



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

"EFECTIVIDAD DE NORETISTERONA Y SUS
METABOLITOS REDUCIDOS EN EL ANILLO A
PARA RESTABLECER LA ACTIVIDAD COPULATORIA
EN LA RATA MACHO CASTRADA"

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION)
P R E S E N T A L A
Biól. MARTHA VERONICA OROPEZA BLANDO



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A Don Héctor porque sigue presente a
través de su inmenso cariño y de sus
enseñanzas.

A mi hijo, mi madre y mi hermano
porque llenan mi vida.

A mis amigos
porque lo son.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurociencias de la Unidad de Investigación Biomédica del IMSS.

Agradezco a la Dra. Gabriela Morali de la Brena su asesoría para la realización del presente trabajo.

Agradezco también a los Dres. José Miguel Cervantes, Juan José Hicks, José Domingo Méndez y Luis Arturo Baiza por la revisión y sus comentarios sobre el mismo.

RESUMEN

La noretisterona es una progestina sintética que pertenece al grupo de los 19-noresteroides que ha sido ampliamente utilizado como anticonceptivo. Se sabe que además de sus efectos típicamente progestacionales puede ejercer acciones estrogénicas y androgénicas tanto en tejidos periféricos como en el eje hipotálamo-hipófisis, al suprimir la secreción hipofisiaria de gonadotrofinas en pacientes con feminización testicular, en mujeres postmenopáusicas y en ratas ovariectomizadas que no recibieron estrógenos previos. Se sabe también que dichas acciones se deben a la interacción de sus metabolitos reducidos en el anillo A, 5 α NET con el receptor de andrógenos y 3 β 5 α NET y su isómero 3 α 5 α NET, con el receptor de estrógenos.

La conducta sexual masculina en la rata depende de la acción de las hormonas testiculares sobre el sistema nervioso central y en animales castrados se ha observado que su expresión es óptima cuando se administran en forma simultánea un andrógeno (DHT) y un estrógeno (E₂).

Por lo anterior, se seleccionó la restitución de la actividad copulatoria en la rata macho castrada como modelo experimental para determinar si las acciones androgénicas y estrogénicas de NET y sus metabolitos reducidos en el anillo A, observadas en tejidos periféricos y sobre la secreción hipofisiaria de gonadotrofinas, se manifiestan también sobre el sustrato neural involucrado en la expresión de dicha conducta.

Para esto se utilizaron ratas macho, adultas, de la cepa Wistar, sexualmente activas que se castraron y después de por lo menos 90 días en que se verificó que ya no mostraran actividad sexual se asignaron a alguno de los siguientes grupos para evaluar la posible actividad androgénica de los compuestos: NET, 5 α NET, 3 β 5 α NET o 3 α 5 α NET (300 μ g), o vehículo, en combinación con E₂ (5 μ g). Para evaluar la posible actividad estrogénica de estos esteroides los Ss se trataron con NET o alguno de sus metabolitos (300 μ g) o vehículo + DHT (300 μ g). El control positivo para ambos esquemas de tratamiento fue un grupo de Ss que recibió DHT (300 μ g) + E₂ (5 μ g). Finalmente para evaluar la actividad androgénica/estrogénica que pudieran tener los compuestos solos, se administraron NET o alguno de sus metabolitos (500 μ g) y como controles un grupo tratado con testosterona (500 μ g) y otro con vehículo (0.2 ml). Los tratamientos se administraron en dosis diarias durante 21 días, en este período se realizaron evaluaciones de actividad sexual cada 72 h y al final del tratamiento se sacrificaron los animales y se diseccionaron la próstata ventral y las vesículas seminales.

Nuestros resultados mostraron que NET fue el único compuesto capaz de ejercer acciones androgénicas que sinergizan con E₂ para restituir la conducta sexual masculina y que estas acciones androgénicas no dependen de su biotransformación a 5 α NET pues no obstante que este último es el metabolito con mayor afinidad por el receptor de andrógenos, no tuvo acciones androgénicas sobre la

actividad copulatoria en estas condiciones. Sin embargo ¹⁹⁷⁷ mostró al mismo tiempo acciones antiandrogénicas sobre el crecimiento de tejidos periféricos, resultado que esta de acuerdo con trabajos previos en que se ha reportado que algunas progestinas sintéticas pueden ejercer acciones androgénicas, antiandrogénicas y sinandrogénicas. El metabolito 3 β 5 α NET, y en menor grado su isómero 3 α 5 α NET fueron los mas efectivos para restituir la actividad copulatoria cuando se administraron en combinación con DHT. Esto es lo que se hubiera esperado en vista de su afinidad por el receptor de estrógenos. Cuando se administraron los compuestos solos, NET fue la mas efectiva para restituir la actividad copulatoria en nuestros sujetos. Esto puede deberse a su doble interacción: por sí misma con el receptor de andrógenos y a través de sus metabolitos 3 β 5 α NET y 3 α 5 α NET, con el receptor de estrógenos.

INDICE

OBJETIVO	1
ANTECEDENTES	2
1. NORETISTERONA	3
1.1 Acciones hormonales de noretisterona	4
1.2 Metabolismo	9
1.3 Acciones biológicas de los metabolitos de noretisterona	11
2. REGULACION HORMONAL DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
SECCION EXPERIMENTAL	21
RESULTADOS	
1. ACTIVIDAD ANDROGENICA DE NET Y SUS METABOLITOS, AL SINERGIZAR CON E ₂	26
2. ACTIVIDAD ESTROGENICA DE NET Y SUS METABOLITOS AL SINERGIZAR CON DHT	31
3. ACTIVIDAD ANDROGENICA/ESTROGENICA DE NET Y SUS METABOLITOS	36
4. EFECTOS SOBRE PROSTATA VENTRAL Y SOBRE VESICULAS SEMINALES	42
DISCUSION	44
CONCLUSIONES	59
BIBLIOGRAFIA	61

O B J E T I V O

Determinar si las acciones androgénicas y estrogénicas de noretisterona y sus metabolitos reducidos en el anillo A, observadas tanto en tejidos periféricos como sobre la secreción hipofisiaria de gonadotropinas, se manifiestan también sobre el sustrato neural que participa en la expresión del comportamiento sexual masculino en la rata.

A N T E C E D E N T E S

Los estrógenos y la progesterona se han utilizado comunmente como anticonceptivos por su capacidad para interferir con la secreción de gonadotropinas y en consecuencia, con la ovulación; sin embargo, a pesar de su potente actividad biológica, tienen una vida media relativamente corta en el plasma y son inefectivos cuando se administran por vía oral. Por esto se han introducido modificaciones estructurales a las moléculas esteroides que les permiten tener una vida media mas larga y al mismo tiempo conservar su actividad biológica a pesar de estar expuestas a los mismos procesos farmacocinéticos que las hormonas naturales. Así, se han sintetizado compuestos que pueden ser utilizados efectivamente como anticonceptivos para administración oral (3).

Entre los distintos compuestos sintéticos que han sido utilizados como anticonceptivos hormonales se encuentran los llamados 19-nor esteroides que se derivan de la 19-nor testosterona. Estos han mostrado un marcado efecto progestacional sobre el endometrio humano cuando se administran por vía oral, en dosis diarias de 2, 5, 10 o 20 mg/día, durante períodos de 21 días alternados con 7 días sin tratamiento (53).

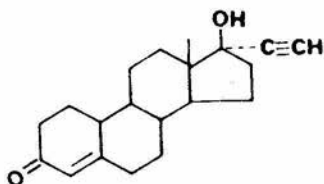
Una ventaja de los 19-nor esteroides sobre los estrógenos que se administran como anticonceptivos es que, entre uno y cuatro días después de suspender la administración de 19-nor esteroides, se presenta un sangrado que se parece al de

la menstruación, lo cual no sucede consistentemente cuando se administran estrógenos. La presencia de este sangrado evita que las usuarias se inquieten ante la posibilidad de estar embarazadas, como sucede cuando hay amenorrea entre dos períodos continuos de medicación (53).

1. NORETISTERONA

Un ejemplo de los 19-nor esteroides sintéticos es la 17 α -etinil,17 β -hidroxi,4-estren,3-ona o noretisterona (NET) que se deriva químicamente de la testosterona a través de la eliminación del metilo angular C 19 en posición 10, característica de los 19-noresteroides, y de la introducción de un grupo etinilo en posición 17 α .

Como consecuencia de estas modificaciones, disminuye importantemente la actividad androgénica de este esteroide y al mismo tiempo adquiere una potente actividad progestacional (49).



NET

1.1 Acciones hormonales de la noretisterona.

Desde 1951, año en que fue sintetizada y patentada (18), NET ha sido ampliamente utilizada en formulaciones anticonceptivas orales e inyectables al igual que en dispositivos intrauterinos medicados, en anillos vaginales, o en implantes subdérmicos. Se ha administrado sola o en combinación con los estrógenos y en todos los casos ha mostrado su efectividad para evitar el embarazo (22, 51, 52).

El mecanismo de acción de la NET fue un punto controvertido a través de muchos años porque, aunque se conocía su efecto supresor de la ovulación, no se sabía si éste era consecuencia de una inhibición sobre la secreción hipofisiaria de gonadotropinas o si no existía tal efecto.

Fue hasta los años sesenta cuando, con la utilización del radioinmunoanálisis, se hizo posible la medición más precisa de niveles hormonales en la circulación y se pudo establecer sin lugar a dudas que NET disminuye los niveles plasmáticos de hormona luteinizante (LH) y, aunque en menor proporción y más lentamente, también los de la hormona estimulante del folículo (FSH) y que esto ocurría tanto en mujeres jóvenes con función gonadal regular como en mujeres postmenopáusicas (21), en quienes no hay o están importantemente disminuídos los esteroides ováricos.

Posteriormente, Pérez-Palacios y col. (47), ampliaron estos estudios y observaron un efecto supresor de los niveles plasmáticos de LH también en pacientes con síndrome de

feminización testicular (SFT) que se castran para evitar el desarrollo de neoplasias en la gónada que, dada la resistencia de estos pacientes a la acción de los andrógenos, permanece en cavidad abdominal. Esto también explica por qué en estos pacientes, al igual que en la mujer postmenopáusica los niveles circulantes de gonadotropinas se mantienen permanentemente altos. Esta es la razón por la que ambos se han considerado como un buen modelo biológico para evaluar los efectos supresores de NET sobre la secreción de gonadotropinas. Estos mismos autores también demostraron que esta progestina puede suprimir la respuesta hipofisiaria a la administración exógena de la hormona hipotalámica liberadora de gonadotropinas (GnRH), en pacientes con SFT y que en mujeres postmenopáusicas disminuye dicha respuesta (47, 48).

Otro hallazgo significativo fue la observación de que la administración sistémica de NET induce una disminución de receptores a estrógenos en citosol de hipófisis y útero de ratas ovariectomizadas (OVX) que coincide con un aumento del contenido de los mismos en el núcleo, lo cual indica que la progestina fue capaz de translocar al núcleo el receptor citosólico de estrógenos, en dichos órganos sensibles (31).

Con objeto de examinar si esta translocación pudiera estar involucrada en algunos eventos neuroendócrinos, Larrea y col., (32) observaron que la administración subcutánea de 1 mg de NET a ratas adultas OVX indujo una disminución importante del contenido de LH en suero 4 hs después, coincidiendo con el momento de mayor concentración de receptores de estrógenos translocados al núcleo por la NET. Puesto que la

unidad hipotálamo-hipófisis de los animales utilizados, al estar privada de estrógenos carece de receptores a progesterona y en vista de que la administración previa de un antiestrógeno (tamoxifén) evita los efectos antigonadotrópicos de NET, los autores postulan que dichos efectos están mediados por un mecanismo de tipo estrogénico.

Es importante enfatizar que la actividad hormonal de la progesterona depende de la presencia de receptores inducidos por los estrógenos (41). Esto explica por qué dicha hormona no tiene efectos antigonadotrópicos en pacientes con SFT, ni en mujeres postmenopáusicas, ni en ratas adultas OVX a quienes no se les haya administrado una dosis previa de estrógenos. No obstante, la NET sí ha mostrado dicha capacidad supresora aun sin haberse administrado estrógenos previos, confirmando así que sus acciones hormonales están mediadas por receptores estrogénicos.

Al respecto cabe mencionar que cuando la NET se ha administrado por vía oral puede inducir cierto grado de queratinización del epitelio vaginal, característica de un efecto estrogénico. Sin embargo, cuando se implanta en el lóbulo lateral izquierdo de la *pars distalis*, induce hipertrofia de las células secretoras de PRL en la hipófisis, que coincide con reducción de tamaño de las células secretoras de LH (1). Los autores mencionan que estos cambios son similares a los que se observan con implantes de $17\beta E_2$ por lo que pueden considerarse como efectos estrogénicos de NET y que, por lo tanto la hipófisis es un indicador de estrogenicidad mas sensible que el epitelio vaginal.

Asimismo se ha observado que la NET es capaz de inducir un ligero aumento en el índice litogénico biliar, mismo que aunque no representa un riesgo para las pacientes, sí revela nuevamente su capacidad para provocar reacciones típicamente estrogénicas (19).

Se sabe que el control de la secreción de gonadotropinas, mediado por esteroides, puede llevarse a cabo en el hipotálamo modificando la secreción de GnRH o en la hipófisis cambiando su capacidad de respuesta al factor liberador hipotalámico y que dicho control pueden realizarlo los estrógenos o los andrógenos pero no la progesterona (29,55).

Larrea y col., (32) reportaron de además de la supresión de los niveles plasmáticos de LH en rata OVX, NET también disminuye significativamente la secreción hipofisiaria de dicha gonadotropina en respuesta a la administración de GnRH exógena (10 μ g) y que este hallazgo se correlaciona con una disminución en el contenido de receptores a GnRH en la hipófisis. Asimismo, los autores señalan que el tratamiento crónico con 1 mg/día durante 15 días de NET, disminuyó el contenido hipofisiario de LH y que esto coincidió con la restitución del contenido hipotalámico de GnRH, indicando que NET ejerció, sobre la secreción de gonadotropinas, efectos similares a los de los estrógenos.

Aunque hasta ahora hemos mencionado los efectos estrogénicos de la NET, debemos señalar que también presenta efectos androgénicos. En 1959, se reportaron algunos casos de niñas

recién nacidas cuyas madres habían sido tratadas con NET en dosis entre 5 y 40 mg/día durante las semanas 5 a 36 de gestación, probablemente como tratamiento preventivo por aborto habitual. En estas pequeñas, con cromatina sexual positiva, se reportó que había crecimiento anormal del clítoris y fusión labioescrotal variable. Los bajos niveles de 17-cetoesteroides urinarios descartaron la posibilidad de que existiera una hiperplasia suprarrenal. La virilización de genitales evidenció el efecto androgénico de la progestina sobre los productos de sexo femenino (24).

Posteriormente se confirmó la capacidad androgénica de la NET entre otras progestinas para inducir virilización de genitales también en fetos femeninos de ratas tratadas con la progestina durante la gestación (66).

Por otra parte también se ha demostrado que en el ratón, algunas de las progestinas sintéticas más utilizadas (medroxiprogesterona, acetato de ciproterona, acetato de medroxiprogesterona, noretinodrel, linestrenol) pueden mostrar actividades androgénicas, antiandrogénicas y/o sinandrogénicas, ya que modifican la actividad de la β -glucuronidasa de riñón y/o la actividad del factor de crecimiento epidermal de la glándula submaxilar en el ratón (12,25,44).

Aportando evidencia de la acción antiandrogénica de NET, Brumsted y col., (11) reportaron que esta progestina disminuyó los niveles séricos de testosterona (de 500 a 164 ng/dl) en una paciente con hiperandrogenemia severa asociada a la presencia de un tumor de células de Leydig y de Sertoli que le fue extirpado

del ovario derecho. Este tejido fue cultivado y se observó que también *in vitro* NET disminuyó la secreción de testosterona (de 1.88 ng/mg a 0.33 ng/mg, en 4h).

1.2 Metabolismo

Al analizar la diversidad de acciones hormonales de la NET, se debe considerar el hecho de que al administrar el compuesto a seres vivos es muy probable que esté siendo biotransformado dentro del organismo, como lo sugiere el que la administración oral de la progestina sea capaz de inducir queratinización del epitelio vaginal y que este efecto no se observe ni cuando se administra la progestina por vía sistémica (28), ni cuando se aplica directamente a la mucosa vaginal.

Esta idea es igualmente apoyada por el hecho de que a pesar de que se ha establecido claramente que la NET tiene efectos típicamente estrogénicos, es incapaz de interactuar directamente con el receptor de estrógenos (14).

Por lo anterior se ha investigado si el metabolismo de la NET podría explicar sus acciones estrogénicas y/o androgénicas.

Al respecto se sabe que la NET se metaboliza en el hígado y en el intestino (27) mediante la reducción en el anillo A, tanto en la posición 5 como en la 3, dando como resultado primero los metabolitos 5 α y 5 β dihidrorreducidos y después los 3 β o 3 α tetrahidorreducidos de cada uno de los anteriores. A continuación se enlistan los metabolitos con sus respectivas abreviaturas, mismas que serán utilizadas en

lo sucesivo:

5 α dihidronoretisterona	5 α NET
5 β dihidronoretisterona	5 β NET
3 α ,5 α tetrahidronoretisterona	3 α ,5 α NET
3 β ,5 α tetrahidronoretisterona	3 β ,5 α NET
3 α ,5 β tetrahidronoretisterona	3 α ,5 β NET
3 β ,5 β tetrahidronoretisterona	3 β ,5 β NET

Basados en evidencias que señalan la importancia de la biotransformación de las hormonas esteroides en sus sitios de acción, (39,46), Pérez-Palacios y col., (45) realizaron estudios del metabolismo de NET marcada con tritio en preparaciones *in vitro* de hipotálamo e hipófisis de ratas adultas castradas. Se observó que la NET tritiada se biotransformó, en ambos tejidos, a sus metabolitos: 5 α NET, 3 α ,5 α NET y 3 β ,5 α NET, indicando la existencia de 5 α , 3 α y 3 β reductasas capaces de utilizar a la NET como sustrato. Otros autores (9,59) encontraron que además de los metabolitos mencionados, se podían identificar también 5 β NET, 3 α 5 β NET y 3 β 5 β NET en el plasma de pacientes que recibieron la progestina en distintas preparaciones utilizadas como anticonceptivos.

La posibilidad de que la NET se transforme a 17 β -etinilestradiol al aromatizarse es un punto controvertido porque aunque algunos investigadores han reportado la presencia de 17 α -etnil,17 β -estradiol en orina de pacientes que utilizaron la NET como anticonceptivo oral, no hubo un aumento simultáneo de estriol urinario. Esto sugirió que el etinilestradiol encontrado pudo haberse formado durante los procedimientos químicos de análisis de las muestras de orina (10). Se ha reportado también que ni la NET ni la 17 α -etiniltestosona se aromatizan; en cambio testosterona (T), 19-

nortestosterona y sus 17α -metilderivados sí son sustrato de las aromatasas, sugiriendo que la cadena lateral 17 -etinil interfiere con la aromatización (10,64).

Por otra parte se demostró la aromatización *in vitro* de NET en una preparación de microsomas de placenta humana; sin embargo su bioconversión *in vivo* en la mujer no gestante es muy poco probable (2).

1.3 Acciones biológicas de los metabolitos de NET

Al demostrarse que la aromatización de NET es poco probable *in vivo* y que en cambio se metaboliza preferentemente a través de la reducción en el anillo A para formar compuestos no fenólicos, el grupo de Pérez-Palacios inició una serie de estudios encaminados a investigar la posibilidad de que las múltiples acciones hormonales de la NET estén mediadas por dichos metabolitos.

Chávez y col. (14), estudiaron la posible interacción de NET y sus metabolitos con los receptores de progesterona, de andrógenos y de estrógenos en preparaciones de útero de ratas OVX y estrogenizadas, de próstata ventral y de útero de ratas prepúberes, respectivamente. Encontraron que NET fue el competidor más eficiente para los sitios de unión específicos de progesterona, que la 5α -reducción disminuye la afinidad por los mismos y que la reducción subsecuente en la posición 3, la suprimió totalmente. La 5α reducción de NET facilita su potencia competitiva para los sitios de unión androgénicos, en

forma similar a como sucede en el caso de la reducción equivalente en la molécula de progesterona. Sin embargo, a diferencia de esta progestina, NET *per se* presenta moderada afinidad por los receptores a andrógenos. En el caso de los receptores estrogénicos el compuesto con mayor afinidad fue el 3 β ,5 α NET seguido de su isómero 3 α ,5 α , en tanto que NET y 5 α NET. no interaccionan con este tipo de receptores. Esto señala sin lugar a dudas que compuestos no fenólicos pueden interactuar con receptores estrogénicos y así, estar participando en las acciones estrogénicas de NET. Esto es relevante sobre todo por el hecho de que no se haya demostrado la aromatización de NET *in vivo* (2,64).

Así se demostró que las modificaciones estructurales a que está sometida la molécula de NET durante su biotransformación, modulan su unión específica con los receptores de hormonas esteroides (14).

El siguiente paso en la investigación propuesta fue la observación de los efectos antigonadotrópicos de NET y sus metabolitos en ratas adultas castradas. Garza-Flores y col., (23) reportaron que NET no modifica el contenido de LH en suero ni en la hipófisis, pero que las modificaciones estructurales de la molécula de NET, facilitan su actividad antigonadotrópica. De este modo la 5 α NET y la 3 β 5 α NET disminuyen los niveles de LH en suero a dosis de 150 μ g/día (sc) durante 7 días y que dicho efecto se potencia al aumentar la dosis a 300 y 500 μ g/día. Esta supresión fue similar a la obtenida cuando se administraron 17 β -estradiol o 5 α -dihidrotestosterona (DHT). El metabolito 3 α 5 α NET también disminuyó los niveles plasmáticos de LH

aunque en menor grado que el derivado 3 β 5 α NET.

La potencia antigonadotrópica de 3 β 5 α NET fue antagonizada por una dosis previa de tamoxifén, pero no así la de 5 α NET. Esto confirma que el metabolito tetrahidroreducido actúa a través de su interacción con el receptor de estrógenos y coincide también en que el isómero 3 α 5 α NET, que tiene menor afinidad por el receptor, muestra menor efecto supresor de los niveles de gonadotropinas.

Por otra parte es importante señalar que los efectos de 5 α -NET al no ser interferidos por la administración del antiestrógeno, se han relacionado con un mecanismo de acción androgénico.

También cabe mencionar que 3 β 5 α NET y en menor proporción 3 α 5 α NET son capaces de inducir la síntesis de los receptores intracelulares a progesterona en la hipófisis anterior de ratas adultas OVX, de manera dependiente de la dosis y que las propiedades de unión de éstos, fueron idénticas a las de los receptores inducidos por 17 β -estradiol (67) reafirmando su capacidad de unión al receptor de estrógenos y su consecuente efecto estrogénico. En este mismo trabajo, los autores describen un aumento significativo del peso uterino en ratas castradas y tratadas con 3 β 5 α NET que fue similar al inducido por 17 β -estradiol. Bajo ambos tratamientos el útero presentó características histológicas también similares.

Estos hallazgos han contribuido a establecer que la diversidad de acciones hormonales de la NET es debida a sus productos de bioconversión metabólica, mismos que tienen mayor potencia biológica estrogénica y androgénica que el compuesto

original.

2. REGULACION HORMONAL DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA.

La expresión del comportamiento sexual en la generalidad de especies estudiadas de mamíferos depende de las hormonas testiculares producidas en el animal adulto (58,69).

Así, se sabe que la castración reduce la actividad sexual en el macho, en diferentes especies. Aunque existen diferencias entre especies y entre los distintos individuos de una misma especie, los primeros cambios en los parámetros copulatorios se pueden observar entre varios días y algunas semanas después de la castración (36).

En la rata macho el primer componente afectado por la gonadectomía es la eyaculación; algunos días después de la cirugía se alarga la latencia de eyaculación hasta que gradualmente se pierde la capacidad para eyacular. Posteriormente se pierde la capacidad para lograr la inserción vaginal del pene durante las montas y finalmente el animal deja de montar y de realizar actividades precopulatorias como el olfateo genital (5,20,38,65). Esta secuencia es constante a pesar de la gran variabilidad interindividual que existe respecto al tiempo que tarda en disminuir y posteriormente desaparecer la conducta sexual (36).

Al mismo tiempo que se presentan los cambios en los patrones copulatorios de los animales castrados, se observan cambios

morfológicos en el pene, el glande disminuye en tamaño y peso, sus papilas epiteliales se atrofian y las espinas córneas desaparecen (50,57). Estos cambios pueden relacionarse con alteraciones funcionales pues el aumento en el número de montas sin intromisión y el alargamiento gradual de la latencia de eyaculación observados después de la castración son similares a cambios que ocurren después de la desensibilización del pene (36). Rodgers & Alheid, (54) reportaron además, que después de la castración, disminuye la capacidad de la rata macho para mantener la erección.

Davidson, (15) encontró que los efectos de la castración sobre la actividad sexual pueden revertirse mediante la administración exógena crónica de testosterona (T) que es el principal andrógeno producido por el testículo (26); sugiriendo que la disminución y subsecuente pérdida de la conducta sexual, se deben principalmente a la falta de esta hormona. Davidson, (15) también observó que el tratamiento con T es más efectivo si se inicia poco tiempo después de la castración que si se inicia cuando la actividad reproductora ha disminuido. Este autor sugiere que la continuidad en los niveles circulantes de T mantiene la capacidad de respuesta de los tejidos neurales y periféricos que participan en la expresión de la conducta sexual; en cambio cuando el animal ha estado privado de hormonas por algún tiempo, requiere un mayor estímulo para que se induzca en él la actividad copulatoria.

La conducta sexual en machos castrados después de la pubertad, se estimula con T de manera dependiente de la dosis. Al aumentar la cantidad de la hormona, las latencias de monta y

de intromisión disminuyen al igual que la latencia de eyaculación y el intervalo posteyaculatorio (5,15).

Los efectos de T varían también de acuerdo a la duración del tratamiento, a la vía de administración y al éster utilizado (36). La relación entre la dosis de la hormona y la intensidad de la respuesta se observa desde dosis subumbrales hasta aquellas con las que la rata alcanza el nivel de actividad que tenía antes de la gonadectomía; después de esto aunque se aumente la dosis no se obtiene una respuesta mayor (33). Se puede considerar que la recuperación de la actividad sexual inducida por T después de la castración es total porque el patrón de actividad de los animales es comparable al observado antes de la castración (58).

Se sabe que en el organismo T puede biotransformarse a 5α -dihidrotestosterona (DHT) bajo la acción de la 5α reductasa o bien puede convertirse en estradiol (E_2) por la participación del sistema enzimático de aromatasas. Estas dos hormonas son los dos principales productos de la biotransformación de T (37). La DHT es uno de los metabolitos de T que tiene mayor actividad biológica periférica en los órganos sensibles a andrógenos (70); sin embargo la DHT en general es poco efectiva para facilitar o para iniciar la actividad sexual en ratas macho castradas; es necesario administrar un tratamiento largo y con altas dosis de esta hormona para observar algún efecto (17,20,40,68).

McDonald y col., (40) compararon inicialmente el efecto de T y de DHT para inducir conducta sexual en ratas macho castradas, y posteriormente, Beyer y col.(7), al comparar el efecto de 10

andrógenos naturales observaron que solamente aquellos que se pueden aromatizar, o sea que se pueden convertir en estrógenos, son efectivos para inducir la expresión del comportamiento sexual posterior a la castración en ratas macho, en tanto que los andrógenos 5 α o 5 β reducidos no estimularon la conducta de cópula aun cuando los primeros son muy potentes para estimular respuestas androgénicas en tejidos periféricos. Esto sugiere que, a diferencia de lo que ocurre en tejidos periféricos, la 5 α reducción de los andrógenos no es suficiente para ejercer su acción sobre las estructuras neurales relacionadas con la expresión de la actividad sexual en la rata macho.

Posteriormente, Morali, y col. (43), mostraron que la administración de bloqueadores de aromatasas interfiere con la activación de la conducta sexual dada por propionato de testosterona (PT) en la rata castrada; esta inhibición se revierte al administrar benzoato de estradiol (BE), indicando que la aromatización es un paso importante en la inducción de la conducta sexual por andrógenos.

La administración de estrógenos solos restituye parcialmente la actividad sexual en ratas macho castradas, las cuales presentan montas e intromisiones, pero el patron de eyaculación se restablece solamente en algunos animales, especialmente en aquellos que tuvieron experiencia sexual previa a la castración o en quienes el tratamiento se inició inmediatamente después de la cirugía (16).

El número de montas e intromisiones previas a la eyaculación es mayor en animales tratados con BE que en los que reciben PT. La latencia de eyaculación y el intervalo

posteyaculatorio también son mayores en los sujetos tratados con estrógenos (60,61). Las latencias de monta e intromisión son largas cuando se administra BE en dosis de 0.5 $\mu\text{g}/\text{día}$ durante 26 días, pero se acortan al aumentar la dosis a 50 $\mu\text{g}/\text{día}$ (35).

Las características descritas de la actividad copulatoria de ratas castradas, tratadas con BE, son muy similares a las que se observan en ratas en las que se ha disminuído la sensibilidad del pene o la información nerviosa aferente, proveniente del mismo (34). Además, el epitelio del pene de los animales que reciben tratamiento sustitutivo con BE carece de las papilas epiteliales dependientes de andrógenos, mostrando un aspecto similar al de ratas prepúberes o al de ratas castradas que no reciben ningún estímulo hormonal exógeno (35,60). Sin embargo, la atrofia de los tejidos periféricos no determina la deficiencia en la ejecución copulatoria de los sujetos tratados con estrógenos, ya que la administración de andrógenos con escasa potencia androgénica periférica como el androstendiol pueden estimular un nivel de actividad sexual comparable al inducido por T (7).

Al utilizar un tratamiento combinado de E_2 con DHT se estimuló el patrón copulatorio completo en la mayoría de los animales tratados. No se encuentran diferencias significativas en los parámetros conductuales de estos animales al compararlos con los de ratas castradas y tratadas con PT, o con los de machos intactos (4,35,62).

Todos estos hallazgos han llevado a la conclusión de que la expresión de la conducta copulatoria en la rata macho depende de

la acción sinérgica de un estrógeno y de un andrógeno.

Al analizar la influencia de las hormonas exógenas sobre la conducta sexual de la rata macho castrada se observa que los estrógenos modifican las latencias de monta y de intromisión, la duración del intervalo posteyaculatorio y el número de montas previas a la eyaculación que son parámetros relacionados con la motivación que el animal tiene para buscar y/o establecer la interacción sexual y no dependen de la capacidad del animal para consumar la cópula. Respecto a los andrógenos se ha visto que son importantes para que el macho eyacule y pueden modificar la proporción de aciertos que es la relación entre el número de intromisiones respecto del número total de montas mas intromisiones, siendo por lo tanto indicadora de la capacidad del animal para lograr la inserción vaginal del pene (I), Es por esto que se considera que los andrógenos tienen una participación importante en la ejecución o consumación del acto sexual.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La conducta sexual masculina en la rata se expresa de manera adecuada cuando actúan sinérgicamente los andrógenos y los estrógenos. Las evidencias experimentales señalan que la acción de los estrógenos se ejerce en el sistema nervioso central y se refleja principalmente en parámetros de motivación sexual como las latencias de monta y de intromisión, y en la

duración del intervalo posteyaculatorio, en tanto que los efectos de los andrógenos se reflejan principalmente en parámetros de ejecución copulatoria como la latencia de eyaculación, el número de montas e intromisiones previas a la eyaculación y la proporción de aciertos.

Esta característica hace de la conducta sexual masculina en la rata un modelo biológico adecuado para evaluar acciones hormonales androgénicas y/o estrogénicas de diversos compuestos, con la posibilidad de diferenciar unas de otras.

Así, tomando como modelo la actividad sexual de la rata macho, podemos valorar si las acciones hormonales de NET y sus metabolitos 5α reducidos, observadas sobre tejidos periféricos y sobre la secreción de gonadotropinas, se manifiestan también en el sistema nervioso central, al estimular la expresión de esta conducta. De esta manera, la posible actividad estrogénica de estos esteroides sintéticos se puede valorar por su capacidad para sinergizar con DHT en la restitución de la conducta sexual de la rata macho castrada. La posible actividad androgénica de NET y sus metabolitos se puede valorar por su capacidad para sinergizar con estradiol. La capacidad de NET y sus derivados para restituir por sí solos la actividad sexual de los sujetos será indicativa de una actividad tanto estrogénica como androgénica intrínseca.

SECCION EXPERIMENTAL

Se utilizaron como sujetos (Ss) ratas macho adultas, de la cepa Wistar, provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Las ratas se colocaron en jaulas colectivas de acrílico, en grupos de 6 animales por cada jaula, con libre acceso a agua y alimento; el ciclo de iluminación fue de 14:10 horas de luz:obscuridad, con luz de 18:30 a 8:30 horas.

Después de dos semanas de permanencia en el bioterio, que permitieron a los animales adaptarse al ciclo de iluminación, se realizaron dos sesiones de evaluación de su actividad sexual con un intervalo de tres días entre ambas, para determinar la conducta espontánea de las ratas, de manera que solamente se incluyeron en los grupos experimentales aquellos animales que presentaron eyaculación en las dos ocasiones.

Las ratas así seleccionadas se castraron a través de una incisión en el escroto, bajo anestesia con éter y se colocaron en jaulas individuales de acero inoxidable, también con libre acceso a agua y alimento. Ahí permanecieron por lo menos 90 días después de los cuales se verificó que ya no mostraran actividad sexual en dos sesiones de 15 min cada una con tres días de intervalo entre una y otra. Una vez comprobada la ausencia de actividad copulatoria, los animales se asignaron al azar a los distintos grupos experimentales para iniciar el tratamiento.

HORMONAS

Se utilizaron noretisterona (NET) que fue donada por Schering Mexicana, S.A., 5 α -dihidronoretisterona (5 α NET) que fue sintetizada a partir de NET por reducción con litio-amoníaco, y los tetrahidroderivados 3B5 α NET y su isómero 3 α 5 α NET, los cuales fueron preparados a partir de 5 α NET por reducción con borohidruro de sodio (8).

La NET y sus metabolitos reducidos en el anillo A, se disolvieron en un pequeño volumen de alcohol metílico (0.2 ml. aproximadamente) que posteriormente se dejó evaporar totalmente; con ello se forman cristales mas finos que los originales. Estos cristales se disolvieron en alcohol etílico absoluto agregando el volumen necesario para que la solución final llevara un 10% de alcohol (esto evita que estos compuestos se precipiten) y finalmente se agregó el volumen complementario de aceite de maíz.

Se utilizaron también, estradiol (E₂) y 5 α -dihidrotestosterona (DHT) (Sigma Chemical Co.); se prepararon soluciones de ambas hormonas disolviéndolas en un pequeño volumen de diclorometano y una vez disueltas se agregó el volumen requerido de aceite de maíz utilizado como vehículo, evaporando después completamente el diclorometano.

Las dosis diarias se inyectaron en un volumen de 0.2 ml para los tratamientos en que se administraron los compuestos solos y en 0.1 ml para los tratamientos combinados con DHT o con E₂, que también se inyectaron en 0.1ml, de manera que el

volumen total inyectado en este caso también fue de 0.2 ml.

TRATAMIENTOS

Todos los tratamientos se administraron en inyecciones subcutáneas diarias, durante 21 días.

Para evaluar la posible capacidad tanto androgénica como estrogénica de los compuestos por sí mismos se formaron cuatro grupos que recibieron respectivamente NET (n=11), 5 α NET (n=12), 3 β 5 α NET (n=12), o 3 α 5 α NET (n=10) en dosis de 500 μ g/día. Como control positivo se utilizó un grupo de Ss (n=10) que recibió testosterona (500 μ g/día); un grupo adicional de Ss (n=10) recibió 0.2 ml/día del vehículo (aceite de maíz conteniendo 10% de etanol) como control negativo.

Para la evaluación de la actividad estrogénica de los compuestos a través de su capacidad para sinergizar con DHT, los 4 primeros grupos (n=8 en cada caso) recibieron NET o alguno de sus metabolitos en dosis de 300 μ g/día mas 300 μ g/día de DHT. El control negativo (n=8) recibió 0.1 ml de vehículo mas 300 μ g/día de DHT.

Finalmente, para evaluar la actividad androgénica de los compuestos mediante su capacidad para sinergizar con E₂ se administraron NET o alguno de sus metabolitos (n=9, 10, 10 y 9, respectivamente) en dosis de 300 μ g/día mas 5 μ g/día de E₂. El control negativo (n=8) recibió 0.1 ml/día de vehículo mas 5 μ g/día de estradiol.

Como control positivo para la evaluación de acciones androgénicas y estrogénicas de los compuestos, se incluyó un grupo que recibió tratamiento con 300 μ g/día de DHT mas 5

$\mu\text{g}/\text{día}$ de E_2 .

EVALUACIONES DE LA CONDUCTA SEXUAL.

Las sesiones de observación de la conducta sexual fueron individuales y se realizaron una cada 72 horas a partir del inicio del tratamiento, durante la fase oscura del ciclo en áreas que fueron iluminadas con luz roja.

El animal se colocó en una caja de plexiglas de 60 x 60 x 40 cm y después de 5 min de adaptación se introdujo una hembra receptiva con la que se le permitió interaccionar libremente.

Las sesiones se suspendieron 15 min después de haber introducido a la hembra si el macho no realizó ninguna intromisión, 30 min después de la primer intromisión si el animal no había eyaculado, 15 min después de la eyaculación si no se presentaba una intromisión subsiguiente o hasta la primer intromisión posterior a la eyaculación.

Durante cada prueba se registraron los siguientes parámetros: latencia de monta, que es el tiempo transcurrido entre el inicio de la prueba y el momento en que el macho realiza la primer monta; latencia de intromisión, o tiempo transcurrido desde el inicio de la prueba hasta que se presenta la primer intromisión; latencia de eyaculación, o intervalo de tiempo entre la primer intromisión y la eyaculación; el intervalo posteyaculatorio que es el tiempo que el macho tarda en reasumir la actividad sexual y se cuenta desde la eyaculación hasta que realiza la primer intromisión de la siguiente serie copulatoria; el número de montas; el número de intromisiones. A partir del

número de montas y de intromisiones se calculó la proporción de aciertos que es igual al número de intromisiones dividido entre el número total de montas mas intromisiones.

También se calcularon, para cada tratamiento, las proporciones de animales que tuvieron actividad de monta, de intromisión y de eyaculación, en cada una de las pruebas y la incidencia de actividad para dichos patrones conductuales, mediante el porcentaje total de pruebas en las que los animales fueron activos.

Al final del tratamiento, después de la última evaluación de conducta sexual, se sacrificaron los animales por sobre exposición a éter, se disecaron la próstata ventral y las vesículas seminales y se pesaron hasta una aproximación de décimas de miligramo.

ANALISIS ESTADISTICO

Las proporciones de sujetos con actividad y de pruebas en las que los animales fueron activos se analizaron con la prueba de chi-cuadrada.

El número de respuestas, sus latencias y la proporción de aciertos se evaluaron utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

Finalmente el peso de los órganos sexuales accesorios se evaluó con la prueba t de Student.

Una $p < 0.05$ se consideró significativa.

RESULTADOS

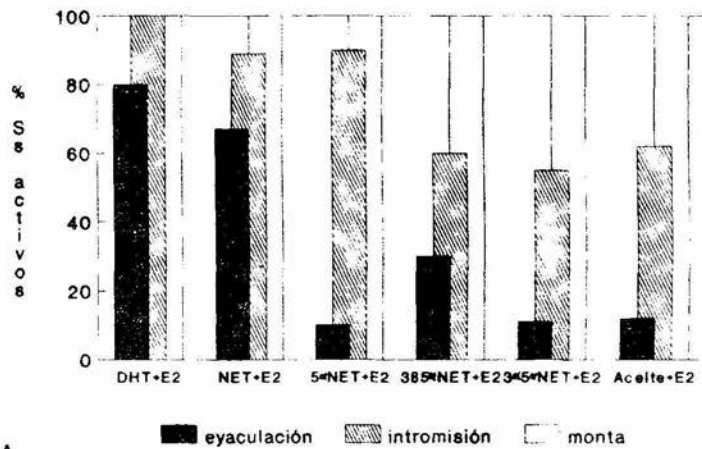
ACTIVIDAD ANDROGENICA DE NET, 5 α NET, 3 β 5 α NET y 3 α 5 α NET, AL SINERGIZAR CON ESTRADIOL, 5 μ g/día.

La Fig. 1-A muestra el porcentaje total de animales que fueron activos durante el tratamiento. Se observa que en los seis grupos todos los animales montaron.

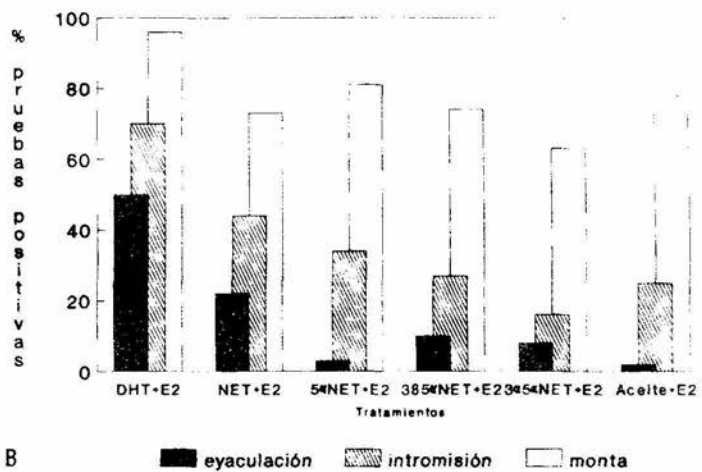
Los grupos tratados con 3 β 5 α NET y con 3 α 5 α NET + E₂, mostraron un porcentaje de animales que tuvieron intromisión, significativamente menor ($p < 0.05$) que el de las ratas que recibieron DHT + E₂ y que no difiere del de los animales que fueron tratados con vehículo + E₂.

Los grupos de sujetos (Ss) que recibieron NET o 5 α NET, + E₂ mostraron porcentajes de Ss con intromisión similares tanto al control tratado con DHT + E₂ como al que recibió vehículo + E₂. Los animales que recibieron NET + E₂ mostraron un porcentaje de Ss con eyaculación similar al de los que fueron tratados con DHT + E₂ y significativamente mayor ($p < 0.05$) al de los que recibieron vehículo + E₂. Los grupos tratados con 5 α -, 3 β 5 α - y 3 α 5 α NET + E₂ registraron porcentajes de Ss con eyaculación menores ($p < 0.05$), que los del grupo que recibió DHT + E₂ y similares a los del grupo de vehículo + E₂.

La Fig.1-B muestra los porcentajes totales de pruebas en las que los animales fueron activos. Se observa que los porcentajes



A



B

Fig. 1. Efecto androgénico de NET y sus metabolitos sobre la conducta sexual de la rata macho castrada. Porcentajes de A) Animales Activos y B) Pruebas con actividad de monta, intromisión y eyacuación durante 21 días de tratamiento con NET o sus derivados (300 µg) en combinación con estradiol (5 µg). Sujetos tratados con DHT (300 µg) o con vehículo, además del estradiol, se utilizaron como controles

de pruebas con monta, intromisión y eyaculación, fueron significativamente menores ($p < 0.01$) en cada uno de los grupos experimentales que en el grupo que recibió DHT + E_2 . Al compararlos con el tratamiento de vehículo + E_2 se, observó que las ratas a las que se les administró NET + E_2 , tuvieron porcentajes mayores de pruebas con intromisión ($p < 0.05$) y con eyaculación ($p < 0.001$). Los porcentajes de pruebas con monta fueron similares al control que recibió vehículo en todos los tratamientos. De igual manera, los porcentajes de pruebas con intromisión y con eyaculación de los grupos tratados con 5α NET, $3\beta 5\alpha$ NET y $3\alpha 5\alpha$ NET + E_2 , fueron similares a los que registró el control de vehículo + E_2 .

La Fig. 2-A muestra los porcentajes acumulativos de animales que montaron en las evaluaciones de actividad sexual realizadas durante el tratamiento. Se observa que todos los tratamientos restituyeron la actividad de monta en el 100% de los Ss, sin embargo dicha restitución tuvo un curso temporal más lento en los grupos tratados con $3\beta 5\alpha$ NET y con $3\alpha 5\alpha$ NET, que fue similar a la del control tratado con vehículo + E_2 .

En la Fig. 2-B se muestra el porcentaje acumulativo de Ss que tuvieron conducta de intromisión en las evaluaciones de actividad sexual realizadas durante el tratamiento. Se observa que los grupos que recibieron $3\beta 5\alpha$ NET o $3\alpha 5\alpha$ NET + E_2 registraron porcentajes de Ss activos menores que los de los grupos tratados con NET, 5α NET o DHT, + E_2 y similares a los del tratamiento con vehículo + E_2 . Asimismo la restitución de la conducta de

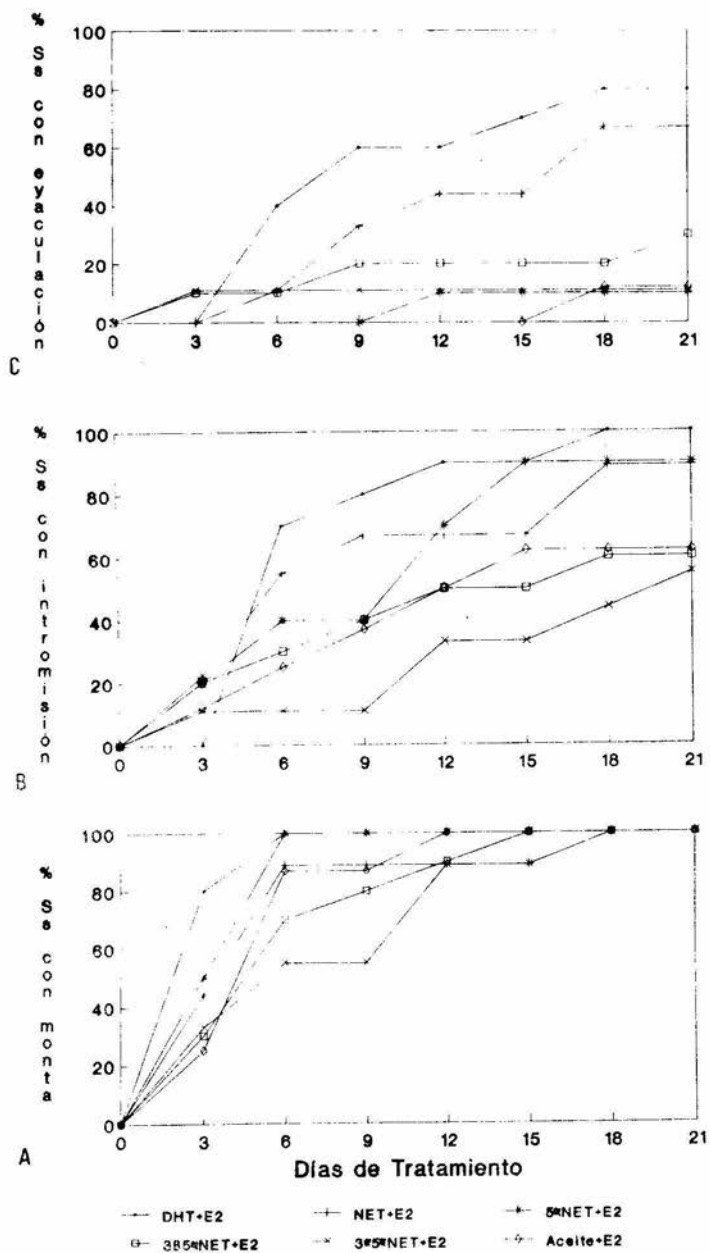


Fig. 2 Efecto androgénico de NET y sus metabolitos sobre la actividad sexual de la rata macho castrada. Porcentaje acumulativo de Ss activos con monta, intrusión y eyacuación durante 21 días de tratamiento con NET o sus derivados (300 μ g) en combinación con estradiol (5 μ g). Como controles se utilizaron Ss tratados con DHT (300 μ g) o con vehículo además del estradiol.

intromisión fue mas lenta en los grupos que recibieron 3 β 5 α NET, 3 α 5 α NET o vehículo en combinación con E₂ que en los que recibieron cualquiera de los demás tratamientos.

En la Fig. 2-C se observa el porcentaje acumulativo de Ss que eyacularon en las sesiones de conducta sexual realizadas durante el tratamiento. Se observa que solamente los Ss tratados con NET + E₂ alcanzaron un porcentaje de actividad cercano al del grupo control que recibió DHT + E₂, aunque el efecto del tratamiento fue mas lento que el del control mencionado. Solamente el 30% de los Ss que recibieron 3 β 5 α NET lograron eyacular y en los demás grupos, tratados con 5 α NET, 3 α 5 α NET o con vehículo además del E₂ solo 10 a 12% de los Ss eyacularon, mostrando en todos estos casos una restitución de la actividad mas lenta.

En la Tabla 1 se muestran los valores promedio de las latencias de monta, de intromisión y de eyaculación, el intervalo posteyaculatorio (IPE) y el intervalo intercopulatorio (IIC) de cada uno de los grupos que recibieron los diferentes tratamientos. No se encontraron diferencias significativas en estos parámetros cuando se compararon los promedios de los tratamientos experimentales con los del control de DHT + E₂, y tampoco las hubo cuando la comparación se realizó con los promedios del grupo control de vehículo + E₂.

En la Tabla 1, se observan también los valores promedio de la proporción de aciertos (número de intromisiones / número de montas + número de intromisiones) registrada en cada uno de los

Tabla 1. PARAMETROS DE ACTIVIDAD SEXUAL DE RATAS MACHO CASTRADAS QUE RECIBIERON DISTINTOS TRATAMIENTOS.

	DHT+E ₂ (300,5µg) n=10	NET+E ₂ (300,5µg) n=9	5αNET+E ₂ (300,5µg) n=10	3α5α NET+E ₂ (300,5µg) n=9	3β5α NET+E ₂ (300,5µg) n=10	VEH+E ₂ (0.1ml,5µg) n=8
% Ss c/monta	100	100	100	100	100	100
c/intromisión	100	89	90	55*	60*	62
c/eyaculación	80	67 [†]	10*	11*	30*	12
% pruebas c/monta	96	73*	81*	63*	74*	78
c/intromisión	70	44* [‡]	34*	16*	27*	25
c/eyaculación	50	22* [‡]	3*	8*	10*	2
lat de monta (seg)	133± 88	189±108	172±133	258±154	204±170	197±170
lat de introm (seg)	208±187	190± 94	310±279	189±124	389±392	237±127
lat de eyac (seg)	966±361	1422±398	1276	736	1154±155	1740
IPE (seg)	536± 70	597± 81	514	456	588± 83	520
IIC (seg)	155±166	191±179	441±284	357±470	284±312	452±302
Prop. aciertos	0.49±0.18	0.37±0.11	0.20±14*	0.20±0.19*	0.29±0.22	0.26±0.13
Intrrom previas a eyaculación	13.3±2.0	17.1±2.1*	16.5	10.2	15.9±5.5	20.0

promedios totales ± D.S.

* p<0.05

* p<0.01 vs DHT + E₂

‡ p<0.001

‡ p<0.05

‡ p<0.01 vs vehículo + E₂

‡ p<0.001

Las proporciones de sujetos y de pruebas con actividad se analizaron con la prueba chi-cuadrada y el resto de los parámetros se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.

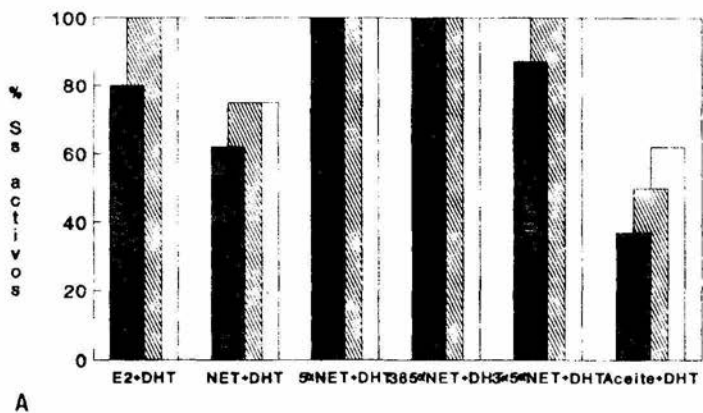
grupos. Solamente los promedios de los grupos tratados con 5 α NET y con 3 α 5 α NET fueron menores ($p < 0.05$) que el promedio del grupo que recibió DHT + E₂. Al comparar los distintos tratamientos con el control de vehículo + E₂, no se encontraron diferencias significativas; sin embargo los grupos tratados con NET y con 3 β 5 α NET tuvieron proporciones de aciertos también similares a las del grupo tratado con DHT + E₂.

Por último, la Tabla 1 muestra el valor promedio del número de intromisiones previas a la eyaculación. Únicamente el grupo al que se le administró NET + E₂ tuvo un mayor ($p < 0.05$) número de intromisiones antes de la eyaculación, que el control de DHT + E₂. Cuando estos datos se compararon con el grupo tratado con vehículo + E₂, no se encontró ninguna diferencia significativa.

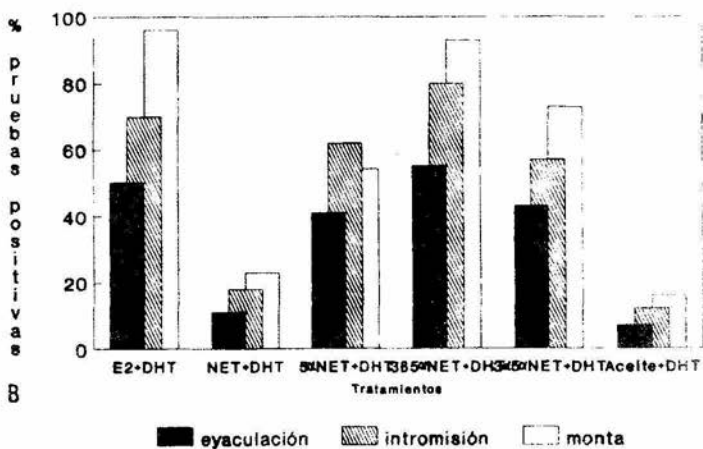
ACTIVIDAD ESTROGENICA DE NET, 5 α NET, 3 β 5 α NET y 3 α 5 α NET AL SINERGIZAR CON 300 μ g/día de DHT.

En la Fig. 3-A se muestran los porcentajes totales de animales que tuvieron actividad de monta, intromisión o eyaculación en las evaluaciones que se realizaron durante el tratamiento. Al comparar los porcentajes de Ss activos en los grupos experimentales con los del grupo que se trató con vehículo + DHT, se observó que tanto el porcentaje de animales que tuvieron intromisión como el porcentaje de los animales que lograron eyacular, fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) en los grupos tratados con 5 α -, 3 β 5 α - y 3 α 5 α NET + DHT pero no en el grupo tratado con NET + DHT. Por otra parte, ningún grupo experimental difirió del control que recibió DHT + E₂, en el porcentaje de Ss activos.

En la Fig. 3-B se muestran los porcentajes totales de pruebas en las que los animales tuvieron actividad de monta, de intromisión y de eyaculación. La administración de 3 β ,5 α NET en combinación con DHT fue la más efectiva para restablecer la actividad sexual; en los tres patrones conductuales, los porcentajes de pruebas con actividad fueron similares a los porcentajes que se obtuvieron bajo el tratamiento de DHT + E₂. La administración de 3 α 5 α NET con DHT determinó que los machos realizaran montas en un porcentaje de pruebas significativamente menor ($p < 0.01$) al de los Ss tratados con DHT + E₂. Sin embargo, mostraron intromisión y lograron eyacular en porcentajes de pruebas similares a los del control que recibió DHT + E₂.



A



B

■ eyaculación ▨ intromisión □ monta

Fig. 3. Efecto estrogénico de NET y sus metabolitos sobre la conducta sexual de la rata macho castrada. Porcentajes de A) Animales Activos y B) Pruebas con actividad de monta, intromisión y eyaculación durante 21 días de tratamiento con NET o sus derivados (300 μ g) en combinación con DHT (300 μ g). Sujetos tratados con estradiol (5 μ g) o con vehículo, además de DHT, se utilizaron como controles.

En los animales que recibieron 5 α NET + DHT el porcentaje de pruebas en las que los machos tuvieron actividad de monta y el porcentaje de pruebas en las que tuvieron intromisión, fueron significativamente menores ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) que los porcentajes registrados en el grupo de DHT + E₂; sin embargo, los porcentajes de pruebas en las que los animales eyacularon, fueron estadísticamente similares.

Los sujetos tratados con NET + DHT presentaron actividad sexual en porcentajes menores ($p < 0.05$) que los registrados en el grupo tratado con DHT + E₂ y que fueron similares a los porcentajes que se registraron con la administración de vehículo + DHT, a diferencia de los porcentajes de pruebas con monta, intromisión y eyaculación de los animales que recibieron 5 α NET, 3 β 5 α NET o 3 α 5 α NET, que fueron significativamente mayores ($p < 0.01$) que los porcentajes respectivos registrados en el grupo que recibió vehículo + DHT.

La Fig. 4-A muestra el porcentaje acumulativo de animales que montaron en las pruebas de conducta sexual realizadas a lo largo del tratamiento. Se observa un curso temporal diferente en la restitución de la conducta de monta por los diferentes tratamientos, siendo más lento el efecto de NET + DHT.

La Fig. 4-B muestra el porcentaje acumulativo de ratas con actividad de intromisión. Se observa que al igual que para la actividad de monta, el tratamiento con NET + DHT fue el que indujo menor porcentaje de Ss activos y lo hizo más lentamente que los demás tratamientos, en forma similar al grupo control tratado con vehículo + DHT. Se observa también que en los sujetos que recibieron 5 α NET +

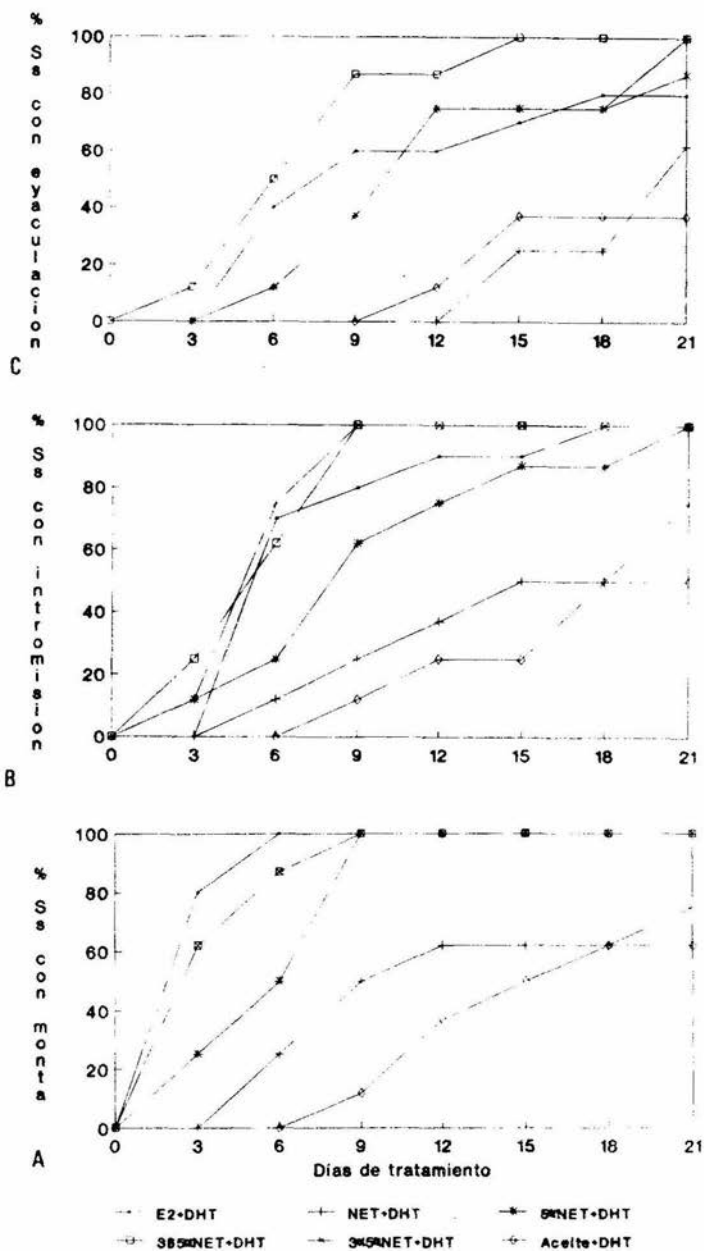


Fig. 4 Efecto estrogénico de NET y sus metabolitos sobre la actividad sexual de la rata macho castrada. Porcentaje acumulativo de Ss activos con monta, intrusión y eyaculación durante 21 días de tratamiento con NET o sus derivados (300 μ g) en combinación con DHT (300 μ g). Como controles se utilizaron Ss tratados con estradiol (5 μ g) o con vehículo además del estradiol.

DHT la recuperación de la conducta de intromisión siguió un curso temporal similar al del control que recibió E_2 + DHT; sin embargo, en los animales tratados con $3\beta 5\alpha$ NET o $3\alpha 5\alpha$ NET en combinación con DHT, fue en los primeros en los que se recuperó dicha conducta.

En la Fig. 4-C se muestran los porcentajes acumulativos de animales que lograron eyacular durante las evaluaciones de conducta sexual que se realizaron a lo largo del tratamiento. La restitución de la eyaculación en los Ss que fueron tratados con NET + DHT fue mas lenta que en el resto de los tratamientos experimentales o el control de E_2 + DHT y comparable a la del grupo que recibió vehículo + DHT. En los grupos tratados con 5α NET o con $3\alpha 5\alpha$ NET en combinación con DHT, se observa que la restitución de la eyaculación presenta variaciones durante el tratamiento, similares a las del control que recibió E_2 + DHT. Finalmente, la restitución de esta conducta inducida por el tratamiento con $3\beta 5\alpha$ NET tuvo un curso temporal más rápido que la del resto de los grupos.

En la Tabla 2 se muestran los valores promedio de las latencias de monta, de intromisión y de eyaculación, el intervalo posteyaculatorio y el intervalo intercopulatorio para cada tratamiento.

Tabla 2. PARAMETROS DE ACTIVIDAD COPULATORIA DE RATAS MACHO CASTRADAS QUE RECIBIERON DISTINTOS TRATAMIENTOS.

	E_2 +DHT	NET+DHT	5 α NET+DHT	3 α 5 α	3 β 5 α	VEN+DHT
	(5,300 μ g) n=10	(300,300 μ g) n=9	(300,300 μ g) n=10	(300,300 μ g) n=10	(300,300 μ g) n=10	(0.1ml.300 μ g) n=8
% Ss c/monta	100	75	100	100	100	62
c/intromisión	100	75	100 $\#$	100 $\#$	100 $\#$	50
c/eyaculación	80	62	100 $\#$	87 $\#$	100 $\#$	37
% pruebas c/monta	96	23 \ddagger	64 $\#$	73 $\#$	93 $\#$	16
c/intromisión	70	18 \ddagger	52 $\#$	57 $\#$	80 $\#$	12
c/eyaculación	50	11 \ddagger	41 $\#$	43 $\#$	55 $\#$	7
lat de monta (seg)	133 \pm 88	110 \pm 90	138 \pm 58 $\#$	183 \pm 119	164 \pm 83	433 \pm 332
lat de introm (seg)	208 \pm 187	144 \pm 98	144 \pm 63	270 \pm 140	199 \pm 92	394 \pm 307
lat de eyac (seg)	966 \pm 361	968 \pm 253	990 \pm 308	881 \pm 226	1050 \pm 351	1007 \pm 484
I P E (seg)	536 \pm 70	856 \pm 265 $\#$	623 \pm 126 $\#$	760 \pm 106 $\#$	634 \pm 99 $\#$	851 \pm 220
I I C (seg)	155 \pm 166	110 \pm 42	139 \pm 151	180 \pm 110	130 \pm 62	239 \pm 242
Prop. aciertos	0.49 \pm 0.18	0.51 \pm 0.19	0.51 \pm 0.15	0.47 \pm 0.16	0.59 \pm 0.13	0.53 \pm 0.23
Intram. previas	13.3 \pm 2.0	10.8 \pm 3.6	13.4 \pm 3.9	11.9 \pm 3.2	12.5 \pm 2.5	11.3 \pm 2.9

Promedios totales \pm D.S.

* p<0.05

$\#$ p<0.05

$\#$ p<0.01 vs E_2 + DHT

$\#$ p<0.01 vs vehiculo + DHT

\ddagger p<0.001

$\#$ p<0.001

Las proporciones de sujetos y de pruebas con actividad se analizaron con la prueba chi-cuadrada y el resto de los parámetros se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.

Las latencias de monta, de intromisión y de eyaculación no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos experimentales al compararlos con la administración de DHT + E₂. Cuando se compararon con la administración de DHT + vehículo, tampoco se encontraron diferencias en estos parámetros, a excepción de la latencia de monta de los animales tratados con 5 α NET + DHT que fué significativamente menor (p<0.05).

El intervalo posteyaculatorio fué mas largo (p<0.05) en los animales tratados con NET, 5 α -, 3 β 5 α -, o con 3 α 5 α NET + DHT, que en los que recibieron DHT + E₂, en tanto que cuando estos valores se compararon con los del grupo de animales a quienes se les administró vehículo + DHT, no se observaron diferencias significativas.

Con respecto al intervalo intercopulatorio tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar los promedios de los grupos que recibieron NET o alguno de sus metabolitos en combinación con DHT, con los controles tanto de vehículo + DHT como de E₂ + DHT.

En la misma Tabla 2 se presentan los promedios de la proporción de aciertos en cada grupo. Este parámetro presentó valores muy similares entre todos los tratamientos, de manera que tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto de ninguno de los dos grupos controles.

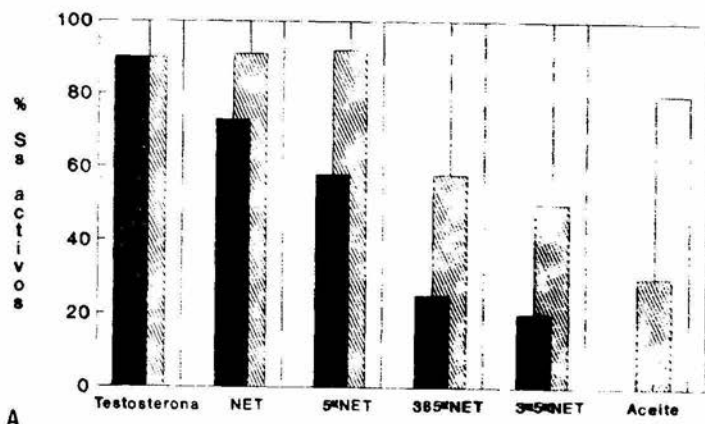
En cuanto al número promedio de intromisiones que los Ss realizaron antes de eyacular tampoco se encontró ninguna diferencia significativa respecto de los controles.

ACTIVIDAD ANDROGENICA / ESTROGENICA DE NET, 5 α NET, 3 β 5 α NET y 3 α 5 α NET AL ADMINISTRARSE EN FORMA AISLADA.

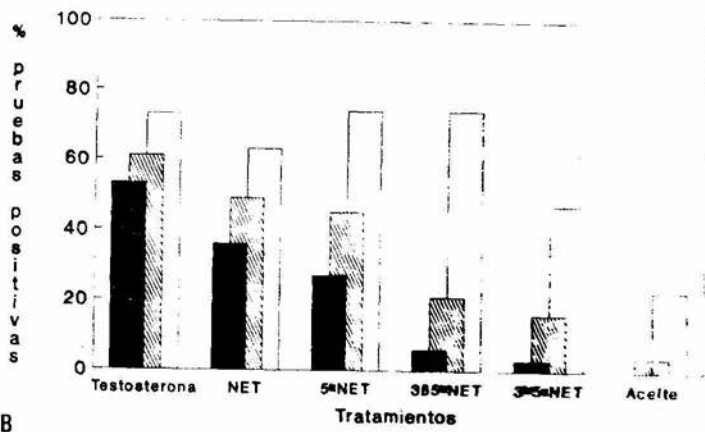
La Fig. 5-A muestra el porcentaje total de animales que fueron activos bajo tratamiento con NET, 5 α NET, 3 β 5 α NET o 3 α 5 α NET. El porcentaje de animales que montaron fue similar en todos los grupos. Los porcentajes de Ss que tuvieron intromisión y los de Ss que lograron eyacular fueron mayores ($p < 0.05$) en los animales tratados con NET o con 5 α NET que en los animales que recibieron vehículo, en tanto que los grupos tratados con 3 β 5 α NET o con 3 α 5 α NET tuvieron porcentajes similares a los de dicho grupo control.

Por otra parte, los porcentajes de Ss que tuvieron intromisión en los cuatro grupos experimentales, fueron similares a los del control tratado con T. Igualmente, los porcentajes de animales que eyacularon en los grupos que recibieron NET o 5 α NET, fueron similares a los del grupo tratado con T. En cambio, los porcentajes de animales que eyacularon en los grupos a los que se les administró 3 β 5 α NET o 3 α 5 α NET fueron menores ($p < 0.05$) que el porcentaje respectivo registrado con el tratamiento con T.

La Fig. 5-B muestra los porcentajes totales de pruebas en las que los animales realizaron montas, intromisiones y eyaculación. El grupo de ratas que fueron tratadas con NET mostró porcentajes de pruebas con monta, con intromisión y con



A



B

■ eyaculación ▨ intrusión □ monta

Fig. 5. Efectividad de NET y sus metabolitos para restituir la conducta sexual de la rata macho castrada. Porcentajes de A)Animales Activos y B)Pruebas con actividad de monta, intrusión y eyaculación durante 21 días de tratamiento con NET o sus derivados (500 μ g) . Sujetos tratados con testosterona (500 μ g) o con vehiculo, se utilizaron como controles.

eyaculación similares a los del grupo tratado con T y mayores ($p < 0.01$) que los del grupo tratado con vehículo.

El grupo tratado con 5aNET tuvo porcentajes de pruebas con intromisión y con eyaculación menores ($p < 0.05$) que los de los Ss que recibieron T, sin embargo estos porcentajes, así como los porcentajes de pruebas con monta fueron mayores ($p < 0.001$) que los de los Ss que recibieron vehículo.

Los animales que recibieron 3B5aNET tuvieron porcentajes de pruebas con intromisión y de pruebas con eyaculación significativamente menores ($p < 0.001$) que los del grupo tratado con T, aunque fueron mayores ($p < 0.05$) que los del grupo que recibió vehículo; el porcentaje de pruebas en que hubo montas fue aún mayor ($p < 0.001$) que el de los Ss tratados con vehículo y en este caso, similar al obtenido en el grupo tratado con T.

El grupo tratado con 3a5aNET tuvo un porcentaje de pruebas con monta menor ($p < 0.05$) que el del grupo que recibió T pero mayor ($p < 0.05$), que el del grupo tratado con vehículo; el porcentaje de pruebas con intromisión fue menor ($p < 0.001$) que el del grupo tratado con T y mayor que el de vehículo ($p < 0.05$) y el porcentaje de pruebas en las que los Ss eyacularon fue menor ($p < 0.001$) al del tratamiento con T y similar al del grupo tratado con vehículo.

La Fig. 6-A muestra los porcentajes acumulativos de Ss que montaron durante el tratamiento. Se observa que la restitución de la respuesta en los grupos tratados con NET, 5aNET o 3B5aNET, siguió un curso temporal similar a la del control tratado con T; solamente en los Ss que recibieron 3a5aNET se observa que dicha

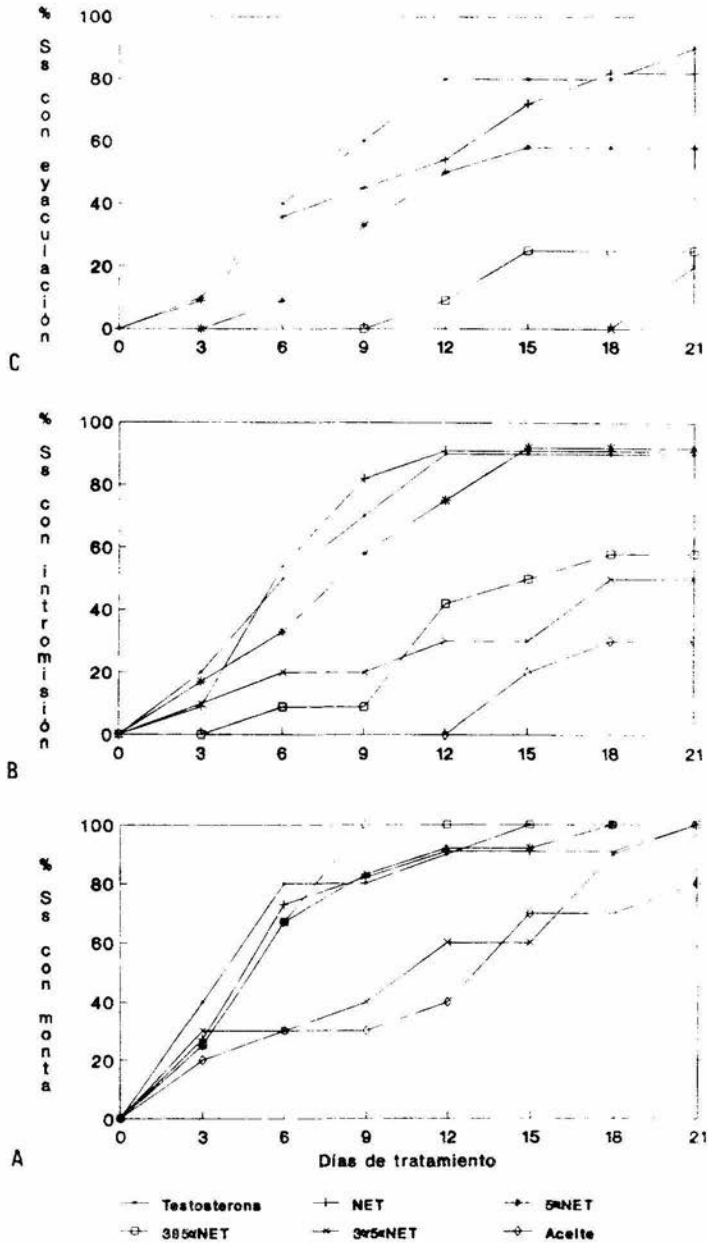


Fig. 6 Efectividad de NET y sus metabolitos sobre la actividad sexual de la rata macho castrada. Porcentaje acumulativo de Ss activos con monta, intromisión y eyaculación durante 21 días de tratamiento con NET o sus derivados (500 µg). Como controles se utilizaron Ss tratados con testosterona (500 µg) o con vehículo.

respuesta fue mas lenta y hasta antes de las dos últimas evaluaciones, en que aumentó hasta ser similar al resto de los tratamientos, comparable a la del grupo que recibió solo el vehículo.

En la Fig. 6-B se encuentra el porcentaje acumulativo de ratas que tuvieron conducta de intromisión en las evaluaciones de conducta sexual que se realizaron durante el tratamiento. La respuesta inducida por NET o por 5 α NET muestra un curso temporal similar al del tratamiento con T. Los tratamientos con 3 β 5 α NET o con 3 α 5 α NET restituyeron la conducta de intromisión en menor porcentaje de Ss y más lentamente que los tratamientos antes mencionados; sin embargo, estas respuestas no fueron tan tardías como la que tuvo el control tratado con vehículo.

La Fig. 6-C muestra el porcentaje acumulativo de Ss que eyacularon en las evaluaciones de actividad sexual realizadas durante el tratamiento. Se observa que el curso temporal para la restitución de la eyaculación de los sujetos tratados con NET, fue similar a la del grupo tratado con T, en tanto que 5 α NET lo hizo mas lentamente y en una menor proporción de Ss. El tratamiento con 3 β 5 α NET mostró una respuesta mucho menor y que se inició más tardíamente y su isómero 3 α 5 α NET solo indujo eyaculación en dos animales, al final del tratamiento.

En la Tabla 3 se presentan los promedios totales de las latencias de monta, de intromisión, de eyaculación, el intervalo

Tabla 3. PARAMETROS DE ACTIVIDAD SEXUAL DE RATAS MACHO CASTRADAS QUE RECIBIERON DISTINTOS TRATAMIENTOS.

	T (500µg) n=10	NET (500µg) n=11	5eNET (500µg) n=12	3e5e NET (500µg) n=10	3e5e NET (500µg) n=12	VEH (0.2 ml) n=10
% Se c/monta	100	100	100	100	100	80
c/intromisión	90	91	92	50	58	30
c/eyaculación	90	73	58	20*	25*	0
% pruebas c/monta	73	63‡	74‡	47*‡	74‡	23
c/intromisión	61	49‡	45*‡	16*‡	21*‡	4
c/eyaculación	53	36‡	27*‡	3*	6*‡	0
lat de monta (seg)	160±149	182±125‡	174±218‡	316±156‡	200±133‡	496±300
lat de introm (seg)	172±135	280± 79	198±120	480±149*	308±153	457±325
lat de eyac (seg)	849±315	1205±253*	764±283	1580± 49*	1211±342	--
I P E (seg)	459±116	692± 90*	456± 59	600	490± 75	--
I I C (seg)	80± 50	135± 56*	202±297	329±328*	273±185*‡	750±212
Prop. aciertos	0.60±0.16	0.41±0.15*‡	0.33±0.17	0.30±0.18	0.22±0.13	0.12±0.05
Introm. previas	13.6±2.2	12.9±2.7	14.1±4.2	15±7.1	18.8±9	--

Promedios totales ± D.S.

* p<0.05

° p<0.01 vs T

• p<0.001

‡ p<0.05

‡ p<0.01 vs vehículo

• p<0.001

Las proporciones de sujetos y de pruebas con actividad se analizaron con la prueba chi-cuadrada y el resto de los parámetros se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.

posteyaculatorio y el intervalo intercopulatorio de los seis grupos de ratas que recibieron alguno de los distintos tratamientos.

Las latencias de monta fueron significativamente menores ($p < 0.05$) en los Ss tratados con NET, 5 α NET, o 3B5 α NET que en los que solamente recibieron el vehículo, en tanto que los Ss a quienes se les administró 3 α 5 α NET, registraron latencias de monta similares a las del grupo tratado con vehículo y mayores ($p < 0.05$) que las del grupo que recibió T.

Las latencias de intromisión de los grupos tratados con NET, 5 α NET o con 3B5 α NET tuvieron valores intermedios que no difirieron estadísticamente de las del grupo tratado con T ni de las del grupo que recibió vehículo. El grupo tratado con 3 α 5 α NET mostró latencias de intromisión similares a las del grupo que recibió vehículo y mayores ($p < 0.05$) que las del tratamiento con T.

Las latencias de eyaculación de los Ss tratados con NET o con 3 α 5 α NET fueron mayores ($p < 0.05$) que las de los Ss que recibieron T; los grupos tratados con 5 α NET o con 3B5 α NET no mostraron diferencias significativas respecto del grupo tratado con T. En el caso de los animales a los que se les administró vehículo, ninguno de ellos eyaculó.

Los intervalos posteyaculatorios del grupo que recibió NET, fueron mayores ($p < 0.05$) que los del grupo tratado con T, los otros tres tratamientos mostraron valores similares a los de éste.

Los intervalos intercopulatorios de los Ss tratados con

NET, 3 β 5 α NET o con 3 α 5 α NET fueron mayores ($p < 0.05$) que los que presentó el grupo tratado con T. El grupo tratado con 5 α NET tuvo intervalos intercopulatorios ligeramente mayores que los de los Ss que recibieron T o de los que recibieron NET pero estas diferencias no fueron significativas.

También en la Tabla 3 se incluyen los promedios totales de la proporción de aciertos de cada uno de los grupos. Los cuatro grupos experimentales tratados con NET, 5 α NET, 3 β 5 α NET o con 3 α 5 α NET presentaron valores menores ($p < 0.05$) que los obtenidos en el grupo tratado con T. Solamente NET registró un promedio mayor ($p < 0.05$) que el del tratamiento con vehículo, los demás grupos no mostraron diferencias significativas con respecto a éste último.

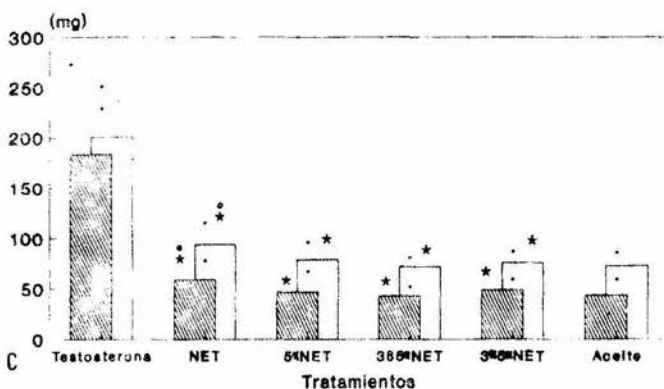
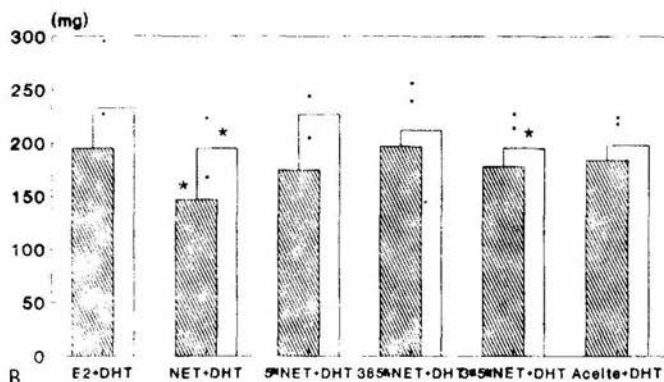
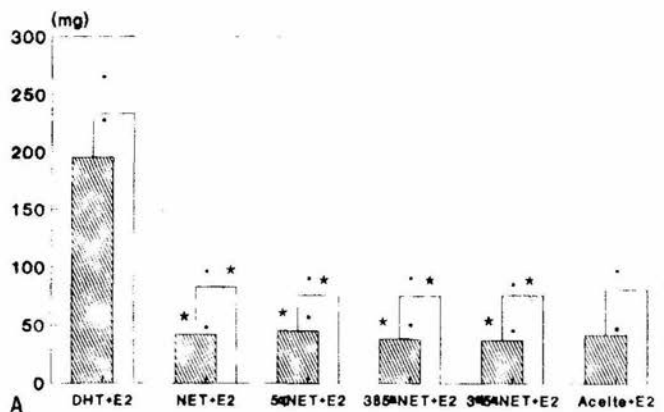
En la misma Tabla 3 se muestran los promedios totales del número de intromisiones que los Ss realizaron antes de eyacular. Ninguno de los grupos experimentales registró diferencias significativas en este parámetro al compararlos con el grupo que recibió T.

EFFECTOS SOBRE PROSTATA VENTRAL Y SOBRE VESICULAS SEMINALES.

La Fig. 7-A muestra los pesos de los tejidos periféricos de los sujetos que fueron tratados con NET o alguno de sus metabolitos en combinación con estradiol. Se observa que tanto la próstata ventral como las vesículas seminales tuvieron pesos significativamente menores en los grupos tratados con estos compuestos que en el grupo control que recibió DHT + E₂, y similares a los del control tratado con vehículo + E₂.

La Fig. 7-B muestra los pesos de próstata ventral y de vesículas seminales de los sujetos tratados con NET, 5 α NET, 3 β 5 α NET o 3 α 5 α NET, + DHT. Los sujetos tratados con NET + DHT tuvieron pesos tanto de próstata ventral como de vesículas seminales, menores ($p < 0.05$) que los del grupo tratado con E₂ + DHT. También en el grupo que recibió 3 α 5 α NET + E₂ las vesículas seminales tuvieron menor peso ($p < 0.05$) que en el mencionado control. Todos los demás grupos mostraron pesos similares en estos tejidos.

La Fig. 7-C presenta los pesos de próstata ventral y de vesículas seminales de los sujetos tratados con NET, 5 α NET, 3 β 5 α NET o 3 α 5 α NET. Los pesos de los tejidos de los sujetos que recibieron testosterona fueron mayores ($p < 0.05$) que los de los demás tratamientos. Sin embargo, los tejidos de los sujetos tratados con NET, fueron al mismo tiempo mayores ($p < 0.05$) que



▨ próstata ventral □ vesículas seminales

Fig. 7 Acciones androgénicas y antiandrogénicas de NEI y sus metabolitos sobre tejidos periféricos de ratas macho castradas. Efecto de tratamiento diario durante 21 días con NET o sus metabolitos en combinación con A) estradiol (5 µg), B) DHT (300 µg) o C) solos (500 µg). Como controles se utilizaron 5x tratados con DHT (300 µg) + estradiol (5 µg), con DHT (300 µg) + vehículo, con estradiol (5 µg) + vehículo, con testosterona (500 µg) o con vehículo solo. Promedios ± D.E.

* p<0.05 al compararlos con la administración de DHT.

† p<0.05 al compararlos con la administración de vehículo

El análisis de los datos se realizó con la prueba t de Student.

los de los animales a quienes se les administró el vehículo solo. Los pesos de los tejidos de los grupos que recibieron los otros tratamientos fueron similares a los del que recibió vehículo.

DISCUSION

Estudios previos han mostrado que la conducta sexual masculina en la rata, depende de las hormonas gonadales, en particular de testosterona que es el principal andrógeno producido por el testículo (26,36). En animales castrados, se ha demostrado que la expresión de dicha conducta es óptima cuando se administran en forma simultánea un andrógeno (DHT) y un estrógeno (E_2); sugiriendo la importancia de las acciones sinérgicas de andrógenos y estrógenos en el comportamiento sexual masculino en la rata (4,16,20,35,60,61,).

ACTIVIDAD ANDROGENICA de NET Y SUS DERIVADOS.

Nuestros resultados indican que ni NET ni sus metabolitos reducidos en el anillo A tuvieron la suficiente actividad androgénica para que al sinergizar con estradiol se restableciera la actividad sexual de manera similar a como lo hizo el tratamiento con DHT + E_2 .

Solamente el patrón de monta se restableció en todos los animales, independientemente del tratamiento que recibieron. Este resultado puede relacionarse con un efecto del propio estrógeno administrado pues coincide con estudios previos en los que se ha observado que la administración de 5 μ g de BE/día durante 26 días a ratas adultas que fueron castradas prepuberalmente, indujo conducta de monta en 50% de los animales y que una dosis de 50 μ g tiene el mismo efecto en

78% de ellos (35). Asimismo, se ha reportado que la administración de 1 μ g de BE/día durante 20 días a ratas adultas castradas, sexualmente expertas, indujo montas en más del 80% de los animales tratados (61). Además, en nuestros resultados la incidencia de actividad de monta (expresada por la proporción de pruebas con actividad) que se observó en los grupos tratados con NET o cualquiera de sus metabolitos, fué similar a la que registraron los Ss a quienes se les administró E₂ + vehículo.

NET fue el único compuesto que mostró una capacidad androgénica parcial al sinergizar con estradiol pues tanto la incidencia de intromisiones como la incidencia de eyaculaciones y el número de Ss que eyacularon fueron mayores en este grupo que en los Ss que solo recibieron el vehículo además del E₂. Sin embargo, las proporciones de pruebas con monta, intromisión y eyaculación fueron al mismo tiempo, menores que las del grupo tratado con DHT + E₂, indicando que su capacidad androgénica para inducir actividad sexual fue menor que la de DHT. El análisis de los porcentajes acumulativos de Ss con actividad coincide con lo observado en los otros parámetros, en el sentido de que solamente NET mostró tener capacidad androgénica para sinergizar con E₂. De hecho, en cuanto a la conducta de eyaculación, NET estimuló este patrón en porcentajes similares a los registrados en el grupo de DHT + E₂ que sin embargo, siempre fueron menores que éste. El efecto androgénico de NET no se observó en los demás parámetros de actividad sexual que se evaluaron. En otros sistemas se había observado que NET podía tener algunas

acciones androgénicas como la virilización de genitales en niñas recién nacidas de madres que recibieron la progestina durante la gestación (24) y en ratas cuyas madres también fueron tratadas con esta progestina (66). Estos efectos se pueden correlacionar con el hecho de que NET se une al receptor citosólico de andrógenos en preparaciones de hipotálamo e hipófisis de rata (47) y en preparaciones de próstata ventral (14), de modo que aunque en este último trabajo se comprobó que la mayor afinidad de NET es por el receptor de progesterona, también se confirmó su unión al receptor de andrógenos. En otro trabajo también se ha demostrado que NET ejerce efectos antigonadotrópicos en ratas a través de un mecanismo que involucra al receptor de andrógenos (47). Todos estos datos concuerdan con nuestros resultados respecto al efecto que ejerce NET sobre la actividad copulatoria de la rata macho castrada cuando se administra en combinación con estradiol. En el presente estudio, no se observó ningún efecto androgénico de NET sobre tejidos periféricos, pues tanto la próstata ventral como las vesículas seminales tuvieron pesos significativamente menores que los del grupo que recibió DHT + E₂ y similares a los del grupo tratado con vehículo.

Aunque tanto para el patrón de monta como para el de intromisión 5 α NET sinergizó con E₂ restituyendo esta actividad casi tan rápidamente como NET o DHT, la incidencia de intromisiones fue muy escasa y prácticamente no estimuló la conducta de eyaculación e incluso mostró menores proporciones de aciertos (una respuesta que se ha considerado como parámetro de actividad androgénica), que las de los Ss tratados con DHT

+ E₂. Por otra parte, 5 α NET no ejerció efectos androgénicos sobre el crecimiento de la próstata ventral ni de las vesículas seminales.

La 5 α NET es el metabolito de NET que tiene mayor afinidad por el receptor de andrógenos (14) y tiene mayor potencia antigonadotrópica que NET, misma que no se revierte con la administración previa de un antiestrógeno (tamoxifén), lo cual indica que su efecto se ejerce a través de un mecanismo androgénico. Resulta por ello muy interesante que en el presente trabajo no haya ejercido efectos androgénicos ni sobre la restitución de la actividad sexual, ni sobre la estimulación del crecimiento de tejidos periféricos.

Los metabolitos tetrahidrorreducidos tampoco mostraron ningún efecto androgénico pues los parámetros de la conducta sexual de los sujetos que recibieron estos tratamientos en combinación con estradiol, tuvieron valores similares a los del grupo tratado con vehículo + E₂. Este hallazgo concuerda con lo que se esperaría en vista de que carecen de afinidad por el receptor de andrógenos (14) y explica que no sean capaces de sinergizar con estradiol. No se observaron diferencias significativas en las latencias de monta, de intromisión y de eyaculación, en el intervalo posteyaculatorio y en el intervalo intercopulatorio de estos grupos al compararlos con los controles tratados con DHT + E₂ o con vehículo + E₂. Esto puede deberse por un lado a que hubo gran variabilidad en los datos, tanto entre los distintos sujetos de un mismo grupo como entre las distintas pruebas de un mismo sujeto, lo cual pudo haber determinado que se enmascararan posibles

diferencias; sin embargo, también cabe la posibilidad antes mencionada de que la falta de diferencias represente la condición similar en todos los grupos de tener un mismo estímulo estrogénico y no tener un efecto androgénico adecuado.

La proporción de aciertos fue menor en los cuatro grupos experimentales que en los Ss tratados con DHT + E₂; sin embargo, estas diferencias solo fueron significativas para los Ss tratados con 5α- o con 3α5αNET + E₂ de quienes podríamos concluir que carecen de efecto androgénico, pero no para los que recibieron NET ni 3β5αNET + E₂. Por otra parte, tampoco se encontraron diferencias al comparar este parámetro en cada uno de los grupos, con el control tratado con vehículo, sugiriendo que los valores registrados son intermedios a ambos controles.

El número de intromisiones previas a la eyaculación fue significativamente mayor en el grupo tratado con NET, pero esto se debe a que en la evaluación del día 6 de tratamiento un Ss tuvo 26 intromisiones antes de eyacular y puesto que solo en el 22% de las evaluaciones los Ss eyacularon, este alto número de intromisiones previas tiene una repercusión importante sobre el promedio general del grupo por lo que podemos considerar que esta diferencia no se debe al tratamiento.

ACTIVIDAD ESTROGENICA DE NET Y SUS DERIVADOS.

Los datos obtenidos con este esquema de tratamiento muestran que en la proporción de Ss activos no hubo diferencias entre los grupos cuando se compararon con el que recibió estradiol + DHT; sin embargo, el grupo tratado con NET + DHT tampoco fue distinto del control de vehículo + DHT mostrando así que existe una tendencia a una menor respuesta con este tratamiento. Por otro lado los tratamientos con 5α -, $3\beta 5\alpha$ - y $3\alpha 5\alpha$ NET + DHT mostraron porcentajes de Ss activos mayores que los de vehículo + DHT. Al analizar la proporción de pruebas en las que los Ss fueron activos, encontramos que el tratamiento con $3\beta 5\alpha$ NET fue el más efectivo para restablecer la actividad sexual porque el grupo que recibió este tratamiento fué el único que además de presentar valores mayores que los del grupo tratado con vehículo + DHT, tuvo porcentajes similares a los del de E_2 + DHT en los tres patrones conductuales (monta, intromisión y eyaculación).

El metabolito $3\alpha 5\alpha$ NET fue el que siguió en efectividad a su isómero $3\beta 5\alpha$ NET pues el grupo tratado con este esteroide en combinación con DHT también registró porcentajes de monta, de intromisión y de eyaculación mayores que los del vehículo aunque solo los dos últimos fueron similares a los del grupo tratado con E_2 + DHT. También, en cuanto al curso temporal de la restitución de la actividad sexual, se observó que ambos compuestos tetrahidrorreducidos fueron los que lograron restablecer más rápidamente los tres patrones conductuales,

confirmando su mayor efecto estrogénico en cuanto a su capacidad de sinergizar con DHT. Estos hallazgos correlacionan adecuadamente con otros estudios *in vivo* en que se han observado acciones estrogénicas de NET (19,28,32,67) y en vista de que dicha progestina no muestra afinidad por el receptor de estrógenos se ha atribuido esta actividad estrogénica a su biotransformación y por lo tanto a la acción de sus metabolitos tetrahidrorreducidos, en primer lugar el 3 β 5 α NET que es el que ha mostrado tener la mayor afinidad por el receptor estrogénico, seguido de su isómero 3 α 5 α NET (14).

En ratas ovariectomizadas 3 β 5 α NET ha mostrado tener mayor potencia antigonadotrópica que NET y este efecto puede ser revertido por la administración previa de tamoxifén (23), indicando que la supresión de gonadotrofinas está mediada por un mecanismo de acción estrogénico.

Por otro lado se ha demostrado en un modelo experimental específico para estrógenos, como es la inducción de la sensibilidad a serotonina en el útero de la rata, que 3 β 5 α NET y en menor grado también 3 α 5 α NET son los metabolitos de NET que tienen mayor efecto estrogénico (13). Así, el que sean estos metabolitos los más efectivos al sinergizar con DHT para restablecer la conducta copulatoria en la rata castrada, confirma una vez más su capacidad estrogénica.

También 5 α NET mostró ser efectivo para restablecer la conducta sexual en nuestros animales pues aunque los porcentajes de pruebas con monta y con intromisión fueron

menores que los de los Ss que recibieron E_2 + DHT, tanto éstos como el porcentaje de pruebas con eyaculación fueron al mismo tiempo mayores que los del grupo tratado con vehículo + DHT.

En el curso temporal de presentación de la actividad sexual se observó también que 5 α NET tuvo un efecto más lento para restituir la conducta copulatoria de los Ss que el que mostraron los compuestos tetrahidrorreducidos. Esto es especialmente interesante en vista de que este metabolito carece de afinidad por el receptor de estrógenos y por lo tanto es incapaz de ejercer acciones de este tipo, como las esperadas para este esquema de tratamientos. Una posible explicación sería que su parcial efectividad se debiera a su biotransformación a sus derivados tetrahidrorreducidos, quienes al interactuar con el receptor de estrógenos, sinergizaran con DHT. Cabe también la posibilidad de que 5 α NET haya ejercido un efecto sinandrogénico, potenciando la acción de DHT pero al respecto no tenemos antecedentes específicos que indiquen que 5 α NET pudiera tener efectos sinandrogénicos por lo que esto es solo una posibilidad que aun debe ser explorada y por lo tanto, hasta ahora la primer alternativa parece ser la más posible.

Nuevamente al analizar las latencias de monta, de intromisión y de eyaculación, así como el intervalo posteyaculatorio (IPE) y el intervalo intercopulatorio, observamos que el IPE fue significativamente mayor en los cuatro grupos que recibieron tratamientos experimentales que en el que recibió E_2 + DHT. Recordando que en la conducta sexual participan un componente motivacional, representado por la

búsqueda del contacto sexual y otro componente consumatorio relacionado con la ejecución y que implica la capacidad para completar el acto sexual (58) y recordando también que los estrógenos ejercen efectos sobre la motivación al facilitar mecanismos neurales involucrados en la expresión de la conducta copulatoria (34) y que estos efectos pueden reflejarse en la duración del IPE (4), se podría concluir que el estímulo estrogénico proporcionado por los diferentes tratamientos (aún los de $3\beta 5\alpha$ - y $3\alpha 5\alpha$ NET que tienen efectos estrogénicos) no fué tan efectivo como el del tratamiento con E_2 + DHT.

Por otra parte, DHT proporciona el estímulo androgénico necesario para el adecuado desarrollo del pene (35), el cual participa importantemente en la localización del orificio vaginal durante la monta (56) para lograr la inserción vaginal del mismo. Es por esto que al haber recibido la misma dosis de DHT, todos los grupos mostraron valores similares en la proporción de aciertos, o sea en la capacidad para lograr la intromisión.

Asimismo, en el número de intromisiones que los animales requirieron para eyacular, no se encontraron diferencias significativas, tal vez debido a que al haber recibido un estímulo androgénico equivalente, la estimulación proporcionada por las intromisiones para alcanzar el nivel requerido para la eyaculación pudo haber sido similar y esto se refleja en un número también similar, de intromisiones previas a la eyaculación.

El aumento en el peso de glándulas accesorias en animales castrados representa una respuesta biológica que

implica un efecto androgénico. Por esto, si todos los grupos recibieron la misma dosis de andrógenos, los pesos tanto de próstata ventral como de vesículas seminales debían ser similares en todos los grupos. Sin embargo se observó que con la administración de NET ambas estructuras tuvieron menor peso que con el resto de los tratamientos. Esto puede correlacionarse con estudios previos en los que NET ha mostrado tener efectos antiandrogénicos pues suprime *in vitro* e *in vivo*, la secreción de testosterona por un tumor ovárico de células Sertoli-Leydig, que era independiente de LH (11). Este hallazgo coincide también con otro reporte que muestra que NET implantada localmente puede disminuir el peso de epidídimo de ratas adultas y que este efecto va aunado a alteraciones histológicas del mismo y a un deterioro de la función secretora, que depende de andrógenos y que contribuye a la maduración adecuada de los espermatozoides (63), sugiriendo que en algunos sistemas, NET puede ejercer acciones antiandrogénicas. Estos efectos podrían ser propios de la NET o podrían estar mediados a través de su biotransformación a 5 α NET que tiene una mayor afinidad por el receptor de andrógenos; sin embargo, esto es solo una posibilidad que aun no ha sido explorada y en el presente estudio al menos, no se observó un efecto antiandrogénico de 5 α NET. En otros sistemas biológicos como son la actividad β -glucuronidasa o de la deshidrogenasa alcohólica renales, o sobre los niveles del factor de crecimiento epidermal en glándula submaxilar en el ratón, se ha mostrado que algunas progestinas sintéticas (acetato de ciproterona, acetato de medroxiprogesterona, acetato de

megestrol) pueden ejercer acciones androgénicas, sinandrogénicas e incluso antiandrogénicas (12,25,44). La posibilidad de que 5 α NET, además de las acciones androgénicas demostradas en la supresión de gonadotropinas (23), pueda ejercer también acciones sinandrogénicas o antiandrogénicas es algo que requeriría de otros estudios, pero al menos en el presente trabajo, a las dosis utilizadas, no parece tener estas acciones. También las vesículas seminales de los animales tratados con 3 α 5 α NET tuvieron menor peso que las de los demás tratamientos, sin embargo este metabolito carece de afinidad por el receptor de andrógenos y además en próstata ventral no se manifestó esta disminución en el peso por lo que en este caso tal vez la diferencia no sea atribuible al tratamiento.

ACTIVIDAD PER SE DE NET Y SUS METABOLITOS REDUCIDOS EN EL ANILLO A.

Los datos obtenidos cuando se administró NET o alguno de sus metabolitos reducidos en el anillo A (500 μ g/día), solos, muestra que, tanto en el porcentaje de Ss que respondieron, como en la frecuencia con la que se expresó cada uno de los patrones copulatorios, NET fue el único compuesto que restableció de manera similar al grupo tratado con T, la actividad sexual de los Ss. A la vez, los valores del grupo tratado con NET fueron mayores que los del grupo que recibió vehículo, indicando que no obstante su falta de

afinidad por el receptor de estrógenos y su moderada afinidad por el receptor de andrógenos, la NET pudo restablecer la actividad copulatoria en forma similar a como lo hizo T. Esto puede explicarse porque al tener NET la capacidad de biotransformarse a su metabolito 3 β 5 α NET, adquiere la capacidad de ejercer acciones estrogénicas que aunadas a aquellas que derivan de su parcial afinidad por el receptor de andrógenos, le permitieron restablecer adecuadamente la actividad sexual en los Ss.

El metabolito 5 α NET fue el que siguió en efectividad a la NET, pues aunque indujo una menor incidencia de intromisiones y de eyaculaciones que T, éstas, al igual que la incidencia de montas fueron sin embargo, mayores que las del grupo que recibió el vehículo. Las proporciones de Ss que realizaron intromisiones y que eyacularon fueron también mayores en el grupo de 5 α NET que en el tratado con vehículo, sugiriendo que al administrarla sola, 5 α NET sí fue capaz de restablecer aunque sea parcialmente, la conducta sexual. Este efecto podría deberse a una acción directa a través de su unión al receptor a andrógenos; sin embargo, esto no coincide con lo observado en el tratamiento en que se administró simultáneamente con E₂, para tratar de establecer su posible efecto androgénico. Sin embargo, puesto que las dosis administradas en estos dos esquemas experimentales fueron diferentes (300 y 500 μ g diarios, respectivamente) esto pudiera explicar que en este último esquema sí se observara un mayor efecto androgénico de 5 α NET. Otra posibilidad sería que estuviera actuando por un mecanismo estrogénico dado a través

de su biotransformación a 3 β 5 α NET. Al respecto cabe mencionar que tanto la latencia de monta como el IPE registrados para el grupo que recibió 5 α NET (y que se consideran como indicadores de la motivación de los Ss), fueron muy similares a los de T y menores que los de vehículo, sugiriendo una adecuada motivación en los Ss que podría estar relacionada con la acción estrogénica de su metabolito 3 β 5 α NET. Por otra parte, los demás parámetros que se consideraron como las latencias de intromisión y de eyaculación, que están influenciados principalmente por acciones androgénicas, resultaron muy similares a las de los animales tratados con T; por el contrario, la proporción de aciertos que es un indicador de acción androgénica, fue significativamente menor que la del grupo que recibió T. De acuerdo con estos datos y considerando la falta de actividad androgénica de 5 α NET para sinergizar con E₂, no parece que sus efectos sobre la actividad sexual en este esquema de tratamiento se deriven de su interacción con el receptor de andrógenos. Cabe mencionar que estos resultados coinciden con datos de McGinnis y Dreifus (42), quienes sugieren que en condiciones fisiológicas es principalmente T y no 5 α DHT quien participa en la regulación de la conducta sexual masculina en la rata, con un efecto complementario por parte de E₂.

Tanto 3 α 5 α NET como 3 β 5 α NET indujeron actividad sexual en los Ss en menor proporción que NET y que 5 α NET. No obstante, el metabolito 3 β reducido fue mas efectivo que su isómero 3 α porque la proporción de pruebas en las que hubo montas en el grupo tratado con 3 β 5 α NET fue similar a la del que

recibió T y mayor que la del grupo que se trató con vehículo, en tanto que para $3\alpha 5\alpha\text{NET}$, aunque dicha proporción fue mayor que la del grupo que recibió vehículo, fue al mismo tiempo menor que la de los Ss tratados con T. Con respecto a la proporción de pruebas en las que los Ss eyacularon, aunque con los dos metabolitos tetrahidrorreducidos fue menor que con T, para el caso de $3\beta 5\alpha\text{NET}$ fue también mayor que la de vehículo. Todos estos datos apoyan la idea de que $3\beta 5\alpha\text{NET}$ fue mas efectivo que su isómero $3\alpha 5\alpha\text{NET}$, para restablecer la conducta copulatoria en nuestros animales. En este caso los efectos de ambos metabolitos tetrahidrorreducidos pudieran estar mediados por sus respectivas interacciones con el receptor de estrógenos; los datos al respecto coinciden con nuestros resultados en que el metabolito con mayor afinidad por el receptor a estrógenos, $3\beta 5\alpha\text{NET}$ (14), fue también el mas efectivo para restablecer la actividad sexual. Los efectos observados sobre todo en la latencia de monta que como ya se mencionó es un indicador de la motivación del individuo, también apoyan la idea de que se trata de acciones en las que está involucrado un mecanismo de acción estrogénico. Por otra parte se ha observado que la formación de metabolitos reducidos en el carbono 3 es completamente reversible en el caso de la posición α , en tanto que para la posición β no lo es, de modo que el sentido predominante de la reacción es hacia la formación del compuesto 3β -reducido (37); por lo anterior resulta que mientras que la $3\alpha 5\alpha\text{NET}$ se puede interconvertir fácilmente con $5\alpha\text{NET}$, $3\beta 5\alpha\text{NET}$ no lo hace. Así, teniendo en cuenta estos datos y la

mayor efectividad de $3\beta 5\alpha$ NET para restituir la conducta copulatoria en nuestros animales, se apoya una vez mas la idea de que 5α NET no actúa por si misma a través de su afinidad por el receptor de andrógenos. Si este fuera el caso, $3\alpha 5\alpha$ NET sería mas efectivo pues podría ejercer acciones androgénicas al regresarse a 5α NET y estrogénicas a través de su parcial afinidad por el receptor a estrógenos.

La proporción de aciertos fue mayor en los Ss que se trataron con T que en el resto de los grupos y solamente los que recibieron NET, tuvieron un valor que fue también mayor que el de los animales tratados con vehículo; esto se explica por las acciones androgénicas de NET que pueden estarse manifestando en este caso como un aumento en la proporción de aciertos. Al analizar el porcentaje acumulativo de Ss activos, se observó que existe una relación directa entre la efectividad de los compuestos utilizados y el tiempo que tardan en inducir actividad. De esta manera NET que fue la mas efectiva, fue también la que primero restableció la conducta y $3\alpha 5\alpha$ NET que fue el compuesto que tuvo el menor efecto, fue el que mas tardó en inducir la. Finalmente, el análisis del efecto de estos tratamientos sobre tejidos periféricos coincide también con lo que hemos observado en el sentido que solamente NET que fue la única que tuvo efecto androgénico sobre la actividad copulatoria de los Ss, fue también la única que produjo un ligero aumento en el peso tanto de próstata ventral como de vesículas seminales y aunque éste no fue comparable con el que produjo T, sí resultó significativo al compararlo con el de los animales que solo recibieron vehículo.

CONCLUSIONES

El análisis de la conducta copulatoria masculina en la rata, constituye un modelo adecuado para evaluar las acciones de tipo hormonal de algunas progestinas sintéticas, como la noretisterona y sus metabolitos.

La interacción de NET con el receptor de andrógenos se manifiesta en acciones androgénicas sobre la restitución de la actividad copulatoria en la rata macho castrada y antiandrogénicas sobre el crecimiento de próstata ventral y vesículas seminales, en los mismos sujetos.

La 5 α reducción de NET disminuyó significativamente su potencia androgénica expresada sobre la estimulación de la actividad sexual de la rata macho castrada, y la reducción subsecuente del anillo A, suprimió totalmente dicha actividad.

La interacción de 3B5 α NET y de 3 α 5 α NET con el receptor a estrógenos, cuando se combinan con DHT, se traduce en acciones estrogénicas que participan en la óptima restitución de la actividad copulatoria de la rata macho castrada.

La efectividad de NET sola para restablecer la actividad copulatoria en la rata macho castrada indica que dicha progestina puede ejercer por sí misma, acciones androgénicas que están mediadas por su interacción con el receptor de andrógenos y estrogénicas a través de sus metabolitos $3\beta 5\alpha$ NET y $3\alpha 5\alpha$ NET, capaces de interaccionar con el receptor a estrógenos.

La 5α NET no parece participar directamente en las acciones hormonales de NET, en este modelo, sino como intermediario para la formación de los metabolitos tetrahidrorreducidos, que tienen la capacidad de ejercer acciones estrogénicas.

R E F E R E N C I A S B I B L I O G R A F I C A S

1. Baker, B.L., Eskin, T.A. and August, L.N. (1973) Direct action of synthetic progestins on the hypophysis. *Endocrinology* 92:965-972.
2. Barbieri, R.L., Petro, Z., Canick, J.A. and Ryan, K.J. (1983) Aromatization of norethindrone to ethinyl estradiol by human placental microsomes. *J. Clin. Endocr. Metab.* 57(2):299-303.
3. Bardin, C.W. y Janne, O.A. (1987) Mecanismos de acción progestacional y androgénica de progestinas sintéticas. En: *Avances Recientes en Regulación de la Fertilidad*. G. Pérez-Palacios, J. Garza-Flores y P.E. Hall (Eds) Ed. Piensa, México, pp. 17-38.
4. Baum, M.J. and Vreeburg, J.T.M. (1973) Copulation in castrated male rats following combined treatment with estradiol and dihydrotestosterone. *Science* 182:283-285.
5. Beach, F.A. and Holtz, A.M. (1946) Mating behavior in male rats castrated at various ages and injected with androgen. *J. Exp. Zool.* 101:91-142.
6. Beach, F.A. and Holtz-Tucker, A.M. (1949) Effects of different concentrations of androgen upon sexual behavior in castrated male rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 42:433-453.
7. Beyer, C., Larsson, K., Pérez-Palacios, G. and Moralí, G. (1973) Androgen structure and male sexual behavior in the castrated rat. *Horm. Behav.* 4:99-108.
8. Bowers, A., Ringold, H.J. and Denot, E. (1958) Steroids CI 19 nordihydrotestosterone derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 80:6115-6121.
9. Braselton, W.E., Lin, T.V., Ellegood, J.O., Mills, T.M. and Mahesh, V.W. (1979) Accumulation of norethindrone and individual metabolites in human plasma during short- and long-term administration of a contraceptive dosage. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 133:154-160.
10. Breuer, H. (1970) Metabolism of progestagens. *The Lancet* 2:615-616.
11. Brumsted, J.R., Chaptis, J., Riddick, D. and Gibson, M. (1987) Norethindrone inhibition of testosterone secretion by an ovarian Sertoli-Leydig cell tumor. *J. Clin. Endocr. Metab.* 65(1):194-197.

12. Bullock, L.P., Barthe, P.L., Mowzowicz, I., Orth, D.N. and Bardin, W. (1975) The effect of progestins on submaxillary gland epidermal growth factor: Demonstration of androgenic synandrogenic and antiandrogenic actions. *Endocrinology* 97(1):189-195.
13. Campos, G., Villanueva, T., Lemus, A.E., Pérez-Palacios, G. y Ponce-Monter, H. (1988) Efectos estrogénicos de noretisterona sobre la sensibilidad a serotonina del útero de ratas ovariectomizadas. XXXI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas 14-18 de agosto, Querétaro, Qro. C-22.
14. Chavez, B., Vilchis, F., Pérez, A.E., García, G., Grillasca, I. and Pérez-Palacios, G. (1985) Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J. Steroid. Biochem.* 22(1):121-126.
15. Davidson, J.M. (1966) Characteristics of sex behavior in male rats following castration. *Anim. Behav.* 14:266-272.
16. Davidson, J.M. (1969) Effects of estrogen on the sexual behavior of male rats. *Endocrinology* 84:1365-1372.
17. Davidson, J.M., Johnston, P., Bloch, G.J., Smith, E.R. and Weick, R.F. (1971) Comparative responses to androgen at androgenic behavioral and other parameters. In: *Proceedings of the III International Congress of Hormonal Steroids*. V.H.T. James and L. Martini (Eds) Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 727-730.
18. Djerassi, C., Miramontes, L. and Rosenkranz, G. (1952) Abstr. Meeting Div. Medical Chem. Am. Soc. Milwaukee, Wis 18J.
19. Etchegoyen, G., Wolpert, E., Galván, E., Landeros, J. and Pérez-Palacios, G. (1983) Effects of synthetic steroid contraceptives on biliary lipid composition of normal mexican women. *Contraception* 27(6):591-603.
20. Feder, H.H. (1971) The comparative action of testosterone propionate and 5 α -androstan-17 β -ol-3-one propionate on the reproductive behavior, physiology and morphology of male rats. *J. Endocrinol.* 51:242-252.
21. Franchimont, P., Cession, G., Ayalon, D., Musters, A. and Legros, J.J. (1970) Suppressive action of norethisterone enanthate and acetate on gonadotropin (FSH and LH) levels. *Obstet. and Gynaecol.* 36(1):93-100

22. Garza-Flores, J., Díaz-Sánchez, V., Jiménez-Thomas, S. and Rudel, H.W. (1984) Development of a low dose monthly injectable contraceptive system: I. Choice of compounds, dose and administration route. *Contraception* 30(4):371-379.
23. Garza-Flores, J., Vilchis, F., García, G.A., Menjívar, M. and Pérez-Palacios, G. (1986) A-ring reduction enhances the antigonadotropic potency of norethisterone. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 112(2):278-283.
24. Grumbach, M.M., Ducharme, J.R. and Motoshok, R.E. (1959) On the fetal masculinizing action of certain oral progestins. *J. Clin. Endocr. Metab.* 19(11):1369-1380.
25. Gupta, C., Bullock, L.P. and Bardin, W. (1978) Further studies on the androgenic, anti-androgenic and synandrogenic actions of progestins. *Endocrinology* 102(3):736-744.
26. Hall, P.F. (1988) Testicular steroid synthesis: Organization and regulation In: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J. Neill (Eds) Raven Press, New York, pp. 975-998.
27. Hümpel, M. (1982) Pharmacokinetics and biotransformation of norethisterone in animals. A review. *Contraception* 26(1):83-95.
28. Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973) The effects of various steroids on the vaginal histology in the rat. *Fert. Steril.* 24(4):284-291.
29. Kalra, P.S., Fawcett, C.P., Krulich, L. and Mc Cann (1973) The effect of gonadal steroids on plasma gonadotropins and prolactin in the rat. *Endocrinology* 92:1256-1268.
30. Labhsetwar, A.P. (1969) Influence of progesterone on the pituitary and plasma levels of LH and FSH in the female rat. *Biol. Reprod.* 1:189-196.
31. Larrea, F., Escobar, N., Garza-Flores, J., Moctezuma, O., Martínez-Campos, A. and Pérez-Palacios, G. (1983) Nuclear translocation of estradiol receptors by the in vivo administration of norethisterone: An alternate mechanism for gonadotropin inhibition. *J. Steroid. Biochem.* 19(6):1747-1752.

32. Larrea, F., Moctezuma, O. and Pérez-Palacios, G. (1984) Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. *J. Steroid. Biochem.* 20(4A):841-847.
33. Larsson, K. (1966) Individual differences in reactivity to androgen in male rats. *Physiol. Behav.* 1:255-258.
34. Larsson, K. and Södersten, P. (1973) Mating in male rats after section of the dorsal penile nerve. *Physiol. Behav.* 10:567-571.
35. Larsson, K., Södersten, P. and Beyer, C. (1973) Sexual behavior in male rats treated with estrogen in combination with dihydrotestosterone. *Horm. Behav.* 4:289-299.
36. Larsson, K. (1979) Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In: *Endocrine Control of Sexual Behavior*. C. Beyer (Ed) Raven Press, New York, pp. 77-163.
37. Loza, M.C., Lemus A.E. and Pérez-Palacios, G. (1988) Metabolismo de hormonas esteroides. En: *Bioquímica e Inmunología*. Vol. II J.J. Hicks y J.C. Díaz-Zagoya (Eds) Editorial Piensa, México, pp. 53-92.
38. Madlafousek, J., Hlinak, Z. and Beran, J. (1976) Decline of sexual behavior in castrated male rats: effects of female precopulatory behavior. *Horm. Behav.* 7:245-252.
39. Martini, L. (1982) The 5 α reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocr. Rev.* 3:1-25.
40. McDonald, P.G., Beyer, C., Newton, F., Brien, B., Baker, R., Tan, H.S., Sampson, C., Kitching, P., Greenhill, R. and Pritchard, D. (1970) Failure of 5 α -dihydrotestosterone to initiate sexual behavior in castrated male rat. *Nature (Lond)* 227:964-965.
41. McEwen, B.S., Davis, P.G., Parsons, B. and Pfaff, D.W. (1979) The brain as a target tissue for steroid hormone action. *Ann. Rev. Neurosci.* 2:65-112.
42. McGinnis, M.Y. and Dreifus, R.M. (1989) Evidence for a role of testosterone-androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology* 124:618-626.

43. Morali, G., Larsson, K. and Beyer, C. (1977) Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. *Horm. Behav.* 9:203-213.
44. Mowszowicz, I., Bieber, D.E., Chung, K.W., Bullock, L.P. and Bardin, W. (1974) Synandrogenic and antiandrogenic effects of progestins: Comparison with nonpregestational antiandrogens. *Endocrinology* 95(6):1589-1599.
45. Pérez, A.E., Hernández, A., Cervantes, P., Vilchis, F. and Chávez, B. (1985) Metabolismo in vitro de noretisterona-³H en hipotálamo e hipófisis de ratas castradas (Abs.) XXV Reunión Anual Soc. Mex. Nutr. Endocr. Mazatlán, México.
46. Pérez-Palacios, G., Larsson, K. and Beyer, C. (1975) Biological significance of the metabolism of androgens in the central nervous system. *J. Steroid. Biochem.* 6:999-1006.
47. Pérez-Palacios, G., Chávez, B., Escobar, ., Vilchis, F., Larrea, F., Lince, M. and Pérez, A.E. (1981) Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. *J. Steroid. Biochem.* 15:125-130.
48. Pérez-Palacios, G., Fernández-Aparicio, M.A., Medina, M., Zacarías, J. and Ulloa-Aguirre, A. (1981,b) On the mechanism of action of progestins. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 97:320-328.
49. Pérez-Palacios, G., Larrea, F., Cerbón, M. y Vilchis, F. (1988) Mecanismos de acción de hormonas esteroides. En: *Bioquímica e Inmunología Vol II*. J.J. Hicks y J.C. Díaz-Zagoya (Eds) Ed. Piensa, México, pp. 93-125.
50. Phoenix, C.H., Copenhauer, K.H. and Brenner, R.M. (1976) Scanning electron microscopy of penile papillae in intact and castrated rats. *Horm. Behav.* 7:217-227.
51. Rice-Wray, E., Goldzieher, J.W. and Aranda-Rosell, A. (1963) Oral progestins in fertility control: A comparative study. *Fert. Steril.* 14(4):402-409.
52. Rivera, R., Alvarado, G., Aldaba, S., Flores, C. and Hernández, A. (1987) Esteroides microencapsulados como una alternativa en anticoncepción de acción prolongada. En: *Avances Recientes en Regulación de la Fertilidad*. Vol.1 G. Pérez-Palacios, J. Garza-Flores y P. Hall (Eds) Editorial Piensa, México, pp. 149-168.

53. Rock, J., García, C.R. and Pincus, G. (1960) Use of some progestational 19-nor steroids in gynecology *Am. J. Obstet. & Gynec.* 79(4):758-767.
54. Rodgers, C.H. and Alheid, G. (1972) Relationship of sexual behavior and castration to tumescence in the male rat. *Physiol. Behav.* 9:581-584.
55. Rotchild, I. (1965) Interrelations between progesterone and the ovary, pituitary and central nervous system in the control of ovulation and the regulation of progesterone secretion. *Vitam. Horm.* 209-327.
56. Sachs, B.D. and Barfield, R.J. (1976) Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat. *Adv. Study Behav.* 7:91-154.
57. Sachs, B.D., Glater, G.B. and O'Hanlon, J.K. (1984) Morphology of the erect glans penis in rats under various gonadal hormone conditions. *Anat. Rec.* 210:45-52.
58. Sachs, B.D. and Meisel, R.L. (1988) The physiology of male sexual behavior. In: *The Physiology of Reproduction* Vol. I. E. Knobil and J. Neill (Eds) Raven Press, New York, pp. 1393-1485.
59. Sahlberg, B.L., Landgren, B.M. and Magnus, A. (1987) Metabolic profiles of endogenous and ethynyl steroids in plasma and urine from women during administration of oral contraceptives. *J. Steroid. Biochem.* 26(5):609-617.
60. Södersten, P. (1973) Estrogen-activated sexual behavior in male rats. *Horm. Behav.* 4:247-256.
61. Södersten, P. and Larsson, K. (1975) Lordosis behavior and mounting behavior in male rats: effects of castration and treatment with estradiol benzoate or testosterone propionate. *Physiol. Behav.* 14:159-164.
62. Södersten, P. and Gustafsson, J.Å. (1980) A way in which estradiol may play a role in the sexual behavior of male rat. *Horm. Behav.* 14:271-274.
63. Srivastava, U.K. (1983) Effect of continuous local microdose norethisterone enanthate on the epididymis of adult rat. *Andrologia* 15(4):333-338.
64. Stanczyk, F.Z. and Roy, S. (1990) Metabolism of levonorgestrel norethindrone and structurally related contraceptive steroids. *Contraception* 42(1):67-96.

65. Stone, C.P. (1939) Copulatory activity in adult male rats following castration and injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 24:165-174
66. Suchowsky, G.K. and Junkmann, K. (1961) A study of the virilizing effect of progestogens in the female rat fetus. *Endocrinology* 68:341-349.
67. Vilchis, F., Chávez, B., Pérez, A.E., García, G. A., Angeles, A. and Pérez-Palacios, G. (1986) Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J. Steroid. Biochem.* 24(2):525-531.
68. Whalen, R.E. and Luttge, W.G. (1971) Testosterone, androstenedione and dihydrotestosterone: Effects on mating behavior of male rats. *Horm. Behav.* 2:117-125.
69. Whalen, R., Yahr, P. and Luttge, W. (1985) The role of metabolism in hormonal control of sexual behavior. In: *Handbook of Behavioral Neurobiology*. N. Adler, D. Pfaff and R.W. Goy (Eds) Vol 7, Reproduction. Plenum Press, New York, pp. 423-494.
70. Wilson, J.D. and Gloyna, R.E. (1970) The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction. *Recent. Prog. Horm. Res.* 26:309-330.