

EFECTOS ÓSEOS DE ACTIVADORES NO GENOTRÓPICOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (ANGELS)

ARIEL SÁNCHEZ^{(1)*} Y CLAUDIA SEDLINSKY⁽²⁾

1) Centro de Endocrinología, Rosario; 2) Servicio de Endocrinología, Hospital Francés, Buenos Aires.

Resumen

Los estrógenos son protectores del hueso y tienen un marcado efecto anti-fractura. Sin embargo, sus efectos sobre los tejidos reproductivos estrechan el margen de su indicación preventiva o terapéutica. Nuevos compuestos derivados de los estrógenos, con un mejor perfil de riesgo/beneficio, han sido investigados en los últimos años. Los activadores no genotrópicos del receptor de estrógenos (ANGELS), cuyo prototipo es el estrén, han suscitado gran interés por su potencial terapéutico. Estas drogas actúan sobre el genoma por un mecanismo no tradicional, es decir no-genómico, activando quinasas citosólicas dependientes de señales extracelulares (ERK-1 y ERK-2). En modelos murinos, el estrén evita la osteopenia post-castración en animales de ambos sexos, sin estimular el útero, el endometrio ni las vesículas seminales. La masa ósea tanto trabecular como cortical aumenta más que con el reemplazo estrogénico en ratas hembra, o androgénico en ratas macho, y mejora la resistencia ósea a la fractura en ensayos biomecánicos de vértebras y huesos largos. Recientemente han aparecido comunicaciones reportando efectos genómicos del estrén, y estimulación de tejidos reproductivos en modelos experimentales. Ésta es una nota de atención y subraya la necesidad de más estudios sobre esta nueva e interesante familia de esteroides sintéticos.

Palabras clave: hueso; osteoporosis; estrógenos; ANGELS, estrén.

EFFECTS OF NON-GENOTROPIC ACTIVATORS OF ESTROGEN RECEPTORS (ANGELS) ON BONE.

Summary

Estrogens prevent osteopenia after the menopause and have clear anti-fracture effects. However, their impact on reproductive tissues has restricted widespread preventive and therapeutic use of estrogens for osteoporosis in women. New drugs derived from estrogens, with a better risk/benefit profile, have been investigated in the last few years. Non-genotropic activators of the estrogen receptor (ANGELS), such as estren, have aroused great interest due to their therapeutic potential. These drugs influence the genoma through a non-classical, non-genomic mechanism, activating extracellular signalling-responsive cytosolic kinases (ERKs 1 and 2). In rodent models estren prevents post-castration osteopenia (both in male and female animals), without stimulating reproductive tissues such as the uterus, the endometrium, and seminal vesicles. Bone mass increases more than it does with the use of estradiol or dihydrotestosterone in male and female animals, respectively, and mechanical properties of bone are improved (vertebrae, long bones). However, there are recent communications reporting genomic effects of estren, and stimulation of reproductive tissues in some experimental models. This is a sobering note, underlying the need of more studies about this new and interesting family of synthetic steroids.

Key words: bone; osteoporosis; estrogens; ANGELS, estren.

* Dirección postal: San Lorenzo 876, 1er. piso, (2000) Rosario, SF. Correo electrónico: asanchez@cimero.org.ar

Los beneficios y efectos colaterales de la terapia de reemplazo hormonal (TRH) en la mujer postmenopáusica son objeto de permanente revisión, sobre todo después de la publicación del estudio WHI.^{1,2} Sin embargo, un efecto es indiscutible: los estrógenos protegen la masa ósea en la postmenopausia, y tienen efecto anti-fractura incluso varios años después del período de administración.³

Debido al riesgo de la estimulación crónica de tejidos reproductivos, con el consiguiente aumento en la incidencia de cáncer de mama y endometrio, se han buscado nuevos compuestos capaces de actuar sobre el receptor de estrógenos de manera selectiva en otros tejidos sin estimular el aparato reproductor. Así han surgido los STEARs (*Selective Tissue Estrogenic Activity Regulators*) como la tibolona, y los SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulators*) como el raloxifeno.^{4,5} La búsqueda de otros compuestos similar-estrógeno no ha cesado, y nos referiremos acá a los ANGELS (*Activators of Non-Genotropic Estrogen-Like Signaling*). Un grupo de investigadores de la Universidad de Arkansas para las Ciencias Médicas, dirigidos por el Dr. Stavros Manolagas, ha desarrollado el estrén (4-estren-3 α ,17 β -diol) –molécula sintética que se une al sitio de unión del receptor estrogénico pero carecería de actividad transcripcional–, y estudiado sus efectos óseos y extra-óseos en un modelo murino.

Hace tiempo se conocía que los esteroides sexuales (tanto estrógenos –E– como andrógenos –A–) ejercen muchos efectos biológicos que no pueden explicarse por la interacción de sus receptores con el ADN. Lo que se ignoraba era la relevancia fisiológica de dicha acción. Los receptores de E y A, lejos de actuar sólo como factores de transcripción dependientes del ligando para regular la expresión génica, aparecen como reguladores que integran múltiples señales entre ligandos y vías de señalización intracelular, coordinando funciones nucleares y extranucleares.

El hueso tiene receptores para estrógenos (ER α y β) y también para andrógenos (AR) pero a una concentración 10 veces menor que la de tejidos reproductivos. A diferencia de lo que ocurre con los tejidos reproductivos que muestran un distribución de dichos receptores de forma sexo-específica, el nivel de expresión y la distribución de los mismos en células óseas es similar en ambos sexos. Hay una relativa inespecificidad de género en la respuesta ósea a E y A: independientemente de la mayor presencia circulan-

te de A o E en uno u otro sexo, son los E los responsables de la maduración y cierre de la placa epifisaria en ambos sexos. E y A disminuyen el proceso de recambio óseo actuando sobre precursores de osteoclastos y osteoblastos por vía genómica al reducir la proliferación y diferenciación de los mismos. Tanto E como A pueden modificar la sobrevivencia de osteoblastos, osteocitos y osteoclastos controlando los procesos de muerte celular programada o apoptosis a través de mecanismos no genómicos.

El estradiol acelera la apoptosis de los osteoclastos y retarda la de osteoblastos y osteocitos; esto se debe principalmente a interacción proteína-proteína entre el ER y ciertos factores de transcripción como NF-kB (*Nuclear Factor kappa B*), y AP-1 (*Activating Protein-1*), entre otros.

La vía genómica es relativamente lenta: supone la entrada del esteroide al citoplasma, la unión a su receptor, la traslocación del complejo esteroide-receptor al núcleo, la interacción con los factores nucleares de transcripción y la transcripción génica.

La vía no genómica o no genotrópica es rápida, sólo requiere la unión del esteroide con un receptor ubicado en la membrana citoplasmática, y es independiente del sexo. Inicia una cascada de fosforilación de una serie de enzimas citosólicas que, una vez activadas, inducen una fuerte actividad antiapoptótica. A través de diferentes vías de señalización las acciones no genotrópicas de los esteroides sexuales modulan finalmente la actividad genómica (ver Fig. 1).

Las MAP-Kinasas (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) son enzimas ricas en treonina y serina que resultan inducidas por factores de crecimiento como el FGF (factor de crecimiento fibroblástico), modulan la unión de los esteroides sexuales con el ADN y activan o reprimen la expresión de genes responsables del crecimiento, diferenciación y sobrevivencia celular. Las más conocidas son las ERKs (*Extracellular signal-Regulated Kinases*) y las JNK (*c-Jun/N-terminal Kinases*); las primeras promueven la actividad y la sobrevivencia de los osteoblastos y la apoptosis de los osteoclastos, mientras que las segundas, abundantes en los mamíferos, al activarse promueven la actividad de los osteoclastos, pero al inhibirse promueven su apoptosis. La acción estimulante de la proliferación osteoblástica de los estrógenos se ejerce a través del gene *c-fos*. Los potentes efectos anti-apoptóticos que tienen los esteroides sexuales sobre los osteoblastos y osteocitos se deben a la estimulación de la cascada

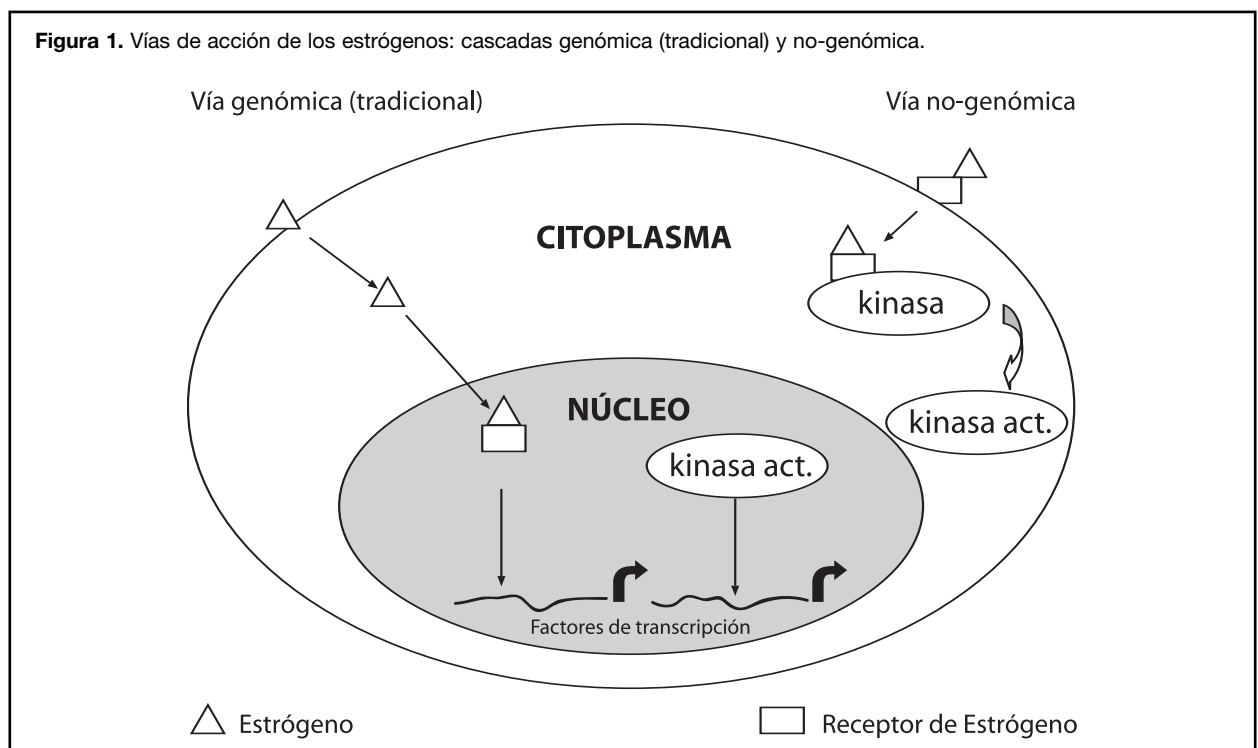
Src/Shc/ERK y a la inhibición de la cascada *JNK**.⁶ Entre las proteínas pro-apoptóticas que se inactivan por efecto estrogénico está *Bad*, al tiempo que se activan genes anti-apoptóticos, como el *Creb*.⁷

Actuando por la vía no-genómica el estradiol actúa a las kinasas ERK-1 y ERK-2; la fosforilación de *Src* tiene lugar en segundos, en unas invaginaciones especiales de la membrana celular llamadas cavéolas. El efecto se da a concentraciones fisiológicas de estradiol (10^{-11} - 10^{-10} M), mientras que la cascada no se activa a concentraciones supra-fisiológicas, quizás en un diseño que trata de proteger a los tejidos no reproductivos de las amplias variaciones del tenor de estrógenos que se dan durante la vida de la mujer (ciclo menstrual, embarazo).⁸

En el modelo murino estudiado por el grupo de Little Rock (Arkansas, EUA), en el que participan dos investigadoras argentinas (las Dras. T. Bellido y L. Plotkin), el estrés revierte la pérdida ósea post-castración tanto en hembras como en machos adultos. El efecto es comparable al del estradiol y la dihidrotestosterona, pero ofrece diferencias con el del raloxifeno: el estrés estimula la osteocalcina, mientras que el raloxifeno la disminu-

ye (esto podría interpretarse como un efecto anabólico del estrés, frente a un efecto anti-remodelatorio del raloxifeno). Macroscópicamente, el grosor de las cortezas tibiales y vertebrales es mayor con estrés que con los esteroides naturales. A nivel microscópico, disminuye significativamente el número de osteoblastos en apoptosis y aumenta 2-3 veces el número de osteoclastos apoptóticos; el balance positivo entre la formación y la resorción óseas resulta 30% mayor con estrés que con estradiol. Desde el punto de vista biomecánico, aumenta la resistencia del fémur a la fractura y la de las vértebras al aplastamiento, y dicho efecto es significativamente mayor que el obtenido con el estradiol. Resulta promisorio el hecho de que el estrés no impide la involución uterina, endometrial, o de las vesículas seminales luego de la castración.⁷ Por otro lado, estudios básicos del mismo grupo muestran que el estrés no estimula el crecimiento de células de cáncer de mama en cultivos.

Los últimos trabajos del mencionado grupo han demostrado que el estrés, al igual que el estradiol, modula la apoptosis de osteoblastos y osteoclastos (retardando la de aquéllos y promoviendo la de éstos)



* *Src* es un proto-oncogén imprescindible para la función de los osteoclastos, aunque no para su maduración; permite la formación de podosomas y la síntesis de proteínas de adhesión. *Shc* es un sustrato que interactúa con varios factores de crecimiento de la familia Insulina/IGF-1.

mediante efectos antioxidantes, estimulando la síntesis de glutatión; la actividad de la glutatión-reductasa también resulta estimulada en osteoclastos (pero no en osteoblastos).⁹

En las células blanco parece haber grandes "signalosomas", sitios especializados de la membrana celular (las ya mencionadas cavéolas) o del propio citoplasma, donde convergen señales de receptores de esteroides, kinasas, proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), etc. Los ANGELS tienen la propiedad de activar dichos signalosomas, propiedad de la que carecen los esteroides sexuales clásicos y los metabolitos androgénicos.¹⁰

Otro grupo de investigadores ha hecho la interesante comprobación de que el estrén ejerce un papel protector sobre el hueso murino en un modelo de ratones machos que carecen del receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha^{-/-}$); estos animales castrados no pierden hueso trabecular si reciben estrén, pero el efecto protector es abolido por un anti-andrógeno. Esto demuestra que, en ausencia del receptor de E, el estrén ejerce efectos óseos actuando sobre el AR.¹¹ El mismo grupo advierte sobre la falta de selectividad de los isómeros del estrén, y han podido mostrar que este estrógeno sintético estimula órganos reproductivos en ratones, y también células de cáncer mamario mantenidas en cultivo.¹²

Hay otros trabajos recientes donde se demuestra que el estrén tiene también actividad genotrópica. Un trabajo sueco muestra el efecto agonista del estrén interactuando tanto con el $ER\alpha$ como con el $ER\beta$ sobre hueso trabecular y útero murino. Observaron que este efecto se produ-

cía por la activación del ADN sobre el elemento de respuesta al estrógeno, demostrando la capacidad del estrén de ejercer efectos genómicos y postulándolo como un SERM con actividad transcripcional.¹³ Otro estudio propone al estrén como una prohormona con capacidad de regular los efectos transcripcionales tanto del ER como del AR. Dicha molécula regularía en forma directa e indirecta la expresión génica de la actividad androgénica dependiente del AR. También demostraron que los osteoblastos, a través de la enzima 3- α hidroxisteroide-deshidrogenasa, pueden transformar el estrén en 19-nortestosterona *in vitro*. Y en cultivos de osteoblastos verificaron la presencia de actividad transcripcional característica de la interacción del ER con el ADN.¹⁴ Finalmente, un trabajo muestra que el estrén, interactuando con el AR en un modelo murino, tiene capacidad de unirse (*in vitro* e *in vivo*) a dicho receptor, translocarse al núcleo celular y regular la transcripción de genes clásicamente regulados por la acción del AR como el gen del PSA.¹⁵

Es probable que en el hueso de los mamíferos el efecto osteotrópico de los esteroides sexuales resulte de un balance entre las acciones genómicas y no-genómicas. El desarrollo de compuestos como el estrén, capaces de proteger al hueso de la ausencia de andrógenos y/o estrógenos, sin estimular los tejidos no reproductivos, abre perspectivas interesantes para la prevención y el tratamiento de la osteoporosis en ambos sexos.¹⁶ Pero antes serán necesarios más estudios sobre la especificidad y seguridad del estrén y de preparados similares.

(Recibido: octubre de 2004. Aceptado: noviembre de 2004)

REFERENCIAS

1. The Writing Group for the Women's Health Initiative investigators: *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women*. JAMA 288:321-33, 2002.
2. Tozzini RI, Bocanera R: *Tratamiento hormonal de reemplazo en el 2003* (Editorial). Rev Méd Rosario 69:7-11, 2003.
3. Bagger YZ, Tankó LB, Alexandersen P, y col: *Two to three years of hormone replacement therapy in healthy women have long-term preventive effects on bone mass and osteoporotic fractures*. Bone 34:728-35, 2004.
4. Modelska K, Cummings S: *Tibolone for postmenopausal women - systematic review of randomized trials*. J Clin Endocrinol Metab 87:16-23, 2002.
5. Sánchez A: *Efectos de los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos sobre el esqueleto*. En "Raloxifeno. Estudio monográfico". Información Científica Gador; Buenos Aires, 1998.
6. Le Roith D, Blakesley VA: *Biology of growth factors*. En "Skeletal growth factors" (E. Canalis, ed.). Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, 2000. Chapter 3, pp 31-50.
7. Massari F: *ANGELS: ¿Una nueva opción?* Rev Arg Osteología 3:26-30, 2004.
8. Kousteni S, Bellido T, Plotkin L, y col: *Nongenotropic, sex nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity*. Cell 104:719-30, 2001.
9. Chen JR, Han L, Zimniak P, y col: *Esteroids regulate*

- glutathione reduction in bone by a nongenotropic mechanism of action: a requirement for their effects on osteoclastogenesis and on the apoptosis of osteoblasts and osteoclasts* (Abstract). J Bone Miner Res 19 (Suppl 1):S284, 2004.
10. Kousteni S, Han L, Almeida M, y col: *Estren, but not estradiol, DHT or 19-nortestosterone, induces osteoblast commitment and differentiation by stimulating Smad1/5/8 phosphorylation and transcription* (Abstract). J Bone Miner Res 19 (Suppl 1):S31, 2004.
 11. Windahl SH, Chiusaroli R, Clément-Lacroix P, y col: *Estrens are non-selective ligands of the androgen receptor, protecting bone in estrogen receptor ?-deleted male mice whilst also affecting reproductive organs* (Abstract). J Bone Miner Res 19 (Suppl 1):S31, 2004.
 12. Galien R, Windahl S, Clément-Lacroix P, y col: *Estrens protect bone against ovariectomy-induced bone loss in mice but fail to be selective on reproductive organs and/or breast cancer cell lines* (Abstract). J Bone Miner Res 19 (Suppl 1):S321, 2004.
 13. Moverare S, Dahlund J, Anderson N, y col: *Estren is a selective estrogen receptor modulator with transcriptional activity*. Mol Pharmacol 64:1428-33, 2003.
 14. Centrella M, McCarthy TL, Chang WZ, Labaree DC, Hochberg RB: *Estren (4-estren-3alpha,17beta-diol) is a prohormone that regulates both androgenic and estrogenic transcriptional effects through the androgen receptor*. Mol Endocrinol 18:1120-30, 2004.
 15. Krishnan V, Bullock HA, Yaden B, y col: *The non genotropic synthetic ligand estren (4-estren-3alpha,17beta-diol) is a high affinity genotropic androgen receptor agonist*. Mol Pharmacol Online, Nov 22, 2004.
 16. Kousteni S, Chen J, Bellido T, y col: *Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids*. Science 298:843-6, 2002.

*“Ahora te agradezco
—es mi deseo— la ironía que has puesto
sobre mis labios, suave como la tuya.
Esa sonrisa me ha salvado de llantos y dolores.
Y no importa si ahora tengo lágrimas para ti,
para todos aquéllos que como tú esperan
y no saben qué.
Ah, muerte gentil, no toques el reloj de la cocina que late sobre el muro;
toda mi infancia pasó sobre el esmalte
de su cuadrante, sobre sus flores pintadas:
no toques las manos, el corazón de los viejos.
¿Pero acaso alguien responde? Oh muerte de piedad,
muerte de pudor. Adiós, querida, adiós, mi dulcissima mater”.*

(FINAL DE UNA CARTA DEL POETA
SALVATORE QUASIMODO A SU MADRE, EN 1948)