50 veces menor afinidad por el MR ( $45.5 \pm 0.9$  nM).

En la Figura 20 se muestran gráficos de Scatchard. La constante de disociación ( $K_d$ ) por  $^3$ H-triamcinolona (TA) fue de  $1.46 \pm 0.09$  nM y la concentración de sitios de unión ( $B_{max}$ ) fue de  $55.4 \pm 9.7$  fmol / mg proteína. Cuando el gráfico de Scatchard fue realizado en presencia de 50 nM  $\Delta$ HOP, se observó un gráfico compatible con una inhibición competitiva. La  $K_{d,p}$  fue de  $8.08 \pm 0.60$  nM y el  $B_{max} = 50.0 \pm 12.5$  fmoles/mg de proteína y la constante de inhibición ( $K_i$ ) fue de 11 nM.

Esto sugiere que la afinidad absoluta de  $\Delta$ HOP por GR es mayor que la inferida de la RBA. HOP mostró una  $K_{d,p}$  de  $5.39 \pm 0.71$  nM, una  $B_{max} = 55.9 \pm 14.2$  fmol/mg de proteína y la  $K_i = 18.6$  nM.

**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

**TABLA 1**

*Uniones relativas (RBAs)*

Esteroides	GR (timo) nM	GR (fibroblastos) nM	CBG (plasma) nM	MR (riñón) nM
DEX	11.7 $\pm$ 0.2	12.4 $\pm$ 0.5	>1000	
B	22.3 $\pm$ 0.6	12.4 $\pm$ 0.5	8.7 $\pm$ 0.2	114.5 $\pm$ 12.5
$\Delta$ HOP	39.7 $\pm$ 2.8	20.7 $\pm$ 0.8	41.4 $\pm$ 4.8	67.0 $\pm$ 2.6
HOP	40.9 $\pm$ 3.2	28.1 $\pm$ 1.2	24.0 $\pm$ 2.9	496.1 $\pm$ 72.1
P <sub>4</sub>	67.1 $\pm$ 5.3	40.7 $\pm$ 1.8	149 $\pm$ 33.2	79.5 $\pm$ 13.1
ALDO	-			0.9 $\pm$ 0.1

**Las afinidades relativas fueron calculadas con la función logística de los cuatro parámetros. Los valores son expresados como nM (media  $\pm$  desvío standard, n=5)**

Como ya se señaló en la Introducción, los glucocorticoides se unen eficientemente al GR y promueven la disociación del receptor de las proteínas hsp. Este proceso, conocido como transformación, permite al GR translocar al núcleo y allí interaccionar con las secuencias específicas de ADN. Hemos evaluado la capacidad de HOP y  $\Delta$ HOP de transformar al GR. Con este fin, cultivos de fibroblastos fueron incubados en presencia de los distintos esteroides, el GR fue inmunoabsorbido de los citosoles y resuelto por inmunoblot (Figura 21). Las incubaciones con DEX promovieron la disociación de la hsp 90 del GR, así como también, de las proteínas que coinmunoabsorben, hsp 70, FKBP 52 (hsp 56) y Cyp 40, que fueron descritos como integrantes del heterocomplejo (140).

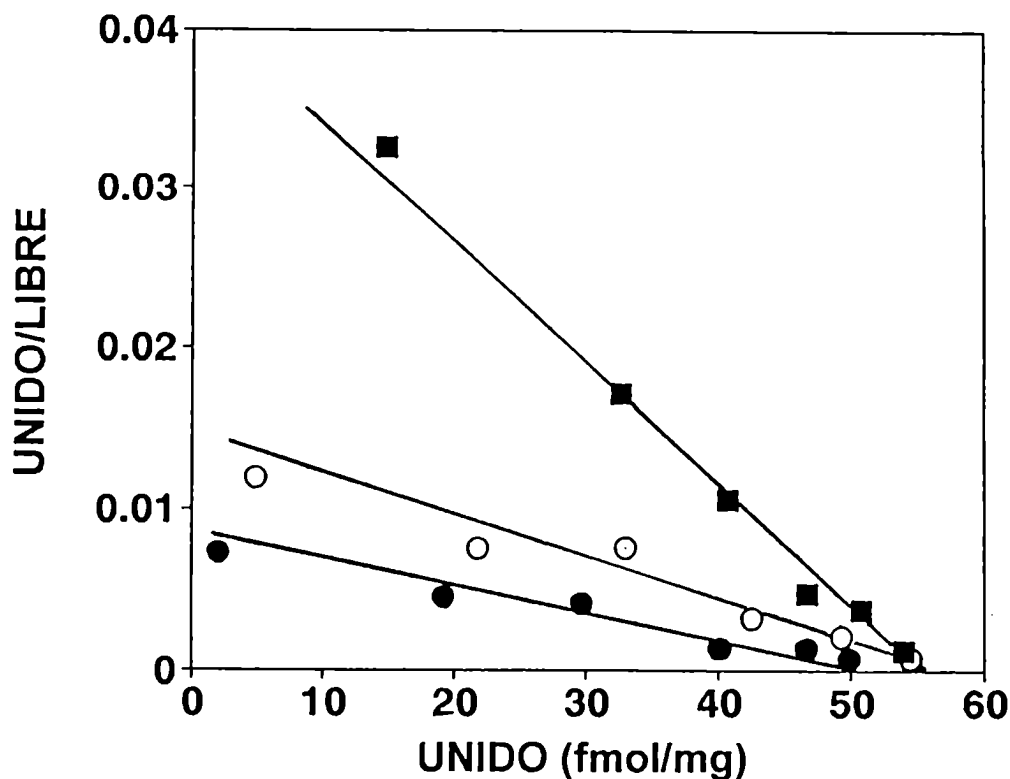


Figura 20: Análisis de Scatchard. Citosoles de fibroblastos fueron incubados a 0° C con  $^3\text{H}$ -triamcinolona (cuadrados), en presencia de 50 nM  $\Delta\text{HOP}$  (círculos llenos) o en presencia de 50 nM HOP (círculos vacíos). Los valores fueron corregidos por el unido no específico. Estudios preliminares indicaron que la unión alcanzaba el plateau a las 2.5 Hs a 0° C y era estable por 18 Hs. Los parámetros cinéticos fueron calculados con el programa Enzfitter v 1.05 (Elsevier, Biosoft, UK).

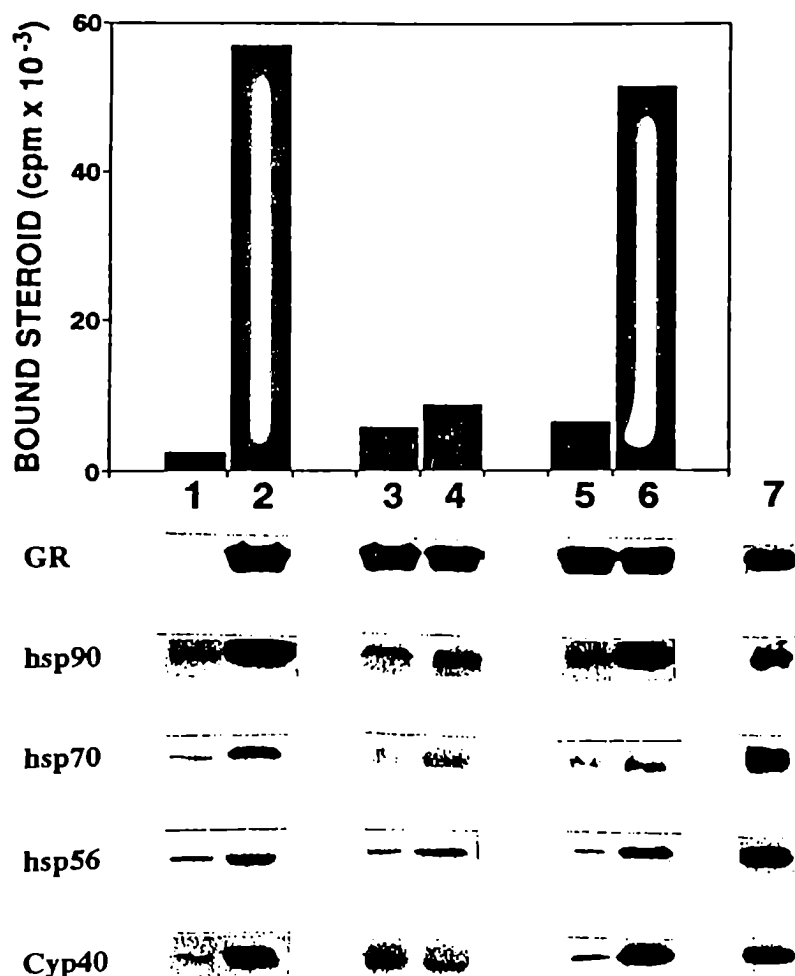
HOP y  $\Delta\text{HOP}$ , que no mostraron, en los experimentos previos, diferencias en sus propiedades biológicas y bioquímicas, también son capaces de disociar las proteínas asociadas al GR. Progesterona, inactivo en los experimentos previos, fue incapaz de transformar GR. Cuando alícuotas de las muestras inmunoabsorbidas fueron incubadas en presencia de  $^3\text{H}$ -TA, las propiedades de unión fueron consistentes con la integridad funcional del heterocomplejo. Cuando la hsp 90 fue disociada del GR la unión disminuye a valores similares a los observados en la inmunoabsorción realizada con suero no inmune.

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

Debido a la total transformación obtenida en presencia de HOP y  $\Delta$ HOP, se debería esperar una inducción significativa del gen reporter CAT si se incubaran células RENTRO-I, previamente transfectadas con un plásmido que contiene dos secuencias GRE canónicas, con los esteroides. Las células RENTRO-1 expresan  $2.2 \times 10^4$  moléculas de GR/célula (136), la proliferación y la muerte celular dependen de la presencia de glucocorticoides. (141). La Figura 22 muestra que la actividad CAT normalizada inducida por 100 nM  $\Delta$ HOP y HOP fue solo el 25 % de la observada con 10 nM DEX. Esta concentración de DEX constituye la respuesta máxima. Cuando fue usado un exceso de 100 veces de  $\Delta$ HOP y HOP, la actividad CAT alcanzó solo un 66 % de la inducción observada en presencia de 10 nM DEX o 1  $\mu$ M corticosterona.

La actividad de HOP puede ser inactivada por la acción de la enzima 11 $\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 1 (125). El producto, 11-cetoprogesterona (KP), exhibe muy baja afinidad por GR. Sin embargo, 11 $\beta$ HSD-1 es capaz de catalizar la reacción inversa y KP puede adquirir propiedades GC debido a su transformación a HOP (125,142). La Figura 22 muestra que KP es incapaz de inducir actividad CAT en células RENTRO-1 sugiriendo que estas células no expresan cantidades significativas de 11 $\beta$ HSD-1. Los resultados de la Figura 22 sugieren que la simple transformación del receptor de glucocorticoides producida por  $\Delta$ HOP y HOP no es suficiente para generar un complejo esteroide-receptor que sea activo transcripcionalmente, como sí se observa, con DEX o corticosterona.



**Figura 21: Inducción de la disociación de hsp90 del GR.** Células WCL2 fueron incubadas en presencia de 0.1 % ETOH (carriles 1 y 2) o 1.0 $\mu$ M de los esteroides indicados (carriles 3-6) y se procedió como se describe en Materiales y Métodos. Con el fin de determinar la actividad de unir esteroides (Grafico de Barras), los inmunopellets fueron incubados con 100 nM <sup>3</sup>H-triamcinolona. 1) citosol inunmoabsorbido con IgG no inmune, 2) citosol adsorbido con el anticuerpo monoclonal Bu-GR (anti-GR), de los carriles 3 a 6 se realizó de la misma manera que en el carril 2, pero los citosoles provienen de células incubadas con DEX (3), HOP (4),  $\Delta$ HOP (5) y Progesterona (P) (6). El carril 7 muestra el perfil de proteínas de 20  $\mu$ l de citosol crudo en buffer TEGM

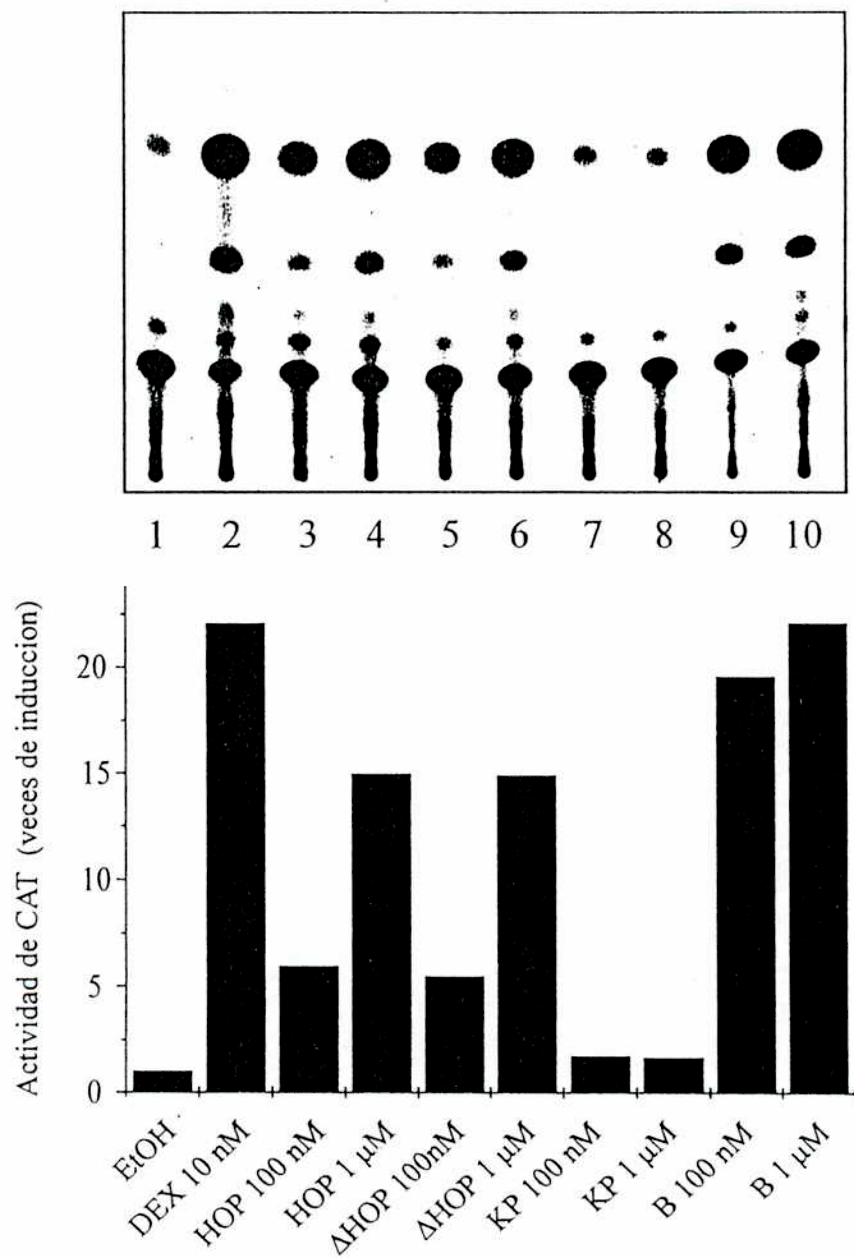


Figura 22 Inducción de la actividad CAT en células RENTRO-1 transfectadas con el plásmido pGRE<sub>2</sub>-tk-CAT. Las células RENTRO-1 fueron cotransfectadas con los plásmidos pGRE<sub>2</sub>-tk-CAT y pRSV-LUC e incubadas con los esteroides en las concentraciones que se indican. La actividad CAT fue normalizada por la actividad LUC. Las incubaciones que se realizaron en presencia de 10 nM HOP o  $\Delta$ HOP (equimolar respecto a DEX) no mostraron inducción de la actividad CAT.

### Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona

En el capítulo 4 analizaremos en particular el efecto apoptótico de HOP y  $\Delta$ HOP. Como veremos estos esteroides se mostraron como débiles inductores de la apoptosis a pesar que ambos transformaron eficientemente el GR.

En paralelo con el patrón característico de apoptosis, se analizó la capacidad de HOP y  $\Delta$ HOP de reducir el peso del timo. DEX mostró una reducción de aproximadamente el 80 %, pero ni HOP ni  $\Delta$ HOP pudieron modificar este parámetro (Figura 23).

Los GC inhiben la incorporación de aminoácidos y precursores de ARN a linfocitos (130) y timocitos (128,133).

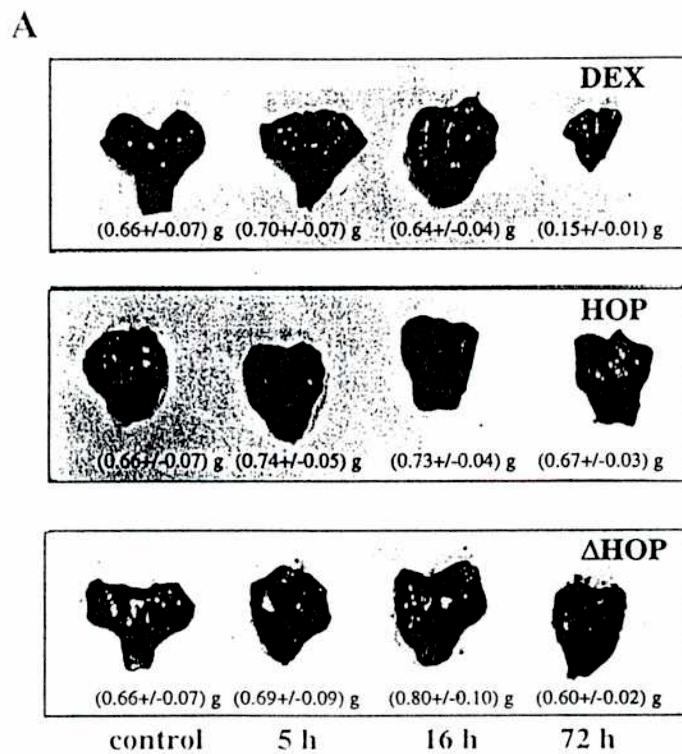


Figura 23: Peso del timo. Ratas ADX fueron inyectadas con 0.5 mg/100 g peso corporal de los esteroides y sacrificadas a distintos tiempos: 5, 16 y 72 Hs. Se extrajeron los timos y se pesaron. Los resultados se expresan en gramos (media  $\pm$  desvío standard, n=4)



### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

Si los efectos de HOP y  $\Delta$ HOP son mediados por el receptor de GC, ellos deberían ser inhibidos por la presencia del antigluocorticoide RU486. Fueron medidas las incorporaciones de  $^3\text{H}$ -Leucina y  $^3\text{H}$ -Timidina a timocitos incubados en presencia y en ausencia de RU486. La Tabla 2 muestra que el RU486 revierte totalmente la inhibición producida por DEX, corticosterona y HOP. Interesantemente, el efecto inhibitor de  $\Delta$ HOP fue sólo parcialmente revertido. Los valores obtenidos en presencia de RU486 representan solo el 50 % de la reversión observada con corticosterona, DEX o HOP en las mismas condiciones. Este resultado nos sugiere que el GR es sólo parcialmente responsable de las propiedades hormonales de  $\Delta$ HOP reflejando, cuando se lo compara con otros GC, una disociación entre los aspectos moleculares de la activación del GR y la respuesta biológica final.

**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

**TABLA 2**

*Efecto inhibitorio de los esteroides en la incorporación de  $^3\text{H}$ -Leucina y  $^3\text{H}$ -Timidina a timocitos*

Esteroides	- RU 486		+ RU 486	
	$^3\text{H}$ -Leu	$^3\text{H}$ -U	$^3\text{H}$ -Leu	$^3\text{H}$ -U
EtOH	7847 $\pm$ 147 (100.0 $\pm$ 1.9)	11372 $\pm$ 877 (100.0 $\pm$ 7.7)	7976 $\pm$ 137 (100.0 $\pm$ 1.7)	11559 $\pm$ 309 (100.0 $\pm$ 2.7)
DEX	2982 $\pm$ 448 <sup>a</sup> (38.0 $\pm$ 15.0)	4673 $\pm$ 329 <sup>b</sup> (43.7 $\pm$ 7.0)	7577 $\pm$ 240 (95.0 $\pm$ 3.2)	11698 $\pm$ 868 (101.2 $\pm$ 7.4)
B	4232 $\pm$ 223 <sup>a</sup> (53.9 $\pm$ 5.3)	5675 $\pm$ 519 <sup>d</sup> (53.1 $\pm$ 9.1)	8430 $\pm$ 343 (105.7 $\pm$ 4.1)	10993 $\pm$ 547 (95.1 $\pm$ 5.0)
HOP	4987 $\pm$ 232 <sup>a</sup> (63.6 $\pm$ 4.7)	6340 $\pm$ 436 <sup>c</sup> (59.3 $\pm$ 6.9)	8375 $\pm$ 292 (105.0 $\pm$ 3.5)	12206 $\pm$ 866 (105.6 $\pm$ 7.1)
$\Delta$ HOP	3102 $\pm$ 221 <sup>a,g</sup> (40.9 $\pm$ 5.4)	5572 $\pm$ 242 <sup>c,h</sup> (52.1 $\pm$ 4.3)	6445 $\pm$ 338 <sup>f,g</sup> (80.8 $\pm$ 5.2)	8918 $\pm$ 270 <sup>e,h</sup> (77.2 $\pm$ 3.0)
P	7411 $\pm$ 510 (94.4 $\pm$ 6.9)	10691 $\pm$ 595 (100.0 $\pm$ 5.6)	8534 $\pm$ 350 (106.9 $\pm$ 4.1)	10889 $\pm$ 769 (94.2 $\pm$ 7.1)

Los valores corresponden a un experimento representativo y son expresados en cpm/10<sup>6</sup> células (media  $\pm$  desvío standard, n=5). Los valores relativos se indican entre paréntesis. Diferente del tratamiento con ETOH p<: (a) 0.001, (b) 0.002, (c) 0.003, (d) 0.005, (e) 0.007, (f) 0.014. Las incorporaciones de  $^3\text{H}$ -Leu (g) y  $^3\text{H}$ -T (h) en presencia de RU486 son significativamente menores que en ausencia de RU486 (p< 0.001)

### Discusión

HOP y  $\Delta$ HOP exhibieron sorprendentemente algunas respuestas GC tan intensas como B y en el caso de  $\Delta$ HOP tan intensas como DEX. Ellas son: inducción de la enzima TAT e incremento en los depósitos de glucógeno para HOP; e inducción de la enzima TAT y la inhibición de la incorporación de precursores a timocitos para  $\Delta$ HOP. En cambio no estimulan el gen reporter CAT ni presentan un efecto significativo sobre el peso de timo lo cual los diferencia de los GC 21 hidroxilados. Aquí se muestra una neta tendencia hacia la disociación de caracteres GC de gran importancia tanto fisiológica como farmacológica.

Importancia fisiológica: la 11 $\beta$ hidroxilación *sería* necesaria y suficiente para ciertas respuestas GC tales como: inducción de TAT e inhibición de la incorporación de precursores o sea que para contestar la pregunta de cuándo aparece la respuesta GC en la molécula de la progesterona hay que discriminar entre las diversas propiedades del efecto pleiotrópico.

Importancia farmacológica: que la introducción de un doble enlace 1:2 a través de las deformaciones conformacionales que produce, *aumentaría de por sí*, algunas de estas respuestas GC hasta el máximo.

El esteroide sintético pregna-1,4-diene-11 $\beta$ ol-3,20-diona ( $\Delta$ HOP) puede ser usado como un agente discriminante entre las altamente complejas, múltiples y heterogéneas acciones glucocorticoides. Las propiedades biológicas tanto *in vivo* como *in vitro* pueden ser

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

comparadas a las ejercidas por DEX o corticosterona. La falta de actividad Na<sup>+</sup> retentora se correlaciona con su baja RBA por el receptor renal de MC. En la Figura 20, se observa la alta afinidad por el GR ,11 nM, que nos permite afirmar que  $\Delta$ HOP es un ligando específico para GR en sistemas donde GR coexiste con MR.  $\Delta$ HOP es eficiente como inductor de la actividad TAT, incrementando los depósitos de glucógeno, inhibiendo la incorporación de aminoácidos y nucleótidos, y disociando el heterocomplejo-hsp90 del GR.

Debido a las características estructurales de  $\Delta$ HOP, se esperaba que este esteroide sintético tuviera las propiedades biológicas y bioquímicas que se observaron en los experimentos aquí mostrados. Sin embargo,  $\Delta$ HOP exhibió algunas propiedades inesperadas: 1) a pesar del hecho que  $\Delta$ HOP transformó completamente GR, este esteroide es un pobre inductor de un gen reporter que contiene dos secuencias GRE; 2) presentó una débil actividad como inductor de fragmentación regular del ADN característico de apoptosis. 3) no afectó el peso del timo 4) el efecto en la incorporación de precursores de proteínas y de ARN es sólo parcialmente inhibido por el antagonista RU486.

Ha sido reportado (143) que en sistemas celulares sensibles a los GC, la concentración de GR afecta el nivel de sensibilidad. Como se observa en la Figura 20, en presencia de HOP y  $\Delta$ HOP no se modificó en número de sitios de unión indicando que este no sería el caso. Sin embargo, también fue reportado que el GR solo no era suficiente para producir apoptosis en células linfoides (144), y que algunas células resistentes a la apoptosis presentaban altos niveles de GR. La comprensión de la causa por la que algunas células

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

difieren en la sensibilidad a los GC nos brindará importante información sobre las vías que llevan a la apoptosis y  $\Delta$ HOP podría ser una importante herramienta para mejorar nuestro conocimiento sobre este proceso.

La capacidad de RU486 de enmascarar los efectos de DEX, corticosterona y HOP en timocitos y recuperar la capacidad de captar aminoácidos y nucleótidos contrasta con una reversión solo parcial para  $\Delta$ HOP. Esta observación es la evidencia molecular que sustenta la hipótesis de Rondinone et al (130) que propone que  $\Delta$ HOP ejerce su efecto a través de otro/s mecanismos de acción no clásicos (no genómicos?). Esta no es la única característica distintiva para  $\Delta$ HOP ya que, a diferencia de la mayoría de los GC, no afecta los niveles de corticosterona plasmáticos (133).

La mayoría de las propiedades de  $\Delta$ HOP son compartidas por HOP excepto que las captaciones de aminoácidos y nucleótidos fueron completamente inhibidas en presencia de RU486. Qué es lo que hace a  $\Delta$ HOP ser diferente de los restantes GCs, en especial de HOP, es desconocido. Sin embargo, se puede especular que la introducción de un doble enlace entre C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> en HOP puede afectar sus propiedades. En efecto, estudios estructurales realizados con HOP usando <sup>13</sup>C-nmr (128) mostraron que la introducción de un doble enlace en la posición 1,2 aumentó la distancia entre C<sub>19</sub> y C<sub>11</sub>-OH para  $\Delta$ HOP, pero no para compuestos 21 hidroxilados como  $\Delta$ 1-cortisol,  $\Delta$ 1-corticosterona. Una hipótesis altamente especulativa sostiene que las modificaciones en el anillo A transmiten su efecto a través del esqueleto carbonado repercutiendo en el anillo D y este cambio estructural permitiría interactuar a  $\Delta$ HOP con GR y transformarlo tan

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

eficientemente como DEX. Sin embargo, de acuerdo a esta hipótesis, el complejo hormona receptor resultante no sería eficiente para desarrollar una respuesta genómica.

Así, en la presente sección se han planteado dos tipos de disociaciones que aparecen en caso de  $\Delta$ HOP y HOP 1) la disociación en el *mecanismo de acción*, o sea en la transformación. Así, estos esteroides transforman el receptor de glucocorticoides casi tan eficientemente como DEX, pero, dicha transformación, no se traduce en un potente efecto final. 2) La disociación en el *efecto final*. Para referirnos a la potencia de estos esteroides deberíamos aclarar qué efecto final estamos señalando, ya que, dependiendo del parámetro GC (TAT, glucógeno, apoptosis, inducción de un gen reporter o incorporación de aminoácidos y nucleótidos) que se analice, la potencia GC de los esteroides varía. Por ejemplo, HOP y  $\Delta$ HOP presentan muy buen efecto en la inducción de TAT, pero su efecto sobre la apoptosis es muy pobre. Por lo tanto, existe disociación a nivel de los órganos blanco de los GC.

En 1972, Baxter et al plantearon esta hipótesis para la cortexolona (11-desoxicortisol) y la progesterona. La cortexolona es un GC subóptimo en células de hepatoma pero actúa como un antiglucocorticoide en timocitos, mientras que la progesterona es subóptimamente activa en las células linfoides y se comporta como un antiglucocorticoide en células de hepatoma (145).

La explicación para ambas disociaciones se encontraba en las posibles diferencias entre los receptores a glucocorticoides de los distintos tejidos (146). A la luz de los descubrimientos del rol de la transcortina (sección 2 de este capítulo) y de la enzima 11 $\beta$ -HSD (Ver Introducción general) en la acción GC, pueden estar involucrados en la

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

disociación a nivel de los órganos blanco, además del receptor, una amplia gama de posibles factores.

Es necesario tener en cuenta estos dos tipos de disociaciones a la hora de definir un compuesto como carente o poseedor de propiedades GC.

El mecanismo por el que las hormonas esteroides modulan la utilización de las secuencias promotoras aún no se conoce. Los receptores interactúan con factores generales de transcripción, co-activadores, otros factores intermediarios y, no se debe descartar, el rol de la cromatina en la regulación génica mediada por hormonas esteroides (147).  $\Delta$ HOP constituye una importante herramienta para elucidar el mecanismo de acción de las hormonas esteroides, así como también, un esteroide menos tóxico y más específico que los GC naturales y sintéticos.

## **3.2 “La influencia del suero de ternero en la respuesta glucocorticoide de derivados 1:2 ene y 11 $\beta$ hidroxilados de progesterona”**

### **Introducción**

Durante los estudios sobre las propiedades glucocorticoides (GC) de los derivados sintéticos de progesterona se observó que, en algunos casos, éstas eran fuertemente influenciadas por la presencia del suero bovino (BCS) en el medio. En este sentido, en 1963 Westphal y su grupo (148-149) reportaron los efectos secuestrantes de ciertas proteínas de la sangre, especialmente transcortina (CBG) y albúmina. Estos efectos podrían enmascarar actividades progesteronales medidas por el test de Hooker-Forbes (150). Como hemos mencionado en la Introducción general, nuestras ideas sobre el rol que cumple transcortina fueron evolucionando a medida que fueron creciendo evidencias que señalan a CBG como una proteína transportadora que, en determinadas circunstancias fisiológicas (23,151-154), promueve la guía de los GC a ciertas células. Poco se sabe sobre el rol fisiológico de otras proteínas séricas que unen progesterona, incluyendo a la albumina.

En la presente sección se ha estudiado sistemáticamente la influencia del suero bovino en las propiedades GC de progesterona. Se han analizado algunas propiedades GC como: la unión al receptor de glucocorticoides, la disociación del receptor del complejo GR-hsp90



### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

como indicador de la capacidad de la hormona de transformar GR, la inducción de la enzima tirosina aminotransferasa (TAT) y la inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina y  $^{35}\text{S}$ -metionina a timocitos. Con el objetivo de analizar las modificaciones estructurales que podrían regular el efecto del BCS, se ha incluido a 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (HOP) y su  $\Delta 1$  derivado ( $\Delta\text{HOP}$ ), en los ensayos. Se han elegido estos dos esteroides ya que la presencia de un  $\text{C}_{11}$  -OH es admitida como esencial para la acción GC y  $\Delta\text{HOP}$  ha mostrado propiedades farmacológicas interesantes (130,131,155,156).

## **Materiales y Métodos**

**Ensayos de Unión:** La unión de  $^3\text{H}$ -corticosterona a CBG parcialmente purificada y la unión de  $^3\text{H}$ -DEX a citosoles de timo fueron medidas como se describió previamente en la sección 3.1. La afinidad relativa (RBA) fue determinada como la concentración de esteroide no radioactivo que desplaza el 50 % de la unión máxima.

**Disociación GR-hsp 90:** Los hepatocitos fueron aislados de hígados de ratones Balb-c (20g) por el procedimiento de Fry et al (121). Las células fueron incubadas en medio HAM-F12 por 45 minutos a 30 °C bajo atmósfera de 95 %O<sub>2</sub> -5%CO<sub>2</sub> con permanente agitación con medio de cultivo suplementado o no con 10% suero bovino tratado con carbón y delipidado (CS-BCS)(Bovine Calf Serum, HyClone, Logan, Utah). La viabilidad fue estimada por exclusión del Azul de Tripán. Luego de la incubación las

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11βhidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

células se lavaron con solución salina de Earle's, resuspendidas en un volumen de 10 mM Hepes, 1mM EDTA, pH=7.4 y se rompieron mediante homogeneización. Los homogenatos fueron centrifugados por 1 hora a 100.000 x g (el sobrenadante es referido como "citosol"). El GR proveniente de 250 µl de citosol fue inmuoabsorbido con el anticuerpo BuGR-2, o cantidades equivalentes de IgG no inmune, por rotación durante 3 horas a 4 °C. Se unió previamente a proteína A-Sepharosa, se resuspendió en 200 µl de buffer TEG (10 mM TES, 50 mM NaCl, 4 mM EDTA, 10 % glicerol, pH=7.6). Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con 1 ml de buffer TEGM (TEG con 20 mM Na<sub>2</sub> MoO<sub>4</sub>) y las proteínas se resolvieron en un gel 9 % PAGE-SDS seguido por un Western blot con: 1µg/ml BuGR para GR, 1µg/ml AC88 para hsp90. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas Immobilon-P. Los inmunoblots se incubaron con el correspondiente <sup>125</sup>I-anti-anticuerpo y se realizaron las autorradiografías.

#### **Bioensayos:**

**Depósitos de glucógeno** se usaron ratas Sprague-Dawley (180-200 gramos) adrenalectomizadas 48 horas antes al día del experimento. Los esteroides fueron disueltos en etanol: propilenglicol: 0.9 % solución fisiológica (3 : 3 : 34) y se inyectaron i.m. 100 µg/100 g de peso corporal la noche previa al día del experimento. La mañana del experimento se repitió la dosis pero esta vez se inyectó i.p.. Tres horas más tarde las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical y los hígados fueron removidos inmediatamente. La purificación del glucógeno se realizó como se describió para el capítulo 1 y la cuantificación se realizó de acuerdo a Krisman (120).

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

**La inducción de la Tirosina aminotransferasa (TAT):** Se aislaron hepatocitos por colagenización de hígado de ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) ADX según el método de Fry (121). Luego de controlar la viabilidad celular por el test de exclusión de Azul de Tripán, se incubaron  $2 \cdot 10^6$  células/ml de medio Ham F12 a 37°C durante 5 horas (la viabilidad celular decayó luego de las 6 horas de incubación) con concentraciones que abarcaron desde  $10^{-15}$  M a  $10^{-5}$  M del esteroide en cuestión. El medio de incubación fue suplementado o no con 10% suero bovino tratado con carbón y delipidado (Bovine Calf Serum, HyClone, Logan, Utah). Además se suplementó el medio con: 10.000 U% de penicilina, 10 mg% de estreptomina, 0.8 mg %de Tylosin, 0.15 g%de  $\text{NaHCO}_3$  y  $5 \mu\text{M}$  de dibutiril-AMP<sub>c</sub> (122). La incubación se hizo con agitación permanente (80 rpm) bajo una atmósfera gaseada de 95 %  $\text{O}_2$ / 5 % $\text{CO}_2$ . Al cosechar las células la viabilidad fue siempre mayor al 95 %. Se ensayó la actividad de TAT en los sobrenadantes de las células sonicadas según el método de Diamondstone (123): se agregaron 30  $\mu\text{g}$  de proteínas a un medio de incubación de 3 ml en fosfato de potasio 0.2 M a pH=7.4 conteniendo 19.2  $\mu\text{moles}$  de L-tirosina , 30  $\mu\text{moles}$  de  $\alpha$ -cetoglutarato, 0.12  $\mu\text{moles}$  de fosfato de piridoxal. Luego de 30 minutos, la reacción fue detenida por el agregado de 0.2 ml de NaOH 10 N y agitada inmediatamente. En el medio alcalino, el ácido *p*-hidroxifenilpirúvico formado se transforma en *p*-hidroxibenzaldehído cuantificable por absorción a 331 nm ( $E_M=27.200 \text{ M}^{-1}$  ). La reacción fue lineal para ese tiempo de incubación hasta los 350  $\mu\text{g}$  de proteína. Una unidad de enzima fue definida como  $\mu\text{mol}$  tirosina/min a 37°C. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (117).

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11βhidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

**La inhibición de la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina y <sup>35</sup>S-metionina** en timocitos se realizó de acuerdo a lo descrito en el capítulo 3.1.

**Medición de la incorporación de <sup>3</sup>H-DEX y <sup>3</sup>H-Progesterona a timocitos:** fue medida en timocitos obtenidos a partir de ratas macho Sprague-Dawley (180-220 g) adrenalectomizadas (ADX) 48 horas antes del día del experimento. Luego de extraídos los timos, se limpiaron y se obtuvieron los timocitos en medio RPMI-1640 cortando el timo con tijera en pequeños trozos. Esta suspensión se filtró a través de 8-10 capas de gasa y las células fueron lavadas con medio RPMI-1640. Se resuspendieron en aprox. 4 ml de medio y fueron contadas con cámara de Neubauer en una dilución 1/100 con Azul de Tripán para analizar su viabilidad. Se incubaron  $22 \times 10^6$  células/ml a 37° C durante distintos tiempos (5 y 30 minutos) con 10 nM del esteroide radioactivo y la presencia o no de 10 % BCS delipidado y tratado con carbón. La reacción fue lineal hasta los 45 minutos para ambos esteroides. Las células fueron contadas nuevamente y siempre la viabilidad fue mayor al 95 %. Luego de la incubación se trabajó siempre en frío. Se centrifugó a 1300 rpm/10 minutos y los precipitados celulares se lavaron con 1 ml de medio RPMI-1640 frío que contenía 10 nM del esteroide correspondiente radioinerte. Los precipitados se resuspendieron en un volumen de 200 µl de PBS y se contó con centelleador 20 % de tritón X-100. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido Mark III (corrección automática de quenching) con una eficiencia del 60 % para el <sup>3</sup>H.

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

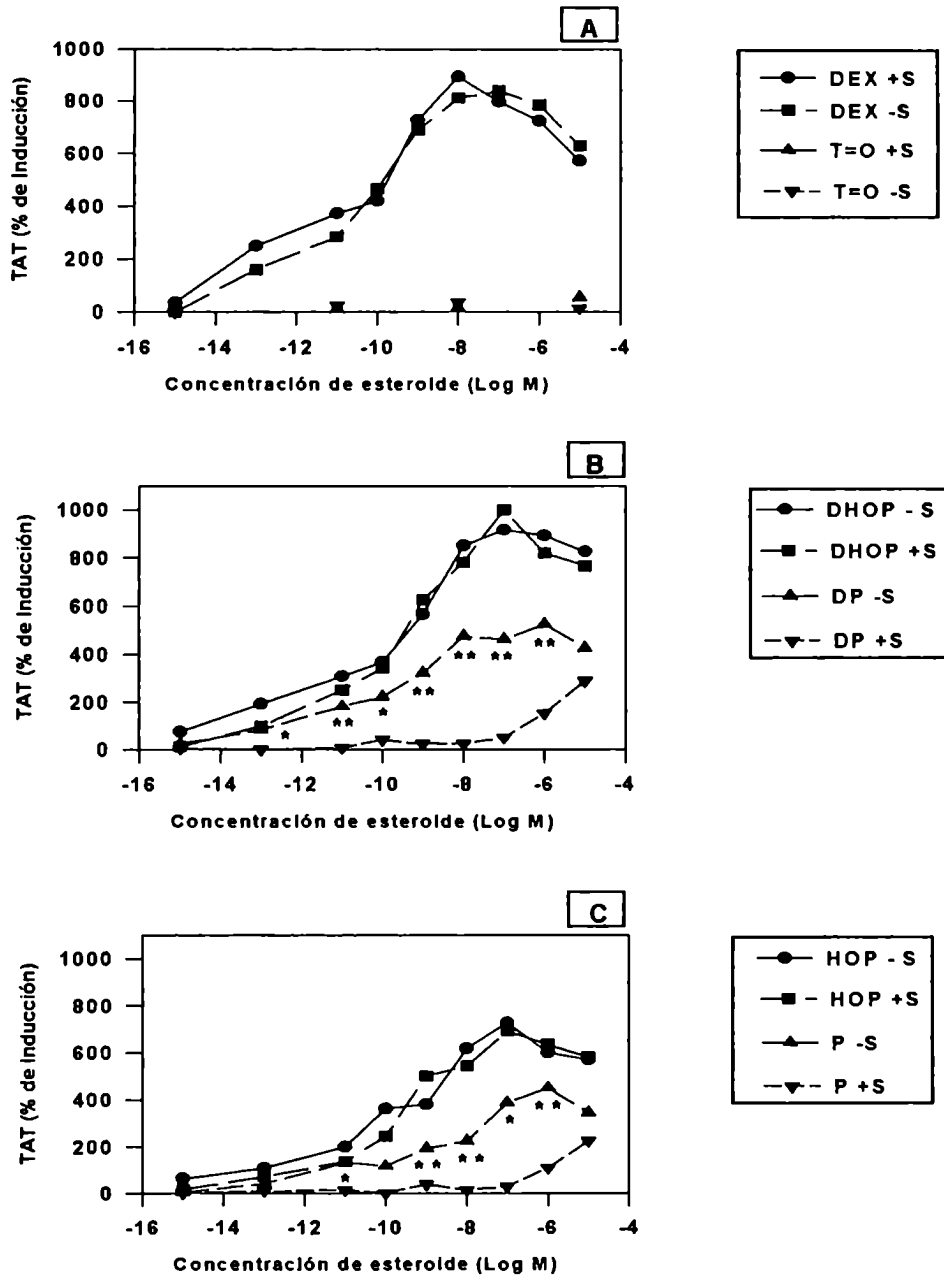
---

#### **Resultados**

En la Figura 24 se observan curvas dosis respuesta para los esteroides en estudio utilizando como parámetro GC la inducción de la enzima tirosín amino transferasa (TAT) en suspensiones de hepatocitos de rata. El BCS cuando está presente en el medio de incubación produce una inhibición de la actividad GC desencadenada por progesterona (P) (Panel inferior) y su  $\Delta 1$ -derivado ( $\Delta P$ ) (Panel central). En presencia de BCS, P y  $\Delta P$  mostraron actividad a una concentración de  $10^{-6}$  M, mientras que a esa misma concentración en ausencia de suero, la actividad subió a 400 % de estimulación. La actividad TAT producida por 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (HOP) y su  $\Delta$ -1 derivado ( $\Delta HOP$ ) no se ve afectada por el agregado del BCS (Panel central y Panel inferior). Así, la hidroxilación en C<sub>11</sub> liberaría al esteroide de la inhibición desarrollada por el BCS. En el Panel superior se incluyen los controles positivo, dexametasona (DEX), y negativo, Testosterona (T=O), las actividades GC de ambos esteroides no se vieron modificadas por el agregado de BCS.

La Tabla 3 muestra los efectos inhibitorios de los esteroides en la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina y <sup>35</sup>S-metionina y la influencia que ejerce el BCS en este parámetro glucocorticoide. Nuevamente, en ausencia de suero, todos los esteroides ejercen efectos inhibitorios similares sobresaliendo  $\Delta HOP$  y DEX con las mayores actividades.

**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**



**Figura 24: Curvas dosis-respuesta en la inducción de la TAT.** Los hepatocitos fueron incubados en la concentración del esteroide indicada, en presencia o ausencia de 10% Suero Bovino delipidado (BCS, indicado aquí como S). La actividad enzimática se midió de acuerdo al método de Diamondstone (123). Los valores se expresan como % de estimulación respecto de las incubaciones con Vehículo (1%etanol). \*diferente respecto -S  $p < 0.01$ , \*\*diferente respecto -S  $p < 0.05$ . HOP: 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona,  $\Delta^1$ HOP:  $\Delta^1$ -hidroxiprogesterona, DEX: dexametasona, P: progesterona.

**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

**TABLA 3**

*Influencia del suero sobre la inhibición de la incorporación de <sup>35</sup>S-Metionina y <sup>3</sup>H-Uridina a timocitos*

Esteroides	- BCS		+ BCS	
	<sup>35</sup> S-Met	<sup>3</sup> H-U	<sup>35</sup> S-Met	<sup>3</sup> H-U
EtOH (1%v/v)	6550 ±450 (100.0±6.9)	12892 ±1301 (100.0±10.1)	8975 ± 820 (100.0±9.1)	16137±1777 (100.0±11.0)
T=O	7043±998 (107.5±15.2)	13988±2677 (108.5±20.8)	9122± 560 (101.6±6.2)	15802± 921 (97.9±5.7)
DEX	3075±615 (46.9± 9.4)	5424±1001 (42.1± 7.8)	3686± 420 (41.1± 4.7)	6231± 598 (38.6±3.7)
HOP	3734±715 (57.0±10.9)	6470±1975 (50.2±15.3)	4766± 250 (53.1± 2.8)	7929± 901 (49.1±5.6)
$\Delta$ HOP	2680±357 (40.9±5.4)	4731±1250 (36.7± 9.7)	3457±616 (38.5±6.9)	6003± 775 (37.2±4.8)
P	4166±866** (63.6±13.2)	7761±1325** (60.2±10.4)	9135±1101 (101.8±12.3)	15425±1216 (95.6±7.5)
$\Delta$ P	4264±757** (65.1 ±11.6)	8599±552** (66.7± 4.3)	8295±874 (92.4±9.7)	16541±1405 (102.5±8.7)

Met, metionina. U, uridina. ETOH, etanol. Los valores son expresados como dpm/10<sup>7</sup> células o como % de las incubaciones con etanol (en paréntesis) y representa la media ± desvío standard (n=3). \*\* diferente respecto +BCS p<0.05. Ver Materiales y métodos.

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

Progesterona y su  $\Delta$ -1 derivado mostraron inhibiciones que rondaron el 40 % y, en presencia de suero, perdieron completamente su actividad inhibitoria. Para analizar a qué nivel ocurre este fenómeno, se analizó el efecto del BCS sobre la disociación del complejo GR-hsp90. La Figura 25 muestra los inmunoblots de GR y hsp 90 obtenidos de hepatocitos incubados con los esteroides en estudio, incubados en presencia y en ausencia BCS. Los resultados indican el grado de disociación i.e. la transformación en un GR activo: la Figura, así como la Tabla 4 con los datos densitométricos, muestran que todos los esteroides ejercieron a distintos niveles la transformación del GR en ausencia de suero. La adición de este último abolió específicamente la transformación producida por el par P/ $\Delta$ P. La disociación ejercida por HOP también fue afectada pero en menor medida.

Con el fin de analizar el rol del suero en la interacción del esteroide con el receptor, se realizaron incubaciones de citosoles de timo en presencia y ausencia de suero. Se observó que en presencia de HOP y  $\Delta$ HOP el suero era incapaz de modificar el porcentaje de desplazamiento, mientras que con P y  $\Delta$ P el suero inhibió la unión aproximadamente 30 y 15 % respectivamente. El porcentaje de desplazamiento no se vio modificado en presencia de DEX con y sin BCS (Tabla 5).

Para dilucidar si el efecto del suero ocurría en un paso aún más temprano que la interacción del esteroide con el receptor y determinar si en el BCS había un *factor secuestrante* que impedía la entrada de progesterona y  $\Delta$ 1-progesterona a la célula evitando así su transformación y posterior actividad GC, se analizó la incorporación de



**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

<sup>3</sup>H-progesterona y <sup>3</sup>H-dexametasona (control positivo ante la imposibilidad de contar con <sup>3</sup>H-HOP) a timocitos.

**TABLA 4**

*Densidades Ópticas de la Figura 25*

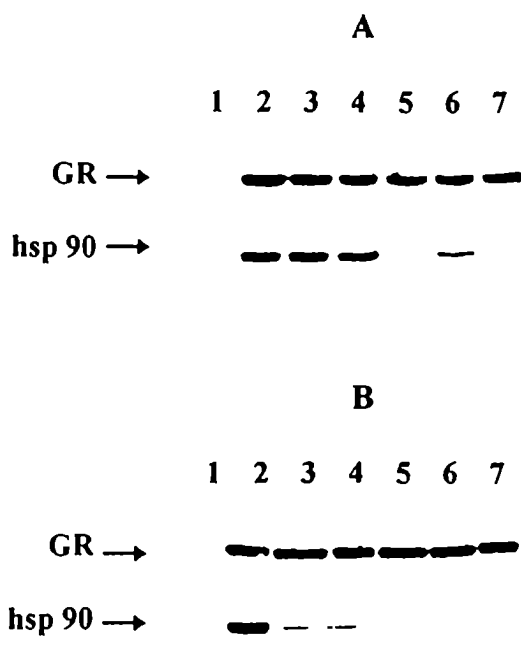
---

Densidad Óptica (unidades arbitrarias)			
Panel			
Carril	A		B
1	0.008		0.019
2	0.305		0.375
3	0.293		0.052
4	0.266		0.053
5	0.037		0.022
6	0.130		0.022
7	0.041		0.029

---

**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---



**Figura 25: Influencia del suero en el medio de incubación en la disociación del heterocomplejo GR-hsp90.** Hepatocitos de ratón fueron incubados con 1 $\mu$ M del esteroide (o vehículo) en presencia (Panel A) o ausencia (Panel B) de 10 % BCS. Los heterocomplejos de los citosoles fueron inmunoabsorbidos con: IgG no inmune (carril 1) o el anticuerpo monoclonal BuGR-2 (carriles 2 al 7). Las condiciones son: 1) IgG no inmune, 2) Vehículo, 3)  $\Delta^1$ -progesterona, 4) progesterona, 5)  $\Delta^1$ -11 $\beta$ hidroxiprogesterona, 6) 11 $\beta$ hidroxiprogesterona, 7) dexametasona.

El BCS afectó la entrada de la progesterona mostrando una disminución de un 50 % en la incorporación (-BCS: 60.12  $\pm$  5 pg, +BCS: 31.8  $\pm$  3.4 pg), mientras que DEX no mostró diferencias en presencia y ausencia de suero (-BCS: 15.7  $\pm$  2.8 pg, +BCS: 18.4  $\pm$  4.5 pg) (Figura 26).

**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

**TABLA 5**

*Efecto del suero sobre la unión de los esteroides a citosoles de timo*

---

Esteroides	% Desplazamiento -BCS <sup>a</sup>	% Desplazamiento + 10 % BCS <sup>a</sup>
DEX	13,8 $\pm$ 0,1	14,8 $\pm$ 0,4
HOP	22,1 $\pm$ 0,3	22,3 $\pm$ 0,2
$\Delta$ HOP	23,4 $\pm$ 0,3	24,4 $\pm$ 2,0
P	36,0 $\pm$ 0,8**	53,0 $\pm$ 0,4
$\Delta$ P	44,8 $\pm$ 0,1**	50,0 $\pm$ 0,6

---

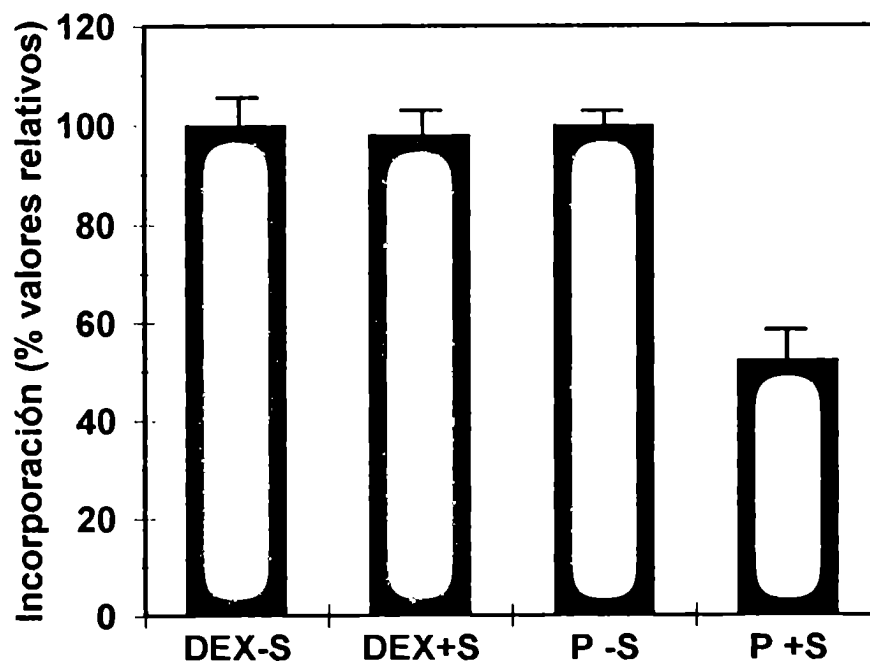
Curvas de desplazamiento con 10 nM <sup>3</sup>H-dexametasona y 100 nM de los esteroides radioinertes, en presencia o ausencia de BCS delipidado. Las incubaciones se realizaron durante 12 Hs a 0°C usando citosoles de timo (5mg de proteína/ml) como fuente de receptores. \*\* p< 0.01 % (n=3)

Se analizó, a continuación, un parámetro *in vivo*: los depósitos de glucógeno hepático donde progesterona y  $\Delta$ 1-progesterona carecieron de efecto (Tabla 6). Por el contrario y, como se indicó en la sección 3.1, HOP y  $\Delta$ HOP mostraron actividad indicando la importancia de C<sub>11</sub> OH para la aparición del efecto GC. El aumento en los depósitos de glucógeno correlacionaron con la afinidad de cada esteroide por el receptor de glucocorticoides y por transcortina (CBG), con la conocida excepción de DEX que presenta unión a GR y no se une a CBG. La baja afinidad de progesterona y  $\Delta$ 1-

**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

progesterona por CBG nos permitirían descartarla como el factor secuestrante responsable del efecto inhibitorio de la acción GC de progesterona.



**Figura 26: Efecto del suero en la captación de  $^3\text{H}$ -progesterona y  $^3\text{H}$ -dexametasona por timocitos.** Se incubaron  $22 \times 10^6$  células/ml a  $37^\circ \text{C}$  durante 30 minutos con 10 nM del esteroide radioactivo y la presencia o no de 10 % BCS delipidado. La reacción fue lineal hasta los 45 minutos para ambos esteroides. Se centrifugó a 1300 rpm/10 minutos y los pellets celulares se lavaron con 1 ml de medio RPMI-1640 frío que contenía 10 nM del esteroide correspondiente radioinerte. Los pellets se resuspendieron en un volumen de 200  $\mu\text{l}$  de PBS y se contó con centelleador 20 % de tritón X-100.

**Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

**TABLA 6**

*Depósitos de glucógeno y uniones relativas (RBAs) a GR y CBG*

Esteroides	Glucógeno <sup>a</sup>	CBG <sup>b</sup> nM	GR <sup>c</sup> nM
DEX	4.75±0.18*	>1000	11.5±0.3
HOP	3.03±0.33**	24.0±2.9	36.1±2.2
$\Delta$ HOP	2.55±0.006**	41.4±4.8	32.5±1.7
P	1.08±0.1	149±33.2	67.0±6.8
$\Delta$ P	0.87±0.17	326.2±47.5	80.2±6.1

<sup>a</sup> Ratas ADX fueron inyectadas con 100 $\mu$ g/100g peso como se describe en Materiales y Métodos. El glucógeno hepático fue purificado y cuantificado con el reactivo de Krisman (120). Los datos se expresan como veces de estimulación de las ratas inyectadas con vehículo (n=5 para cada tratamiento). \* p<0.01, \*\* p<0.05 diferentes respecto de las ratas inyectadas con vehículo.

<sup>b</sup> Curvas de desplazamiento con 5 nM <sup>3</sup>H-corticosterona y crecientes concentraciones de los esteroides radioinertes, se incubaron durante 12 Hs a 0°C usando CBG parcialmente purificada (1mg de proteína/ml).

<sup>c</sup> Curvas de desplazamiento con 10 nM <sup>3</sup>H-dexametasona y crecientes concentraciones de los esteroides radioinertes, se incubaron durante 12 Hs a 0°C usando citosoles de timo (5mg de proteína/ml). Las afinidades relativas fueron calculadas para cada esteroide como la concentración de esteroide radioinerte que desplaza el 50 % del % máximo de unión.

### **Discusión**

Nótese el modo condicional utilizado en la discusión de la sección anterior "...la 11 $\beta$ hidroxilación *sería* necesaria y suficiente para ciertas respuestas GC tales como: inducción de TAT e inhibición de la incorporación de precursores o sea que para contestar la pregunta de cuándo aparece la respuesta GC en la molécula de la progesterona habría que discriminar entre las diversas propiedades del efecto pleiotrópico".

"...que la introducción de un doble enlace 1:2 a través de las deformaciones conformacionales que produce, *aumentaría de por sí*, algunas de estas respuestas GC hasta el máximo". Este modo de expresarme respondió a la duda que teníamos acerca de la influencia en las condiciones de trabajo sobre los resultados. ¿Acaso la presencia de algunos componentes de los medios de cultivo tales como el suero de ternero podrían influenciar los resultados en un sentido u en otro produciendo así artefactos discriminatorios?

Analicemos los resultados de la presente sección: con diferencias cuantitativas, progesterona (P), 11 $\beta$ -hidroxiprogesterona (HOP) y  $\Delta$ 1-11 $\beta$ -hidroxiprogesterona ( $\Delta$ HOP) fueron capaces de disociar el complejo GR-hsp90 en medio carente de suero. Esta actividad se incrementó con las sucesivas sustituciones moleculares desde progesterona a  $\Delta$ HOP, éste último prácticamente igualando a DEX en transformar al GR. Los típicos parámetros *in vitro* para los glucocorticoides, como la inducción de TAT en hepatocitos y la inhibición de la síntesis de ARN y proteínas en timocitos, siguen

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

el mismo patrón de actividad que se citó anteriormente. En el último parámetro,  $\Delta$ HOP mostró una tendencia de superar a DEX.

La adición de 10 % BCS al medio produjo drásticos cambios: abolió la capacidad disociante, la actividad TAT y los efectos inhibitorios del par P/ $\Delta$ P pero no mostró igual comportamiento con los otros esteroides ensayados. Así, la 11 $\beta$ -hidroxilación liberaría a la estructura de la progesterona de la inhibición producida por el suero.

La disociación de la hsp 90 del GR es un evento previo que desencadena la activación del receptor (43). Esto explica el paralelismo con lo mencionado previamente: la cascada de eventos comenzaría en, o cerca de la disociación del GR y los efectos biológicos seguirían consecuentemente.

La unión del esteroide al receptor es un evento previo a la activación del GR, lo que nos llevó a plantear las siguientes preguntas: ¿el factor presente en el BCS inhibe la unión directamente de progesterona al GR?, ¿actúa afectando la disociación sin afectar la unión? o ¿el BCS posee un factor que secuestra progesterona e inhibe la captación de este esteroide por la célula?. Para las dos primeras preguntas deberíamos plantear que el factor se une a la membrana de la célula, o la atraviesa, y activaría algún mecanismo de inhibición de la unión de progesterona al receptor o la disociación. La tercera opción está apoyada por los resultados de la Figura 26, donde se observó en presencia de suero, una inhibición del 50 % en la incorporación de progesterona a timocitos. Así, Westphal et al. han mostrado repetidamente que las proteínas de la sangre podían inhibir o abolir completamente la actividad progestacional de progesterona (147,148,149). No solo transcortina, sino también el *orosomucoide*, una alfa 1-glicoproteína ácida, podía causar

### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

la pérdida de actividad progestacional. Los autores sostienen que, a pesar que las concentraciones de esta proteína son bajas, ella presenta una interacción mas fuerte con la progesterona que otras proteínas (147). Así, el orosomucoide mostró una afinidad 1000 veces mayor por progesterona que por cortisol. Años más tarde, Do et al. encontraron una proteína en el suero de bovino con unión preferencial por triamcinolona y una afinidad similar por cortisol, dexametasona y progesterona (157).

La albúmina une debilmente a progesterona pero, debido a su abundancia y su rápida disociación de los esteroides, podría suplementar el pool de progesterona libre dentro de los tejidos (153).

Otra proteína del suero que ha sido profusamente estudiada es transcortina. De acuerdo a la nueva teoría de Sitteri et al. (153), Hammond et al (23,151,152) y Rosner et al (154), transcortina promueve la liberación de los GC en las células blanco y esto implicaría una interacción con proteasas que reconocerían a transcortina debido a su estructura de Serpinas (23). Más aún, transcortina fue descripta como una proteína que posee la capacidad de unirse a membranas plasmáticas de células MCF-7, activando un sistema de segundos mensajeros (154).

En concordancia con éstos resultados y descubrimientos los esteroides estudiados que mostraron actividad GC *in vivo* son los que presentaron mayor unión por el GR y transcortina, con la excepción de DEX. Este hecho descartaría el rol secuestrante de transcortina, muy aceptado hasta hace unos años, en la respuesta GC y la plantearía como una proteína cooperativa. Podríamos especular en que transcortina, debido a su transporte de glucocorticoides selectivo y dirigido, podría ser un factor causante en las



### **Capítulo 3-Influencia de la introducción de un doble enlace 1:2 y de la 11 $\beta$ hidroxilación en la respuesta GC de la Progesterona**

---

células blanco para *preferir* GCs en lugar de progesterona. Así, si transcortina está presente en el medio, podría ser una proteína cooperativa para los GC, pero no para otros esteroides, y la 11 $\beta$ -hidroxilación de progesterona sería un factor discriminante importante entre influencias opuestas.

Todos estos conceptos hablan en favor de un rol integrativo de las proteínas de la sangre y su afinidad por los esteroides en estudio. Las proteínas pueden ser secuestrantes para un grupo de esteroides y guía hacia la célula blanco para otro. El efecto del suero en conjunto resulta pues, para cada esteroide, de la suma algebraica de varias uniones a proteínas.

Concluimos que las proteínas del suero actúan de una manera integrada, que en el caso de progesterona hay factores que la secuestrarían (¿orosomucoide?, ¿proteína con afinidad por triamcinolona?, ¿albumina? ) y hay también falta de unión a proteínas cooperativas (transcortina) impidiendo la transformación del GR y posterior efecto GC. La 11 $\beta$ -hidroxilación sería el requerimiento estructural para evitar estos efectos del suero y disparar una respuesta GC. Este sería *uno de los* mecanismos por los que esta funcionalización confiere actividad GC a los derivados de progesterona.

Queda abierta la duda si el efecto discriminatorio del suero de ternero-que afecta a los derivados 11 $\beta$ hidroxilados pero no afecta a los no 11 $\beta$ hidroxilados- es un artefacto técnico o si responde a una situación fisiológica

*o*

### Introducción

En 1940 Ingle et al, reportaron que los glucocorticoides (GC) producían reducción en el peso del timo de ratas adrenalectomizadas (158) y, años más tarde, Dougherty et al describieron a los GC como inductores de linfocitosis (159). En la actualidad, se sabe que la muerte de los linfocitos ejercida por los GC representa la activación de un programa fisiológico de muerte celular conocido como apoptosis.

Los linfocitos T, componentes del sistema inmune que maduran en el timo, poseen receptores que les permiten reconocer a los antígenos y sólo aquellos que posean receptores adecuados tendrán la capacidad de reaccionar únicamente con las sustancias extrañas. La selección de las células que poseen los receptores óptimos es por apoptosis evitando que se produzcan linfocitos defectuosos que desencadenen fenómenos de autoinmunidad. Los glucocorticoides como agentes antiinflamatorios, antialérgicos e inhibidores de la respuesta inmune en general, inducen la apoptosis en el timo.

En 1980, A. Wyllie describió la apoptosis inducida por los glucocorticoides en suspensiones de timocitos y que ésta era producida por la activación de una endonucleasa (59). Esta actividad letal está mediada por el receptor de glucocorticoides (GR) (160,161) pero éste solo no es suficiente para evocar la señal de apoptosis (162,163). Las razones por las que varias células linfoides GR+ difieren de otras en su sensibilidad a los GC son aún desconocidas. Una hipótesis es que los niveles de bcl-2 determinen la sensibilidad del timo por los GC. (164).

En el tejido neural los GC inducen apoptosis en las neuronas del hipocampo (165) y se ha sugerido que en condiciones fisiológicas los GC hacen peligrar a las células nerviosas, ya que, si son expuestas a algún stress metabólico, responderán con apoptosis.

La pérdida del epitelio uterino debido a una disminución de los niveles hormonales en la última fase secretoria del ciclo estral ocurre por apoptosis. Los estrógenos estimulan el crecimiento del epitelio uterino y la progesterona estimula su diferenciación. Una disminución de los niveles de progesterona o el uso de antiprogestágenos, como el RU486, resulta en apoptosis de las células epiteliales sin cambio en las células del estroma uterino (166). Bcl-2 es expresado en las células del endometrio uterino y se sugirió que podría estar asociado al fenómeno de apoptosis mediada por hormonas esteroides (167). En el epitelio uterino humano, la expresión de bcl-2, predomina al final de la fase folicular y es mínima o ausente en la fase secretoria, cuando la apoptosis se hace visible. Este hecho plantea la posibilidad que bcl-2 esté involucrado en la protección contra la apoptosis durante la fase proliferativa del ciclo menstrual. bcl-2 podría ser blanco de la acción de las hormonas esteroides ya que posee, en su secuencia promotora, elementos que responden a las hormonas (HREs). (168)

En 1997 Pecci et al describieron que la administración de progesterona a una línea celular de endometrio que expresa el receptor de progesterona no sólo incrementaba los niveles del mensajero de bcl-x, sino que modificaba el cociente bcl-xcorto/bcl-xlargo, a favor de la isoforma antiapoptótica. Las cantidades de mensajeros de bcl-x y sus isoformas podrían representar el mecanismo por el cual progesterona controla la muerte celular en las células epiteliales de endometrio. (140)

En el ovario, la atresia de los folículos ováricos ocurre por apoptosis y el tratamiento *in vivo* con gonadotropina coriónica (eCG) provoca una disminución en el número de células de la granulosa apoptóticas y de folículos atrésicos. El tratamiento con eCG a ratas inmaduras produce una disminución en los niveles del mRNA de bax, mientras que los niveles de bcl-xlargo (bcl-xL) y bcl-2 no se modifican. Se ha propuesto que, en el ovario, los cocientes bax/bcl-L y bax/bcl-2 pueden ser importantes en la decisión de los folículos ováricos de morir o sobrevivir.(169)

En la presente sección se estudió la función de distintos GC como reguladores de la inducción de apoptosis, analizándose el efecto de los mismos sobre la fragmentación del ADN y sobre la expresión de los genes de la familia de bcl-2. Se eligieron dos tipos celulares diferentes: timocitos, donde los GC inducen apoptosis, y células de epitelio uterino donde estudios preliminares mostraron la respuesta contraria de DEX, en efecto este esteroide sintético, mantiene la viabilidad en estas células en condiciones de bajo suero.

Los GC inducen, en timo, la ruptura del ADN en pequeños fragmentos múltiples de 100 pb en un patrón similar a una “escalera” cuando son corridos en geles de agarosa. Este efecto es parte de un proceso que ocurre a un nivel mayor: la muerte celular programada o apoptosis que inducen los GC en el timo. Cuando ratas adrenalectomizadas fueron tratadas con una dosis de 5 mg/kg de DEX, se extrajeron los timos y se aisló finalmente el ADN apoptótico de los timocitos, se observó el patrón característico de apoptosis Usando este ensayo que permite aislar el ADN apoptótico (134), HOP y  $\Delta$ HOP se

mostraron como débiles inductores de la apoptosis a pesar de que ambos transformaron efectivamente el GR.

### **Materiales y Métodos**

#### **Cultivo celular y tratamientos:**

Las células RENTRO I fueron crecidas en platos de plástico (Greiner) en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (FCS) y 5 % de suero de ternero neonato conteniendo: penicilina (100 IU/ml), streptomina (100µg/ml) y glutamina (2mM) a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5 % CO<sub>2</sub>. Las hormonas fueron suministradas a partir de soluciones concentradas 1000 veces en etanol. Las células fueron cuantificadas con una cámara de Neubauer y la viabilidad fue determinada por el método de exclusión de Azul de Tripán.

**Apoptosis en la línea celular RENTRO I:** Las células fueron pretratadas durante 9 horas en medio con 10 % CS-FCS (170). y luego 12 horas con 1% CS-FCS seguidas de 36 horas en 1 % CS-FCS con el agregado de los distintos esteroides.

Finalizada la incubación con los esteroides (DEX, HOP, ΔHOP) se aspiró el medio y se agregó 1 ml de TBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Fosfato de potasio monobásico 0.9 mM, Fosfato de sodio dibásico 6.4 mM, 25 mM Tris) se cosecharon las células con rubber policeman y se colocaron en tubos de 1 ml. El ADN de las células fue obtenido de acuerdo al método de Herrmann et al (134) descrito en el capítulo 2. El ADN fue precipitado y resuelto en un gel de agarosa 1.65% que contenía 0.5 % de bromuro de

etidio. Una escalera de 100 pb fue usada como marcador de peso molecular. El área correspondiente a los fragmentos de ADN fue cuantificada por densitometría y usada para estimar los cambios en la proporción de ADN apoptótico luego del tratamiento hormonal.

### **Apoptosis en timo:**

Ratas macho Sprague-Dawley (180-200 g) adrenalectomizadas 48 horas antes del día del experimento fueron inyectadas i.p. con 0.5 mg esteroide/100 g peso corporal. Luego de 5 horas se sacrificaron los animales. Se obtuvieron los timocitos de la siguiente manera: se extrajeron los timos, se limpiaron, cortaron en trozos pequeños, se filtró a través de 8-10 capas de gasa y las células fueron lavadas con medio RPMI-1640. Se resuspendieron las células en aprox. 4 ml de medio y fueron contadas con cámara de Neubauer con Azul de Tripán a fin de analizar su viabilidad. El ADN de las células fue obtenido de acuerdo al método de Herrmann et al (134).

### **Inducción de la actividad cloroanfenicol acetil transferasa (CAT) y luciferasa**

**(LUC):** Se realizaron transfecciones transientes utilizando con los vectores de expresión en mamíferos pGRE<sub>2</sub>-tk-CAT y MMTV-LUC utilizando el método de fosfato de calcio descrito en el capítulo 2, de acuerdo a Chen et al (136). Finalizadas las transfecciones, las células fueron incubadas a 37° C durante 10 horas con medio DMEM 10 % CS-FCS, seguido de 36 horas con los distintos esteroides. El extracto protéico se obtuvo mediante tres ciclos de congelado y descongelado y una posterior centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos. La actividad enzimática CAT fue medida de acuerdo a lo descrito en la sección 3.1 (137). La actividad luciferasa (LUC) fue medida de acuerdo a lo descrito

en la sección 3.1 (138). Como referencia interna se cotransfectaron 3  $\mu$ g pRSV-LUC y pRSV- $\beta$ gal, respectivamente.

**Extracción del ARN de las células RENTRO I:**

El ARN total se aisló siguiendo el método descrito por Chomczynsky et al (171). Brevemente, se aspiró el medio de las células y se agregaron 4 ml de solución desnaturizante (4 M tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio pH=7, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.5 % sarcosil), la solución se transfirió a tubos estériles. Se extrajo el ARN total con 0.8 ml acetato de sodio pH=4; 4 ml de fenol saturado en agua y 0.8 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (49: 1). La mezcla se incubó 15 minutos a 4°C y se centrifugó 30 minutos a 9000 rpm a 4 °C. El ARN contenido en la fase acuosa se precipitó por agregado de 1 volumen de isopropanol. Se resuspendió el pellet en 0.3 ml de solución de desnaturización y se procedió a una segunda precipitación. El ARN obtenido se disolvió en agua previamente tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

**Extracción de ARN de timos:**

Ratas macho Sprague-Dawley (180-200 g) adreoprivas 48 horas antes del día del experimento fueron inyectadas i.p. con 0.5 mg esteroide/100 g peso corporal. A las 0.5 y 1 horas fueron sacrificadas y se les extirparon los timos. Estos fueron homogeneizados con la solución desnaturizante (4 M tiocianato de guanidinio, 25 mM citrato de sodio pH=7, 0.1 M  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.5 % sarcosil) en una relación de 4 ml de solución desnaturizante por timo. Se transfirieron a tubos estériles. A partir de este paso, se realizó el mismo protocolo descrito en extracción de ARN de las células RENTRO I.



**Análisis del ARN:**

Para la preparación de la ribosonda de bcl-x, el plásmido pGLD3 gentilmente cedido por J. M. Hardwick (The John Hopkins Hospital, Baltimore, MD) fue digerido con Hinf I y transcripto con la RNA polimerasa T3. El tamaño del transcripto fue de 294 pb, siendo los fragmentos protegidos para bcl-xlargo y bcl-xcorto 237 y 155 pb, respectivamente. Como control interno se utilizó una ribosonda conteniendo la secuencia de la enzima GAPDH. El plásmido pTRIGAPDH fue digerido con Bgl I y transcripto con la RNA polimerasa T3. El largo de la sonda fue de 204 pb y el tamaño del fragmento protegido 145 pb. Las sondas de ARN fueron marcadas con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP siguiendo el protocolo que indica el fabricante (Promega). Brevemente, se hizo una incubación durante 90 minutos a 40° C para cada una de las ribosondas con buffer transcripción (Tris HCl 40 mM pH 7.5, 6 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 2 mM spermidina, 10 mM NaCl), 10mM DTT, 20 Unidades Rnasin, 0.5 mM de cada uno de los NTPs (GTP, UTP, ATP), 12  $\mu$ M CTP, 1  $\mu$ g ADN, 50  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP concentración final: 10 mCi/ml, 1 Unidad polimerasa. Luego se agregó 1 Unidad de DNAsa RQI y se incubó 15 minutos a 37° C. Las ribosondas fueron purificadas a través del pasaje de la mezcla de reacción por una columna de Sephadex G-50 (Nick columns, Pharmacia). La hibridización se realizó de la siguiente manera: 30  $\mu$ g de ARN, 1.000.000 cpm de la ribosonda bcl-x y 20.000 cpm de la ribosonda GAPDH fueron coprecipitados y se disolvieron en buffer hibridización. El ARN se desnaturalizó por calentamiento a 95°C durante 10 minutos. La hibridización se llevó a cabo durante 18 horas a 52°C. La hibridización se detuvo por el agregado de buffer digestión (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl) conteniendo 2 $\mu$ g/ml RNAsa T1 y

40 µg/ml RNasa A. El ARN no hibridizado se digirió durante 1 hora a 37 °C y luego las proteínas fueron desnaturalizadas por agregado de proteinasa K (100 µg) y SDS (concentración final: 6%) durante 1 hora a 40 °C. Los fragmentos de ARN hibridados con la sonda se precipitaron, extrajeron con fenol : cloroformo y se precipitaron con 70 % etanol. Los ARN precipitados se resuspendieron en buffer de siembra y se resolvieron por PAGE 5 % acrilamida y 8 M urea. Las cuantificaciones se realizaron con Phospho-imager usando el programa Image-Quant y, en todos los casos, fueron normalizadas contra la señal de GAPDH.

### Resultados

La línea celular RENTRO I constituye una herramienta muy útil para el estudio de la respuesta GC ya que no posee receptores a hormonas esteroides, excepto glucocorticoides (GR) (135). Para corroborarlo, se realizaron transfecciones transientes con dos plásmidos que responden a los GC, el pGRE<sub>2</sub>-tk-CAT y el MMTV-LUC, y se trataron las células con 10<sup>-8</sup> M dexametasona (DEX). Como se observa en la Tabla 7 y en la Figura 27, DEX indujo entre 12 y 14 veces la actividad de ambos genes reporter mientras que R-5020, el agonista específico del receptor de progesterona, no se diferenció de la inducción basal.

En la Figura 28 se muestra la dependencia del suero y esteroides en el crecimiento de la línea celular RENTRO I. Así, en presencia de 10 % CS-FCS, DEX no estimuló diferencialmente el crecimiento respecto de las células incubadas con Etanol (Control)

(Panel A). Cuando se reduce la concentración del CS-FCS presente en el medio a 1 %, las células crecidas en presencia de DEX mantienen su viabilidad, mientras que ésta

**TABLA 7**

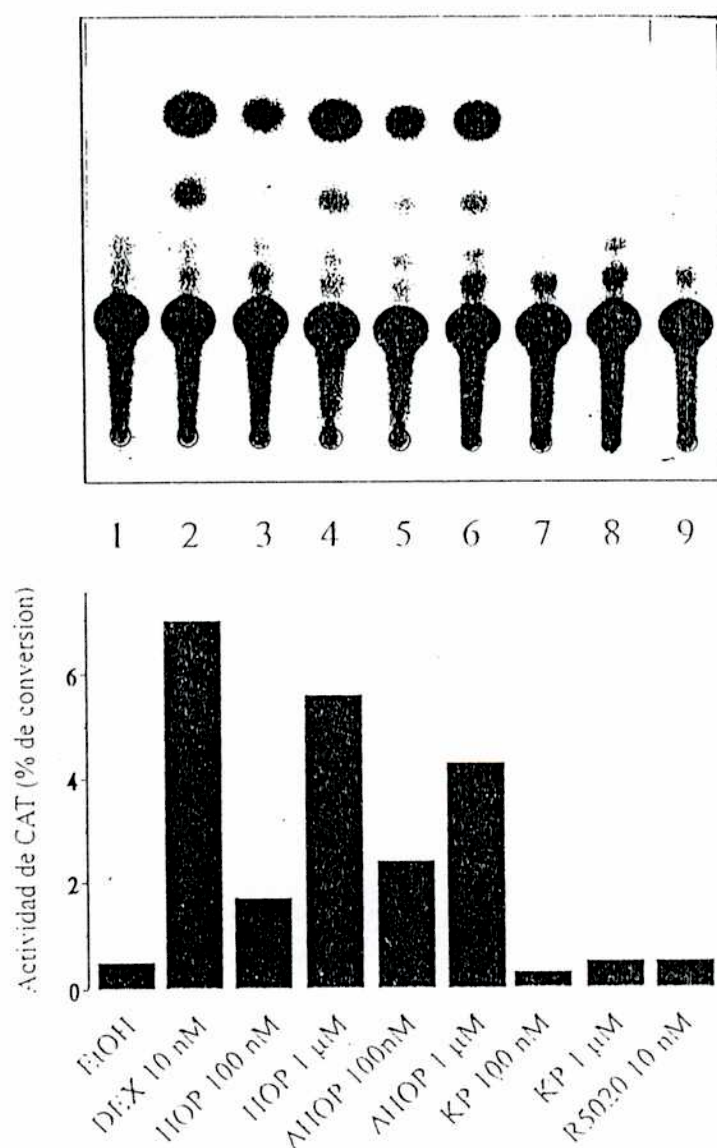
*Respuesta de las células RENTRO-I transfectadas con el plásmido MMTV-LUC*

Hormona	Actividad Luciferasa (U/mg de proteína)
<b>Etanol (Control)</b>	<b>2.14</b>
<b>DEX 10<sup>-8</sup>M</b>	<b>26.8</b>
<b>HOP 10<sup>-7</sup>M</b>	<b>1.78</b>
<b>HOP 10<sup>-6</sup>M</b>	<b>13.9</b>
<b>ΔHOP 10<sup>-7</sup>M</b>	<b>1.20</b>
<b>ΔHOP 10<sup>-6</sup>M</b>	<b>9.08</b>
<b>KP 10<sup>-7</sup>M</b>	<b>1.90</b>
<b>KP 10<sup>-6</sup>M</b>	<b>2.17</b>
<b>R-5020 10<sup>-8</sup>M</b>	<b>1.97</b>

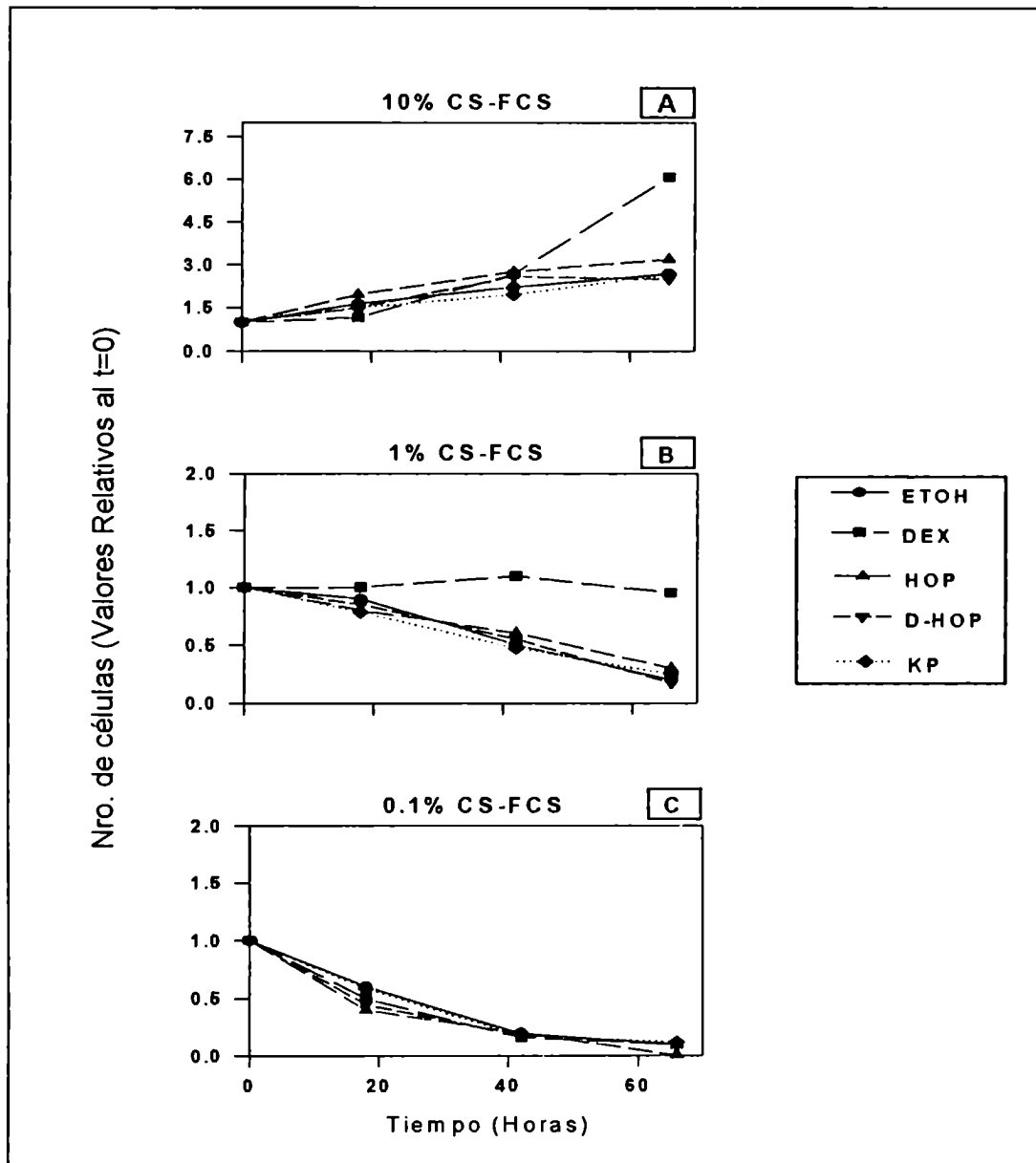
**Se realizaron transfecciones transientes en la línea celular RENTRO I utilizando el vector de expresión en mamíferos MMTV-LUC de acuerdo a Chen et al (136).**

disminuye en células incubadas con Etanol (Panel B). En presencia de una concentración aún menor de suero, 0.1 %, no se observó el efecto “protector” de los GC y todos los tratamientos condujeron a una significativa disminución en el número de células viables (Panel C)

Con el fin de analizar si este “efecto protector” provocado por los GC es debido a una inhibición de la apoptosis inducida en esas condiciones, se extrajo el ADN apoptótico de células incubadas con los esteroides en presencia de 1 % CS-FCS y se analizó el patrón en escalera de cada uno de los tratamientos.



**Figura 27: Respuesta de las células RENTRO-1 transfectadas con el plásmido pGRE<sub>2</sub>-tk-CAT.** Las células RENTRO-1 fueron transfectadas con el plásmido pGRE<sub>2</sub>-tk-CAT e incubadas con los esteroides en las concentraciones que se indican.



**Figura 28: Influencia de las diferentes concentraciones de suero fetal bovino delipidado (CS-FCS) y las hormonas en el crecimiento de las células RENTRO I.** Las células fueron pretratadas durante 20 Horas con 1 %FCS (sin carbón) previas al tratamiento con las concentraciones de CS-FCS que se indican. Las células viables fueron contadas luego de los tiempos indicados. Las curvas de crecimiento corresponden a un experimento representativo de tres realizados.

En la Figura 29 se observa que, en las condiciones estudiadas, 1% CS-FCS, las células murieron por apoptosis y el tratamiento con DEX inhibió la muerte celular programada.

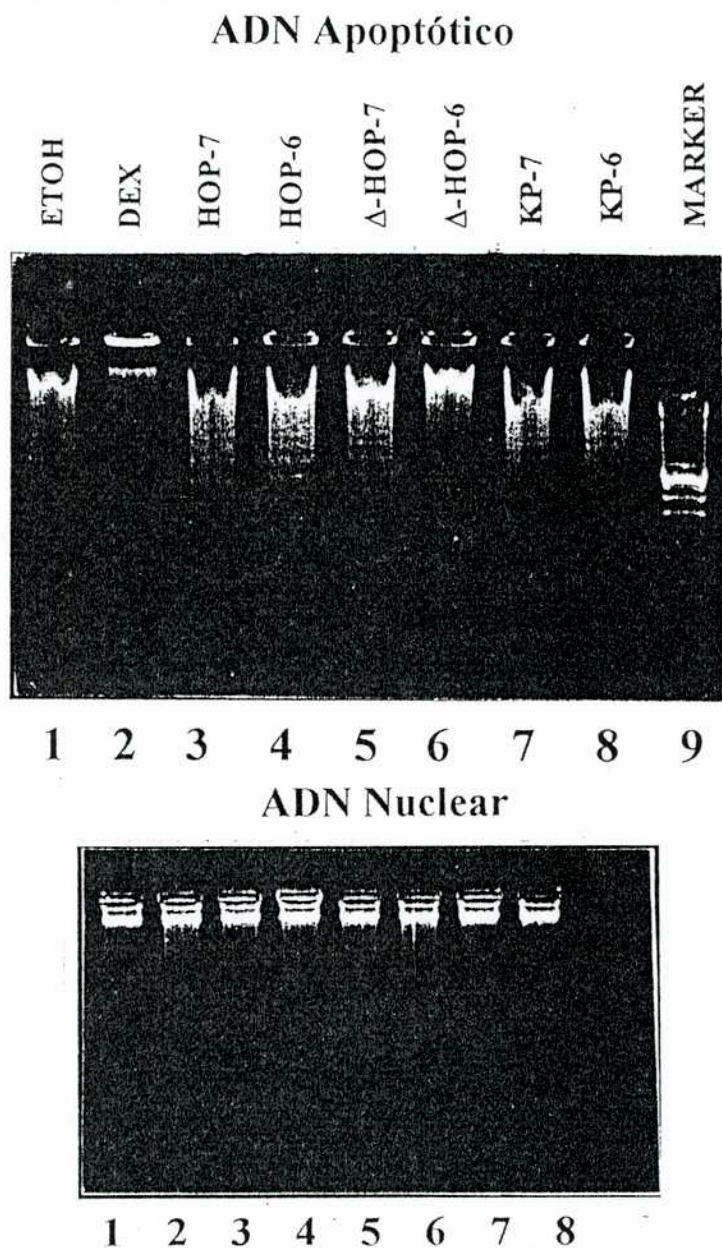
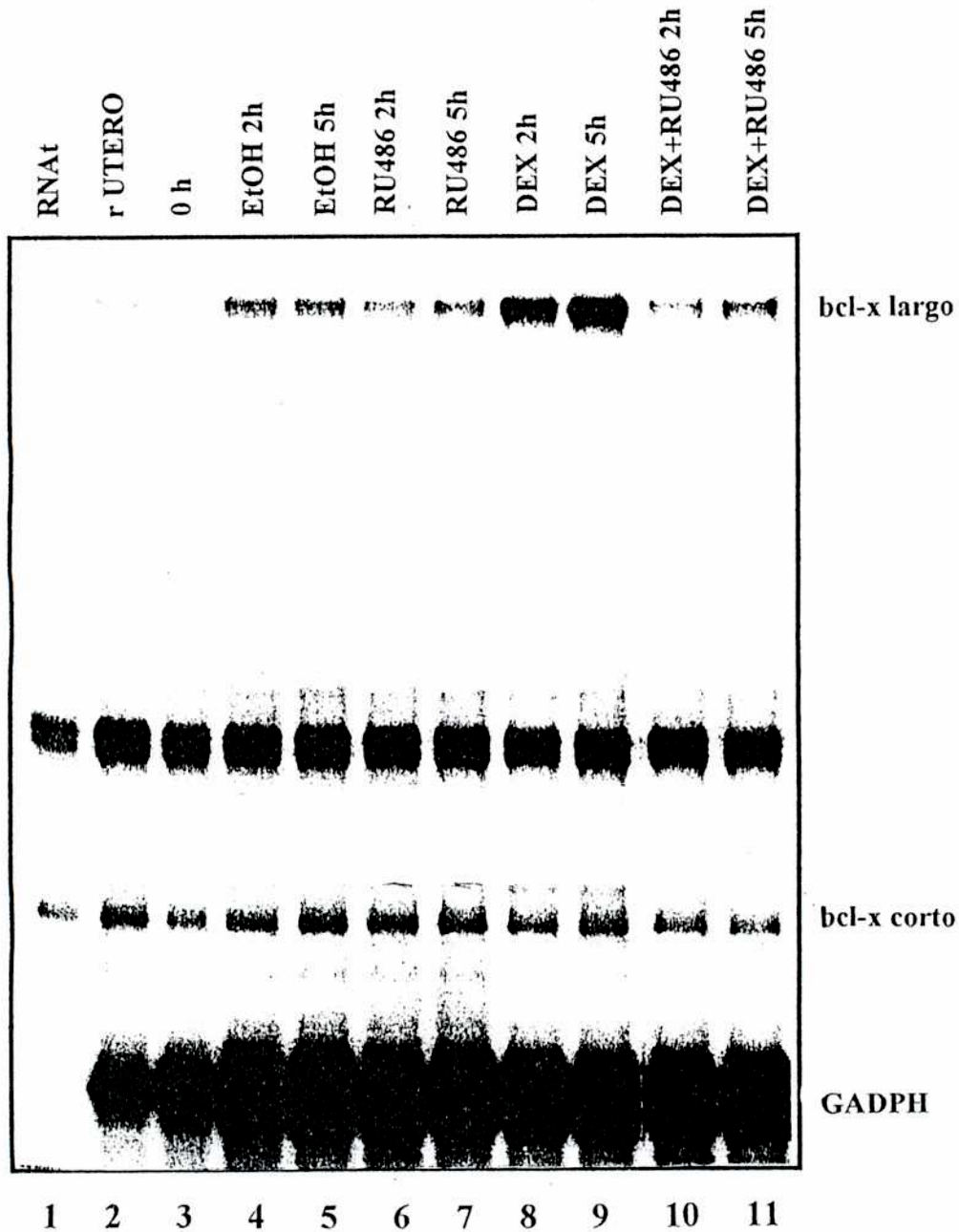


Figura 29: Análisis del ADN de la línea celular RENTRO I. Las células fueron pretratadas durante 9 horas en medio con 10 % CS-FCS (170), y luego 12 horas con 1% CS-FCS seguidas de 36 horas en 1 % CS-FCS con el agregado de los distintos esteroides. La extracción del ADN apoptótico se realizó de acuerdo a Herrmann et al (134). El ADN se corrió en un gel de agarosa 1.5 % y fue teñido con Bromuro de Etidio.

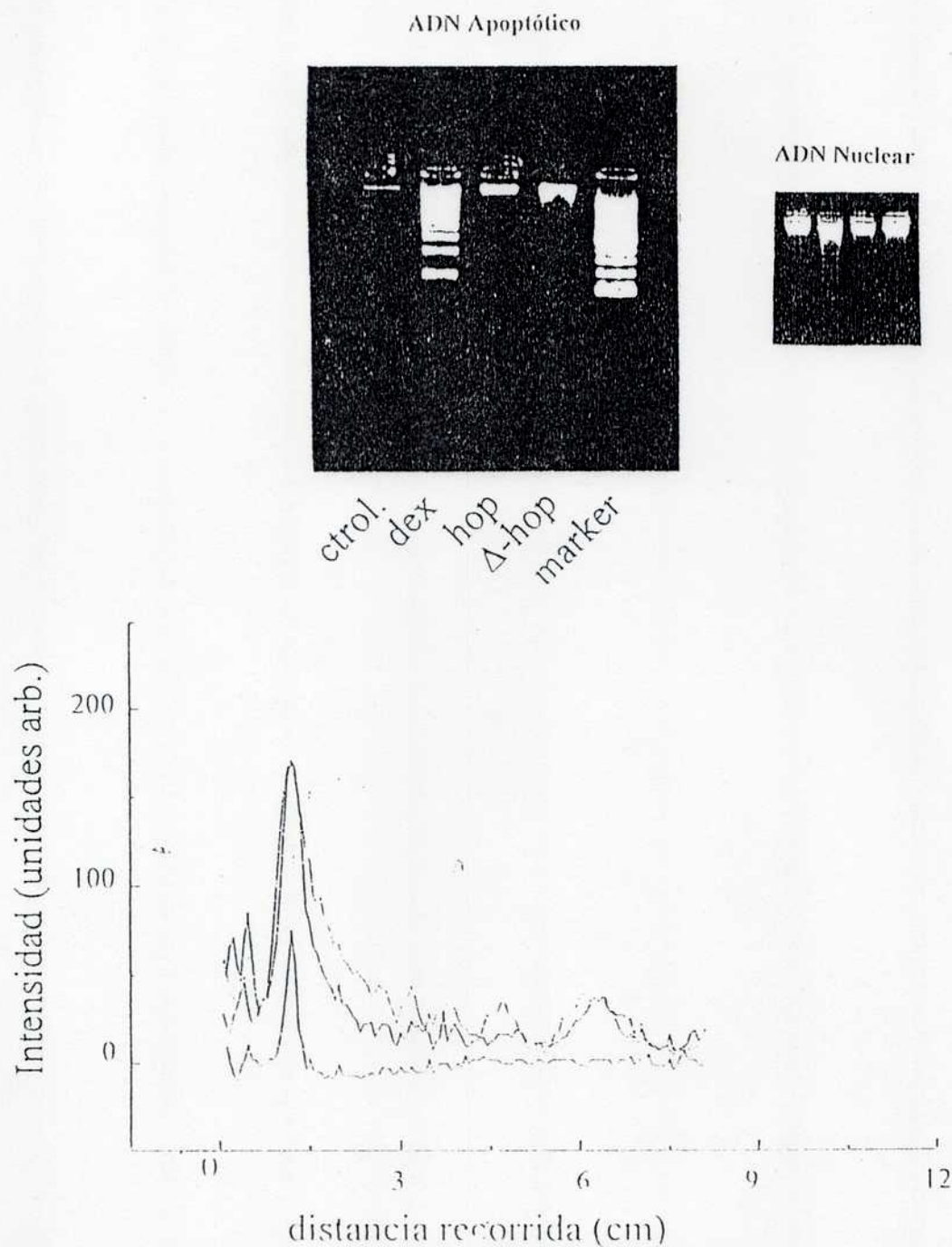
A continuación, se analizó la posible correlación entre el resultado obtenido y los niveles de los miembros de la familia del gen *bcl-2*. Previamente, se intentó medir *bcl-2* pero los niveles fueron indetectables (datos no mostrados), lo que hizo al sistema más interesante aún, ya que se observaba una inhibición de la apoptosis en ausencia de niveles detectables de *bcl-2*. Se analizaron luego los niveles de *bcl-x* mediante ensayos de protección a RNasas en la línea celular RENTRO I (Figura 30). Cuando se cuantificaron los mensajeros, se observó que el tratamiento con DEX produjo un aumento de los niveles de ARN mensajero de *bcl-x* ( $\Sigma$  *bcl-x* corto y largo) que se hace visible a las 2 horas (Etanol: 1, DEX: 4.6) (carril 8) y crece a las 5 horas (Etanol: 1, DEX: 7.1) (carril 9) de tratamiento hormonal. Este efecto es anulado por el antagonista RU486 (carriles 10 y 11) indicando que el efecto está mediado por GR. Por otro lado, el análisis de la relación *bcl-x* corto/largo demostró que el tratamiento hormonal disminuía ese cociente en favor de un mayor nivel de transcripción correspondiente a la isoforma *bcl-xL* antiapoptótica (Etanol: 0.24, DEX 2Hs: 0.09, DEX 5 Hs: 0.07).

A continuación, resultó muy interesante comparar los resultados obtenidos en este sistema, donde los GC son inhibidores de la apoptosis, con el sistema clásico en el que los GC son inductores de la apoptosis: la acción *in vivo* de dexametasona en timo de rata. En la Figura 31 se observa que una dosis de 5 mg/kg de dexametasona induce el patrón en escalera característico de la apoptosis en timos de ratas adrenalectomizadas. El análisis del ARN extraído de los timos, que se observa en la Figura 32, reveló que los niveles de *bcl-x* ( $\Sigma$  *bcl-x* corto y largo) disminuyeron con el tratamiento con DEX respecto de los animales inyectados con vehículo (Vehículo: 1, DEX 2 Hs: 0.45) (Figura 32-B).

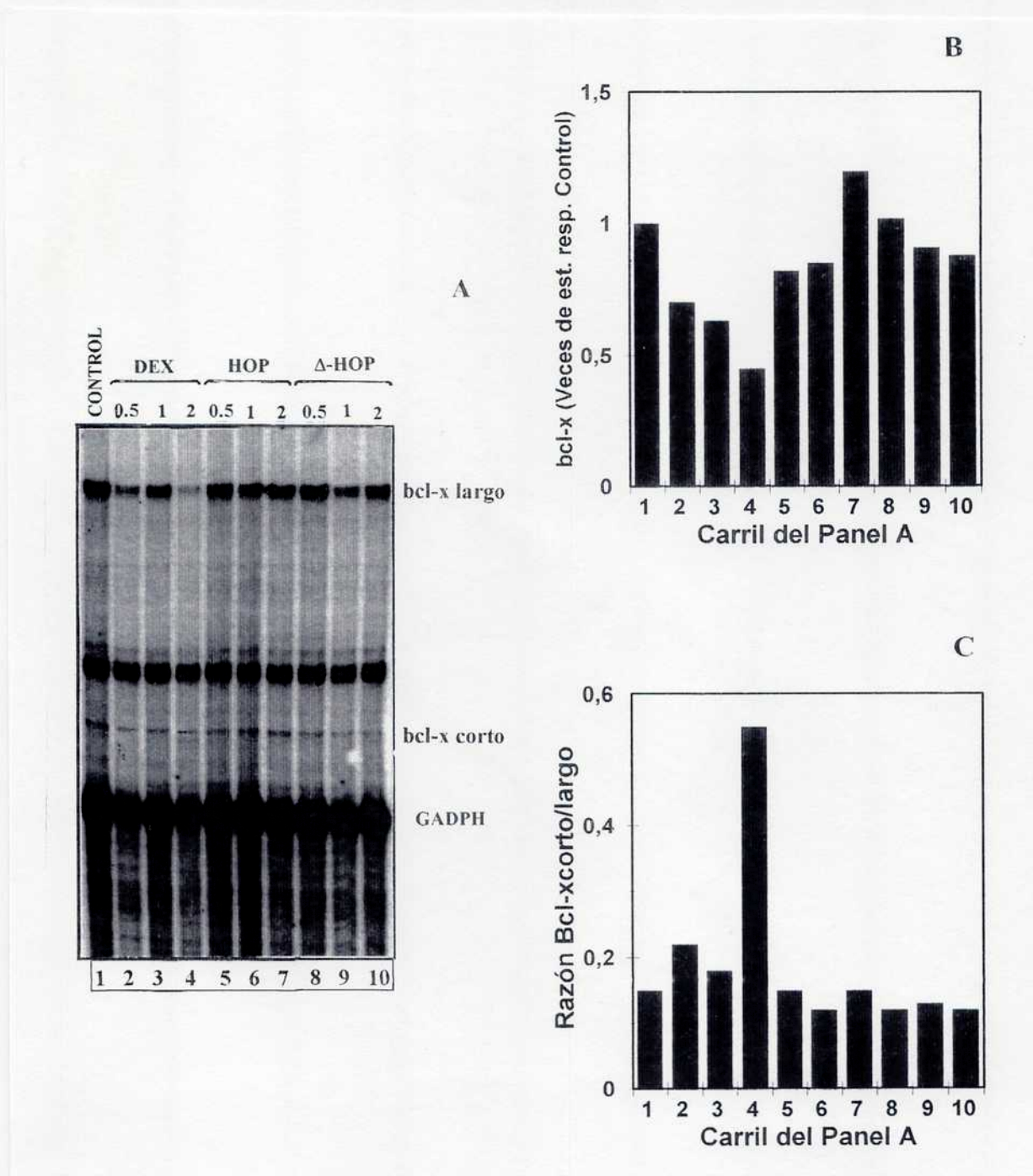


**Figura 30: Ensayos de protección a RNAsas para detectar los transcritos de *bcl-x* en Células RENTRO I.** Las células fueron incubadas durante 2 Hs (carriles 4, 6, 8 y 10) y 5 Hs (carriles 5, 7, 9 y 11) en presencia de 1% CS-FCS y las hormonas (o etanol) que se indican en la parte superior del gráfico. El ARN total se aisló siguiendo el método descrito por (171) y el análisis del ARN se realizó según lo indicado en Materiales y Métodos. Se señalan las bandas protegidas de ambas isoformas del gen *bcl-x*. El tRNA es el control negativo y el rÚtero el control positivo.





**Figura 31: Apoptosis en timo.** Ratas ADX fueron inyectadas con 0.5 mg/100 g peso corporal de los esteroides DEX, HOP y  $\Delta$ HOP y sacrificadas 5 horas después. Se analizó el ADN apoptótico de los timocitos mediante el método de Herrmann et al (134). Los tratamientos son los que se indican bajo cada carril (Panel izquierdo). El ADN nuclear es utilizado como control de recuperación (Panel derecho) y se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb.



**Figura 32: Ensayo de protección a RNAsas en timo.** Ratas ADX fueron inyectadas con 0.5 mg/100 g peso corporal de los esteroides DEX, HOP y ΔHOP y sacrificadas 0.5, 1 y 2 horas después. El ARN total se aisló siguiendo el método descrito en (171) y el análisis del ARN se realizó según lo indicado en Materiales y Métodos. Se señalan las bandas protegidas de ambas isoformas del gen bcl-x (Panel A). En el Panel B se cuantificaron los niveles de los transcritos de bcl-x/GAPDH del Panel A. En el Panel C se cuantificó la relación bcl-xcorto/largo para cada tratamiento del Panel A. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados donde el error fue menor al 5%.

La relación bcl-x corto/largo se vió incrementada con el tratamiento con DEX haciéndose visible a las 2 horas (Vehículo: 0.14, DEX: 0.51) (Figura 32-C).

En dos sistemas donde los GC cumplen funciones antagónicas, éstas, en parte, estarían mediadas por una modificación en los niveles de transcriptos de las distintas isoformas del gen bcl-x, específicamente, el cociente bcl-x corto/largo.

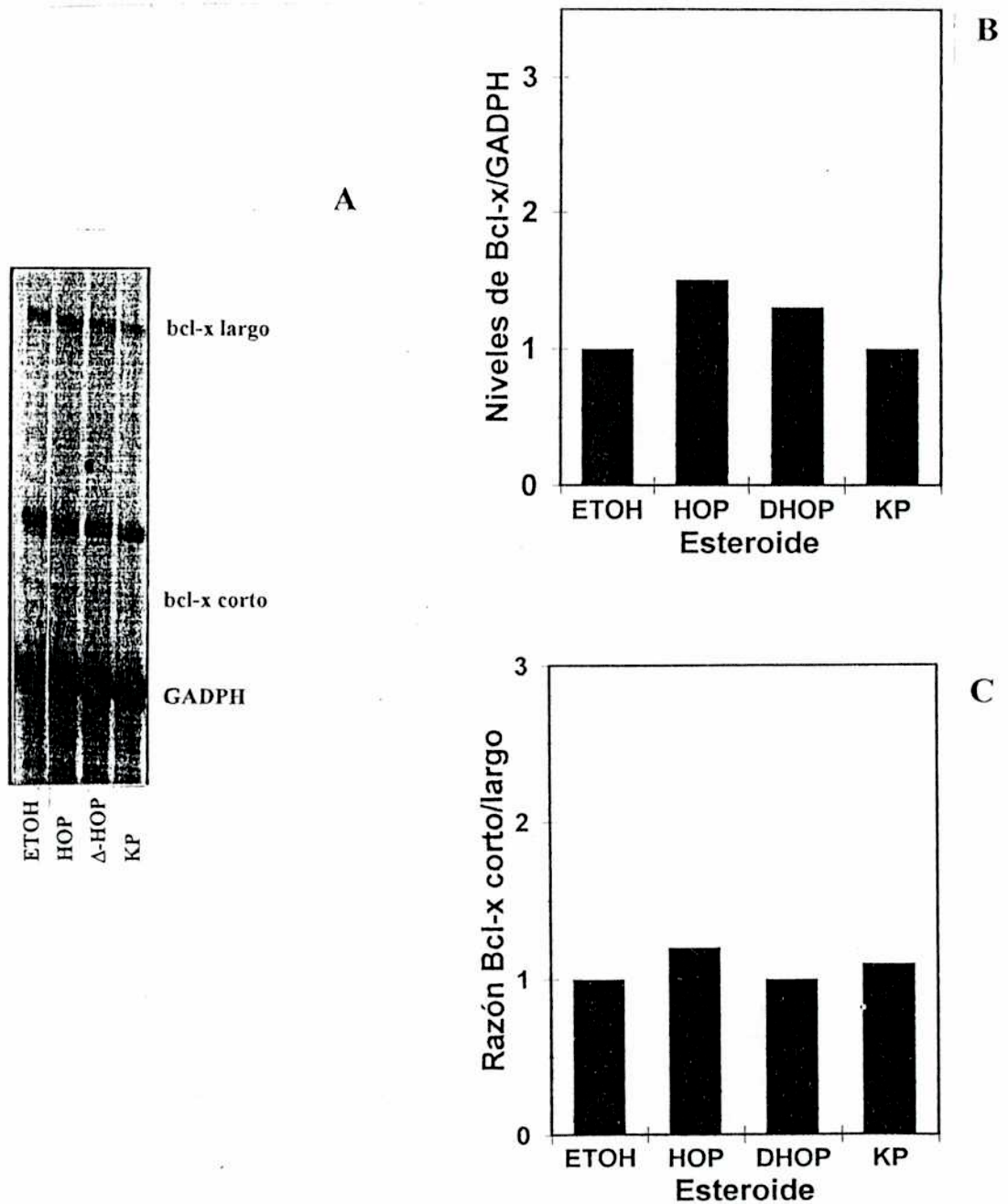
Cuando se realizaron transfecciones transientes con los plásmidos pGRE<sub>2</sub>-tk-CAT y el MMTV-LUC en la línea celular RENTRO I, se observó que HOP y  $\Delta$ HOP estimularon en forma similar y dosis dependiente los genes reporter, pero cuando se los comparaba con DEX estimularon recién a una concentración de 100 nM y mostraban sólo el 20 % de la inducción (Tabla 7 y Figura 27). El esteroide 11 cetoprogesterona (KP), que carece del C<sub>11</sub>-OH, fue incapaz de inducir ambos genes reporter.

Se realizaron curvas de crecimiento bajo las distintas condiciones de suero en presencia de HOP,  $\Delta$ HOP y KP. Los esteroides no mostraron capacidad de proteger a las células del efecto apoptótico producido por la disminución al 1 % del CS-FCS (Figura 28).

Cuando los parámetros analizados para DEX fueron estudiados con HOP,  $\Delta$ HOP y KP, se observó que no inhibieron la apoptosis, a las distintas concentraciones probadas, en la línea celular RENTRO I (Figura 29) y no produjeron modificación en los niveles de bcl-x, ni en el cociente bcl-x corto/largo (Figura 33).

Se analizó el efecto inductor de apoptosis producido por HOP y  $\Delta$ HOP en timo. 5 mg/kg de los esteroides fueron inyectados y se sacrificaron los animales a las 0.5, 1 y 2 horas post-inyección. Se observó que HOP no indujo fragmentación del ADN en escalera, mientras que  $\Delta$ HOP solo presentó un efecto muy débil (Figura 31). Se analizaron los

niveles de mensajeros de bcl-x para cada uno de los tratamientos *in vivo* y no se observaron diferencias tanto en los niveles de transcritos como en el cociente bcl-xcorto/largo (Figura 32).



**Figura 33: Ensayos de protección a RNAsas para detectar los transcritos de bcl-x en Células RENTRO I.** Las células fueron incubadas durante 5 Hs en presencia de 1% CS-FCS y HOP,  $\Delta$ HOP y KP. El ARN total se aisló siguiendo el método descrito en (171) y el análisis del ARN se realizó según lo indicado en Materiales y Métodos. Se señalan las bandas protegidas de ambas isoformas del gen bcl-x (Panel A). En el Panel B se cuantificaron los niveles de los transcritos de bcl-x/GADPH del Panel A. En el Panel C se cuantificó la relación bcl-xcorto/largo para cada tratamiento del Panel A. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados donde el error fue menor al 5%.

## Discusión

En el presente capítulo, se ha analizado el rol de los GC en el control de la apoptosis, en dos sistemas donde poseen un rol antagónico. En la línea celular RENTRO I, que representa un modelo del fenotipo observado en el epitelio uterino, la falta de suero en el medio de incubación indujo apoptosis, la cual fue revertida por dexametasona. La acción antiapoptótica de GC no puede ser explicada, en este caso, por un aumento en los niveles de bcl-2, ya que la expresión de dicho gen, en este tipo celular, fue indetectable. Sin embargo, el efecto antiapoptótico sí se correlaciona con un cambio en la expresión de las dos isoformas del gen bcl-x: favoreciendo la expresión de bcl-xL (isoforma antiapoptótica) bajo el tratamiento hormonal. Los GC producen, en RENTRO I, una disminución de la relación bcl-x corto/bcl-x largo.

En el timo, donde los GC son inductores de apoptosis, el efecto apoptótico se correlacionó con un cambio en la expresión de las dos isoformas del gen bcl-x, favoreciendo, en este caso, la expresión de bcl-xC bajo el tratamiento hormonal, invirtiéndose la relación descrita para la línea celular RENTRO I. bcl-xL regula el proceso de diferenciación de los timocitos a través de su papel antiapoptótico (172).

Recientemente, Chang et al (173) han reportado en una línea celular de cáncer gástrico que la inducción de apoptosis con inhibidores de la síntesis de ARN y proteínas, es acompañada por un aumento en los niveles de bcl-xC. Los GC, en este tipo celular, inhiben apoptosis suprimiendo el aumento en los niveles de bcl-xC y aumentando el nivel basal de bcl-xL. (173)

Cuando se analizó en profundidad el papel que juegan los esteroides HOP y  $\Delta$ HOP en la regulación de la apoptosis se observó que, a diferencia de otros parámetros GC como incorporación de precursores en timocitos o los depósitos de glucógeno *in vivo*, no mostraron efecto en la fragmentación del ADN y no modificaron los niveles de los mensajeros del gen *bcl-x*.

A pesar que se han descrito casos de apoptosis sin “patrón en escalera” y viceversa, el hecho que HOP y  $\Delta$ HOP no hayan afectado el nivel de fragmentación del ADN en dos sistemas distintos (timo y línea celular RENTRO I) y que en el análisis de los marcadores de apoptosis de la familia del gen *bcl-2* no hayan mostrado diferencias, nos lleva a concluir que su papel en la apoptosis es débil o nulo, confirmando la disociación a nivel de los órganos blanco de los GC descrita en la sección 3.1.

Los GC ejercen su acción a través de la unión a un receptor específico, transformándolo. El complejo hormona-receptor se transloca al núcleo y allí, interactúa con las secuencias que responden a los GC (GREs, elementos de respuesta a glucocorticoides). La secuencia PuG(G/A)ACA corresponde a la mitad del GRE y debe estar a una distancia de 3 pb de la otra mitad del palíndromo para ser un GRE activo. Cuando se analiza la secuencia del gen *bcl-x* se observa que no posee GREs lo que nos plantea la siguiente pregunta: ¿Cómo los GC regulan la transcripción de un gen que no posee GREs? Una posible explicación la podemos encontrar en el mecanismo de acción del GR de tipo II (Véase Introducción) en el que no se requiere la interacción del receptor con la secuencia GRE sino que la regulación de la transcripción ocurre por captura de una proteína activadora (AP-1).

Por otro lado, la acción de las hormonas esteroideas ha sido recientemente ligada a las vías de la activación de las protein quinasas A y C (174). Así, los GC deberían sinergizar con otras vías metabólicas y de transducción de señales para conducir a la apoptosis.

La causa por la cual los GC en algunos tejidos inducen apoptosis y en otros la inhiben no ha sido aún dilucidada. Es muy probable que se encuentre relacionado con la expresión de factores tejido específicos que conducen hacia una vía o la otra.

Los resultados integrados de este capítulo y el que le antecede permiten discriminar claramente entre la respuesta GC consistente en la captación de precursores en timocitos -que es inducible por HOP y  $\Delta$ HOP- con características muy particulares para la segunda -y la apoptosis e involución del peso del timo-, propiedades que practicamente no se hallan afectadas por dichos esteroideas. Esto confirmaría la independencia de ambos grupos de respuesta GC (también confirmada verbalmente por JA Cidlowski a CPL).



***21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona: Un nuevo esteroide sintético con propiedades antigluocorticoides específicas***

### **Introducción**

Como vimos antes, el receptor de glucocorticoides clonado en 1985 (175), es miembro de una superfamilia de receptores intracelulares que funcionan como factores de transcripción activados por ligando (176). Como hemos dicho, los esteroides requieren la torsión del anillo A hacia la cara  $\alpha$  para presentar una actividad GC óptima (109,110). De otra manera, los agonistas mineralocorticoides (MC) precisan de una conformación plana para presentar actividad  $\text{Na}^+$  retentora (126). El receptor de mineralocorticoides (MR) clonado por Arriza et al (8) en 1987, ha presentado una alta homología con el GR. Debido a esta homología no nos debe sorprender que los esteroides naturales y sintéticos exhiban reacción cruzada con GR y MR. El receptor de progesterona (PR) es el tercer miembro de esta superfamilia y su ligando natural, la progesterona, exhibe reacción cruzada con MR y GR.

Empleando una aplicación sistemática de estrategias que incrementen la actividad, disminuyan la reactividad cruzada y eviten los efectos no deseados, se progresó mucho en el campo del desarrollo de agentes antihormonales con gran potencia y selectividad. Especialmente, este progreso se ha hecho notorio en el campo de los antiandrógenos y antiestrógenos (177).

El desarrollo de anticorticoides selectivos (de la familia de la spironolactona, que ha sido usada en clínica) es más restringido. Esos inhibidores parecen pertenecer a la clase de anti-MCs de disociación rápida (177). Otro esteroide sintético descrito como un anti-

## **Capítulo 5-21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona: Un nuevo esteroide sintético con propiedades antiglucocorticoides específicas**

MC es el ZK91587 que mostró unión específica al MR de riñón (178) y de hipocampo (179), pero no por el GR. Este esteroide sintético es una importante herramienta en el estudio de la función MR en tejidos que se encuentran contaminados con otros receptores.

Finalmente, se encontró a principios de los '80 (180) el  $11\beta$ -aminofenil-substituido 19 noresteroide, RU 38486, comunmente llamado RU 486 o Mifepristona. El RU486 presentó efecto anti-GC. Sin embargo, este compuesto también presentó actividad antiprogestacional lo que llevó a su uso como abortivo (181). El desarrollo de un compuesto con selectiva actividad anti-GC es para los farmacólogos, una meta aún no alcanzada.

En el presente capítulo se presenta un nuevo esteroide sintético, 21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona (21OH-6OP), que presentó propiedades antiglucocorticoides sin mostrar reacción cruzada con MR o PR en la rata. La nueva estructura ha sido desarrollada como resultado de el estudio sistemático de las propiedades GC y MC de 21-desoxiesteroides (capítulo 2 y (7), en el que el esteroide más torsionado 6,19-oxidoprogesterona (6OP) careció de ambas propiedades. Para el presente trabajo se añadió un C<sub>21</sub>-OH a esta estructura con el fin de conferirle propiedades GC o anti-GC al esqueleto de la 6OP.

*Antecedentes inmediatos:* En el presente capítulo he completado y extendido los estudios iniciados por Mario Galigniana respecto a la capacidad del 21OH-6OP de actuar como ligando capaz de bloquear a los receptores de glucocorticoides sin afectar la unión de aldosterona a MR. En su tesis, Galigniana informa que el compuesto careció de efectos

## **Capítulo 5-21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona: Un nuevo esteroide sintético con propiedades antiglucocorticoides específicas**

---

GC (síntesis de glucógeno hepático e inducción de TAT) y presentó unión por GR ( $EC_{50}$ : 0,2  $\mu$ M) y por CBG ( $EC_{50}$ : 87,7  $\mu$ M). Esto nos hizo pensar en que podría tratarse de un antiglucocorticoide y nos propusimos ensayarlo, en conjunto con GC potentes, en distintos parámetros GC: inducción de la enzima TAT e inhibición de la incorporación de precursores de ARN a timocitos. Debido a la relativa unión de 21 OH-6OP a CBG y con el fin de evitar la contaminación de esta proteína en los preparados de receptores, aquí se han realizado los ensayos utilizando  $^3$ H-DEX como trazador, en lugar de  $^3$ H-B usada en los experimentos previos.

### **Materiales y Métodos**

**Reactivos:** 6OP y su derivado 21 hidroxilado 21 OH-6OP fueron sintetizados como describieron Brachet-Cota et al (182) y Veleiro et al (183) respectivamente.

**Ensayos de Unión:** La unión de  $^3$ H-corticosterona a CBG parcialmente purificada, la unión de  $^3$ H-DEX a citosoles de timo y la unión de  $^3$ H-aldosterona a citosoles de riñón fueron medidas como se describió previamente en la sección 3.1. RU 28362 (1  $\mu$ M) fue agregado a la preparación de MR para impedir la reactividad cruzada de  $^3$ H-aldosterona a GR. La unión de  $^3$ H-progesterona al receptor de PR de útero se realizó de acuerdo a lo descrito por Jordan et al (184). Los PR fueron obtenidos a partir de los úteros de ratas inmaduras Sprague-Dawley inyectadas durante los tres días previos al experimento con una dosis de 1  $\mu$ g de 17 $\beta$ -estradiol. Los animales fueron sacrificados y sangrados por punción cardíaca. Se perfundió a través de la aorta NaCl 0.9 % frío hasta que los

## **Capítulo 5-21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona: Un nuevo esteroide sintético con propiedades antigluocorticoides específicas**

---

órganos se blanquearon totalmente. Los úteros se homogeneizaron con ultraturrax ( 2 ciclos de 10 segundos a potencia intermedia) en buffer TEGI (0.1 M Tris, 10 mM EDTA, 25 % glicerol, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 20 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.1 mM PMSF, pH=7.4). Los homogenatos se centrifugaron a 3.100 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante fue utilizado como fuente de PR. La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (117). Las incubaciones se realizaron con 10 nM de  $^3\text{H}$ -Progesterona (AE= 90 Ci/mmol), 1  $\mu\text{M}$  de cortisol (para impedir la reacción cruzada de  $^3\text{H}$ -progesterona con GR y CBG) y con 7 mg de proteína/ml durante 12 horas a  $0^\circ\text{C}$ , en presencia de cantidades crecientes de hormona no radioactiva para desplazar la marca del trazador por competencia y evaluar así sus afinidades relativas. Luego de la incubación se separa la hormona libre de la unida mediante el agregado de un volumen de carbón activado-dextrano (2% : 0.2 %) frío, se centrifuga durante 10 minutos a 3000rpm en frío y se toma del sobrenadante 400  $\mu\text{l}$  para contar. La radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido

Los cocientes hormona radioinerte / $^3\text{H}$ -progesterona utilizadas fueron: 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100. Para el caso de la curva de competencia de progesterona con progesterona radioinerte, las dpm correspondientes al cociente radioinerte/ $^3\text{H}$ -P =1000 fueron descontadas como unión inespecífica a todas las demás incubaciones, mientras que el cociente 0 , y luego de ser descontado el inespecífico, fue considerado el 100% de unión. Las concentraciones de esteroide necesarias para desplazar el 50 % del trazador ( $\text{CE}_{50}$ ) fueron calculadas con el programa PCRIA v 4.1.

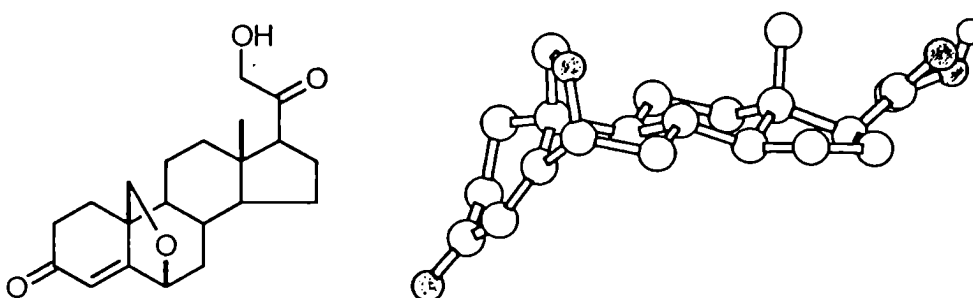
## Capítulo 5-21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona: Un nuevo esteroide sintético con propiedades antiglucocorticoides específicas

### Ensayos biológicos:

**La excreción de Na<sup>+</sup>:** fue medida en ratas macho Sprague-Dawley (250g) adrenalectomizadas (ADX) 48 horas antes del día del experimento. Los esteroides fueron disueltos en etanol. Para inyectarlos se los diluyó con 0.9 % de NaCl y propilenglicol a una proporción final de vehículo 3 : 3 : 34 (etanol: propilenglicol: solución fisiológica). La actividad Na<sup>+</sup> retentora fue medida por una modificación del método original de Kagawa (133). El Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> urinarios y plasmáticos fueron medidos con un analizador de iones. Los resultados se expresaron como el cociente entre la tasa de excreción de sodio de las ratas inyectadas con el esteroide en estudio respecto del control ADX inyectado con vehículo.

**La inhibición de la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina** en timocitos se realizó de acuerdo a lo descrito en el capítulo 3.1.

### Resultados



**Figura 34: Estructura plana y el conformero más estable del 21 OH-6OP**

## **Capítulo 5-21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona: Un nuevo esteroide sintético con propiedades antigluocorticoides específicas**

---

En la Figura 34 se muestran la estructura plana y el conformero más estable del 21 OH-6OP. Las optimizaciones geométricas fueron realizadas con el programa AMPAC 5.0 (Semichem, Shawnee, KS) usando el método semiempírico AM-1.

La Tabla 8 muestra las propiedades de unión del 21 OH-6OP al GR obtenido de citosol de timo de rata, a CBG parcialmente purificada de plasma de rata, y al MR obtenido de citosol de riñón de rata. Se han incluido los valores de 6OP con propósitos comparativos. Este esteroide presentó una moderada afinidad relativa (RBA) por el GR ( $K_d$ : 125 nM) y una baja afinidad por la CBG ( $K_d$ : 1.27  $\mu$ M). No compitió eficientemente con la  $^3$ H-aldosterona por el MR a pesar que un exceso de 1000 veces fue agregado a la incubación.

La introducción del grupo funcional  $C_{21}$ -OH incrementó más de 40 veces las propiedades de unión del 6OP a GR y 100 veces la unión a CBG. Esta introducción no mejoró la unión del esqueleto del 6,19-oxidopregnano a MR.

21 OH-6OP careció de propiedades MC, comparado con 6OP, otro débil retentor de  $Na^+$  (Figura 35). Como otros débiles retentores de  $Na^+$ , 6OP y 21 OH-6OP mostraron curvas dosis-respuesta parabólicas con un máximo de retención del 40 % para 21 OH-6OP y 50% para 6OP a altas dosis perdiendo actividad a dosis aún mayores (6). Para estudiar la unión de la aldosterona al MR de riñón sin la influencia de los abundantes GR, se bloquearon los GR incubando con el ligando específico RU28362 (177) que impide la reacción cruzada de aldosterona con el GR. Previamente, y con el fin de determinar el porcentaje de saturación alcanzado, se realizó el gráfico de Klotz (Figura 36).

**TABLA 8**

*Uniones relativas (RBAs) por GR, MR y CBG*

Esteroides	GR <sup>a</sup> nM	MR <sup>b</sup> nM	CBG <sup>c</sup> nM
B	22.3 ± 0.6	132 ± 7.0	8.7 ± 0.4
21-6OP	125 ± 8.0	>10.000	1270 ± 109
6OP	5999 ± 350	3205 ± 320	>10.000
ALDO	4839 ± 250	4.55 ± 0.2	4779 ± 220

<sup>a</sup> Curvas de competencia con 10 nM <sup>3</sup>H-dexametasona y crecientes concentraciones de los esteroides radioinertes, se incubaron durante 12 Hs a 0°C usando citosoles de timo (5mg de proteína/ml). Las afinidades relativas fueron calculadas para cada esteroide como la concentración de esteroide radioinerte que desplaza el 50 % del % máximo de unión.

<sup>b</sup> Curvas de competencia con 5 nM <sup>3</sup>H-aldosterona y crecientes concentraciones de los esteroides radioinertes, se incubaron durante 12 Hs a 0°C usando citosoles de riñón (8mg/ml). Las afinidades relativas fueron calculadas para cada esteroide como la concentración de esteroide radioinerte que desplaza el 50 % del % máximo de unión.

<sup>c</sup> Curvas de competencia con 5 nM <sup>3</sup>H-corticosterona y crecientes concentraciones de los esteroides radioinertes, se incubaron durante 12 Hs a 0°C usando CBG parcialmente purificada (1mg de proteína/ml).



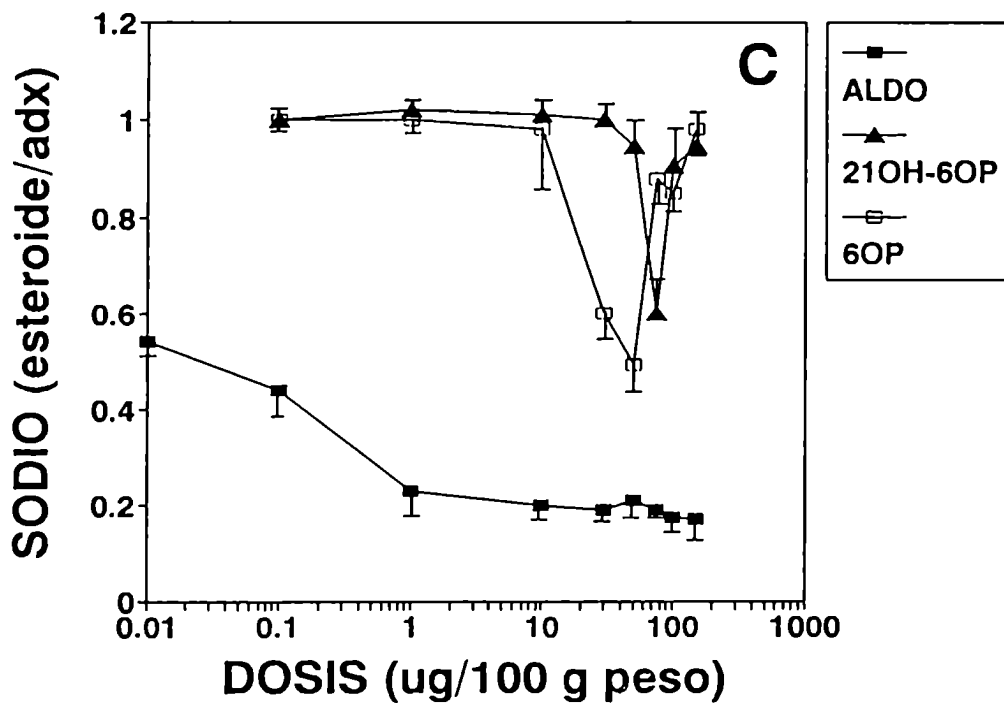
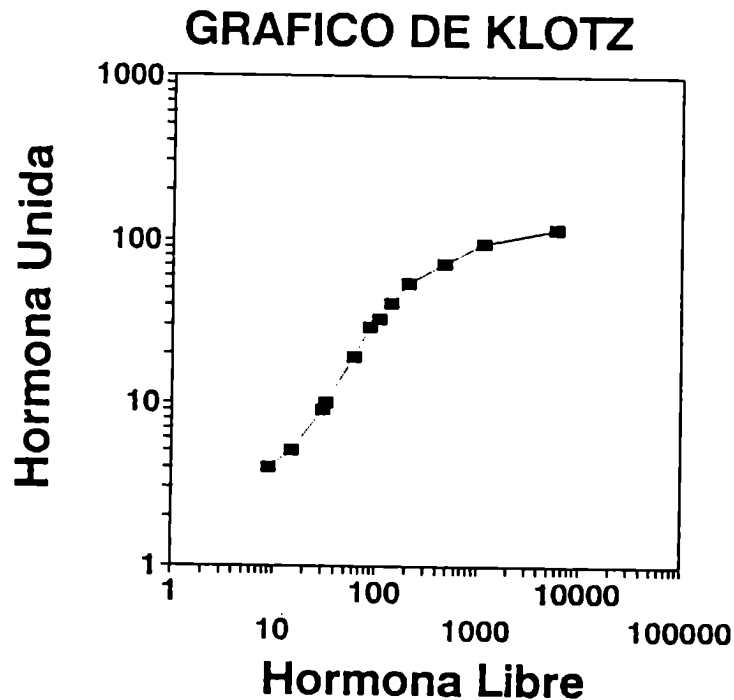


Figura 35: Ausencia de propiedades mineralocorticoides de 21OH6OP. Ratas ADX fueron tratadas con las dosis indicadas de los esteroides y la actividad  $\text{Na}^+$  retentora fue medida por una modificación del método original de Kagawa (133). Los datos son expresados como la tasa de excreción de  $\text{Na}^+$  de los animales tratados respecto de la tasa de excreción de los animales inyectados con vehículo. La figura muestra un experimento representativo realizado con 5 animales por dosis ensayada.



**Figura 36: Gráfico de Klotz para las preparaciones de citosoles de riñón en el que se observa la aparición de un punto de inflexión en la mitad de la saturación y la simetría de la curva sigmoidea alrededor de ese punto, indicando que la concentración de hormona utilizada es la correcta.**

Se observó la aparición de un punto de inflexión en la mitad de la saturación y la simetría de la curva sigmoidea alrededor de ese punto indicando que la concentración de hormona utilizada era la correcta.

En la Figura 37, se observa que en ausencia del RU 28362, aldosterona se une a dos poblaciones de receptores con distinta afinidad observándose el gráfico de Scatchard quebrado. Estas dos poblaciones representan a los MR (alta afinidad,  $K_d$ : 0.75 nM) y los GR (baja afinidad,  $K_d$ : 62 nM) (Figura 37-B). En presencia de 1  $\mu$ M RU28362, se observan únicamente los MR reduciéndose el gráfico a una sola recta, como ocurre con

## **Capítulo 5-21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona: Un nuevo esteroide sintético con propiedades antigluocorticoides específicas**

---

el ligando específico para los MR, ZK 91587 (Figura 37-A y C, respectivamente). Las constantes de disociación para el MR en las diferentes condiciones se encuentran entre 0.4 y 1 nM que representa una afinidad al menos 80 veces mayor que por el GR. Cuando 21 OH-6OP fue agregado a las incubaciones realizadas en presencia de  $^3\text{H}$ -aldosterona, se observó nuevamente un solo sitio de unión con los parámetros cinéticos compatibles con los del MR ( $K_d$ : 0.7 nM). Esto sugiere que 2.5  $\mu\text{M}$  de 21 OH-6OP son capaces de enmascarar la reacción cruzada de la  $^3\text{H}$ -aldosterona con los GR que se encuentran presentes en la preparación.

De acuerdo a las propiedades de unión del 21 OH-6OP, se podría esperar un efecto antagónico GC. Así, la Figura 38 muestra que 21 OH-6OP fue capaz de antagonizar la inducción de TAT por parte de DEX y corticosterona. La actividad basal (Figura 38, control) fue medida agregando 0.2 % de etanol a la suspensión celular. Ni 6OP ni 21 OH-6OP fueron capaces de facilitar la inducción de TAT pero tanto 100 nM DEX como 100 nM corticosterona facilitaron la inducción entre 5-6 veces. 6OP no fue capaz de inhibir esta estimulación pero, en cambio, 21 OH-6OP inhibió un 80 % la inducción de TAT cuando fue coincubada con 100 nM DEX o corticosterona.

La Figura 39 muestra que 21 OH-6OP fue capaz de antagonizar totalmente la inhibición de la captación de  $^3\text{H}$ -uridina a timocitos producida por DEX o corticosterona. Nuevamente, 6OP no mostró actividad como GC o antiGC.

La Figura 40 muestra que 21 OH-6OP desplaza a la  $^3\text{H}$ -progesterona de receptores de útero tan débilmente como lo hace el control negativo 17 $\beta$ -estradiol. La progesterona radioinerte desplazó la  $^3\text{H}$ -progesterona eficientemente.

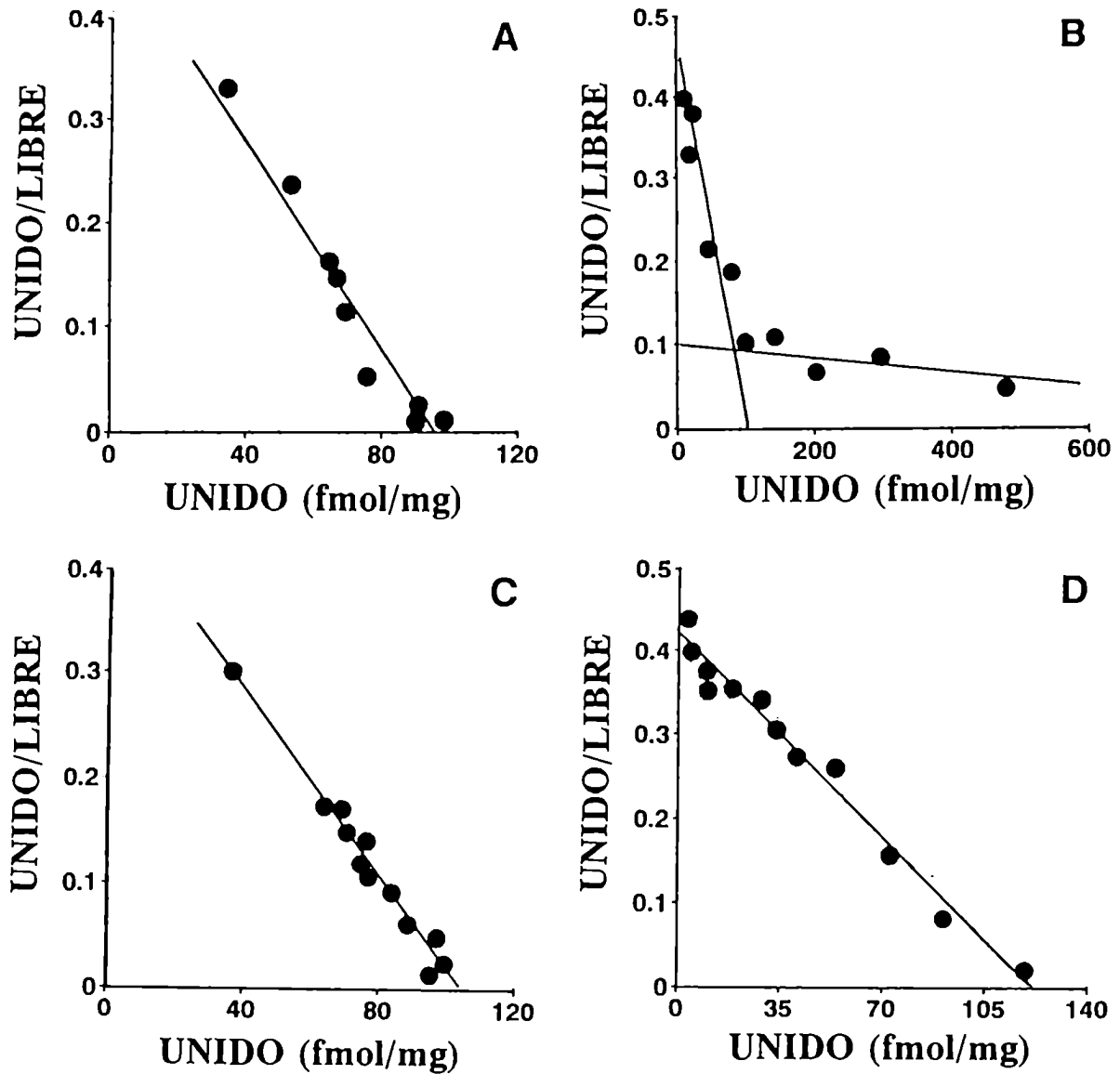


Figura 37: **216OP** es un potente bloqueante de los receptores de tipo II de riñón. Se realizaron gráficos de Scatchard con citosoles de riñón (8mg/ml). Las incubaciones se realizaron durante 4 Hs a 0 C con el agregados de  $^3\text{H}$ -ZK91587 como ligando específico para los sitios de tipo I (A),  $^3\text{H}$ -ALDO solo (B),  $^3\text{H}$ -ALDO+ 1.0  $\mu\text{M}$  RU28362 para enmascarar los sitios de tipo II, y  $^3\text{H}$ -ALDO + 2.5  $\mu\text{M}$  21OH6OP (D).

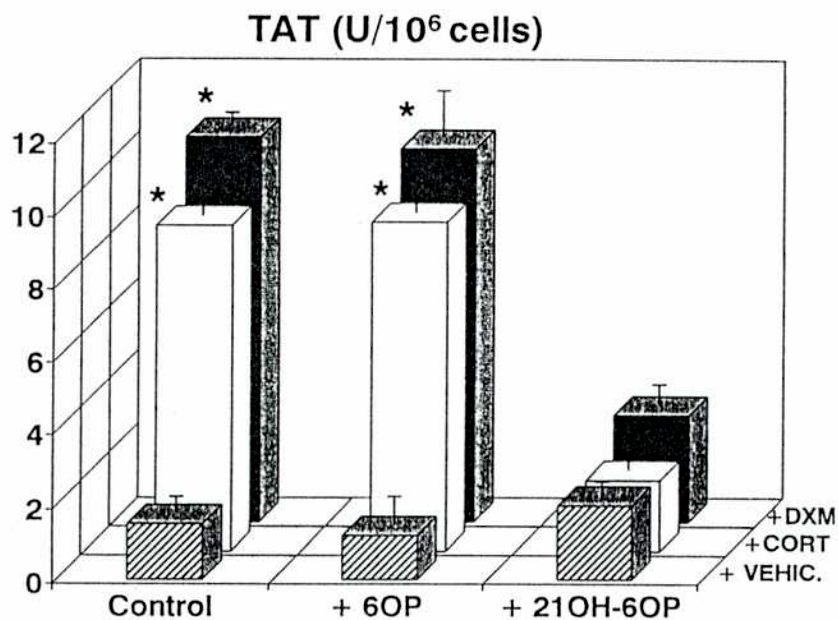


Figura 38: 21OH6OP presenta efecto antagónico en la inducción de TAT. La actividad TAT fue inducida en hepatocitos en presencia de 100 nM DEX (barras negras) o 100 nM corticosterona (B) (barras blancas) en ausencia (control) o presencia de 2.5  $\mu$ M 6OP (+6OP) o 21OH6OP (+21OH6OP). Barras rayadas: incubaciones realizadas en presencia de vehículo en lugar de agonista. \* significativamente diferente ( $p < 0.01$ ) de la actividad basal. Los resultados son presentados como la media  $\pm$  desvío standard de cuatro experimentos.

□ EtOH      ■ OH-6OP      ▨ 6OP

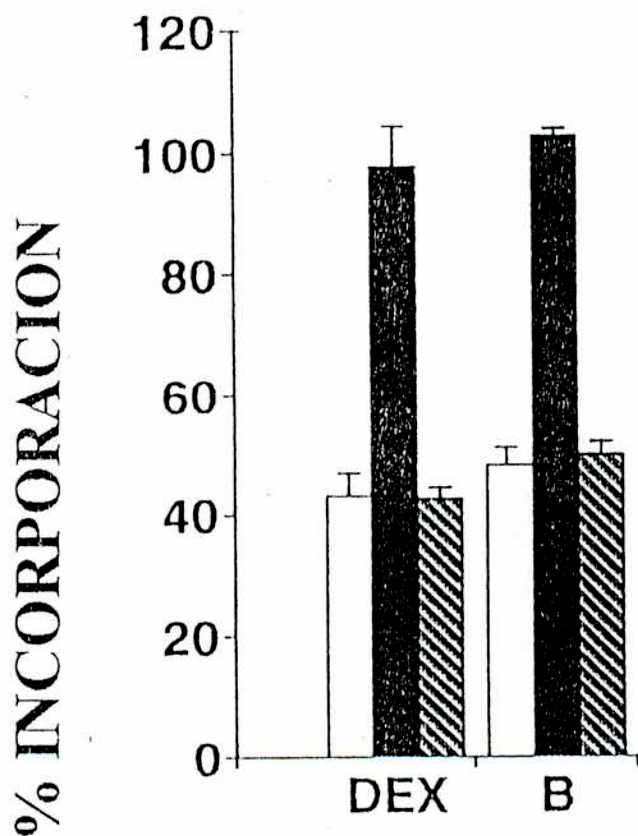


Figura 39: 21OH6OP presenta efecto antagónico en la inhibición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -uridina a timocitos. Se incubaron timocitos obtenidos de ratas ADX durante 45 minutos en presencia de  $^3\text{H}$ -uridina y  $1\mu\text{M}$  DEX o corticosterona. Se agregaron  $2.5\mu\text{M}$  21OH-6OP o 6OP o el volumen equivalente de etanol. Se lavaron las células, se contaron y se midió la radiactividad asociada a la fracción no soluble en ácido perclórico. Se normalizaron los resultados por  $10^6$  células.

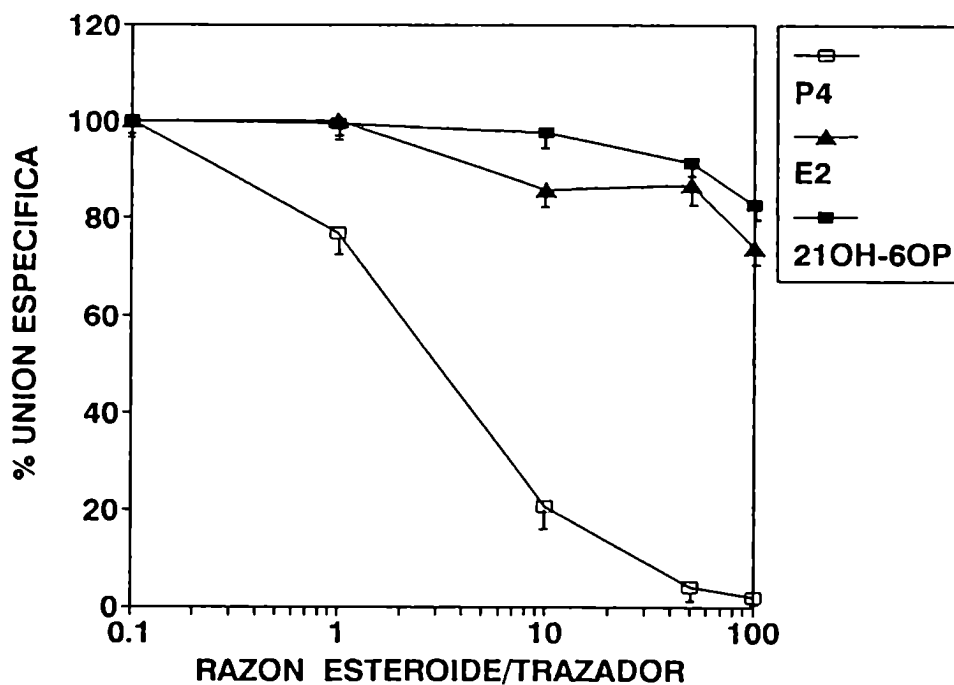


Figura 40: 21OH6OP no presenta reacción cruzada con el receptor de progesterona. La unión a citosoles de útero fue realizada de acuerdo al método de Jordan y Dix (192) durante 12 hs a 0 C en presencia de diferentes concentraciones de los competidores radioinertes.

### Discusión

En el presente capítulo se ha demostrado que 21 OH-6OP puede ser usado como una herramienta útil en el estudio de las interacciones esteroide-receptor en aquellos sistemas en que existe más de un tipo de receptor. La afinidad relativa al GR obtenido de citosoles de timo fue de 125 nM. A pesar de esta moderada afinidad, 21 OH-6OP no mostró habilidad para interactuar con el MR o PR. Fue capaz de bloquear los GR en citosoles de riñón donde los GR coexisten con los MR y altos niveles de CBG, de dos orígenes

## **Capítulo 5-21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona: Un nuevo esteroide sintético con propiedades antigluocorticoides específicas**

---

diferentes: la inevitable contaminación por plasma (185,186) y la biosíntesis por el riñón (187).

La inducción de la actividad TAT en hepatocitos y la inhibición de la captación de uridina a timocitos, desarrollada por DEX y corticosterona, fueron significativamente inhibida por 21 OH-6OP, indicando que este nuevo esteroide podría ser utilizado como antagonista GC. Debido a que no presentó reacción cruzada con PR, 21 OH-6OP puede ser interesante como un agente bloqueante específico para el GR. Hasta el presente, no había sido desarrollado un anti-GC puro ya que la mayoría de los antiprogestágenos y antigluocorticoides disponibles presentan reacción cruzada con otros receptores (177).

Podríamos imaginar una gran variedad de mecanismos por los cuales una antihormona puede interferir con el agonista; la interferencia más común es a la unión del esteroide por inhibición directa o indirecta (alostérica). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la dopamina y el factor de crecimiento epidérmico pueden afectar la transformación de sus receptores hormonales a la forma activa sin presentar unión al receptor (188). También fue sugerido que la presencia del esteroide entre las hebras del ADN parece tener importantes implicancias en la transactivación (189). Debido a que la unión del esteroide al receptor es el primer evento de una cascada muy sofisticada y todavía aún no dilucidada que lleva al receptor como factor de transcripción, no se puede aún especular en el mecanismo de acción molecular del 21 OH-6OP.

El presente capítulo ha demostrado que 21 OH-6OP se une casi exclusivamente al GR, careciendo de respuesta GC (7) por lo que puede ser usado como una herramienta útil en el estudio de la interacción esteroide receptor. El hecho que 21 OH-6OP carezca de



## **Capítulo 5-21-hidroxi-6,19-oxidoprogesterona: Un nuevo esteroide sintético con propiedades antigluocorticoides específicas**

---

afinidad por PR y MR sugiere ciertas ventajas, respecto a otros antiesteroides conocidos, tanto como para estudios *in vivo* como *in vitro*.

## CONCLUSIONES

### a) Correlaciones

1) Con notorias excepciones (DEX, RU28362 y 5 $\beta$ -dihidroprogesterona), las afinidades de los 22 esteroides estudiados obedecen con una muy buena linealidad a la correlación afinidad por GR vs afinidad por CBG.

2) Existe una correlación inversa, simétrica con respecto a la observada para propiedades MC, del ángulo A/BCD de la mayoría de los esteroides estudiados con su afinidad por GR (y por consiguiente, por CBG). A estos efectos, los esteroides se pueden dividir en cuatro grupos: I) de alta afinidad; II) grupo conformacionalmente plano, de baja afinidad; III) los  $\Delta_1$  esteroides, correlacionados en una paralela a sus esteroides madres, lo cual significa menor afinidad por GR o CBG de la que se esperaría de acuerdo con su ángulo de torsión; IV) grupo de esteroides muy torsionados (con baja unión). El conjunto de correlaciones sugiere una torsión óptima para unión a dichas proteínas (entre -20 y -28 para el grupo I. Entre -20 y -36 para el conjunto de los grupos I y III).

3) Contrariamente a lo observado por Duax para efecto antiinflamatorio, no se observa correlación de ángulo de torsión vs inducción de TAT (ni utilizando A/BCD ni C3/D).

### b) Las propiedades de HOP y $\Delta$ HOP

Este par de esteroides posee propiedades glucocorticoides apreciables, a veces muy intensas o carece de otras.

Entre las primeras se cuentan la unión a GR y/o CBG, la disociación del complejo GR-hsp90, la gran capacidad de inducción de la TAT exhibida tanto por HOP como por  $\Delta$ HOP y la inhibición de la incorporación de nucleótidos y aminoácidos a timocitos (*respuestas A*). Por el contrario, ninguno de los dos esteroides afecta el peso del timo, ni sensiblemente las propiedades apoptóticas habitualmente demostradas por otros GC. Tampoco indujeron sensiblemente un gen reporter en una línea celular que expresa el receptor de GC (*respuestas B*).

Finalmente, a diferencia de las respuestas a todos los demás corticoides ensayados, incluyendo HOP, la respuesta a  $\Delta$ HOP no es bloqueada totalmente por el inhibidor RU486.

¿Qué hace, entonces, la 11 $\beta$  hidroxilación—o sea, **fisiológicamente el primer paso de la corticoidogénesis**— a la molécula de la progesterona?

La 11 $\beta$  hidroxilación hace que la estructura de la progesterona exprese propiedades GC (*respuestas A*) que la molécula sin hidroxilar no ha expresado.

Si consideramos las respuestas B ni la progesterona ni sus derivados  $\Delta_1$  o 11 $\beta$ hidroxilados las expresan.

Sin embargo ¿es la 11 $\beta$ hidroxilación la responsable de esta discriminación, o se trata de un artificio experimental, según el cual, **bajo ciertas condiciones técnicas** aparece dicha diferencia?

Una primera aproximación parece apoyar la segunda alternativa. En efecto, experimentos con cultivos de timocitos o hepatocitos dependen de la presencia de suero de ternero para que los esteroides no 11 $\beta$ hidroxilados no expresen respuestas A. En ausencia de dicho suero, no existen diferencias de estos derivados con progesterona o su  $\Delta_1$  derivado: todos expresan respuestas A.

Pero ¿es la diferencia observada puramente artificial o acaso encierra un trasfondo fisiológico?

El experimento in vivo, que relaciona orden de potencia esteroidea para depósitos de glucógeno con unión a GR así como CBG, sugiere que las proteínas del suero homólogo ejercerían un rol fisiológico “dirigido” como uno de los factores que confieren especificidad GC a la 11 $\beta$  hidroxilación.

Los razonamientos sobre ausencia de efectos MC y de unión a MR de moléculas muy torsionadas (grupo IV) permitieron desarrollar el primer antiglucocticoide (competitivo por GR) específico, ya que carece de afinidad por MR o receptores a progesterona.

## **BIBLIOGRAFIA**

- (1)- Selye H *Proc Soc Exp Biol Med.* 46: 116-121 (1941)
- (2)- De Nicola AF en Calandra R, de Nicola A, *Endocrinología Molecular*, Capítulo 15.  
(Editorial El Ateneo, 1985)
- (3)- *Glucocorticoid Hormone Action*, Edited by J.D. Baxter and G.G. Rousseau,  
Springer-Verlag Berlin- Heidelberg- New York, 1979)
- (4)- Gros EG en Calandra R, de Nicola A, *Endocrinología Molecular*, Capítulo 2.  
(Editorial El Ateneo, 1985)
- (5)- Duax W, Griffin J, Strong P, Funder J, Ulick S *J Am Chem Soc* 104: 7291-7293  
(1982)
- (6)- Burton G, Galigniana MD, De Lavallaz S, Brachet-Cota AL, Sproviero EM, Ghini  
AA, Lantos CP, Damasco MC *Mol Pharmacol* 47: 535-543 (1995)
- (7)- Galigniana MD “Relación Estructura-Actividad de Esteroides con Actividad  
Biológica de Mineralocorticoides” FFyB (1996)
- (8)- Arriza JL, Weinberger C, Glaser T, Handelin BL, Housman DE *Science* 237: 268-  
275 (1987)
- (9)- Patel PD, Sherman TG, Goldman DJ, Watson SJ *Mol Endocrinol* 3: 1877-1885  
(1989)
- (10)- Funder JW, Feldman D, Edelman IS *Endocrinology* 92: 994-1004 (1973)
- (11)- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI *Science* 242: 583-585 (1988)
- (12)- Ulick S, Teddle R, Mantero F *J. Clin Endocrinol Metab* 70: 200-206 (1990)
- (13)- Monder C *J Steroid Biochem and Molec Biol* 40: 533-536 (1991)
- (14)- Monder C *Ann N Y Acad Sci* 595: 26-39 (1990)
- (15)- Rusvai E, Fejes-Toth A *J Biol Chem* 268: 10717-10720 (1993)
- (16)- Lopez-Bernal A, Flint A, Anderson A, Turnbwell A *J Steroid Biochem and Molec  
Biol* 13: 1081-1087 (1979)
- (17)- Yang K *J Steroid Biochem and Molec Biol* 52: 337-343 (1995)

- (18)- de Kloet ER, Sybesma H, Reul JHM *Neuroendocrinology* 42: 513-521 (1986)
- (19)- de Kloet ER, Versteeg DHG, Kovacs GL *Brain Res* 264: 323-327 (1983)
- (20)- de Kloet ER, Ballach G, McEwen BS *Endocrinology* 96: 598-609 (1975)
- (21)- Duperrex H, Gaeggeler HP, Kenouch S, Farman N, Rossier BC *24th Ann Meeting USGEB/USSBE (Abstr)* (1992)
- (22)- Edwards CRW, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA *Lancet* 2: 986-989 (1988)
- (23)- Hammond GL *Biochemical Society Transactions* 25: 577-582 (1997)
- (24)- Maitra U, Saeekhan M, Rosner W *Endocrinology* 133: 1817-1822 (1993)
- (25)- Funder JW *Endocrinology* 137: 5264-5268 (1996)
- (26)- Evans RM *Science* 240: 889-895 (1988)
- (27)- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umenoso K, Blumberg B, Kastner M, Chambon P, Evans RM *Cell* 83: 835-839 (1995)
- (28)- Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM *Cell* 46: 645-652 (1986)
- (29)- Hollenberg SM, Giguere V, Segui P, Evans RM *Cell* 49: 39-46 (1987)
- (30)- Dahlman-Wright K, Almlöf T, Mc Ewan IJ, Gustafsson JA, Wright APH *Proc. Natl. Acad Sci USA*. 91: 1619-1623 (1994).
- (31)- Freedman LP, Luisi BF, Korzun ZR, Basavapa R, Sigler PB, Yamamoto KR *Nature* 334: 543-546 (1988)
- (32)- Zilliacus J, Wright APH, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA *Mol Endocrinol* 9: 389-400 (1995)
- (33)- Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson JA, Tsai MJ, O'Malley BW *Cell* 55: 361-369 (1988)
- (34)- Picard D, Yamamoto KR. *EMBO J* 6: 3333-3340 (1987)
- (35)- Lefstin JA, Thomas JR, Yamamoto KR. *Genes Dev.* 8: 2842-2856 (1994)
- (36)- Pratt WB *J Biol Chem* 268: 21455-21458 (1993)
- (37)- Dahlman-Wright K, Wright APH, Gustafsson JA *Biochemistry* 31: 9040-9044 (1992)
- (38)-Holleberg S, Evans RM *Cell* 55: 899-906 (1988)

- (39)- Hutchinson KA, Scherrer LC, Czar MJ, Stancato LF, Chow YH, Jove R, Pratt WB *Ann N Y Acad Sci* 684: 35-48 (1993)
- (40)- Hutchinson KA, Dittmar KD, Czar MJ, Pratt WB. *J Biol Chem* 269: 5043-5049. (1994).
- (41)- Czar MJ, Owens-Grillo JK, Yem AW, Leach K, deibel MRJ, Welsh MJ, Pratt WB. *Mol Endocrinol* 8: 1731-1741. (1994).
- (42)- Baulieu EE *J Cell Biochem* 35: 161-174 (1987).
- (43)- Pratt WB *Bioessays* 14: 841-848 (1992).
- (44)- Hu LM, Bowdell J, Hu JM, Orti E, Munck A. *J Biol Chem* 269: 6571-6577 (1994).
- (45)- Onate SA, Tsai SY, Tsay M-J, O'Malley BW *Science* 270: 1354-1357 (1995)
- (46)- Tsai M-J, O'Malley BW *Annu Rev Biochem* 63: 451-486 (1994)
- (47)- Karin M *J. Biol Chem* 270: 16483-16486 (1995)
- (48)- Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P *Cell* 62: 1189-1204 (1990)
- (49)- Lin ECC, Knox WE *Biochim Biophys Acta* 26: 85-88 (1957)
- (50)- Grange T, Guénet G, Dietrich JB, Chasserot S, Fromont M, Befort N, Jami J, Beck G, Pictet R *J. Mol. Biol* 184: 347-350 (1985)
- (51)- Weber G, Singhal RL *Metabolism* 13: 8-11 (1964)
- (52)- Kreutner W, Goldberg ND *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58: 1515-1519 (1967)
- (53)- De Wulf H, Stalmans W, Hers HG *Eur. J. Biochem.* 6: 545-551 (1968)
- (54)- De Wulf H, Hers HG *J. Biochem.* 6: 552-557 (1968)
- (55)- Mersmann HJ, Segal HL *J. Biol. Chem.* 244: 1701-1704 (1969)
- (56)- Schrenk R *Endocrinology* 45: 317-334 (1949)
- (57)- Munck A, Crabtree GR, Smith KA *Glucocorticoid Hormone Action Monograph in Endocrinology*. 341-355, capítulo 19, Editado por JD Baxter y GG Rousseau, Springer-Verlag, Berlín (1979)
- (58)- Foley JE, Jeffries M, Munck A *Journal of Steroid Biochemistry* 12: 231-243 (1980)
- (59)- Wyllie AH *Nature* 284: 555-556 (1980)

- (60)- Oldenburg NBE, Evans-Storms RB, Cidlowsky JA *Endocrinology* 138: 810-818 (1997)
- (61)- Thompson EB *Mol. Endocrinol* 8: 665-673 (1994)
- (62)- Bortner CD, Oldenburg NBE, Cidlowsky JA *Trends in Cell Biology* 5: 21-26 (1995)
- (63)- McConkey DJ, Nicoreta P, Hartzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S *Arch Biochem Biophys* 269: 365-370 (1989)
- (64)- Lam M, Dubyak G, Distelhorst CW *Mol Endocrinol* 7: 686-693 (1993)
- (65)- Schwartzmann RA, Cidlowsky JA *Endocr Rev* 14: 133-151 (1993)
- (66)- Peitsch MC, Polzar B, Stephan H, Crompton T, Mac-Donald HR, Mannherz HG, Tschoop J *EMBO J* 12: 371-377 (1993)
- (67)- Barry MA, Eastman A *Arch Biochem Biophys* 300: 440-450 (1993)
- (68)- Barry MA, Reynolds JE, Eastman A *Cancer Res* 53: 2349-2357 (1993)
- (69)- Ucker DS, Obermiller PS, Ekhart W, Apgar JR, Berger NA, meyers J *Mol Cell Biol* 12: 3060-3069 (1992)
- (70)- Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN *Biochem J* 286: 331-334 (1992)
- (71)- Tomei LD, Shapiro JP, Cope FO *Proc Natl Acad Sci* 90: 853-857 (1993)
- (72)- Zakeri ZF, Quaglino D, Latham T, Lockshin RA *FASEB J* 7: 470-478 (1993)
- (73)- Oberhammer F, Fritsch G, Schmied M, Pavelka M, Printz D, Purchio T, Lassmann H, Schulte-Herrmann R *J Cell Sci* 104: 317-326 (1993)
- (74)- Fukuda K, Kojiro M, Chiu JF *Am J Pathol* 142: 935-946 (1993)
- (75)- Shen W, Kamendulis LM, Ray SD, Corcoran GB *Toxicol Appl Pharmacol* 112: 32-40 (1992)
- (76)- Askew DS, Ashmun RA, Simmons BC, Cleveland JL *Oncogene* 6: 1915-1922 (1991)
- (77)- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC *Cell* 69: 119-128 (1992)
- (78)- Kastan MB *J NIH Res* 5: 53-57 (1993)
- (79)- Taylor R *J NIH Res* 5: 59-62 (1993)



- (80)- Oltvai ZN, Korsmeyer SJ *Cell* 74: 609-619 (1993)
- (81)- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ *Cell* 79: 189-192 (1994)
- (82)- Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding LY, Lindsten T, Turka LA, Mao XH, Nuñez G, Thompson CB *Cell* 74, 597-608 (1993)
- (83)- Hockenbery D, Nuñez G, Milliman CL, Schreiber RD, Korsmeyer SJ *Nature* 348: 334-336 (1990)
- (84)- Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC *Nature* 361: 365-369 (1993)
- (85)- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC *Cancer Res* 53: 4701-4714 (1993)
- (86)- Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y *Cancer Res* 54: 2468-2471 (1994)
- (87)- Shiraiwa N, Inohara N, Okada S, Yuzaki M, Shoji S, Ohta S *J Biol Chem* 271: 13258-13265 (1996)
- (88)- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ *Cell* 75: 241-251 (1993)
- (89)- Jacobson MD, Raff MC *Nature* 374: 814-816 (1995)
- (90)- Jacobson MD, Burne JF, Raff MC *EMBO J* 13: 1899-1910 (1994)
- (91)- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X *Cell* 86: 147-157 (1996)
- (92)- Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VEA, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT *Eur J Biochem* 236: 1-26 (1996)
- (93)- Fawell SE, White R, Hoare S, Sydenham M, Page M, Parker MG *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6883-6887 (1990)
- (94)- Arbuckle ND, Dauvois S, Parker MG *Nucleic Acids Res* 20: 3839-3844 (1992)
- (95)- Baulieu E *JAMA* 262: 1808-1814 (1989)
- (96)- Groner B, Hynes EN, Rahmsdorf J, Ponta H *Nucleic Acids Res* 11: 4713-4725 (1983)
- (97)- Wehling M *Trends Endocrinol Metab* 5: 347-353 (1994)
- (98)- Clarke R, van den Berg HW, Murphy RF *J Natl Cancer Inst* 82: 1702-1705 (1990)

- (99)- Reddy AG, Shivaji S, Gupta PD *J Steroid Biochem and Molec Biol* 33: 1229-1233 (1989)
- (100)- Willmer EN *Biol Rev* 36: 368-398 (1961)
- (101)- Selye H *Endocrinology* 30: 437-453 (1942)
- (102)- Spach C, Streeten DH *J Clin Invest* 43: 217-227 (1964)
- (103)- Moore FL, Orchnik M *Horm Behav* 28: 512-519 (1994)
- (104)- Moore FL, Orchnik M, Lowry C *Receptor* 5: 21-28 (1995)
- (105)- Quelle FW, Smith RV, Hrycyna CA, Kaliban TD, Crooks JA, O'Brien JM *Endocrinology* 123: 1642-1651 (1988)
- (106)- Trueba M, Ibarolla Y, Ogiza K, Marino A, Macarulla JM *J Membrane Biol* 120: 115-124 (1991)
- (107)- Orchnik M, Murray TF, Franklin PH, Moore FL *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3830-3834 (1992)
- (108)- Gametchu B *Science* 236: 456-461 (1987)
- (109)- Lantos CP, Burton G, Roldán A, Damasco M, Aragonés A *Physiopathology of Endocrine Diseases and Mechanisms of Hormone Action*, R Soto, A de Nicola, J Blaquier Eds, AR Liss, New York, 477-494 (1981)
- (110)- Duax WL, Cody V, Griffin JF, Rohrer DC, Weeks CM *J Toxicol Environ Health* 4: 205-227 (1978)
- (111)- Yamakawa M, Ezumi K, Shiro M, Nakai H, Kamata S, Matsui T, Haga N *Mol Pharmacol* 30: 585-589 (1986)
- (112)- Rousseau GG, Kirchoff J, Formstecher P, Lustenberg P *Nature* 279: 158-160 (1979)
- (113)- Rousseau GG, Chambon P, Bresseur N, Marcotte L, Matton P, Smith JP *J Steroid Biochem and Molec Biol* 18: 237-244 (1983)
- (114)- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Campbell J *Endocrinology* 125: 2224-2226 (1989)
- (115)- Edwards CR, Burt D, Stewart PM *J Steroid Biochem* 32: 213-216 (1989)
- (116)- Hammond GL *Endocrine Reviews* 11: 65-79 (1990)
- (117)- Bradford M *Analyt Biochem* 72: 248-254 (1976)

- (118)- Muldoon T, Westphal U *J Biol Chem* 242:5636-5645 (1967)
- (119)- Hopkins R *Advances in Enzimology* 6: 389 (1946)
- (120)- Krisman C *Anal Biochem* 4: 17-23 (1962)
- (121)- Fry J, Jones C, Webkin P, Bridges J *Anal Biochem* 71: 341-350 (1976)
- (122)- Granner D, Tomkins G *Methods in Enzimology* 17-A 633-637 (1975)
- (123)- Diamondstone T *Anal Biochem* 16: 395-401 (1966)
- (124)- Lewin B Genes V Oxford University Press (1994)
- (125)- Galigniana M.D, Vicent GP, Burton G, Lantos C.P *Steroids* 62: 358-364 (1997)
- (126)- Koshida HI, Mijamori I, Soma R, Matsubara T, Ikeda M, Takeda R, Nakamura S, Kiuchi F, Tsuda Y *Endocrinology* 126: 1410-1415 (1990)
- (127)- Kraulis I, Traikov H, Li M, Birmingham M *J Steroid Biochem Molec Biol* 4: 129-137 (1973)
- (128)- Roldán A., Burton G., Castillo M.B., Damasco M.C., Lantos C.P *J.Steroid Biochem.* 15: 467-472 (1981)
- (129)- Gonzalez MD, Burton G *Org Magn Res* 22: 586-591 (1984)
- (130)- Rondinone C.M., Schillaci R., Castillo M.B., and Roldán A *Clin Exp Immunol.* 86: 311-314 (1991)
- (131)- Rondinone C.M., Schillaci R., and Roldán A *Drug Develop.Res* 26: 61-65. (1992)
- (132)-Homo F, Picard S, Durant S, Gagne D, Simon J, Dardenne, Duval D *Journal of Steroid Biochem* 12: 433-443 (1980)
- (133)- Rondinone C.M., Schillaci R., Lantos C.P., and Roldán A *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 39: 181-188 (1989)
- (134)- Kagawa C, Shipley E, Meier R *Proc Soc Exp Biol Med* 80: 281-285 (1952)
- (135)- Herrmann M., Lorenz H.M., Voll R., Grünke M., Woith W, Kalden J *Nucleic Acids Res* 22: 5506-5507 (1994)
- (136)- Helftenbein G, Alvarez CV, Tuohimäki P., Beato M *Oncogene* 8: 2075-2085 (1993)
- (137)- Chen C, Okayama H *Mol. Cell Biol* 7: 2745-2752 (1987)
- (138)- Chalepakis G, Arnemann J, Slater E, Brüller H.J, Gross B, Beato M *Cell* 53: 371-382 (1988)
- (139)- Gould SJ, Subramani S *Anal.Biochem* 7: 5-13 (1988)

- (140)- Pratt WB, Welsh M.J *Sem.Cell Biol.* 5: 201-211 (1992)
- (141)- Pecci A, Scholz A, Pelster D, Beato M *J.Biol Chem* 272: 11791-11798 (1997)
- (142)- Souness G, latif S, Lorenzo J, Morris DJ *Endocrinology* 136: 1809-1812 (1995)
- (143)- Vanderbilt J, Miesfeld R, Maler B, Yamamoto K *Mol.Endocrinol.* 1: 68-74 (1987)
- (144)- Thomson EB *Cancer Res* 51: 551-5556 (1991)
- (145)- Baxter J, Forsham P *The American Journal of Medicine* 53: 573-589 (1972)
- (146)- Samuels HH, Tomkins GM *J Molec Biol* 52: 57-62 (1970)
- (147)- Beato M, Candau R, Chávez S, Möws C, Truss M *J Steroid Biochem Molec Biol* 56: 47-59 (1996)
- (148)- Westphal U, Forbes T *Endocrinology* 73: 504-507 (1963)
- (149)- Westphal U, Ashley BD, Selden GL *Arch.Biochem* 92: 441-448 (1961)
- (150)- Hooker CWW, Forbes TR *Endocrinology* 41: 158-169 (1947)
- (151)- Hammond GL, Smith CL, Goping LS, Underhill DA, Harley MJ, Reventos J, Musto NA, Gunsalus GL, Bardin CW *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 5153-5157 (1987)
- (152)- Hammond GL, Smith CL, Paterson NAM, Sibbald WJ *J Clin Endocrinol Metab* 71: 34-39 (1990)
- (153)- Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW *Recent Prog Horm Res* 38: 457-510 (1982)
- (154)- Rosner W *Endocrine Rev* 11: 80-91 (1990)
- (155)- Castillo MB, Gonzalez MD, Burton G, Lantos CP, Roldán A *Experientia* 39: 617-618 (1983)
- (156)- Rondinone CM, Roldán A *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 40: 357-364 (1990)
- (157)- Do YS, Feldman D *Endocrinology* 107: 1370-1375 (1980)
- (158)- Ingle DJ *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 174-175 (1940).
- (159)- Dougherty TF *Physiol Rev* 32: 379-401 (1952)
- (160)- Meisfeld R, Okret S, Wilkstram AC, Wrange Z, Gustafsson JP, Yamamoto KR *Nature* 312: 779-781 (1984)
- (161)- Ashraf J, Thompson EB *Mol Endocrinol* 7: 631-642 (1993)

- (162)- Zawydiwski R, Harmon JM, Thompson EB *Cancer Res* 43: 3865-3873 (1983)
- (163)- Thompson EA Jr *Cancer Res* 51: 5551-5556 (1991)
- (164)- Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ *Cell* 75: 229-240 (1993)
- (165)- Mizoguchi K, Kunishita T, Chui DH, Tavira T *Neurosci Lett* 138: 157-160 (1992)
- (166)- Rotello RJ, Lieberman RC, Lepoff RB, Gerschenson LE *Am J Pathol* 140: 449-456 (1992)
- (167)- Lu QL, Poulsom R, Wong L, Hanby AM *J Pathol* 169: 431-437 (1993)
- (168)- Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O, Ito Y, Tsujimoto Y, Akao Y *Lancet* 344: 28-29 (1994)
- (169)- Tilly J, Tilly K, Kenton M, Johnson A *Endocrinology* 136: 232-241 (1995)
- (170)- Lippman M, Bolan G, Huff K *Cancer Res* 36: 4595-4601 (1976)
- (171)- Chomczynsky P, Sacchi N *Anal Biochem* 162: 156-159 (1987)
- (172)- Chao DT, Korsmeyer SJ *Int Immunol* 9 (9): 1375-1384 (1997)
- (173)- Chang TC, Hung MW, Jiang SY, Chu JT, Chu LL, Tsai LC *FEBS Lett* 415 (1): 11-15 (1997)
- (174)- Power REF, Mani S, Codina J, Conneely OM, O'Malley BW *Science* 251: 1636-1639 (1991)
- (175)- Hollemberg SM., Weinberger C, Ong ES, Cereli G, Oro A, Lebo R., Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM *Nature* 318: 635-641 (1985)
- (176)- Forman VM, Evans RM *Ann NY Acad Sci* 761: 29-37 (1995)
- (177)- Teutsch G, Nique F, Lemoine G, Bouchoux F, Céréde E, Gofflo D, Philibert D *Ann NY Acad Sci* 761: 5-28 (1995)
- (178)- Grill HJ, Nickisch K, Schulze PE, Laurent H, Elger W, Heubner A, Pollow K *J Steroid Chem* 23 (suppl): 19S (1985)
- (179)- Sutanto W, de Kloet ER *Life Sci* 43: 1537-1543 (1988)
- (180)- Antiprogestins-Antiglucocorticoids, in *Endocrinology at Roussel-Uclaf* 64 (1993)
- (181)- Spitz IM, Bardin CW *N Engl J Med* 329: 404-412 (1993)
- (182)- Brachet-Cota AL, Burton G *Z Naturforsch Teil B Anorg Chem Org Chem* 45: 711-715 (1990)
- (183)- Veleiro AS, Nevado MV, Monteserín MC, Burton G *Steroids* 60: 268-271 (1995)

- (184)- Jordan VC, Dix CJ *J Steroid Biochem and Molec Biol* 11: 285-291 (1979)
- (185)- Galigniana MD, Vicent GP, Lantos CP, Burton G *Anal Asoc Quim Argent* 81: 333-340 (1993)
- (186)- Krozowski ZS, Funder JF *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6056-6060 (1983)
- (187)- Kraujelis K, Hulinskaite A, Meilus V *J Steroid Biochem and Molec Biol* 38: 43-47 (1991)
- (188)- Jensen EV *Ann Acad Sci* 761: 1-4 (1995)
- (189)- Hendry LB, Chu CK, Rosser ML, Copland JA, Wood JC, Mahesh VB *J Steroid Biochem and Molec Biol* 49: 269-280 (1994)

