

00361

20

2^oJ.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIGONADOTROPICA DE DERIVADOS DE NORETISTERONA REDUCIDOS EN EL ANILLO A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS

(**BIOLOGIA CELULAR**)

P R E S E N T A :

Q.F.B. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I. Resumen	3
II. Introducción.	
1. <i>Antecedentes generales.</i>	<i>5</i>
2. <i>La Noretisterona.</i>	<i>12</i>
2.1 <i>Antecedentes generales de NET.</i>	<i>12</i>
2.2 <i>Propiedades físico químicas de NET.</i>	<i>13</i>
2.3 <i>Efecto antigonadotropico de NET.</i>	<i>14</i>
2.4 <i>Mecanismo de transporte de NET.</i>	<i>15</i>
2.5 <i>Efecto de NET sobre la unidad hipotálamo-hipófisis.</i>	<i>16</i>
2.6 <i>Efecto tipo estrógeno de NET.</i>	<i>16</i>
2.7 <i>Metabolismo in vitro de NET.</i>	<i>17</i>
2.8 <i>Interacción de NET con receptores citoplasmáticos.</i>	<i>17</i>
2.9 <i>Actividad estrogénica de los derivados de NET.</i>	<i>19</i>
III. Hipótesis de Trabajo.	20
IV. Material y Método.	22
1. <i>Reactivos.</i>	<i>22</i>
2. <i>Animales de experimentación.</i>	<i>26</i>
3. <i>Radioinmunoanálisis de LHr y FSHr.</i>	<i>26</i>
3.1 <i>Amortiguador ensayo</i>	<i>27</i>
3.2 <i>Preparación de primeros anticuerpos.</i>	<i>27</i>
3.3 <i>Marcación de I^{125}-LHr y I^{125}-FSHr.</i>	<i>27</i>

3.4 Preparación de estándares LHr y FSHr.	28
3.5 Protocolo de RIA.	29
3.6 Control de calidad.	30
4. Tratamiento hormonal.	30
4.1 Efecto antigonadotrópico de NET y sus derivados.	30
4.2 Efecto antigonadotrópico de NET y sus derivados en presencia de antiestrógeno (TAM).	32
4.3 Efecto antigonadotrópico de NET y sus derivados en presencia de antiandrógeno (AcCYP).	33
4.3.1 Optimización de la dosis de AcCYP.	33
4.3.2 Tratamiento con AcCYP seguido de NET, 5 α -NET y 3 β ,5 α -NET.	34
5. Prueba estadística.	35
V. Resultados.	36
VI. Discusión.	47
VII. Conclusiones.	53
VIII. Bibliografía.	54
IX. Publicaciones.	59

I. RESUMEN

Concientes de la necesidad de desarrollar más y mejores métodos anticonceptivos que permitan controlar el crecimiento poblacional, se diseñó el presente estudio para evaluar principalmente, la potencia antigonaodrópica de dos derivados reducidos de noretisterona (NET): el 5 α -NET y el 3 β ,5 α -NET, los cuales pudieran ser empleados en nuevas formulaciones anticonceptivas a dosis menores que las usualmente aplicadas de NET.

La NET es una de las progestinas sintéticas más ampliamente utilizadas como anticonceptivo a pesar de los efectos indeseables que se sabe provoca su emplea, ya sea en formulaciones orales o inyectables; efectos que pensamos son resultado de su metabolismo. Es por esto que nos pareció importante estudiar la potencia progestacional de los derivados reducidos de NET y el mecanismo por el cual estos ejercen su actividad biológica.

El modelo de la rata castrada fue muy útil para evaluar el mecanismo y la potencia inhibitoria de gonadotropinas hipofisarias de los metabolitos de NET; dado que presenta niveles elevados de LH y FSH, así como ausencia de receptores para progesterona, condición bajo la cual la inhibición de gonadotropinas se realizaría vía receptores para estrógenos o receptores para andrógenos. Ambos derivados fueron activos en este modelo, y por ello se añadió al diseño experimental de manera separada, un antiestrógeno (acetato de ciproterona) o un antiandrógeno (tamoxifen), para poder discriminar el derivado y el receptor activos en

cada caso. De esta manera se encontró que el derivado 5 α -NET es un potente inhibidor de gonadotropinas, principalmente de LH, a través de su unión con el receptor de andrógenos y el derivado 3 β ,5 α -NET mostró actividad antigonaotrópica vía unión con el receptor para estrógenos.

Basados en que el metabolito reducido 5 α -NET es susceptible de posterior reducción a derivados 3 α ,5 α y 3 β ,5 α , planteamos como mejor alternativa el empleo del derivado tetrahidro reducido 3 β ,5 α -NET en nuevas formulaciones anticonceptivas, el cual al ser administrado a dosis sensiblemente menores que NET pudiera tener menores efectos indeseables con similar capacidad anticonceptiva.

II. INTRODUCCION

1. ANTECEDENTES GENERALES:

En el año de 1859, se dió un fenómeno importante en la historia de la humanidad, aunque no fue apreciado inmediatamente: por primera vez en millones de años la población global sumó mil millones. Tomó entonces sólo 80 años alcanzar el segundo millar de millones en 1930 y unos 30 años más tarde, en 1961 se llegó a tres mil millones. Posteriormente bastaron únicamente 15 años para que sumaran cuatro mil millones y se necesitaron de 11 a 12 años para llegar a los cinco mil millones, en 1987. Día con día la población mundial se incrementa en unos 175,000 seres humanos y, de acuerdo con las actuales proyecciones, puede alcanzar los ocho mil millones en algún momento entre el año 2020 y el 2030. México ha sido anfitrión de importantes Conferencias Internacionales sobre Población, y de ellas surgieron declaraciones, como la de la Conferencia de Coyoac en 1974, la cual decía: "Los proximos 30 años traerán una duplicación de la población mundial; otro mundo encima de éste, igual en número, demandas y esperanzas". En 1984 durante la Segunda Conferencia de Población Mundial, dentro del Plan de Acción se declaró: "Se exhorta a los Gobiernos y Agencias Donantes a que brinden mayores recursos a la investigación biomédica en tecnología anticonceptiva, encaminada tanto a la seguridad como a la eficiencia de los métodos anticonceptivos existentes así como al desarrollo de nuevos métodos" (1).

Hace 20 años los gobiernos de siete países establecieron Programas de Planificación Familiar, mientras que hoy en día, más de 120 gobiernos apoyan tales programas directa o indirectamente. Sin embargo, es igualmente cierto que de un total de 600 millones de parejas en edad reproductiva que habitan en vías de desarrollo, aproximadamente 500 millones no están utilizando métodos adecuados para la regulación de la fertilidad (1). El siguiente cuadro muestra datos mundiales acerca del empleo de los métodos anticonceptivos.

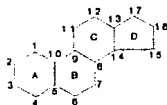
Estimaciones Mundiales del empleo de Metodos
para la Regulación de la Fertilidad
(modificada: de OMS 1978 y actualizada 1987)

METODO	M I L L O N E S D E USUARIAS
Coito interrumpido	?
Métodos naturales (ritmo)	?
Lactancia prolongada	50-100
Métodos de barrera (condón, diafragma)	15- 25
Dispositivos intrauterinos (DIUs)	15- 35
Anticonceptivos hormonales	60-100
Esterilización (en el varón y en la mujer)	15- 30
Aborto	30- 60

Los anticonceptivos de acción prolongada, ya sean píldoras mensuales, inyectables mensuales, bi o trimestrales, implantes subdérmicos, sistemas intrauterinos o intracervicales, pertenecen a la clase de anticonceptivos esteroides (1). Los esteroides son compuestos que contienen el sistema de anillo ciclopentanoperhidro-fenantreno y difieren unos de otros por la introducción de dobles enlaces entre ciertos pares de átomos de carbono, por la entrada de

de sustituyentes en vez de átomos de hidrógeno o por la adición de un tipo específico de cadena lateral; en base a esto los esteroides se clasifican como derivados de ciertos hidrocarburos: C_{18} estrano, C_{19} androstano, C_{21} pregnano (2); de estos derivados los más empleados como anticonceptivos esteroides sintéticos son las progestinas que derivan de la molécula de 17α -OH progesterona (acetato de medroxiprogesterona (MPA), acetato de clormadinona) de la serie C_{21} y aquellas que derivan de la 19-nor-testosterona (noretisterona (NET), noretinodrel, levonorgestrel) de la serie C_{19} .

Ciclopentanoperhidrofenantreno
núcleo básico de los esteroides.

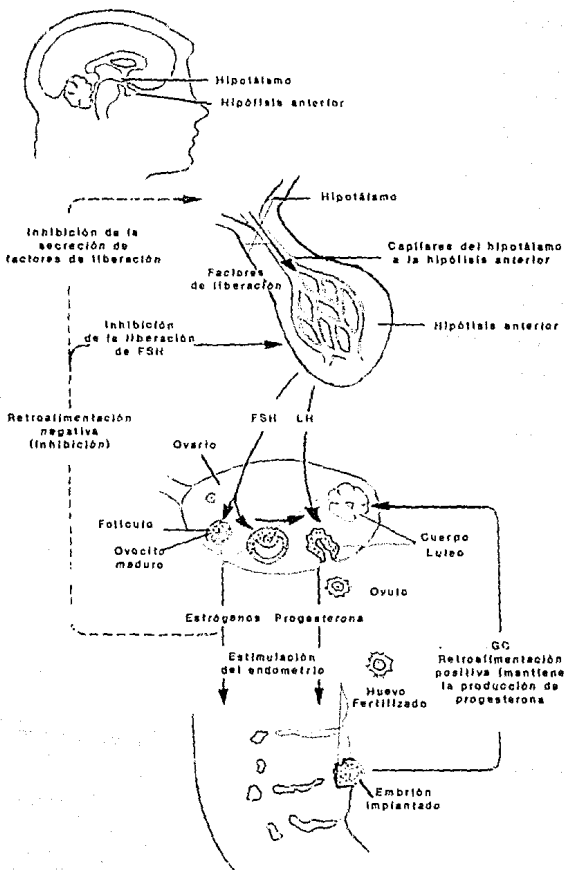


En la búsqueda de formulaciones anticonceptivas más eficaces y de menos efectos colaterales se ha trabajado desarrollando compuestos de fórmula similar a la progesterona, la cual desde que fue purificada en 1934 por Buternandt y Westphal, abrió una gran línea de investigación sobre la inhibición de la ovulación. Desde entonces se demostró que la progesterona de manera natural es capaz de inhibir los niveles de gonadotropinas hipofisarias inhibiendo así la ovulación, pero por su rápida degradación por vía oral, no ha sido posible emplearla como anticonceptivo.

La progesterona al igual que los estrógenos juegan un papel importante dentro del sistema regulador denominado eje hipotálamo-hipófisis-ovario (figura 1).

figura. 1.

Eje hipotálamo-hipófisis-ovario



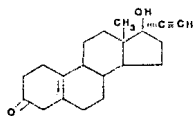
Los niveles de progesterona y estrógenos en mamíferos hembra son regulados por un complejo sistema de retroalimentación denominado eje hipotálamo-hipófisis-ovario (figura 1), en el cual juega un papel fundamental la hipófisis anterior que a su vez está conectada con el hipotálamo por medio de un sistema de vasos sanguíneos. En las terminaciones nerviosas del hipotálamo el péptido liberador de gonadotropinas (LHRH), se encuentra dentro de gránulos, en los cuales su liberación es regulada por efectos estimulatorios o inhibitorios de los esteroides sexuales, principalmente la progesterona y de diversos neurotransmisores (3), por un mecanismo que parece no estar mediado vía receptores. Las células nerviosas del hipotálamo al ser estimuladas, descargan el péptido liberador hipotalámico, el cual entra por los vasos sanguíneos y se une al receptor de las células de la hipófisis anterior, estos receptores están ubicados en la membrana plasmática de las células de la hipófisis y ejercen su efecto a través de señales o segundos mensajeros; la activación se inicia con la unión de la hormona a su receptor específico, produciendo nuevas señales o segundos mensajeros intracelulares que van a ejercer su efecto a nivel citosólico o nuclear. La respuesta celular que induce la unión hormónaprotéica-receptor es mediada por AMP cíclico de manera diferente en cada órgano blanco. Bajo el estímulo de las hormonas protéicas los niveles de AMP cíclico cambian hasta 5 veces en segundos y estos cambios desencadenan una serie de reacciones específicas dependiendo de la hormona y del tipo de célula blanco. En el caso específico de la LHRH, esta da como resultado la liberación de la hormona foliculo estimulante (FSH). Gracias a la FSH, la cual ejerce su efecto vía receptores específicos membranales, el folículo crece en tamaño y número de células. Las células foliculares secretan estrógenos que estimulan el crecimiento de la pared uterina y sus glándulas, preparándose para la implantación del embrión, si el óvulo

es fertilizado. Los estrógenos también actúan en el hipotálamo y en la hipófisis; el mecanismo por el cual las hormonas esteroideas ejercen sus efectos en la hipófisis es mediado vía receptores, por un mecanismo que se realiza a nivel genómico. Los receptores para hormonas esteroideas presentan gran similitud y están constituidos por cadenas polipeptídicas de aproximadamente 800 amino ácidos distribuidos en tres dominios distintos: el dominio carboxilo terminal, al cual se une la hormona; el dominio intermedio, al cual se une el DNA y el dominio aminoterminal que activa la transcripción de genes. Algunos receptores para hormonas esteroideas están localizados en citosol cuando se encuentran inactivos, mientras que otros están localizados principalmente en el núcleo; en cualquier caso la unión de la hormona esteroide con el receptor incrementa la afinidad de este por el DNA, permitiendo que éste se una de manera específica a secuencias de nucleótidos, lo cual ocasiona que se active o que en algunos casos se suprima la transcripción de genes que cada hormona específica regula; es así como los estrógenos actúan en la hipófisis reduciendo la secreción de FSH, la cual a su vez provoca una disminución en los niveles de estrógenos por un mecanismo de retroalimentación negativa. Cuando el folículo madura los niveles de FSH disminuyen y el hipotálamo también por mecanismo de retroalimentación negativa libera la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), la cual hace que la hipófisis anterior secrete la hormona luteinizante (LH). La LH completa la maduración del folículo y el óvulo, el folículo maduro libera al óvulo dentro del oviducto en donde es transformado por una glándula endócrina temporal, el cuerpo lúteo. Bajo la continua estimulación de LH, el cuerpo lúteo secreta progesterona. La progesterona actúa induciendo el crecimiento de la pared uterina preparándose para recibir al embrión. En ausencia de fertilización del óvulo y embarazo, el cuerpo lúteo se degenera. Como

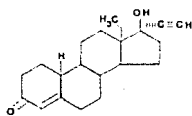
resultado de la disminución de los niveles circulantes de estrógenos y progesterona se produce degeneración de la pared uterina y se inicia la menstruación (4,5).

Los resultados obtenidos en la elaboración de progestinas sintéticas, han permitido conocer que pequeñas modificaciones en el anillo básico de la progesterona, puede dar como resultado un aumento importante en la potencia anticonceptiva así como diversas actividades tales como efecto androgénico, sinandrogénico, antiandrogénico, etc. (6), debiéndose realizar por esta razón, estudios rigurosos que nos indiquen la dosis adecuada a la que deberá administrarse un compuesto para obtener el efecto anticonceptivo deseado (7,8).

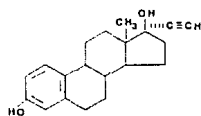
Figura 2. Estructura química de los anticonceptivos esteroideos más comúnmente empleados.



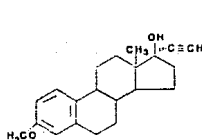
Noretinodrel



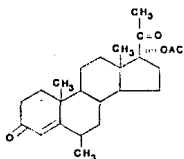
Norgestrel



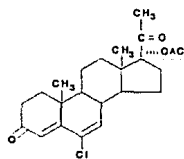
17 -Ethinilestradiol



Mestranol



Acetato de Medroxiprogesterona



Acetato de Clormadinona

2. LA NORETISTERONA:

2.1 Antecedentes de NET:

Una de las progestinas sintéticas que se usan cotidianamente en la clínica es un derivado químico de la 19-nortestosterona, la 17 α -etinil-17 β -hidroxi-4-estren-3-ona ó noretisterona (NET), la cual fue sintetizada en México por Djerassi, Miramontes y Rosenkranz en 1951 (9).

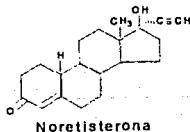
Las primeras evaluaciones de la noretisterona en animales (1954), mostraron que era un progestágeno con alta capacidad de inhibir la ovulación (10). Posteriormente (Hertz y cols. 1954, Jadryevic y cols. 1956, Pincus y cols. 1956, Saunders y cols. 1956) realizaron estudios para confirmar la potencia de NET y su empleo en el tratamiento de desórdenes menstruales y problemas de fertilidad (11). Estudios clínicos con NET mostraron que ésta era capaz de provocar una inhibición efectiva de la ovulación y era un regulador confiable de la menstruación. Estos trabajos sirvieron de base para proponer a la NET como una alternativa viable para ser empleada como anticonceptivo. En estos primeros estudios se observó también que la NET presentaba una ligera actividad estrogénica, efecto que se asoció entonces a que las preparaciones estaban contaminadas con pequeñas cantidades de estrógeno activo. El metabolismo de NET en la mujer fue estudiado hacia 1968, analizando la excreción de NET tritiado en plasma y orina (12).

La NET es usada actualmente en muy diversas formulaciones y combinaciones con estrógenos. Dentro de los nombre comerciales de presentaciones orales tenemos el Anovlar 21 (1 mg NET + 0.05 mg estrógeno), Norace-1 (1mg NET + 0.02 mg estrógeno), Ortho-Novum (0.5 mg NET + 0.1 mg estrógeno), etc. Su formulación anticonceptiva inyectable como enantato de noretisterona (en-NET) es usada por un millón de mujeres en cuarenta diferentes países (1).

En las investigaciones ucerca de los efectos de NET, se ha encontrado que además de su efecto progestacional (13) exhibe otros efectos tales como: actividad estrogénica, androgénica y antihormonal (14,15,16,17). Se han planteado diferentes hipótesis para explicar sus efectos, siendo una de las más relevantes la que ofrece una explicación a través de su biotransformación a metabolitos reducidos en el anillo A, principalmente los derivados 5 α -NET, 3 α ,5 α -NET y 3 β ,5 α -NET.

2.2 Propiedades físico-químicas de la NET:

Fórmula desarrollada (18):



Fórmula condensada (18): $C_{20}H_{26}O_2$

Peso molecular (18): 298.42 g/mol.

Punto fusión (18): Entre 220°C y 208°C.

Solubilidad (18): Prácticamente insoluble en agua, soluble 1: 150 de alcohol, 1: 90 de acetona, 1: 30 de cloroformo, 1: 5 de piridina, soluble en dioxano y ligeramente soluble en eter.

2.3 Efecto antigonadotrópico de NET:

Como índice de actividad progestacional se analizó la potencia antigonadotrópica de NET en el humano (19,20). Para realizar este análisis en condiciones fisiológicas que pusieran de manifiesto claramente la actividad de NET se eligió como modelo a la mujer post-menopáusicas, dado que presenta niveles persistentemente elevados de gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH). Empleando en-NET y progesterona natural se demostró que NET ejerce una actividad antigonadotrópica en la mujer post-menopáusicas no tratada con estrógenos, sistema en el cual la progesterona natural fue incapaz de ejercer este efecto, pues necesita la presencia de su receptor específico, cuya síntesis es regulada directamente por estrógeno (21,22), indicando que la capacidad antigonadotrópica de NET se realiza por un mecanismo de acción diferente al de la progesterona natural.

La capacidad antigonadotrópica de NET podría haberse explicado por su potencia estrogénica o por su interacción con el receptor de andrógenos. Para saber si el efecto de NET se realiza vía receptor de andrógenos se incluyó en el estudio otro modelo, el cual estuvo constituido por individuos con pseudohermafroditismo masculino y deficiencia heredada de receptor para andrógenos, estos pacientes también presentan niveles elevados de LH y FSH así como ausencia de receptores de progesterona estrógeno dependientes. Los resultados obtenidos indicaron que el efecto antigonadotrópico de NET no es mediado vía receptor de andrógenos, dado que en ausencia del receptor específico, la NET fue capaz de dar un efecto antigonadotrópico.

2.4 Mecanismo de transporte de NET:

El mecanismo de transporte para esta progestina ha sido investigado en el humano y en diferentes especies de mamíferos (rata, conejo y bovinos) (23) a través de estudios de desplazamiento, en los cuales se valoró la capacidad de NET para desplazar dihidrotestosterona (DHT) y cortisol de sus respectivas globulinas transportadoras SHBG y CBG. Estos datos demostraron la capacidad de NET de interactuar con ambas proteínas plasmáticas transportadoras de esteroides sexuales.

2.5 Efecto de NET sobre la unidad hipotálamo-hipófisis:

Con objeto de clarificar la actividad estrogénica de NET se ha investigado su efecto en la unidad hipotálamo-hipófisis (24) evaluando la translocación del receptor de estrógeno al núcleo, encontrándose que el receptor citosólico de estradiol es translocado al núcleo de las células hipofisarias después de la administración crónica in vivo de NET a ratas hembras castradas. En pruebas de desplazamiento se encontró que la NET fue incapaz de desplazar estradiol tritiado de los receptores nucleares. La translocación del receptor de estrógenos se vió acompañada por la inhibición de hormona luteinizante corroborándose nuevamente la capacidad antagonotrópica de esta progestina.

2.6 Efecto tipo estrógeno de NET:

En base a estudios realizados en ratas castradas se ha informado el efecto tipo estrógeno de NET (25), en estos se inyectó tanto NET como 17β -estradiol para evaluar la respuesta sobre gonadotropinas hipofisarias posterior a un pulso de LHRH, se encontró así, que el efecto inhibitorio sobre la actividad de la hormona hipotalámica, LHRH fue similar con la administración de NET y 17β -estradiol, mostrando de esta manera que la molécula de NET posee un efecto tipo estrógeno, el cual posteriormente se explicará como efecto del metabolismo de esta progestina.

2.7 Metabolismo in vitro de NET:

A través de estudios bioquímicos se ha establecido que la NET se metaboliza in vitro, como in vivo a nivel de órganos blanco (26) produciendo compuestos reducidos en el anillo A, los cuales se han identificado en suero y orina de mujeres bajo tratamiento con NET (27). Estos datos indican la presencia de enzimas capaces de transformar la NET a otros metabolitos estructuralmente diferentes, esto aunado a los hallazgos reportados acerca de sus diversas actividades nos permite deducir que el metabolismo de las progestinas sintéticas y las interacciones de estos productos de bio-conversión con los receptores putativos a esteroides dentro de las células blanco puede modular y dirigir la expresión de sus actividades biológicas.

2.8 Interacción de NET con receptores citoplasmáticos:

Para ejercer su efecto a nivel de los órganos blanco, las hormonas esteroides necesitan de la presencia de receptores intracelulares que permiten la interacción de la hormona con el genoma celular (28).

Las investigaciones realizadas empleando los derivados de NET, han aportado nueva luz sobre el mecanismo de acción de las progestinas. En años recientes se informó la interacción de NET y sus metabolitos 5α -NET, $3\alpha,5\alpha$ -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET con receptores

citoplasmáticos en órganos blanco (29). Los resultados obtenidos con estos estudios de desplazamiento de los receptores para hormonas esteroides, demostraron que la potencia competitiva de NET y sus derivados por sitios de unión a receptores citoplasmáticos de hormonas esteroides, fue diferente no sólo para cada receptor sino también para cada compuesto en particular, la siguiente tabla muestra la afinidad de unión relativa (RBA) entre cada esteroide los receptores.

Afinidad de Unión Relativa

Esteroides	Receptores de Progesterona	Receptores de Andrógenos	Receptores de Estrógenos
NET	11.2	8.1	< 0.1
5 α -NET	4.8	14.8	< 0.1
3 α ,5 α -NET	< 0.1	< 0.1	< 0.1
3 β ,5 α -NET	< 0.1	< 0.1	6.3
3 α ,3 β -NET	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Progesterona	26	nd	nd
ORG-2058	100	nd	nd
5 α -DHT	nd	172	nd
R-1881	nd	100	nd
17 β -Estradiol	nd	nd	100

Estos datos muestran una conducta por parte de NET similar a lo que sucede con el andrógeno natural, La testosterona, para la cual una reducción en posición 5 α provoca un aumento en la constante de afinidad por el receptor para andrógenos y su posterior reducción en posición 3 α ,5 α y 3 β ,5 α da como resultado dos metabolitos, el 3 α ,5 α -androstano diol que no tiene afinidad por el receptor para andrógenos y presenta poca afinidad por el receptor para estrógenos, y el derivado 3 β ,5 α -androstano diol que no tiene afinidad por el receptor para andrógenos pero que presenta gran afinidad por el receptor para estrógenos (30).

2.9 Actividad estrogénica de derivados de NET:

La transformación de NET a sus derivados neutros tetrahidros reducidos en el anillo A (3 α ,5 α -NET y 3 β ,5 α -NET) y su interacción con el receptor de estrógenos, fue un hallazgo importante que condujo a la realización de nuevos estudios. La posible actividad estrogénica de los derivados 3 α ,5 α -NET y 3 β ,5 α -NET se estudió valorando su capacidad de inducir receptores de progesterona estrógeno dependientes (31,32,21), empleando como modelo experimental a la rata ovariectomizada. Los resultados obtenidos demostraron que la administración de 3 β ,5 α -NET indujo la síntesis de receptores de progesterona estrógeno dependientes en la hipófisis anterior de la rata. Los receptores para progesterona inducidos por 3 β ,5 α -NET mostraron propiedades físico-químicas y de unión similares a las presentadas por los receptores inducidos por estradiol. Por su parte el derivado 3 α ,5 α -NET presentó un efecto antagónico con respecto a su alcohol isómero 3 β . De esta manera se demostró que el derivado tetrahidro reducido 3 β ,5 α de NET, que no posee anillo fenólico en su estructura, es capaz de inducir respuesta típicamente estrogénica vía receptor para estrógenos.

La actividad estrogénica del 3 β ,5 α -NET también ha sido confirmada al demostrar que es capaz de adelantar la pubertad medida como la apertura vaginal y ciclicidad reproductiva en ratas, de la misma manera que lo hace el estradiol (E₂) (33).

III. HIPOTESIS DEL TRABAJO

Siendo la planificación familiar un tema de actualidad en los países subdesarrollados ó en vías de desarrollo como México (1,34), la investigación anticonceptiva adquiere particular relevancia. Por ello en el presente trabajo se pretende evaluar la potencia antigonaotrópica de los derivados de una progestina sintética ya conocida, la NET, la cual se ha empleado como anticonceptivo por más de 30 años.

Los derivados de NET reducidos en el anillo A, 5 α -NET, 3 α ,5 α -NET y 3 β ,5 α -NET pudieran ser empleados también como anticonceptivos, pero para ello deberá probarse ampliamente su actividad progestacional y/o antigonaotrópica al igual que la ausencia de efectos indeseables.

Teniendo como base los estudios efectuados por varios grupos de trabajo respecto a NET, en los que se ha investigado la capacidad de esta progestina de inhibir gonadotropinas (19,20,25), su mecanismo de transporte e interacción con las proteínas transportadoras de hormonas esteroides (23,35), así como su metabolismo (27,33), y la unión de NET y sus derivados a receptores citoplasmáticos (29). Se planteó como hipótesis del presente trabajo la siguiente: Una reducción en la posición 5 α de la molécula de NET (derivado de la 19-Nortestosterona), aumentaría su potencia antigonaotrópica de manera análoga a lo que sucede con un esteroide natural como la testosterona, en donde una reducción en la posición 5 α provoca un aumento en la potencia de la molécula e incrementa su capacidad de unión al receptor de andrógeno (36,37,38,39,40).

Con respecto a los derivados $3\alpha,5\alpha$ -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET, de los cuales se ha reportado su interacción con el receptor de estrógenos (29), podríamos suponer que si existe actividad antigonadotrópica será vía receptor de estrógenos, como sucede de manera natural con el estradiol.

El empleo de un tratamiento previo con antiandrógeno (acetato de ciproterona) y antiestrógeno (tamoxifen) podría ayudarnos a dilucidar y clarificar el mecanismo de acción por el cual estos derivados reducidos 5α NET y $3\beta,5\alpha$ NET, pudieran ejercer una inhibición de los niveles de gonadotropinas hipofisarias (41).

El modelo de la rata adulta castrada, seleccionado para este trabajo, parece ser práctico y accesible para realizar nuestro estudio, no solamente por presentar niveles elevados de gonadotropinas, sino también por presentar ausencia de receptores para progesterona estrógeno inducibles (19).

En base a lo antes mencionado, el presente estudio tuvo como objetivo: " Evaluar la potencia inhibitoria de gonadotropinas hipofisarias (hormona luteinizante y hormona foliculo estimulante), ejercida por la noretisterona (NET) y sus derivados reducidos en el anillo A, 5α -NET, $3\beta,5\alpha$ -NET y $3\alpha,5\alpha$ -NET en la rata".

IV. MATERIAL Y METODOS

1. REACTIVOS.

- 1.1 *Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO.): Sephadex G-100-120 (G100-120), Fosfato de Sodio Monobásico Anhidro (S-0751), Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro (S-0876), Cloruro de Sodio (S-9625), Azida de Sodio (S-2002), gamma-globulina (G-0261), Albumina (A-8022), Gelatina (G-9382), Timerosal (T-5125), Aceite de Maíz (C-8267), EDTA (ED255), Cloramina T (C-9887), Bisulfito de Sodio (S-9000)*
- 1.2 *Tamoxifen (TAM), (Trans-(1-P-β-dimetilamino etoxifenil)-1,2-difenilbutil-1-ona), fue obtenido de Imperial Chemical Industries, Macclesfield, Cheshire, Inglaterra.*
- 1.3 *Acetato de Ciproterona (AcCYP), C1,2α-metileno-6-cloro-3, 20 -dioxo-4,6-pregnanolieno-17α-il-acetato, fue donado por Shering Mexicana, México.*
- 1.4 *La Noretisterona (NET), (17α-etinilo-17β-hidroxi-4-estreno-3-ona, con una pureza mayor al 98%), fue donada por Shering Mexicana, México.*

1.5 *La preparación de 5 α -NET se efectuó a partir de NET con un alto grado de pureza. La reducción de NET se logra por medio de la reacción de litio en amoníaco líquido; sin embargo se obtiene siempre como sub-producto el compuesto de reducción de la triple ligadura en C-17. Con el propósito de minimizar la formación de este contaminante, Bowers y Cols. (42) utilizaron una mezcla de tetrahidro furano-tolueno como co-solvente en la reacción de litio-amoniaco líquido y obtuvieron una contaminación del 10%. Durante el curso de este estudio, se investigó en detalle esta reacción, encontrándose que diversos factores pueden afectar la formación del contaminante. Entre éstos se incluyen la velocidad de adición de litio a la mezcla de solvente, el secado del amoniaco líquido, el exceso de litio utilizado y el tiempo de reacción. Optimizando estas variables se logró obtener 5 α -NET con una mínima contaminación (5%). La purificación de 5 α -NET se realizó por recristalizaciones sucesivas. Los cristales blancos obtenidos a partir de hexano-acetato de etilo, mostraron las siguientes constantes: punto de fusión: 225°C, índice de rotación $[\alpha]_D$ (cloroformo) = +5.5°, Resonancia magnética nuclear: $[CDCl_3]$ 2.57 ppm (S, 1H); 0.9 ppm (S, 3H). Se obtuvo evidencia adicional de pureza química mediante el análisis de la conducta cromatográfica del compuesto en cromatografía gas-líquido y de alta presión. La formación de 5 α -NET fue de 85%.*

1.6 *La obtención de los dos tetrahidros isómeros 3 α , 5 α -NET y 3 β , 5 α -NET se efectuó a partir de 5 α -NET químicamente pura. La reducción del grupo 3-oxo de la 5 α -NET se realizó por medio de borohidruro de sodio en metanol como había sido informado por*

Bowers y Cols. (42). Estos investigadores, sin embargo solo obtuvieron el alcohol 3 β , mientras que en este estudio se obtuvo una mezcla de aproximadamente 85-90% del alcohol 3 β y 10-15% de alcohol 3 α . La separación de los alcoholes isoméricos se llevó a cabo por medio de cromatografía flash (43) y la identidad de estos productos se estableció por métodos espectroscópicos, principalmente el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, donde se pudo observar claramente la diferencia de desplazamiento químico del hidrógeno en C-3 (3.5 ppm para el alcohol 3 β y 4.17 ppm para el isomero 3 α). Debido a la necesidad de contar con mayores cantidades del alcohol 3 α y evitar la separación de los isómeros, se probó el hidruro doble de litio y aluminio en tetrahidro furano, sin embargo, los resultados fueron similares. Posteriormente, cuando se usó como reactivo reductor el "selectride" de litio (44), se obtuvo una mezcla de 95% de alcohol 3 α y 5% de alcohol 3 β . Estos resultados parecieran deberse a la falta del grupo metilo-19 que permite que el reactivo se aproxime por la cara β de la molécula y se lleve a cabo un ataque ecuatorial. Las constantes de los tetrahidro-alcoholes fueron: 3 α , 5 α -NET= punto de fusión 117°C, índice de rotación $[\alpha]_D$ (cloroformo) = 1.56°, resonancia magnética nuclear (CD₃OD) δ : 3.98 ppm (m, 1H, 3H); 2.6 ppm (S, 1H); 0.88 ppm (S, 3H) y para el 3 β , 5 α -NET= punto de fusión = 191°C, índice de rotación $[\alpha]_D$ (Cloroformo) = -25°, resonancia magnética nuclear (CD₃OD) δ : 3.45 ppm (b.m., 1H, 3H); 2.77 ppm (S, 1H); 0.82 ppm (S, 3H). Finalmente se determinó la conducta de estos compuestos en cromatografía de alta presión y gas-líquido.

1.7 *Los reactivos necesarios para montar el radioinmunoanálisis (RIA) de hormona luteinizante de rata (LHr) y hormona folículo estimulante de rata (FSHr) fueron obtenidos de las siguientes fuentes:*

1.7.1 *Reactivos donados por The National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIDDK), Baltimore Maryland , U.S.A.: estándar de yodación de FSH (NIDDK-rFSH-I-8), anticuerpo de conejo anti FSHr (NIDDK-anti-rFSH-S-11), estándar de referencia de FSHr (NIDDK-rFSH-RP-1), estándar de yodación de LHr (NIDDK-rLH-I-8), anticuerpo de conejo anti LHr (NIDDK-anti-rLH-S-10), estándar de referencia de LHr (NIDDK-rLH-RP-1).*

1.7.2 *Los sueros controles de LHr y FSHr se prepararon en base a sueros de ratas adultas castradas, los cuales se mantuvieron congelados a -20°C hasta su uso.*

1.7.3 *El yodo radioactivo I^{125} (IMS-30) fue comprado a Amersham International, Buckinghamshire, England con una actividad específica promedio de 15 μCi $I^{125}/\mu\text{g}$.*

1.7.4 *Segundo anticuerpo: Se preparó como segundo anticuerpo en nuestro laboratorio una gamma-globulina de borrego dirigida con contra una gamma-globulina de conejo purificada.*

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION:

Para todas las pruebas se emplearon ratas hembras y machos de la cepa Wistar, de 200 -250 g de peso; las cuales se criaron en el bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán y fueron mantenidos en ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los requerimientos de comida y agua fueron proporcionados ad libitum. Los animales se castraron 15 días antes del tratamiento mediante el procedimiento de orquidectomía bilateral para los machos y a través de ovariectomía vía incisión en ambos costados en el caso de las hembras.

3. RADIOINMUNOANALISIS DE LHr Y FSHr:

La técnica de radioinmunoanálisis (RIA) fue desarrollada por Yalow y Berson en 1960 (45) y se basa en la competencia entre la sustancia a cuantificar (analito) y el análogo marcado radioactivamente (marca) por una cantidad limitada de sitios de unión del anticuerpo. La cantidad de marca unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito (46).

En el presente trabajo se utilizó como método de separación entre la fracción libre y la unida, la técnica de doble anticuerpo en la cual un segundo anticuerpo o anticuerpo gammaglobulina se emplea para lograr una precipitación específica de la fracción unida (47).

El RIA para cada una de las gonadotropinas se estandarizó en nuestro laboratorio usando reactivos de NIDDK de la siguiente manera:

3.1 Amortiguador de ensayo:

Amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M, NaCl 150 mM, azida de sodio 15 mM como conservador, pH 7.6 adicionado de EDTA 0.1 M, albúmina sérica bovina (BSA) (200 mg/L) y gammaglobulina (5 mg/L).

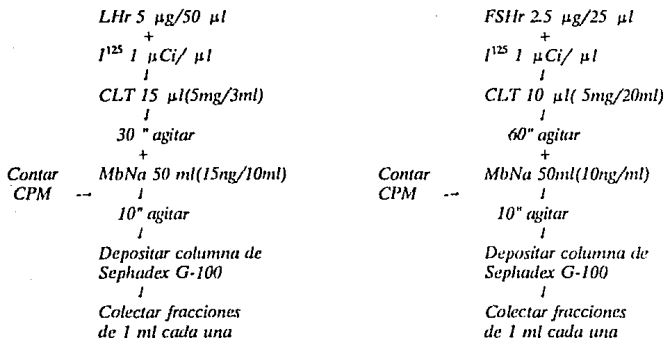
3.2 Preparación de primeros anticuerpos:

Los primeros anticuerpos o gammaglobulinas anti LHr y anti FSHr preparados en conejo, fueron proporcionados por NIDDK, y se diluyeron con el amortiguador de ensayo a una dilución final de: LHr 1:180,000 y FSHr 1:125,000. El porcentaje de reacción cruzada entre ambas hormonas fue menor a 0.05 %, según lo reportado por NIDDK para estos anticuerpos.

3.3 Marcación de LHr y FSHr con I^{125} :

Ambas hormonas LHr y FSHr se marcaron en nuestro laboratorio con I^{125} usando la técnica de la cloramina T (48), método por el cual las tirosinas presentes en la proteína son oxidadas por la cloramina T para permitir la incorporación de I^{125} en esta molécula; la reacción es detenida por la adición de un agente reductor, metabisulfito de sodio. Mediante una posterior elución es posible separar en cada caso la hormona unida a I^{125} libre.

Tanto de LH como de FSH se yoclaron 5µg disueltas en amortiguador de fosfatos pH 7.6, usando el procedimiento esquematizado en los siguientes diagramas:



La actividad específica promedio lograda fue de 45 µCi/µg y 98 µCi/µg para LHr y FSHr respectivamente.

3.4 Preparación de estándares de LHr y FSHr:

Los estándares de NIDDK para LHr y FSHr se diluyeron empleando el amortiguador de ensayo al hacer las dobles diluciones para lograr las siguientes concentraciones:

FSHr 1000 , 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ng/ml

LHr 1000 , 500, 250, 125, 62.5, 31.25 ng/ml

3.5 Protocolo de RIA para LHr y FSHr

REACTIVOS	EST. μ l	Bo μ l	UNE μ l	CT μ l
<i>Estándar, control, desconocido</i>	100	---	---	---
<i>Primer anticuerpo</i>	200	100	---	---
<i>Hormona I¹²⁵</i>	100	100	100	100
<i>Amortiguador</i>	---	200	300	---
<i>Incubar 24 h T.A.</i>				
<i>Segundo anticuerpo diluido 1:10</i>	200	200	200	---
<i>Incubar 4 h T.A.</i>				
<i>Agua destilada</i>		1 ml		---
<i>Centrifugar 3000 rpm 30 min. 4°C.</i>				
<i>EST = estándar</i>	<i>UNE = unión no específico</i>			
<i>Bo = unión máxima</i>	<i>CT = cuenta total</i>			

El sobrenadante se descartó por decantación y se limpiaron cuidadosamente las paredes de los tubos con un aplicador, evitando tocar el fondo del tubo. La radiactividad se cuantificó en un contador de centelleo para radiaciones gamma (Cristal 5000, Packard, U.S.A).

3.6 Control de calidad:

Gracias a la cuantificación que en cada RIA de LHr y FSHr se efectuó de los sueros controles preparados con suero de ratas castradas se logró determinar el coeficiente de variación (C.V.) intra e inter análisis para ambas gonadotropinas (49).

	<u>% C.V. intra-análisis</u>	<u>% C.V. inter-análisis</u>
LHr	6.3	8.9
FSHr	4.0	9.5

4. TRATAMIENTO HORMONAL.

4.1 Efecto antigonadotrópico de NET y sus derivados.

Los esteroides a empleados NET, 5 α -NET, 3 α ,5 α -NET y 3 β ,5 α -NET, se disolvieron en aceite de maíz y se inyectaron en la parte proximal de la extremidad posterior vía subcutánea durante 7 días consecutivos. El tratamiento y la dosis que recibió cada grupo de ratas castradas se especifican en los siguientes cuadros:

4.1.1:

GRUPO	ESTEROIDE	DOSIS ADMINISTRADAS
a	NET	50 µg/100 µl/día
b	NET	75 µg/100 µl/día
c	NET	150 µg/100 µl/día
d	NET	300 µg/100 µl/día
e	NET	500 µg/100 µl/día
f	NET	1000 µg/100 µl/día
g	-	vehículo

4.1.2:

GRUPO	ESTEROIDE	DOSIS ADMINISTRADAS
a	5α-NET	50 µg/100 µl/día
b	5α-NET	75 µg/100 µl/día
c	5α-NET	150 µg/100 µl/día
d	5α-NET	300 µg/100 µl/día
e	5α-NET	500 µg/100 µl/día
f	-	vehículo

4.1.3:

GRUPO	ESTEROIDE	DOSIS ADMINISTRADAS
a	3β,5α-NET	50 µg/100 µl/día
b	3β,5α-NET	75 µg/100 µl/día
c	3β,5α-NET	150 µg/100 µl/día
d	3β,5α-NET	300 µg/100 µl/día
e	3β,5α-NET	500 µg/100 µl/día
f	-	vehículo

4.1.4:

GRUPO	ESTEROIDE	DOSIS ADMINISTRADAS
a	3 α ,5 α -NET	50 μ g/100 μ l/día
b	3 α ,5 α -NET	75 μ g/100 μ l/día
c	3 α ,5 α -NET	150 μ g/100 μ l/día
d	3 α ,5 α -NET	300 μ g/100 μ l/día
e	3 α ,5 α -NET	500 μ g/100 μ l/día
f	-	vehículo

El 7º día de tratamiento se sacrificaron las ratas por decapitación y se obtuvieron los sueros correspondientes los cuales se congelaron a -20 °C hasta su cuantificación.

4.2 Efecto antigonadotrópico de NET y sus derivados en presencia de antiestrógeno.

Grupos de ratas castradas hembras o machos fueron tratadas con tamoxifen disuelto en solución salina fisiológica, a una dosis de 200 μ g/día durante cuatro días consecutivos al término de los cuales se aplicó el esteroide correspondiente a cada tratamiento en dosis única disuelto en aceite de maíz. Los grupos de 6 ratas se distribuyeron empleando el siguiente esquema:

Ratas Macho Castradas:

Grupo	Dosis de Antiestrógeno	4º Día Dosis Esteroide
a	TAM 200 μ g/d/4d	5 α -NET 0.5 mg/100 μ l
b	TAM 200 μ g/d/4d	3 β ,5 α -NET 0.5mg/100 μ l
c	TAM 200 μ g/d/4d	vehículo

Ratas Hembras Castradas:

<i>Grupo</i>	<i>Dosis de Antiestrógeno</i>	<i>4º Día Dosis Esteroides</i>
<i>a</i>	<i>TAM 200 µg/d/4d</i>	<i>NET 0.5 mg/100 µl</i>
<i>b</i>	<i>TAM 200 µg/d/4d</i>	<i>5α-NET 0.5mg/100 µl</i>
<i>c</i>	<i>TAM 200 µg/d/4d</i>	<i>3β,5α-NET 0.5 mg/100 µl</i>
<i>d</i>	<i>TAM 200 µg/d/4d</i>	<i>vehículo</i>

Cuatro horas después de la administración de los metabolitos de NET, las ratas fueron decapitadas y las muestras de suero almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

4.3 Efecto antigonadotrópico de NET y sus derivados en presencia de antiandrógeno.

4.3.1. Optimización de la dosis de Acetato de Ciproterona.

A grupos de 6 ratas castradas se les administró el antiandrógeno acetato de ciproterona disuelto en aceite de maíz, en dosis de 1 mg/100 µl y 2 mg/100 µl, durante 7 días consecutivos.

<i>Grupo</i>	<i>Dosis antiandrógeno</i>
<i>a</i>	<i>Ac-CYP 1 mg/d/7</i>
<i>b</i>	<i>Ac-CYP 2 mg/d/7</i>

Al finalizar el tratamiento los animales se decapitaron y las muestras de suero se congelaron a -20°C hasta su cuantificación.

4.3.2. Tratamiento con AcCYP seguido de NET, 5α -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET :

Tanto NET como sus derivados 5α NET y $3\beta,5\alpha$ NET se prepararon usando aceite de maíz 100 ml por dosis única. Se emplearon tanto ratas castradas hembras como machos en grupos de 6 animales elegidos al azar y tratados de acuerdo al siguiente esquema:

Grupo	Dosis Antiandrógeno	7° Día Dosis esteroide
a	AcCYP 1 mg/d/7d	NET 0.5 mg/100 $\mu\text{l/d}$
b	AcCYP 1 mg/d/7d	5α -NET 0.5 mg/100 $\mu\text{l/d}$
c	AcCYP 1 mg/d/7d	$3\beta,5\alpha$ -NET 0.5 mg/100 $\mu\text{l/d}$
d	---	vehículo

Al finalizar el tratamiento se decapitaron los animales cuatro horas después de la administración de NET y sus metabolitos. Las muestras de suero se congelaron a -20°C hasta su cuantificación.

5. PRUEBA ESTADÍSTICA.

La prueba estadística que se utilizó para comparar las concentraciones de gonadotropinas en los sueros de ratas sometidos a los diferentes tratamientos fue la "t" de Student (50).

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

donde : X = Media muestral

S = Desviación estándar

n = Número de datos

gl = $n_1 + n_2 - 2$

V. RESULTADOS

La capacidad de NET y sus metabolitos reducidos en el anillo-A, de inhibir gonadotropinas en el modelo de la rata castrada se evaluó de acuerdo a los tratamientos ya enunciados.

Todas las muestras obtenidas fueron cuantificadas por RIA de doble anticuerpo, para el cual se usaron tanto LHr y FSHr con I^{125} , siguiendo el protocolo descrito en la sección de material y método. Como resultados de los marcajes tenemos en la figura 3 y la figura 4 dos curvas tipo en las cuales se observa el patrón de elución de cada una de las gonadotropinas marcadas.

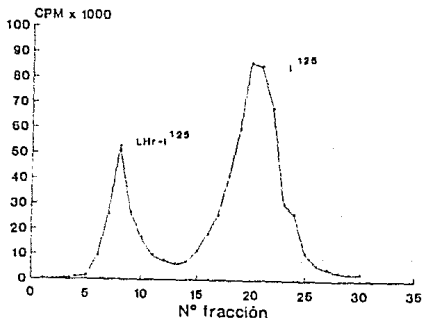


figura 3.

Perfil de elución de LHr- I^{125} en columna de sephadex G-100. Los productos de reacción se separaron eluyendo con amortiguador fosfo salino pH 7.6 y el contenido de radiactividad para cada fracción se midió en un contador de radiación gamma.

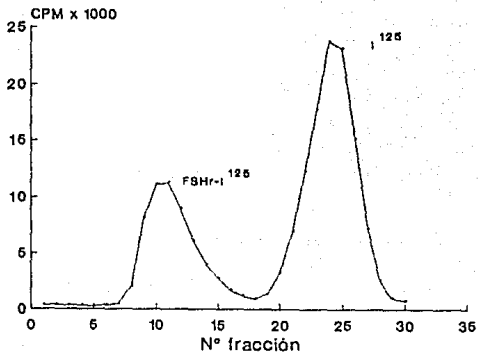


figura 4. Perfil de elución de FSHr- 125 en columna de sephadex G-100. Los productos de reacción se separaron eluyendo con amortiguador fosfo salino pH 7.6 y la radiactividad para cada fracción se midió en un contador de radiación gamma.

La fracción 8 para LHr usó como la 10 y 11 para FSHr de los marcajes presentados en las figuras 3 y 4, se recolectaron y se congelaron a -20°C hasta su uso. La actividad específica para LHr- 125 fue de 33 Ci/g y la de FSHr- 125 de 97 Ci/g.

El RIA para la gonadotropina de rata se estandarizó, según lo indicado en Material y Métodos. Las figuras 5 y 6 muestran las curvas estándar tipo obtenidas para cada gonadotropina, las cuales presentan parámetros aceptables en un RIA.

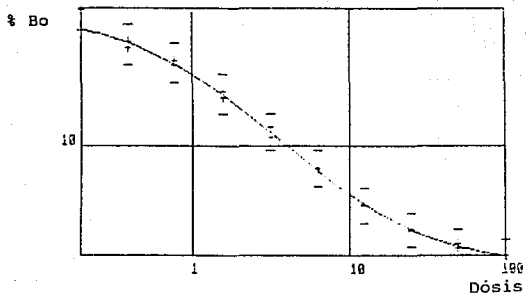


figura 5.

Curva estándar para L.Hr. La curva presenta un desplazamiento aceptable en todos sus puntos y una pendiente de -0.90 .

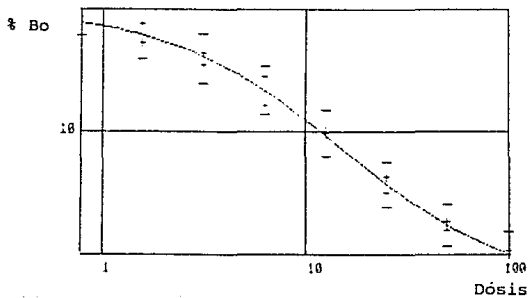


figura 6.

Curva estándar para L.Hr. La curva presenta un desplazamiento óptimo en todos sus puntos con una pendiente de -1.0 .

El primer tratamiento efectuado con ratas machos castradas, realizado para cuantificar el efecto de la administración crónica de NET, 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET y 3 α ,5 α -NET sobre las gonadotropinas hipofisiarias LHr y FSHr, aportó los resultados presentados en la figura 7 y 8.

Las dosis de NET de 50, 75, 150, 300 y 500 μ g no tuvieron efecto sobre los niveles de gonadotropinas, al aumentar la dosificación diaria a 1000 μ g se logró la inhibición de ambas gonadotropinas.

El empleo de 5 α -NET resultó en una disminución de la concentración de LHr y FSHr en todas las dosis superiores a 75 μ g/d/7.

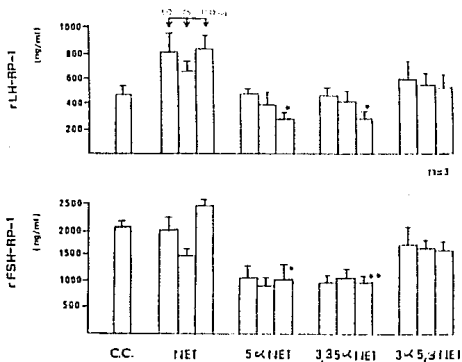


figura 7.

Efecto de la dosis de 50, 75 y 150 μ g administrada por 7 días de NET y sus derivados reducidos en el anillo A, sobre los niveles en suero de LHr y FSHr en la rata macho castrada. Los resultados muestran el $\bar{X} \pm$ SEM. *p < 0.05, ** p < 0.01.

A la dosis de 500 μg , 5 α -NET fue capaz de inhibir ambas gonadotropinas hipofisarias con una significancia estadística de $p < 0.05$, como se indica en la figura 8.

El tratamiento con el derivado reducido 3 β ,5 α -NET dió como resultado una inhibición de ambas gonadotropinas a una dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{d}/7\text{d}$, con una significancia estadística de $p < 0.005$ para LHr y 0.01 para FSHr, a las otras dosis administradas de el derivado 3 α ,5 α -NET no fueron capaces de inhibir los niveles de las gonadotropinas hipofisarias, como se muestra en la figura 8.

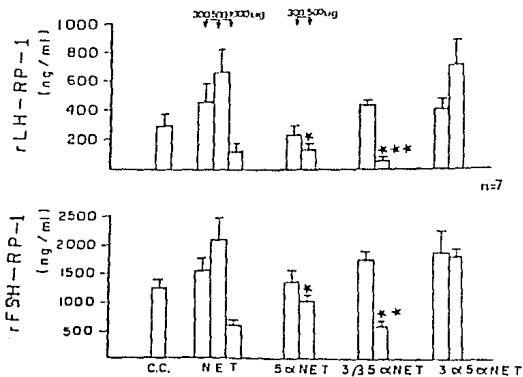


figura 8.

Efecto de la dosis crónica de 300 y 500 μg de NET y sus derivados reducidos en el anillo A, sobre los niveles en suero de LHr y FSHr en la rata macho castrada. Los resultados muestran $\bar{X} \pm \text{SEM}$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

La administración de 200 $\mu\text{g}/4$ días tamoxifen a los grupos de ratas machos y hembras adultos castrados, como tratamiento previo a la administración de una dosis única de 5α -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET fue seguido de un tiempo de cuatro horas, para la toma de muestra sanguínea, tiempo suficiente para que ocurra la mayor inhibición de gonadotropinas bajo la administración de NET (24). En la figura 9 se muestra el efecto de una dosis única de 5α -NET sobre las ratas machos castradas posterior al tratamiento con el antiestrógeno; la potencia inhibitoria de 5α -NET sobre la LHR es clara, con una $p < 0.01$. La administración de una única dosis de $3\beta,5\alpha$ -NET a un grupo de animales tratados con tamoxifen por 4 días, no fue capaz de disminuir los niveles de LHR en el tratamiento de ratas machos castradas.

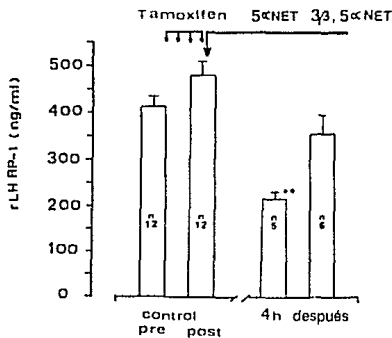


figura 9.

Efecto de 5α -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET sobre la concentración de LHR en la rata macho castrada, previo tratamiento con antiestrógeno por 4 días. Los resultados muestran $\bar{X} \pm SD$.
 ** $p < 0.01$.

El mismo tratamiento aplicado a ratas hembras castradas (fig.10) muestra resultados que correlacionan con los datos de ratas machos; 5α -NET posterior al tratamiento con tamoxifen tuvo un efecto inhibitorio sobre LHr, con una $p < 0.001$.

El derivado 3β , 5α -NET fue incapaz de inhibir LHr en la rata hembra castrada. En este tratamiento se incluyó un grupo con NET el cual no logró inhibir la concentración de LHr después de 4 días de la administración con tamoxifen. A las muestras obtenidas del tratamiento de ratas hembras castradas, también se les cuantificó FSHr, cuyos resultados se observan en la figura 10.

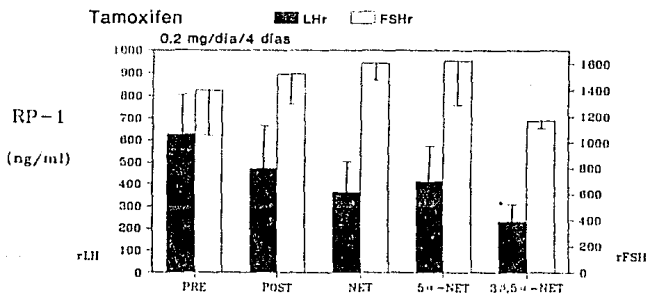


figura 10.

Efecto de NET, 5α -NET y 3β , 5α -NET, sobre los niveles de gonadotropinas, previo tratamiento con TAM durante 4 días en la rata hembra castrada. Los resultados están expresados como $\bar{X} \pm SD$. * $p < 0.001$.

Los niveles de FSHr disminuyen con una dosis de 5 α -NET previo tratamiento con tamoxifen, aunque por la dispersión en los datos no existe una significancia estadística que lo señala como diferente del control. El tratamiento con 3 β ,5 α -NET posterior a la aplicación de tamoxifen por 4 días no tuvo efecto sobre los niveles de FSHr, figura 10.

Para el empleo del antiandrógeno esterooidal AcCYP, se investigó la dosis a la que debía ser administrado, pues este compuesto ejerce una actividad androgénica, sinandrogénica, progestacional o antigonaotrópica dependiendo de la dosis (41,51,52,53). Se procedió de acuerdo a lo indicado en la sección de Material y Método, buscando la dosis de AcCYP a la cual éste no presenta efecto antigonaotrópico per se, en el modelo de la rata castrada.

Los resultados se muestran en la fig. 11 en donde se observa que la dosis de 2 mg de AcCYP inhibe las concentraciones de LHR, por lo que se eligió 1 mg como dosis para el tratamiento pues permite mantener sin cambio los niveles de LHR, durante los 7 días de tratamiento previos a la administración de NET y sus derivados.

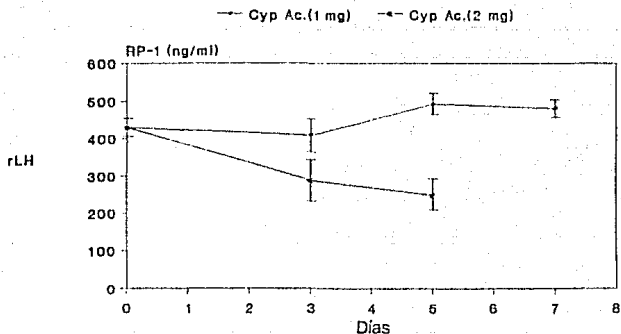


figura 11. Efecto de la dosis de AcCYP sobre la concentración de LHr en la rata hembra castrada. Resultados como $\bar{X} \pm SD$.

Para evaluar el efecto de NET, 5α NET y 3β , 5α -NET en presencia de un antiandrógeno se procedió según lo indicado en la sección de Material Métodos. Definida la dosis de AcCYP, se inició la administración de ésta durante los 7 días consecutivos previos al tratamiento con NET y sus derivados. Las muestras sanguíneas se tomaron siguiendo el mismo esquema del tratamiento con tamoxifen, 4 horas después de la dosis de androprogesterina, periodo indicado como de máxima respuesta (24).

El primer grupo que se trató fue el de ratas machos castradas; la figura 12 muestra los resultados de éste tratamiento. La NET aplicada en una sólo dosis a un grupo de ratas, logró inhibir las concentraciones de LHr con una $p < 0.1$ respecto al nivel post tratamiento con

AcCYP. El empleo derivado reducido en la posición 5 α de NET conservó los valores de LHr en los mismos niveles que con el tratamiento de 7 días con AcCYP. El metabolito reducido 3 β ,5 α -NET condujo a una inhibición significativa, $p < 0.001$ cuando los resultados son comparados con el nivel pos AcCYP.

Los niveles de FSHr posterior a los diferentes tratamientos con NET, 5 α -NET y 3 β ,5 α -NET permanecieron sin cambio después de 4 horas, figura 12.

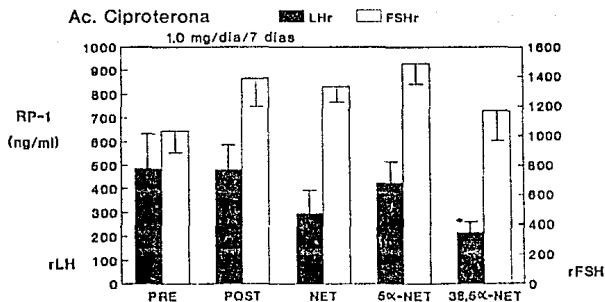


figura 12.

Efecto de NET, 5 α -NET y 3 β ,5 α -NET en ratos machos castrados, tratadas con AcCYP por 7 días, sobre las concentraciones de LHr y FSHr. Resultados expresados como $\bar{X} \pm SD$. * $p < 0.001$.

El segundo grupo de tratamiento con AcCYP a una dosis de 1 mg por día, durante 7 días, estuvo constituido por 4 grupos de ratas hembras castradas, siguiendo el esquema de trabajo ya descrito. Se administraron las dosis de NET, 5 α -NET y 3 β ,5 α -NET, cuyos resultados después de 4 horas de administración se presentan en la figura 13. La NET al igual que 5 α -NET no inhibió el nivel de LHr respecto al valor pos tratamiento con AcCYP. Por su parte el metabolito 3 β ,5 α -NET disminuyó la concentración de LHr considerablemente ($p < 0.001$), respecto al valor pos tratamiento con AcCYP.

La cuantificación de FSHr de las muestras de suero de ratas hembras castradas tratadas con NET, 5 α -NET y 3 β , 5 α -NET, no mostraron cambio alguno respecto a la concentración de esta gonadotropina pos tratamiento con AcCYP, figura 13.

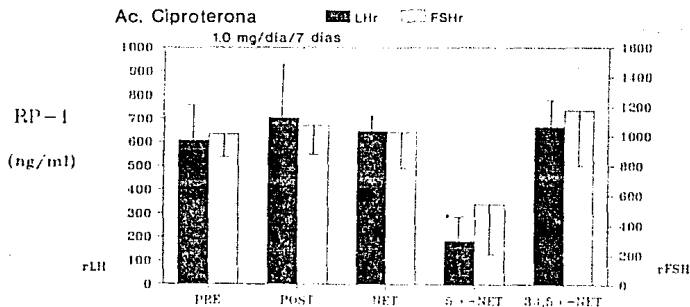


figura 13.

Efecto de NET, 5 α -NET y 3 β ,5 α -NET en ratas hembras castradas, tratadas con AcCYP por 7 días, sobre las concentraciones de LHr y FSHr. Resultados expresados como $\bar{X} \pm SD$. * $p < 0.001$.

VI. DISCUSION

Para analizar los resultados obtenidos al evaluar la potencia antigonadotrópica de NET y sus derivados reducidos en el anillo A, podríamos dividirlos de acuerdo a las tres fases en las que se llevó a cabo el trabajo.

fase 1. Efecto antigonadotrópico de NET, 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET y 3 α ,5 α -NET.

La NET en esta primera fase no logró a dosis menores de 1000 μ g inhibir las gonadotropinas, esto pudiera deberse a la ausencia del receptor de progesterona en la rata castrada, con el cual NET tiene gran afinidad (29), aunque se ha demostrado que su mecanismo de acción difiere del de la progesterona (19).

El derivado 5 α de NET, tuvo actividad antigonadotrópica a dosis mayores a 150 μ g, este resultado confirma la hipótesis planteada, pues la reducción en posición 5 α aumentó la potencia de esta progestina de manera análoga al aumento en la potencia androgénica que presenta el derivado 5 α del andrógeno natural, la testosterona (38,55): se pudo confirmar de esta manera que el aumento en la actividad biológica por reducción en el anillo A, sucede tanto en compuestos sintéticos como naturales en la serie de esteroides C₁₉.

Se puede suponer con estos datos que el efecto inhibitorio de 5 α -NET pudiera deberse a su interacción con receptores para andrógenos o estrógenos, únicos presentes en la rata castrada; aunque los antecedentes indican que existe mayor afinidad entre este derivado y el receptor de andrógeno (29). La posterior reducción de este derivado a 3 α ,5 α -NET y 3 β ,5 α -NET, podría también ser la causa del incremento en la actividad antigonaotrópica.

Con el fin de conocer lo que sucede con los metabolitos completamente reducidos se utilizaron los derivados 3 α ,5 α -NET y 3 β ,5 α -NET. Los resultados obtenidos con el 3 β ,5 α -NET muestran una inhibición en la concentración de ambas gonadotropinas con dosis de progesterina superiores a 150 μ g. Podríamos explicar este aumento en la potencia antigonaotrópica de 3 β ,5 α -NET respecto de NET, como el resultado de su interacción con el receptor para estrógenos (29), y muy probablemente NET sea metabolizada de manera similar a la testosterona en la cual existe una reducción del compuesto 5 α a 3 α ,5 α y 3 β ,5 α por acción enzimática de la 3 α o 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa, que actúan de manera reversible mediante oxidación preferencialmente en compuestos 3 α ,5 α y no en los 3 β ,5 α (56,57). El derivado 3 β ,5 α de NET podría ser un compuesto de metabolismo terminal y su efecto se debería solamente a la acción de sí mismo.

Por el contrario el alcohol isómero 3 α ,5 α -NET bajo administración crónica en la rata castrada, exhibió una actividad antigonaotrópica nula, a pesar de que este derivado presenta también unión al receptor de estrógenos (29), indicando que la unión hormona receptor da por

resultado efectos distintos dependiendo del esteroide, y que esta unión no garantiza una actividad antigonadotrópica. En este caso la posible reacción enzimática reversible de este derivado al compuesto oxidado 5α -NET, que a su vez podría reducirse enzimáticamente a $3\beta,5\alpha$ -NET y $3\alpha,5\alpha$ -NET, daría una compleja mezcla cuyos efectos en conjunto pudieran ser nulos.

fase 2. Efecto antigonadotrópico de 5α -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET previo tratamiento con antiestrógeno.

Los resultados presentados muestran que el derivado reducido 5α -NET fue el único que logró disminuir de manera estadísticamente significativa los niveles de LH tanto en la rata macho como en la hembra castradas. Estos datos correlacionan con lo descrito en cuanto a la interacción de 5α -NET con el receptor de andrógenos.

Las concentraciones de FSHr no fueron inhibidas de manera significativa bajo tratamiento con 5α -NET; esto puede explicarse en base al particular mecanismo de regulación de la FSH, el cual se realiza por la inhibina, mediante un sistema de retroalimentación a nivel hipofisiario (58).

Los resultados del tratamiento con el tetrahidro derivado $3\beta,5\alpha$ -NET, previo bloqueo de receptores con tamoxifen, muestran que este fue incapaz de disminuir los niveles de LH y FSH

en la rata castrada hembra o macho; datos que correlacionan con las observaciones acerca de su unión al receptor de estrógenos y la posibilidad de que el $3\beta,5\alpha$ -NET no presente reacción de oxidación hacia 5α -NET.

fase 3. Efecto antigonadotrópico de 5α -NET y $3\beta,5\alpha$ -NET previo tratamiento con antiandrógeno.

Los resultados del estudio de dosificación del acetato de ciproterona muestran que éste a una dosis de 2 mg inhibe LHR no así a la dosis de 1 mg comprobándose de esta manera que el antiandrógeno elegido, es capaz de tener diversas actividades dependiendo de la dosis (41,51,52,53).

Nuestros datos indican que el tetrahydro derivado $3\beta,5\alpha$ de NET tuvo la capacidad de inhibir los valores de LHR en presencia de receptores para estrógeno, resultado que correlaciona en ambos tratamiento a ratas machos y hembras castradas con el reporte de su unión a este receptor intracelular (29).

Nuevamente apelamos a la analogía con el andrógeno natural para explicar la actividad de esta progestina, $3\beta,5\alpha$ -NET, la cual suponemos es un derivado terminal en el metabolismo de NET, cuyos efectos se ven ejercidos por una única vía, su unión con el receptor de estrógenos.

Los valores informados para FSHr bajo este tratamiento crónico con AcCYP previo a la administración de 3 β ,5 α -NET, conducen a la deducción anteriormente expuesta, acerca del papel regulador de la inhibina sobre los niveles de FSH en ratas hembra o macho castradas, razón por la que el 3 β ,5 α -NET a la dosis empleada no fue capaz de ejercer su efecto inhibitorio sobre las concentraciones de FSHr con la misma potencia manifestada sobre LHR.

El conjunto de resultados aportados por este trabajo se basan en el modelo experimental, de la rata castrada, el cual ofrece la posibilidad de estudiar la potencia y mecanismo de acción de anticonceptivos sintéticos; modelo al que recurrimos dada la imposibilidad de contar con un sistema fisiológico experimental ideal, que conjuntara las condiciones fisiológicas de una mujer en edad reproductiva. Por esta razón no es posible extrapolar totalmente estos datos al modelo humano y será necesario realizar estudios piloto que permitan hacer una observación de la potencia antigonaotrópica de estos derivados en el humano; dado que cuando una usuaria toma un anticonceptivo están presentes en el organismo una serie de factores en los que se incluyen al mismo tiempo todos los receptores mencionados en esta discusión.

Tomando nuestros datos obtenidos en la rata castrada, que indican una actividad antigonaotrópica del derivado 5 α -NET vía receptor de andrógeno y del compuesto 3 β ,5 α -NET vía receptor de estrógeno, como punto de partida para la elaboración de nuevas formulaciones anticonceptivas, se pueden hacer varias consideraciones: sería ventajoso el empleo del derivado completamente reducido 3 β ,5 α -NET con el cual no se tendrían los diversos efectos que 5 α -NET

por su unión a receptores para andrógenos y su metabolismo hacia $3\alpha,5\alpha$ daría; la dosis anticonceptiva necesaria del $3\beta,5\alpha$ -NET sería menor a la comúnmente empleada en las formulaciones con NET, condición que nos lleva a pensar además que la disminución en la dosis de anticonceptivo traería consigo una disminución de los efectos indeseables en el uso de NET; efectos tales como: presencia de hirsutismo, explicado por la actividad androgénica de NET, probablemente resultado de su conversión a 5α -NET. También, al reducirse la dosis, pudieramos esperar una disminución de efectos indeseables tipo estrogénicos como el reportado bajo tratamiento con progestinas sintéticas sobre los niveles de lípidos en suero, que se asocian directamente con riesgo cardiovascular (59). Así mismo podríamos considerar la rápida excreción que se presentaría con el empleo del derivado $3\beta,5\alpha$ -NET; el cual tendría una pronta sulfoconjugación o glucocojugación hepática, para su posterior eliminación vía urinaria.

Creemos que el presente trabajo da una aportación en la evaluación de progestinas sintéticas y específicamente proporcione bases que sirven para el posible desarrollo de formulaciones anticonceptivas que empleen los derivados reducidos de NET, principalmente el tetrahidro reducido $3\beta,5\alpha$ -NET.

VII. CONCLUSIONES

- *Las modificaciones estructurales en el anillo A de la molécula de NET aumentan su potencia antigonadotrópica en la rata castrada.*
- *El efecto antigonadotrópico ejercido en la rata castrada por 5 α -NET en presencia de antiestrógeno indica que su actividad es mediada vía receptor de andrógenos y la supresión del efecto antigonadotrópico de 3 β ,5 α -NET indica que su actividad es mediada vía receptores para estrógenos.*
- *El efecto antigonadotrópico ejercido en la rata castrada por 3 β ,5 α -NET en presencia de antiandrógeno indica que su actividad es mediada vía receptor de estrógeno y la supresión del efecto antigonadotrópico de 5 α -NET indica que su actividad es mediada vía receptores para andrógenos.*
- *El mecanismo de acción de los derivados reducidos de NET es mediado a través de su unión a receptores intracelulares.*

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- *Diczfalusy E. Riesgos, beneficios y controversias en el uso de anticonceptivos de acción prolongada. En Avances Recientes en Regulación de la Fertilidad, eds. G. Pérez-Palacios, J. Garza-Flores and P.E. Hall. Ed. Piensa, México. 1: 1-2, 1987.*
- 2.- *Tietz N.W. Hormonas Esteroides. En Química Clínica Moderna. Ed. Interamericana. 498, 1972.*
- 3.- *Charli J., Ponce G., Joseph-Brubo P. Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. ed. Domínguez Casalá. Ed. UNAM-Porrúa, 59-83, 1991.*
- 4.- *Darnell J., Lodish H. and Baltimore D. Steroid Hormones and Their Cytosolic Receptors: The levels of steroid hormones are regulated by complex feedback circuits. In Molecular Cell Biology. Ed. Scientific American Books, Inc. 700, 1986.*
- 5.- *Charli J.L., Ponce G. y Bravo P.J. Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Ed. Miguel Ángel Porrúa. 3: 57-72, 1991.*
- 6.- *Bullock L.P., Barthe P.L., Mowszowicz I., Orth D.N. and Bardin C.W. The effect of progestins on submaxillary gland epidermal growth factor: Demonstration of androgenic, synandrogenic and antiandrogenic actions. Endocrinology. 97: 189-195, 1975.*
- 7.- *Shapiro S.S., Dyer R.D. and Colás A.E. Synthetic progestins: In vitro potency on human endometrium and specific binding to cytosol receptor. Am. J. Obstet Gynecol. 132: 549-554, 1978.*
- 8.- *Edgren R.A. and Sturtevant F.M. Potencias of oral contraceptives. Am. J. Obstet. Gynecol. 125: 1029-1037, 1976.*
- 9.- *Djerassi, C., Miramontes, L., and Rosenkrantz, G. Abstr. Meeting Div., Medical Chem., Am. Chem. Soc. Milwaukee, Wis. 188, 1952.*
- 10.- *Djerassi C., Miramontes L., Rosenkrantz G. and Sondheimer F. J. Am. Chem. Soc. 76: 4092-4094, 1954.*
- 11.- *Tyler W.T. Clinical Use of 19-Norethynyltestosterona. Paper presented at Annual Meeting of Pacific Coast Fertility Society, 1956.*
- 12.- *Kanyab S., Fotherby K. and Klopper A.I. Metabolism of [3 H] Norethisterone in women. J. Endocr. 41: 263-272, 1968*

- 13.- Goebelsman U., Stancyk F.Z. and Brenner P. Serum norethisterone concentrations following intramuscular norethindrone oenanthate injection: effect upon serum LH, FSH, estradiol and progesterone. *Contraception*. 19: 283-315, 1979.
- 14.- Hilliard J., Croxatto H.B., Hayward J.N. and Sawyer C.H. Norethindrone blockade of LH release to intrapituitary infusion of hypothalamic extract. *Endocrinology*. 79: 411-419, 1966.
- 15.- Revesz C., Chappel C.I. and Gaudry R. Masculinization of female fetuses in the rat by progestational compounds. *Endocrinology*. 66: 140-144, 1960.
- 16.- Reel J., Humprey R., Shih Y., Windsor B., Sakowski R., Creger P., Edgeen R. Competitive progesterone antagonists: receptor binding and biologic activity of testosterone and 19-nortestosterone derivatives. *Fertility and Sterility*. 5: 553-561, 1979.
- 17.- Cerbón M., Lemus A.E., Vilchis F., Pusapera A.M., García G.A. and Pérez-Palacios G. A-Ring reduced derivatives of norethisterone exert antihomonal effects. *J. Steroid Biochem.* in press, 1991.
- 18.- *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*. 28 Ed. (James, E.F.Reynolds Ed.) The Pharmaceutical Press, London. 1421-1423, 1982.
- 19.- Pérez-Palacios G., Chávez B., Escobar N., Vilchis F., Lurea F., Lince M. and Pérez A.E. Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. *J. Steroid Biochem.* 15: 125-130, 1981.
- 20.- Pérez-Palacios G., Fernández-Aparicio M.A., Medina M., Zacarias-Villarreal J. and Ulloa-Aguirre A. On the mechanism of action of progestins. *Acta Endocrinologica*. 97: 320-328, 1981.
- 21.- MacLusky N.J. and McEwen B.S. Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature*. 274: 276-278, 1978.
- 22.- Leavitt W.W., Chen T.J. and Allen T.C. Regulation of progesterone receptor formation by estrogen action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 286: 210-225, 1977.
- 23.- Larrea F., Lince-Campillo M. y Pérez-Palacios G. Mecanismo de transporte e interacción de noretisterona con proteínas plasmáticas. *Rev. Invest. Clin. (Méx)*. 35: 189-196, 1983.
- 24.- Larrea F., Escobar N., Gurzu-Flores J., Moctezuma O., Martínez-Campos A. and Pérez-Palacios G. Nuclear translocation of estradiol receptors by the in vivo administration of norethisterone: an alternate mechanism for gonadotropin inhibition. *J. Steroid Biochem.* 19: 1747-1752, 1983.

- 25.- Larrea F., Moctezuma O. and Pérez-Placios G. Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. *J. Steroid Biochem.* 20: 841-847, 1984.
- 26.- Braselton W.E., Lin T.J., Ellegood J.O., Mills T.M., Mahesh V.B. Accumulation of norethisterone and individual metabolites in human plasma during short and long-term administration of contraceptive dosage. *Am. J. Obstet. Gynec.* 133: 154-160, 1979.
- 27.- Stanczyk F.Z., Roy S. Metabolism of levonorgestrel, norethindrone and structurally related contraceptive steroids. *Contraception.* 42: 67-96, 1990.
- 28.- Jensen E.V. and Jacobson H.I. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog. Horm. Res.* 18: 387-414, 1962.
- 29.- Chávez B.A., Vilchis F., Pérez A.E., García G.A., Grillasco I. and Pérez-Palacios G. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J. Steroid Biochem.* 22: 121-126, 1985.
- 30.- Loza M.C., Lemus A.E., y Pérez-Palacios G. Metabolismo de hormonas esteroides. En *Bioquímica e Inmunología.* eds. Híks J.J. y Díaz-Zagoya J. Ed. UNAM, 2: 53-93, 1988.
- 31.- Vilchis F., Chávez B., Pérez A.E., García G.A., Angeles A. and Pérez-Palacios G. Evidences that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *J. Steroid Biochem.* 22: 525-531, 1986.
- 32.- Larrea F., Vilchis F., Chávez B., Pérez A.E., Garza-Flores J. and Pérez-Palacios G. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J. Steroid Biochem.* 27: 657-663, 1987.
- 33.- Lemus A.E., Damsky R., Enriquez J., García G.A., Vilchis F. y Pérez-Palacios G. Efecto de noretisterona y de sus metabolitos 5 α -reducidos sobre la inducción de la pubertad en la rata hembra. (Resumen No. 2) XI Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigaciones en Reproducción Humana y XIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. 21-25 de mayo de 1988. Puerto Vallarta, Jal. México.
- 34.- Ortiz H. Urge lograr índice de crecimiento poblacional mesurado. En *El Sol de México*, pg 3a, 8 $\frac{1}{2}$ columna, 11 octubre 1991.
- 35.- Qi-Gui L. and Hämpel. Serum protein characteristics of cyproterone acetate, gestodene, levonorgestrel and norethisterone in rat, rabbit, dog, monkey and man. *J. steroid Biochem.* 35: 319-326, 1990.

- 36.- Beyer C., Morali G. and Cruz M.L. Effect of 5α -dihydrotestosterone on gonadotrophin secretion and estrous behavior in the female Wistar rat. *Endocrinology*. 89: 1158-1161, 1971.
- 37.- Beyer C., Jaffe R.B. and Gay V.L. Testosterone metabolism in target tissues: effect of testosterone and dihydrotestosterone injection and hypothalamic-implantation on serum LH in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 91: 1372-1375, 1972.
- 38.- Pérez-Palacios G., Larsson K. and Beyer C. Biological significance of the metabolism of androgens in the central nervous system. *J. Steroid Biochem.* 6: 999-1006, 1975.
- 39.- Celotti F., Massa R. and Martini L. Metabolism of sex steroids in central nervous system. *Endocrinology*. ed. DeGrott. Ed. Grune & Stratton, New York. 1: 41-53, 1979.
- 40.- Martini L. The 5α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. *Biochemical and physiological implications*. *Endocrine Rev.* 3: 1-25, 1982.
- 41.- Mowszowicz I., Bieber D., Chung K.W., Bullok L.P. and Bardin C.W. Synandrogenic and antiandrogenic effect of progestins: comparison with nonprogestational antiandrogens. *Endo*. 95: 1974.
- 42.- Bowers A., Ringold H.J. and Denot E. C1 19-nordihydrotestosterone derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 6115, 1958.
- 43.- Still W.C., Kahn M. and Miltra A. Rapid chromatographic technique or preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.* 43: 2923-2925, 1978.
- 44.- Stillwell W.G., Horning E.G., Horning M.G., Stillwell R.N. and Zlatiks A. Characterization of metabolites of steroid contraceptive by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Steroid Biochem.* 3: 699-706, 1972.
- 45.- Yallow R.S. and Benson S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39: 1157-1175, 1960.
- 46.- Baker T.S., Abbott S.R., Daniel S.G. and Wright J.F. Immunoradiometric assays. In *Alternative Immunossays*. ed. W.P. Collins. Ed. John Wiley & Sons. 59-75, 1985.
- 47.- *Manual del Laboratorio de Hormonas*. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Departamento de Biología de la Reproducción. México, D.F., 1983.
- 48.- Bolton A.E. Selection of an iodination method. In *Radioiodination Techniques*. Ed. Printarium Ltd. Wembley Middlesex. 28-35, 1977.

- 49.- Menjivar M., Cardenas M., Ulloa-Aguirre A., Recio R., Rocha C., Bedolla N., Pérez-Palacios G. y Garza-Flores J. Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. II. Evaluación de la calidad interna y externa en la cuantificación de gonadotropinas hipofisarias. *Rev. Invest. Clin.* 42: 336-340, 1990.
- 50.- Wayne D. Estimación: La distribución t. En *Bioestadística Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud*. Ed. Limusa. 132-137, 1983.
- 51.- Neri R., Florance K., Koziol P. and Van Cleave P. Biological profile of a nonsteroidal antiandrogen, SCH 13521 (4'-Nitro-3'-Trifluoromethylisobutyranilide). *Endo.* 91: 427-437, 1971.
- 52.- Johnson C. and Naqvi R.H. Effect of cyproterone acetate on LH in immature rats. *Endocrinology*, 84: 421-425, 1969.
- 53.- Isurugi K., Fukutani K., Ishida H. and Hosoi Y. Endocrine effects of cyproterone acetate in patients with prostatic cancer. *The Journal of Urology*. 123: 180-183, 1980.
- 54.- Goebelsman U., Stancyk F.Z. and Brenner P. Serum norethindrone concentrations following intramuscular norethindrone oenanthate injection: effect upon serum LH, FSH, estradiol and progesterone. *Contraception*. 19: 283-315, 1979.
- 55.- Drouin J. and Labrie F. Selective effect of androgens on LH and FSH release in anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology*. 98: 1528-1534, 1976.
- 56.- Samperez S. and Jouan P. Androgen metabolism, androgen and oestrogen receptors in the male rat anterior pituitary. *J. Steroid Biochem.* 11: 819-831, 1979.
- 57.- Liu Kao L.W., Perez Lloret A. and Weisz J. Metabolism in vitro of dihydrotestosterone, 5 α -androstan-3 α ,17 β -diol and its 3 β -epimer, three metabolites of testosterone, by three of its target tissues, the anterior pituitary, the medial basal hypothalamus and the seminiferous tubules. *J. Steroid Biochem.* 18: 1109-1115, 1977.
- 58.- Ying S. Inhibins, activins and follistatins: Gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Rev.* 9: 267-293, 1988.
- 59.- World Health Organization. A multicentre comparative study of serum lipids and lipoproteins in four groups of oral combined contraceptive users and a control group of IUD users. *Contraception*. 38: 605-629, 1988.

A-ring reduction enhances the antigonadotropic potency of norethisterone

Josué Garza-Flores, Felipe Vilchis, Gustavo A. García,
Martha Menjivar and Gregorio Pérez-Palacios

*Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition Salvador Zubirán and
Department of Organic Chemistry, Postgraduate Division,
School of Chemistry, National University of Mexico, Mexico City*

Abstract. To assess whether structural modifications on the A-ring of norethisterone (NET) could modify its antigonadotropic potency, comparative studies using NET, 5 α -dihydro NET (5 α -NET) and its 3 β ,5 α and 3 α ,5 α tetrahydro derivatives in castrated adult rats were undertaken. The antigonadotropic effect of these compounds was evaluated by measuring the serum and pituitary immunoreactive concentrations of LH and FSH following their chronic sc administration to animals depleted of progesterone receptors. The results demonstrated that 3 β ,5 α -NET and 5 α -dihydro-NET exhibited a significantly greater gonadotropic inhibiting activity as compared with that of their parent compound. The simultaneous administration of tamoxifen with 3 β ,5 α -NET resulted in a significant diminution of its antigonadotropic potency, particularly for LH. These data indicate that the potent antigonadotropic effect of 3 β ,5 α -NET metabolite was mediated via oestrogen receptors. The LH inhibitory activity of 5 α -dihydro-NET was not suppressed by the non-steroidal antioestrogen administration, thus suggesting that 5 α -NET might exert its effect via androgen receptors. The overall data were interpreted as demonstrating that metabolic conversion products of NET exhibit potent antigonadotropic effect. The data are consistent with an A-ring enhancement of the antigonadotropic potency of this synthetic progestin and open an alternate approach to the development of fertility regulating agents.

Norethisterone (NET), 17 α -ethynyl-17 β -hydroxy-4-estren-3-one, has been extensively used as a progestogen in a number of hormonal contraceptive formulations. It has been recognized that NET is the active compound of its ester derivatives, as well as, of other synthetic progestogens as norethindrol, lynestrenol and ethynodiol diacetate (Murugesan et al. 1973; Kamyab et al. 1968; Howard et al. 1975). Metabolic studies have disclosed that NET undergoes extensive in vivo transformations, particularly reductions on its A-ring, to form dihydro and tetrahydro derivatives. Indeed, these compounds have been isolated from serum of women on contraceptive NET therapy (Braserton et al. 1979).

Previous studies from this laboratory have indicated that the mode of action of NET differs from that of natural progesterone (Pérez-Palacios et al. 1981), suggesting that under certain circumstances, the metabolic conversion of NET to its reduced metabolites is necessary to express its activity in humans. Indeed, Larrea et al. (1983, 1984), demonstrated that NET exhibits a potent estrogen-like biological effect in spite of its lack of interaction with the oestrogen receptor. Furthermore, the in vivo NET aromatization has remained a controversial and still unsolved issue (Breuer 1977; Barvieri et al. 1983). Recently, Chávez et al. (1985) demonstrated the stereospecific interaction of A-ring reduced NET derivatives with intracellular putative steroid receptors other than those of progesterone.

Request for reprints to: Josué Garza-Flores, M.D.,
Department of Reproductive Biology, National Institute
of Nutrition, Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga
No. 15, 14000 Mexico, D.F.

This report describes the chronic effects of NET and its reduced metabolites 5 α -dihydro NET (5 α -NET), 3 β ,5 α -tetrahydro NET derivative (3 β ,5 α -NET) and its 3 α (3 α ,5 α -NET) and 3 β (3 β ,5 α -NET) isomers upon the serum and pituitary gonadotropin concentration in adult castrated rats. The effects of a non-steroidal anti-oestrogen upon the antigonadotropic potency of NET derivatives was also investigated.

Materials and Methods

Material

Authentic NET was kindly provided by Schering Mexicana, SA Mexico City. The A-ring derivatives of NET were synthesized as previously described by Bowers et al. (1958), with minor modifications. The 3 β ,5 α -NET and 3 α ,5 α -NET were prepared by sodium borohydride reduction (Bowers et al. 1958). Authentic samples of the 3 β ,5 α -NET, 3 α ,5 α -NET and 3 β ,5 α -NET were generously supplied by G. D. Searle Co. Chicago, IL. Chemical purity of NET and its derivatives was greater than 98% as assessed by their melting points, high performance liquid chromatography and H-nuclear magnetic resonance spectrometric analysis as has been previously described (Chavez et al. 1985). Tamoxifen was obtained from Imperial Chemical Industries, Macclesfield, Cheshire.

Animals

Adult male Wistar rats weighing 200–250 g were gonadectomized under light ether anaesthesia 15 days prior to the experiments. Animals were kept under a 14 h-light, 10 h-dark cycle and maintained on food and water ad libitum.

Hormone assays

Serum LH and FSH were measured by specific radioimmunoassays (RIA) using the double antibody technique following protocols supplied by the NIAMDD rat pituitary hormone distribution programme, Baltimore, MD. The results were expressed as ng/ml (mean \pm SEM) using rLH-RP-1 and rFSH-RP-1 as standards. The inter- and intra-assay coefficients of variation were 7.0 and 13.7 for LH and 8.6 and 20.0 for FSH, respectively. The pituitary LH and FSH immunoreactive content was measured from 1:1000 dilution aliquots of pituitary homogenates prepared for each pituitary gland and homogenized with 10 strokes of a teflon pestle on ice-cold 0.05 M phosphate buffer (PBS) pH 7.0, containing 0.3 mg phenyl-ethyl-sulphonyl-fluoride/ml (Sigma Inc. Chemical Co., St. Louis MO). The results were expressed as μ g of gonadotropins per gland.

Experimental

All steroids employed were dissolved in 0.2 ml corn oil containing 10% absolute ethanol and sc administered according to the following protocols.

NET, 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET and 3 α ,5 α -NET were daily administered at increasing doses (12.5, 25, 50, 75 and 150 μ g/day) for 7 consecutive days to 5 groups of castrated animals. On the 7th day, blood samples were obtained by decapitation and the pituitary glands were immediately removed. Animals treated with 17 β -oestradiol, 5 α -dihydrotestosterone (DHT) and oil, using identical doses and administration schedule to that of the experimental groups, served as controls.

Another experiment, using NET 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET and 3 α ,5 α -NET daily administration (300 and 500 μ g) for 7 days to castrated animals was also undertaken. Serum and pituitary samples were handled as described above. Oil-treated rats served as control group.

Antioestrogen administration

Two groups of tamoxifen-primed castrated rats were treated with a single dose (500 μ g) of 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET. Tamoxifen was sc administered at the daily dose of 200 μ g for 4 consecutive days. Serum LH was measured before and after antioestrogen priming and 4 h after administration of the NET metabolites.

Results

The effects of the administration of NET, 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET for 7 days upon the serum gonadotropin content of castrated rats are shown in Fig. 1. The NET administration did not exert any inhibitory effect on serum and pituitary LH at all doses employed (12.5–150 μ g/day). An identical lack of inhibitory effect of NET upon serum and pituitary FSH was also noticed (Fig. 1). A-ring reduction of NET enhanced its gonadotropin inhibitory effect. Indeed, a significant decrease on both LH and FSH (Fig. 1) at the 150 μ g daily dose was noticed following the administration of 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET. No significant variations on the pituitary content of gonadotropins were observed at all doses used, and a lack of antigonadotropic effect of 3 α ,5 α -NET was noticed at all doses administered. 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -oestradiol-treated control animals exhibited a sharp decrease on the serum LH and FSH concentration with a concomitantly unchanged pituitary gonadotropin content (results not shown).

The results obtained in this experiment prompted us to examine the effects of chronic admini-

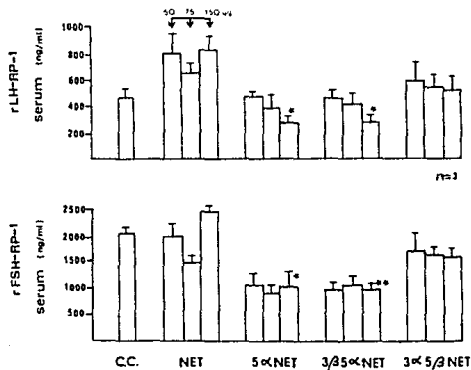


Fig. 1.

Effect of increasing doses of NET and its A-ring reduced derivatives on serum immunoreactive concentration of LH and FSH. Results are expressed as the mean \pm SEM of at least 3 animals. * P < 0.05, ** P < 0.01 when compared with the NET group (Student's t -test). Doses of NET and its derivatives below 50 μ g/day were ineffective.

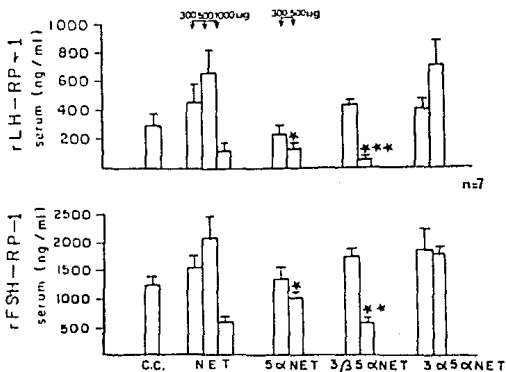


Fig. 2.

Serum gonadotropin levels after chronic α administration of 300 or 500 μ g of NET and its derivatives. Results are expressed as the mean \pm SEM of at least 7 animals. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.005 when compared with the NET group (Student's t -test).

stration of higher doses of NET and its derivatives upon gonadotropins. Accordingly, NET, 5 α -NET, 3 β ,5 α -NET and 3 α ,5 α -NET were daily administered at the doses of 300 and 500 μ g for 7 consecutive days. As depicted in Fig. 2, the 3 β ,5 α -NET and 5 α -NET exhibited a potent antigonadotropic activity in terms of both LH and FSH at the 2 dose levels employed, whereas NET did not. Indeed, to accomplish a significant NET-induced serum gonadotropin inhibition it was necessary to increase the daily dose up to 1 mg. The administration of 3 α ,5 α -NET resulted in a lack of antigonadotropic effect as shown in Fig. 2.

The chronic administration of NET at the dose of 1 mg/d induced a slight, although not significant, diminution of the LH content of the pituitary glands (952 ± 164 μ g/gland) as compared with the oil-treated control group (1268 ± 209 μ g/gland). Identical results were obtained with 3 β ,5 α -NET at the dose of 500 μ g/d. Neither NET nor its derivatives induced significant changes on the FSH pituitary content at all doses employed.

To examine if the antigonadotropic effect of 3 β ,5 α -NET and 5 α -NET are the result of their interactions with hypothalamic-pituitary oestrogen receptors, they were administered into tamoxifen primed castrated animals. LH was measured 4 h following the administration of NET derivatives because previous studies have indicated that maximum gonadotropin inhibition occurs at this point of time after NET injection (Larrea et al. 1983). The results indicated that antioestrogen administration resulted in a diminution of the LH inhibitory potency of 3 β ,5 α -NET, whereas it had very little effect, if any, upon the antigonadotropic activity of 5 α -NET, as shown in Fig. 3.

Discussion

The results presented herein indicate that structural modifications on the A-ring of the NET molecule effectively enhanced its antigonadotropic activity under certain circumstances. All experiments were conducted in the long-term castrated adult male rat, a suitable model for this comparative assessment, not only because of its elevated serum levels of gonadotropins, but also because of its well documented depletion of hypothalamic-pituitary progesterone receptors (Pérez-

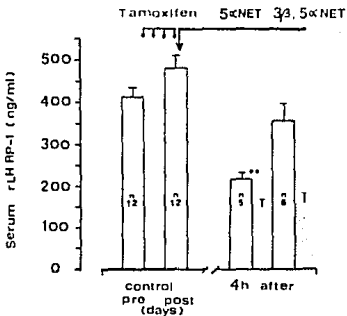


Fig. 3.

Effect of 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET upon serum LH inhibition in tamoxifen primed animals. (For details see the text). ** $P < 0.01$ when compared with control post-tamoxifen rats. Non-primed animals (\square) were also treated with the two NET derivatives ($n = 6$, each group).

Palacios et al. 1983) and its concomitant progesterone unresponsiveness in terms of gonadotropin inhibition (Larrea et al. 1984).

Hydrogenation of the double bond by formation of the 5 α (trans A/B ring junction) NET derivative, resulted in a significant increase of the LH inhibitory activity. These findings are in accordance with the observation that A-ring reduction at the 5 α -position of naturally occurring androgens increases their antigonadotropin activity. In fact, the majority of data available (Bever et al. 1971, 1972; Pérez-Palacios et al. 1975; Celotti et al. 1979; Martini 1982) indicate that 5 α -DHT is more effective than testosterone in suppressing LH release; thus implying that enhancement of this biological activity by A-ring reduction occurs on both natural C₁₉ and synthetic 19-nor-17 α -ethynyl steroid compounds.

The pituitary content of LH following the chronic administration of 5 α -NET at all doses employed remained unchanged, indicating that its LH inhibitory effect was exerted upon the pituitary release rather than on hypothalamic-regulated LH pituitary synthesis, an observation on

line with the suggestion of Martin (1982) that the effect of 5 α -DHT is exerted prevalently, if not exclusively, on the anterior pituitary. The finding that the 5 α -NET-induced LH suppression was not impaired by the simultaneous administration of tamoxifen demonstrated that this effect was not mediated via oestrogen receptors and strongly suggests that it was the result of 5 α -NET interaction with intracellular androgen binding sites. This suggestion is supported by a recent report of Chávez et al. (1985) which gave evidence of high-affinity binding of 5 α -NET with cytosol located androgen receptors.

Further reduction of 5 α -NET, at its 3 β or 3 α position yielded different effects in terms of its LH-inhibitory activity. Thus 3 β ,5 α -NET exhibited a potent ability to diminish serum LH levels following its chronic administration. On the contrary, the 3 α isomeric alcohol (3 α ,5 α -NET) exhibited a lower LH inhibitory activity as compared with 5 α -NET, although its potency was similar to that of unmodified NET. The finding that the 3 β ,5 α -NET derivative had a greater capability to suppress LH release than its 3 α ,5 α -isomer is in contrast with a number of studies undertaken with the natural tetrahydro derivatives of testosterone (Eckstein 1975). The 3 α ,5 α -corresponding androstane diol has been found to be as active as or more effective than DHT in serum LH inhibition (Zanisi et al. 1973; Verjans & Eik-Nes 1976, 1977a,b). Nevertheless, our results are in agreement with the demonstration that 3 β ,5 α -NET binds stereospecifically with the intracellular oestrogen receptor to a large extent, whereas its 3 α -isomeric derivative displays lower affinity for this putative steroid receptor. Further support for this concept was furnished by the diminution of the 3 β ,5 α -NET antagonistic effect induced by tamoxifen (Fig. 3).

The effectiveness of A-ring reduced NET derivatives to suppress FSH release was slightly different from that observed on LH inhibition. Thus, 3 β ,5 α -NET was the most potent inhibitor of serum FSH levels after its chronic administration, being followed by 5 α -NET, whereas 3 α ,5 α -NET exhibited lower FSH inhibitory potency. On the basis of this observation, the suggestion is interesting that 5 α -reduced derivatives of testosterone (DHT and 3 α ,5 α -diol) play only a secondary role in the negative feedback control of FSH and that to accomplish this effect testosterone requires its bioconversion to oestrogens, particu-

larly since these compounds are indeed good suppressors of FSH release (Kulin 1972). These observations indicate that the FSH diminution induced by 3 β ,5 α -NET were mediated via oestrogen receptors and are in accordance with the demonstration that this NET derivative can effectively initiate oestrogen-like biochemical cellular response (Vilchis et al. 1986).

All in all, the results demonstrate an enhancement of the antagonistic potency of NET by its A-ring reduction in the animal model employed thus underlining the importance of the metabolic fate of the synthetic progestogen. Although the effects of these metabolic conversion products of NET in other mammalian species cannot yet be ascertained and deserve further pharmacological assessment, it certainly opens up for a new approach in the search for new and potent ovulation inhibiting agents.

Acknowledgments

The authors wish to thank NIADDC (Bethesda, MD) for providing rat LH and FSH biological material for the performance of assay and Mrs. Beatriz Alarcon for typing the manuscript.

This work was supported in part by Grants from the National Council and Science & Technology (CONACYT), Mexico City, the Special Programme of Research in Human Reproduction, World Health Organization, Geneva, and the Rockefeller Foundation, New York.

References

- Barbieri R L, Petro Z, Canick J A & Ryan K J (1983): Aromatization of norethisterone to ethynyl estradiol by human placental microsomes. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 299-303.
- Bever C, Morah G & Cruz M L (1971): Effect of 5 α -dihydrotestosterone on gonadotrophin secretion and estrous behavior in the female Wistar rat. *Endocrinology* 89: 1158-1161.
- Bever C, Jaffe R B & Gay V L (1972): Testosterone metabolism in target tissues: effects of testosterone and dihydrotestosterone injection and hypothalamic-implantation on serum LH in ovariectomized rats. *Endocrinology* 91: 1372-1375.
- Bowers A, Ringold H J & Denot F (1958): Steroids. Cl. 19-Nordihydrotestosterone derivatives. *J Am Chem Soc* 80: 6115-6121.

- Braselton W E, Lin T J, Ellegood J D, Mills T M & Mahesh V B (1979): Accumulation of norethisterone and individual metabolites in human plasma during short and long-term administration of a contraceptive dosage. *Am J Obstet Gynec* 133: 154-160.
- Breuer H (1970): Metabolism of progestagens. *Lancet* 2: 615-616.
- Breuer H (1977): Metabolic pathways of steroid contraceptive drugs. In: Garattini S & Berendes H W (eds). *Pharmacology of Steroid Contraceptive Drugs* p 73. Raven Press, New York.
- Celotti F, Mava R & Martini L (1979): Metabolism of sex steroids in central nervous system. In: DeGroot L J (ed). *Endocrinology*. Vol 1: 41-53. Grune & Stratton, New York.
- Chávez B A, Vilchis F, Perez A E, Garcia G A, Grillawala I & Pérez-Palacios G (1985): Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 22: 121-126.
- Eckstein B (1975): Studies on the mechanism of the onset of puberty in the female rat. *J Steroid Biochem* 6: 873-878.
- Gerhards E, Hecker W, Hitzte H, Nieuweloer B & Bellman O (1971): Zum Stoffwechsel von norethisteron (17 α -äthynyl-4-östrren-17 β -ol-3-on) und DL-sowie D-norgestrel (18-methyl-17 α -äthynyl-4-östrren-17 β -ol-3-on) beim Menschen. *Acta Endocrinol (Copenh)* 68: 219-248.
- Howard G, Khan F S, Warren R J & Fotherby K (1975): Metabolism of norethisterone oenanthate in vivo and in vitro. *J Endocrinol* 65: 20-21.
- Kamyab S, Fotherby K & Klopper A I (1968): Metabolism of ¹⁴C lynestrenol in man. *J Endocrinol* 42: 337-343.
- Kulin H E & Reiter E O (1972): Gonadotropin suppression by low dose estrogen in men: evidence for differential effects upon FSH and LH. *J Clin Endocrinol Metab* 35: 836-839.
- Larrea F, Escobar N, Garza-Flores J, Mettezuma O, Martinez Campos A & Pérez-Palacios G (1983): Nuclear translocation of norethisterone: An alternate mechanism for gonadotropin inhibition. *J Steroid Biochem* 19: 1747-1752.
- Larrea F, Moctezuma O & Pérez-Palacios G (1984): Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of the ovariectomized rats. *J Steroid Biochem* 20: 841-847.
- Martini L (1982): The 5 α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. *Biochemical and physiological implications*. *Endocrine Rev* 3: 1-25.
- Murugesan K, Hingorani V & Laumas K R (1973): In vitro metabolism [6,7-³H]norethynodrel in the human endometrium and the myometrium. *Acta Endocrinol (Copenh)* 74: 576-591.
- Okada H, Amatsu M, Ishihara S & Tokuda G (1964): Conversion of some synthetic progestins to estrogens. *Acta Endocrinol (Copenh)* 46: 31-36.
- Pérez-Palacios G, Larsson K & Beyer C (1975): Biological significance of the metabolism of androgens in the central nervous system. *J Steroid Biochem* 6: 999-1006.
- Pérez-Palacios G, Fernandez Aparicio M A, Medina M, Zacarias Villareal J & Ulloa-Aguirre A (1981): On the mechanism of action of progestins. *Acta Endocrinol (Copenh)* 97: 320-328.
- Pérez-Palacios G, Chavez B, Vilchis F, Escobar N, Larrea F & Pérez A E (1983): Interaction of medroxyprogesterone acetate with cytosol androgen receptors in the rat hypothalamus and pituitary. *J Steroid Biochem* 19: 1729-1735.
- Sisenwine S F, Liu A L, Kimmel H B & Ruelius W H (1974): Phenolic metabolites of DL-norgestrel: A method for the removal of 1-hydroxylated metabolites, potential sources of phenolic artifacts. *Acta Endocrinol (Copenh)* 76: 789-800.
- Verjans H L & Eik-Nes K B (1976): Effects of androgens, 5 α -androstanones, 5 β -androstanones, oestrenes and oestratrienes on serum gonadotrophin levels and ventral prostate weights in gonadectomized, adult male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 83: 201-210.
- Verjans H L & Eik-Nes K B (1977a): Comparison of effects of C₁₉ (androstene or androstane) steroids on serum gonadotrophin concentrations and on accessory reproductive organ weights in gonadectomized adult male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 84: 829-841.
- Verjans H L & Eik-Nes K B (1977b): Gonadotrophin suppression by steroids in normal, adult male rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 84: 842-849.
- Zanizi M, Motta M & Martini L (1973): Inhibitory effects of 5 α -reduced metabolites of testosterone on gonadotrophin secretion. *J Endocrinol* 56: 315-316.

Received August 2nd, 1985.

Accepted January 15th, 1986.

FURTHER STUDIES ON THE ANTIGONADOTROPIC MECHANISM OF ACTION OF NORETHISTERONE

J. GARZA-FLORES,¹* M. MENJÍVAR,¹ M. CARDENAS,¹ M. REYNOSO,² G. A. GARCÍA,² and G. PÉREZ PALACIOS¹

¹Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition S. Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15 Tlalpan, Mexico City and ²Molecular Biology Laboratory, Mexican Institute of Social Security, Mexico City and ³Postgraduate Division, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, UNAM, Mexico City, Mexico

(Received 9 April 1990)

Summary—To examine the molecular mechanisms involved in the antigonadotropic effects of norethisterone (NET) and two of its A-ring reduced metabolites the 5 α -norethisterone (5 α -NET) and the 3 β ,5 α -norethisterone (3 β ,5 α -NET) at the neuroendocrine level, a series of experiments were undertaken in adult castrated rats. Animals were primed either with 0.2 mg of tamoxifen (Tam) for 4 consecutive days or 1.0 mg of cyproterone acetate (CPA) for 7 days followed by a single subcutaneous injection of 0.5 mg of NET, 5 α -NET or 3 β ,5 α -NET. Four hours later, they were sacrificed and blood obtained for the measurement of immunoreactive serum LH and FSH. The results indicated that antiestrogen (Tam) pretreatment precluded the inhibitory effects of NET and the 3 β ,5 α -NET but not those of the 5 α -NET derivative. Pretreatment with CPA did not modified the antigonadotropic action of the 3 β ,5 α -NET metabolite but it markedly reduced the inhibitory action of the 5 α -NET, thus indicating that in the experimental model used, the antigonadotropic effects of NET, are in part the result of its metabolic conversion to its A-ring reduced metabolites. While the 5 α -NET displayed an androgenic effect, the 3 β ,5 α -NET exhibited estrogen-like effect at the neuroendocrine level.

INTRODUCTION

Norethisterone NET, (17 α -ethynyl-19-nortestosterone), a 19-nortestosterone derivative was first synthesized in 1951 [1]; Since then this synthetic progestin has been widely used as a contraceptive agent either alone or in combination with estrogens [2-5]. It has been recognized that NET is further metabolized to various dihydro and tetrahydro A-ring reduced metabolites which have been isolated from serum and urine of women under contraceptive therapy [6-8]. Previous experiments have shown that NET displays a variety of hormonal effects when administered to several mammalian species [9-12]. The progestogenic, estrogenic and androgenic effects of NET, have been previously reported in bioassays as well as in clinical studies [13-16]. Administration of NET as an enanthate derivative exhibits a potent gonadotropin inhibitory activity in non-estrogen-sensitized postmenopausal women, an effect which is not seen with progesterone alone, suggesting that its mode of action might differ

from that of progesterone [17]. Indeed several studies from our laboratories have suggested an estrogenic mode of action of NET upon the hypothalamic-pituitary unit of ovariectomized rats [18, 19]. Moreover, further studies have indicated that biotransformation of NET to other metabolites such as the A-ring reduced dihydro derivatives can specifically interact with either estrogen or androgen receptors [20]. This interaction has been shown to be followed by specific biological responses, that with estrogen receptors there is the induction of progesterone highly specific binding sites at the pituitary level. Further support for this concept was derived from recent observation showing that some tetrahydro-NET derivatives are indeed more potent in terms of inhibitory effect on serum gonadotropins levels than NET itself [21, 22].

In the present study further observations on the mechanism of action of NET are performed by the analysis of the effects of the administration of NET and two of its A-ring reduced derivatives (5 α -NET and 3 β ,5 α -NET) upon the hypothalamic-pituitary unit of adult ovariectomized rats in the presence of tamoxifen (Tam) and cyproterone acetate (CPA).

*To whom correspondence should be addressed

EXPERIMENTAL

Chemicals

Norethisterone (NET), (17 α -ethinyl-17 β -hydroxy-4-estren-3-one) was kindly provided by Schering Mexicana, Mexico. The NET derivatives were synthesized as previously described [24] with minor modifications. The 3 β ,5 α -NET was prepared by sodium borohydride reduction [25]. The chemical purity of NET and its metabolites was >98% as assessed by melting points, high-performance liquid chromatography and H-nuclear magnetic resonance spectrometric analysis. Tamoxifen (Tam), (trans-(1-*p*- β -dimethylaminoethoxyphenyl)-1,2-diphenylbut-1-ene), was obtained from Imperial Chemical Industries, Macclesfield, Cheshire, Cyproterone acetate (17-acetoxy-6-chloro-1 α ,2 α -methylene-pregna-4,6-diene-3,20-dione), was a gift from Schering Mexicana, Mexico. All other chemicals employed were analytical grade and purchased from Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.

Animals

Adult male and female Wistar rats weighing 200–250 g were gonadectomized under light ether anesthesia 3 weeks prior to the experiments. Animals were kept under a 14 h-light, 10 h-dark day cycle and maintained on food and water *ad libitum*.

Antiandrogen administration

Tamoxifen (Tam), was administered s.c. at a daily dose of 0.2 mg for 4 consecutive days [18]. On the fourth day, the animals ($n = 6$) were treated with either the vehicle, NET or its metabolites 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET at a single dose of 0.5 mg. Four hours after, blood samples were obtained by decapitation and serum aliquots were stored at -20°C for hormonal analysis.

Antiandrogen administration

The steroidal progestin with antiandrogen properties cyproterone acetate (CPA) was subcutaneously injected at various doses to establish the antiandrogen optimal doses. One milligram per day for 7 days was subsequently chosen for the study in male and female castrated rats.

The serum LH and FSH levels were measured before and after priming with tamoxifen or cyproterone acetate as well as after 4 h of steroid administration. This schedule was based on the time required for NET to induce a maximum gonadotropin inhibition [18].

Hormone assays

Serum gonadotropins were measured by specific radioimmunoassays (RIA) using the double antibody technique following the protocols kindly supplied by the NIADK Rat Pituitary Hormone Distribution Program, Baltimore, Md. The results were expressed as ng/ml (mean \pm SD) according to the rLH-RP-1 and rFSH-RP1 used as standards. The intra- and inter-assay coefficients of variation for LH were 6.3 and 8.9%, respectively and for FSH 4.0 and 9.5% respectively. Direct comparison between the 2 groups was performed using the Student's *t*-test for unpaired samples.

RESULTS

Administration of NET to adult castrated male rats decreased the serum LH and FSH. This inhibitory effect upon serum gonadotropins was also observed to a greater extent with both NET metabolites indicating their greater antigonadotropic potency (Table 1).

Table 1 Effect of a single injection of 0.5 mg of NET and its reduce metabolites 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET upon serum LH in castrated male rats. Results are expressed as the mean \pm SD. The percentage of LH inhibition from the control post treatment is shown in parentheses

	Control post-treatment	NET	5 α -NET	3 β ,5 α -NET
Non primed (vehicle)	191 \pm 24 (0) $n = 6$	199 \pm 22* (49) $n = 6$	129 \pm 10* (67) $n = 6$	157 \pm 20* (60) $n = 6$
Cyproterone acetate (1 mg day ⁻¹ 4 days)	481 \pm 25 (0) $n = 6$	239 \pm 53* (39) $n = 5$	424 \pm 57 (12) $n = 5$	216 \pm 14* (55) $n = 5$
Tamoxifen (200 μ g day ⁻¹ 4 days)	478 \pm 30 (0) $n = 12$	—	213 \pm 19* (55) $n = 2$	351 \pm 37 (27) $n = 6$

* $P < 0.01$ when compared to control post treatment group

* $P < 0.001$ when compared to control post treatment group

When the serum LH and FSH levels were compared before and after tamoxifen administration, a slight non significant rise was observed. As shown in Fig. 1, administration of a single dose (0.5 mg) of 5 α -NET to Tam primed rats resulted in a significant ($P < 0.001$) decrease in serum LH and FSH levels. However, neither NET nor 3 β ,5 α -NET was effective as gonadotropin inhibitor in TAM primed

castrated female rats. Since the administration of 1 mg for 7 days of cyproterone acetate did not induce any significant change in the circulating pituitary gonadotropins level this dose was chosen for further experiments whereas administration of 2 mg of CPA inhibited the serum LH levels when compared to pretreatment values (Fig. 2). Figure 3 shows the results of LH and FSH in serum when NET or its A-ring

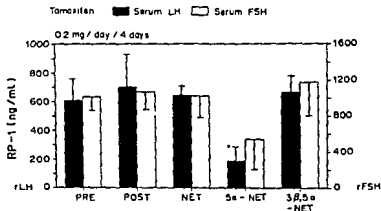


Fig. 1. Effect of NET, 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET upon serum gonadotropins in tamoxifen primed female castrated rats. * $P < 0.001$ when 5 α -NET was compared with control post tamoxifen group. The results are expressed as mean \pm SD.

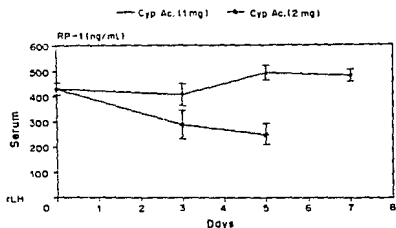


Fig. 2. Effect of cyproterone acetate upon serum LH in castrated female rats. Results are mean \pm SD.

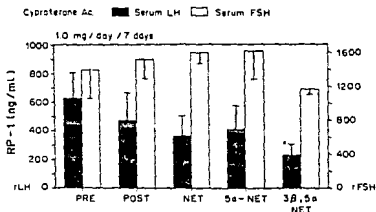


Fig. 3. Serum gonadotropin inhibition of NET, 5 α -NET and 3 β ,5 α -NET in cyproterone acetate primed animals. * $P < 0.001$ when compared with control post cyproterone acetate group.

reduced derivatives were administered to CPA-treated rats. As depicted, only the $3\beta,5\alpha$ -NET was able to decrease significantly ($P < 0.001$) the serum concentration of LH, whereas FSH serum concentrations did not exhibit major changes though there was a slight decrease after $3\beta,5\alpha$ -NET administration, thus suggesting the estrogenic potency of $3\beta,5\alpha$ -NET. There was a lack of FSH inhibition after NET or 5α -NET.

DISCUSSION

The results obtained in this study confirm and extend previous observations on the mechanism of gonadotropin inhibition of NET and provides further evidence on the biological activity of two of its metabolites, the 5α -NET and the $3\beta,5\alpha$ -NET.

Previous studies from this group have suggested that the estrogenic effects of NET are probably due to the formation of non-phenolic A-ring reduced metabolites which can interact with cytosolic receptors other than the progesterone receptors [17-19]. The demonstration that 5α -NET can interact *in vitro* with the androgen intracellular receptors and that preferentially but not exclusively the $3\beta,5\alpha$ -NET binds the estrogen receptors [20], coupled with the data obtained on the induction of estrogen-dependent progesterone receptors of the rat anterior pituitary [21], and the enhanced *in vitro* antagonistic effect of NET reduced metabolites prompted us to undertake this study in antiestrogen and antiandrogen primed rats. Like the natural androgens, it is assumed that NET undergoes extensive *in vitro* metabolism in the target tissues. The 5α -reduction, NET could be further metabolized to the tetrahydroderivatives such as $3\alpha,5\alpha$ -NET and $3\beta,5\alpha$ -NET by the 3α -hydroxysteroid dehydrogenase or 3β -hydroxysteroid dehydrogenase [26]. While a large extent of 3α -diols could be oxidized by a reversible reaction of the 3α -hydroxysteroid dehydrogenase, the formation of 3β -diols led to the rapid formation of more polar steroids indicating that further reduction of 3β -diols occur rather than oxidation [27]. These observations are important for interpreting our data since interconversion between metabolites seems to occur it is unlikely that $3\beta,5\alpha$ -NET could be oxidized to 5α -NET. However, in the case of 5α -NET it is possible that the effects observed in the present study are not only those of 5α -NET but also the result of further reduction.

The finding that Tam pretreatment impaired the gonadotropin inhibition of NET and $3\beta,5\alpha$ -NET suggests that its effect is mediated via the estrogen receptor. The antigonadotropic effect of 5α -NET was maintained in the presence of Tam thus indicating that 5α -NET asserts its action through interaction with a different cytosolic receptor. This suggestion is supported by the previous results indicating high affinity of 5α -NET derivative for the intracellular androgen receptors [20]. In order to further confirm the androgen-like effect of 5α -NET, CPA pretreated animals were treated with NET or its metabolites. The observations from these experiments indicated that under antiandrogen treatment, $3\beta,5\alpha$ -NET maintained its antigonadotropic activity whereas the inhibitory effects of 5α -NET was significantly reduced.

The overall data suggests that the antigonadotropic effects of NET are the result of its A-ring reduction, leading to the formation of 5α -NET and $3\beta,5\alpha$ -NET which exhibit androgenic and estrogenic actions respectively at the neuroendocrine level. The significance of this results could explain the wide spectrum of hormonal effects observed after the *in vitro* administration of NET and can be useful in the design of more potent and specific steroidal contraceptives.

Acknowledgements—This study was supported in part by grants from the World Health Organization Special Programme of Research Development and Research Training in Human Reproduction, Geneva; The Rockefeller Foundation, New York; and The National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico City.

REFERENCES

- Djerassi C, Miramontes I and Rosenkrantz G: Abstracts of Meeting Divisional Medical Chemistry. *Am. Chem. Soc.* (1952) Milwaukee, Wisc. (Abstr. 18).
- Hertz R, Tullner W and Raffelt E: Progestational activity of orally administered 17 α -ethynyl-19-nortestosterone. *Endocrinology* 54 (1954) 228-230.
- Pincus G, Chang M. C., Zarrow M. X., Hafez E. S. E. and Merrill A.: Studies of the biological activity of certain 19-nor steroids in female animals. *Endocrinology* 59 (1956) 695-707.
- McGivins D. A. and Djerassi C.: Some chemical and biological properties of 19-nor-17 α -ethynyl testosterone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 71 (1953) 500-515.
- Zarrow M. X., Peters I. E. and Cadwell A. I.: Comparative potency of several progestogenic compounds in a battery of different biological tests. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 71 (1958) 532-541.
- Braselton W. E., Lin T. J., Mills T. M., Ellegood J. O. and Mishesh V. B.: Identification and measurement by gas chromatography-mass spectrometry of norethandrone and metabolites in human urine and blood. *J. Steroid Biochem.* 8 (1977) 9-18.

7. Braselton W. E., Iin T. J., Ellegood J. O., Mills T. M. and Mahesh V. B.: Accumulation of norethisterone and individual metabolites in human plasma during short and long-term administration of contraceptive dosage. *Am. J. Obstet. Gynec.* 133 (1979) 154-160.
8. Salberg B.-I., Landgren B.-M. and Axelsson M.: Metabolic profiles of endogenous and ethinyl steroids in plasma and urine from women during administration of oral contraceptives. *J. Steroid Biochem.* 26 (1987) 609-617.
9. Saunders F. J. and Drill V. A.: The myotrophic and androgenic effects of 17-ethinyl-19-nortestosterone and related compounds. *Endocrinology* 58 (1956) 567-572.
10. Edgren R. A., Calhoun D. W., Elton R. I. and Colton F.: Estrogen antagonisms: the effects of series of relatives of 19-nortestosterone on estrone induced uterine growth. *Endocrinology* 65 (1959) 265-272.
11. Ravez C., Chappel C. I. and Gaudry R.: Masculinization of female fetuses in the rat by progestational compounds. *Endocrinology* 68 (1960) 140-144.
12. Edgren R. A., Jones R. C. and Peterson D. I.: A biological classification of progestational agents. *Fert. Steril.* 18 (1967) 238-256.
13. Foote W. D., Foote W. C. and Foote I. H.: Influence of certain natural and synthetic steroids on genital development in guinea pigs. *Fert. Steril.* 19 (1968) 606-615.
14. Labrie F., Feland I., Iagrace I., Drovin J., Azadian-Boulanger G. and Raynaud J. P.: High inhibitory activity of R-5020, a pure progestin at the hypothalamic adenophyseal level on gonadotropin secretion. *Fert. Steril.* 28 (1977) 1104-1112.
15. Grumbach M. M., Ducharme J. R. and Moloshok R. E.: On the fetal masculinizing action of certain oral progestins. *J. Clin. Endocr. Metab.* 19 (1959) 1369-1380.
16. Jacobson B. D.: Hazards of norethisterone therapy during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynec.* 84 (1962) 962-968.
17. Pérez-Palacios G., Fernandez-Aparicio M. A., Medina M., Zacarias-Villateal J. and Ulloa-Aguirre A.: On the mechanism of action of progestins. *Acta Endocr. (Copenh.)* 97 (1981) 320-328.
18. Larrea F., Escobar N., Garza-Flores J., Moctezuma O., Martínez Campos A. and Pérez-Palacios G.: Nuclear translocation of norethisterone: an alternate mechanism for gonadotropin inhibition. *J. Steroid Biochem.* 19 (1983) 1747-1752.
19. Larrea F., Moctezuma O. and Pérez-Palacios G.: Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. *J. Steroid Biochem.* 20 (1984) 841-847.
20. Chavez B. A., Vilchis F., Pérez A. E., Garcia G. A., Grillasca I. and Pérez-Palacios G.: Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolite. *J. Steroid Biochem.* 22 (1985) 121-126.
21. Vilchis F., Chavez B., Pérez A. E., Garcia G. A., Angeles A. and Pérez-Palacios G.: Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterone receptors. *J. Steroid Biochem.* 22 (1985) 525-531.
22. Garza-Flores J., Vilchis F., Garcia G. A., Menjivar M. and Pérez-Palacios G.: A-ring reduction enhances the antigonadotropic potency of norethisterone. *Acta Endocr.* 112 (1986) 278-283.
23. Larrea F., Vilchis F., Chavez B., Pérez A. E., Garza-Flores J. and Pérez-Palacios G.: The metabolism of 19-norcontraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J. Steroid Biochem.* 27 (1987) 657-663.
24. Bowers A., Ringold H. J. and Denot E.: Steroid Cl. 19-Nor-dihydrotestosterone derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 6115-6121.
25. Still W. C., Kahan M. and Mitra A.: Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. *J. Org. Chem.* 43 (1978) 2923-2925.
26. Wei Liu Kao L., Lloret Perez A. and Weisz J.: Metabolism *in vitro* of dihydrotestosterone, 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol and its 3 β -epimer, three metabolites of testosterone, by three of its target tissues, the anterior pituitary, the medial basal hypothalamus and the seminiferous tubules. *J. Steroid Biochem.* 8 (1977) 1109-1115.
27. Samperiz S. and Jovan P.: Androgen metabolism, androgen and oestrogen receptors in the male anterior pituitary. *J. Steroid Biochem.* 11 (1979) 819-831.