

03068



Universidad Nacional Autónoma de México

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

IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LA PROGESTERONA Y SUS  
METABOLITOS 5-*alfa* y 5-*beta* REDUCIDOS EN EL  
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

CARLOS KUBLI GARFIAS

MEXICO, D. F.

1982

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
LOCALIZACION CEREBRAL DE LAS PROGESTINAS.....	4
METABOLISMO DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	7
EFFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTRICA CEREBRAL.....	9
ESTROGENOS, PROGESTERONA Y CONDUCTA SEXUAL.....	19
EL CONCEPTO DE "PREHORMONA" Y LA IMPORTANCIA BIOLOGICA DE LOS METABOLITOS DE LA PROGESTERONA.....	25
MECANISMO DE ACCION Y RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD..	29
POSTULACION DE UN CODIGO.....	33
APENDICE I.....	39
APENDICE II.....	40
REFERENCIAS.....	48

## INTRODUCCION

Quizá el primer hallazgo del efecto de un esteroide sobre el sistema nervioso central (SNC) fué el de Cashin y Moravsek (1927), quienes encontraron que grandes dosis de colesterol por via intravenosa producen un estado de analgesia, anestesia y parálisis. Aunque la obtención de los primeros cristales puros de otros esteroides, como por ejemplo estradiol o progesterona, fué en la década de los 30's, fué 10 años más tarde cuando empezaron a aparecer los primeros reportes sobre el efecto central "anestésico" de los esteroides gonadales (Selye, 1942). Estos trabajos tomaron como indice de efecto la pérdida del reflejo de la postura, lo cual hace difícil la diferenciación entre anestesia o algún efecto tóxico.

Estudios posteriores de P'An y Laubach (1964), Figdor, Kodet, Bloom, Agnello, P'An y Laubach (1957), Atkinson, David, Pratt, Sharpe y Tomich (1965), Gyermek, Genter y Fleming (1967) demostraron que algunos compuestos 5 $\beta$  reducidos derivados de la progesterona (P) poseen una potencia anestésica mayor, ya que el tiempo de pérdida de la conciencia, del reflejo postural y la insensibilidad del animal a

estímulos nociceptivos es mayor a dosis iguales. Todos estos experimentos evidenciaron un efecto claro de los esteroides derivados del pregnano sobre el SNC. Sin embargo, surgieron preguntas acerca de su sitio y mecanismo de acción y sobre todo de su importancia en la fisiología del sistema nervioso central y de su conexión con otras funciones de tipo endócrino.

A pesar de que la progesterona es un compuesto muy estudiado y de que se le conocen una gran variedad de efectos, existe muy poca información acerca de las posibles acciones o del significado fisiológico de sus derivados reducidos en posición cinco. De hecho es un campo prácticamente inexplorado en el que existen muchas posibilidades. Debido a la biotransformación importante de la progesterona en los tejidos que da origen a cerca de 20 compuestos existe la posibilidad de que en algunos casos los efectos observados como consecuencia de la administración de esta hormona sean debidos a alguno o algunos de estos metabolitos.

Actualmente se conocen varios efectos sobre el SNC de la progesterona y sus derivados 5 $\alpha$  y 5 $\beta$ . Se sabe por ejemplo que dichos compuestos producen sincronización de la actividad eléctrica cerebral y disminución de la frecuencia de disparo de las neuronas en la corteza cerebral, el mesencéfalo y

algunas zonas diencefálicas (Gyermek, Genter y Fleming, 1967; Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976). Asimismo, algunas de estas progestinas participan en el control de la secreción de gonadotrofinas, sobre todo de hormona luteinizante y de hormona folículo-estimulante (Brown-Grant, 1974; Zanisi y Martini, 1975; Fink y Henderson, 1977; Nuti y Karavolas, 1977). Con respecto a la conducta sexual, sobre todo el despliegue de la conducta de lordosis por la hembra, las progestinas favorecen esta respuesta en la rata tratada previamente con estrógenos (Whalen y Gorzalka, 1972; Kubli-Garfias y Whalen, 1977). Por todo ello resulta importante hacer un análisis más detallado del estado actual del conocimiento de los compuestos derivados del pregnano sobre el SNC.

Al parecer no queda ninguna duda de que el cerebro es un órgano blanco de esteroides y éstos pueden producir en el encéfalo una gran variedad de efectos. Sin embargo, pueden ser distinguidos cuando menos dos niveles de acción de estos compuestos en las neuronas: efectos membranales o no genómicos y efectos genómicos (McEwen, Krey y Luine, 1978).

Dentro de los efectos no genómicos de los esteroides podrían incluirse los efectos sobre la

actividad eléctrica cerebral y los cambios sobre el estado de conciencia.

Por otra parte, aunque es difícil establecer una correlación entre los efectos sobre la excitabilidad y algún otro fenómeno biológico, es posible postular que el efecto depresor (posiblemente membranal) de las progestinas reducidas en posición 5 estén relacionadas con alguna actividad esteroide-dependiente del SNC.

El presente trabajo pretende enmarcar y destacar los efectos de los metabolitos de la P reducidos en posición 5, los cuales han sido poco estudiados e incluso considerados como fisiológicamente inactivos. Sin embargo se ha presentado una nueva perspectiva en el posible significado biológico de estos compuestos, ya que tienen efectos casi inmediatos de tipo depresor sobre tejidos excitables que son al mismo tiempo órganos blanco de esteroides e.g. tejido nervioso y miometrio.

#### LOCALIZACION CEREBRAL DE LAS PROGESTINAS.

Con la técnica de marcar compuestos químicos con radioisótopos se abrieron nuevas posibilidades que permitieron estudiar drogas y rastrearlas en animales experimentales. De esta manera fué posible conocer la

localización, la vida media y el metabolismo de diferentes sustancias en los seres vivos.

Los estudios iniciales de la captación de P radiactiva en el SNC fueron dirigidos principalmente hacia el hipotálamo. Se encontró que dos minutos después de la inyección intravenosa de P radiactiva (marcada con tritio) se detecta la concentración más alta en este tejido (Laumas y Farooq, 1966; Laumas, 1967). Después de este período, la radioactividad decrece rápidamente. Seiki y Hattori (1973) examinaron durante un período de 3 horas la retención de P radiactiva en el hipotálamo, encontrando que se concentra en cantidades ligeramente mayores que en la corteza y el cerebelo. Whalen y Luttge (1971a) encontraron una captación elevada de P tritiada en ratas ovariectomizadas, sobre todo en el mesencéfalo. Además, este grupo dió evidencias de la existencia de un sistema saturable de receptores a la P en el mesencéfalo (Whalen y Luttge, 1971b).

Con la técnica de autorradiografía, Sar y Stumpf (1973) han demostrado la acumulación de P tritiada en algunas áreas hipotalámicas, que incluyen el núcleo arcuato, el área periventricular y los núcleos supraquiasmáticos. Sin embargo, es importante hacer notar que la captación de P por el tejido nervioso se



localiza en regiones mesencefálicas más que diencefálicas, lo cual hace sospechar la posibilidad de que en esa región la influencia de esta hormona sea más importante desde el punto de vista funcional (Whalen y Luttge, 1971 a,b).

Recientemente ha sido aceptado que la P actúa en las células neuronales a través de receptores específicos a esta hormona en el SNC. La demostración de que existen receptores a la P en el encéfalo se debe a Leavitt, 1976; Moguilewsky y Reynaud, 1977; Kato y Onuchi, 1977; MacLusky y McEwen, 1978. La demostración de que existe un receptor a la P en hipotálamo y mesencéfalo es clara aunque en el hipotálamo los niveles de receptores generalmente son bajos (Blaustein y Feder, 1979). La síntesis de receptores a la progesterona en algunas áreas cerebrales requieren de la estimulación de los estrógenos mientras que otras no (McLusky y McEwen, 1978). En la corteza cerebral por ejemplo los receptores no son inducibles por estradiol y sus concentraciones son similares a las del hipotálamo (McLusky y McEwen, 1978). Los receptores a la P son proteínas con un coeficiente de sedimentación de 6 a 7 unidades svedberg las cuales no solo aceptan a la P sino también captan a la 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-diona

(5 $\alpha$ -dihidroprogesterona, 5 $\alpha$ -DHP), lo cual muestra una baja especificidad del receptor (Kato Onuchi y Okinaga, 1978). Es importante hacer notar que la localización de la progesterona en las áreas cerebrales mencionadas, así como la existencia de receptores específicos con gran afinidad, no son pruebas irrefutables del sitio de acción de la P y sus metabolitos. Sin embargo, la probabilidad de que estas estructuras estén involucradas es muy alta.

#### METABOLISMO DE LA PROGESTERONA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La progesterona puede ser biotransformada (Dorfman y Ungar, 1965; Briggs y Brotherton, 1970) y sigue cuando menos cuatro vías diferentes: hacia corticoides, hacia andrógenos y estrógenos, hacia compuestos reducidos en posición 5 $\alpha$  y hacia derivados reducidos en 5 $\beta$ . La formación de estos compuestos se debe a la acción de enzimas, principalmente oxido-reductasas, que actúan en los carbonos 3, 5 y 20 originándose isómeros trans y cis. En el caso concreto de la reducción del carbono 5 se obtienen dos conformaciones con respecto a los anillos A y B de la progesterona. A/B trans cuando el hidrógeno 5 se

encuentra en posición  $\alpha$  y una conformación A/B cis cuando se encuentra en posición  $\beta$ . Existe además la posibilidad de una cetona en el carbono 3. De esta manera los cambios metabólicos de la P en los tejidos dan origen a múltiples metabolitos tales como pregnandionas, pregnanolonas y pregnandioles, todos ellos con posible actividad biológica aunque muchos de ellos han sido considerados clásicamente como inactivos (Selye 1948).

La progesterona en el sistema nervioso central es metabolizada principalmente hacia progestinas  $5\alpha$  tales como  $5\alpha$ -pregnan-3,20-diona y  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -pregnan-20-ona (Karavolas y Herft, 1971; Karavolas y Nuti, 1976). En nuestro laboratorio hemos encontrado (Kubli-Garfias, Magdaleno, Pacheco-Cano y Ortega-Suárez, 1979) que existe una conversión importante de la progesterona a  $20\alpha$ -hidroxi-pregnen-3-ona ( $20\alpha$ -hidroxi-pregnenona,  $20\alpha$ -OH-P) en el SNC y que esta conversión depende importantemente de la administración previa de estrógenos; la acumulación observada en el mesencéfalo fué mayor que en el hipotálamo o en la corteza. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado recientemente por Karavolas, Hodges, O'Brien y McKenzie (1979). Asimismo encontramos, con la administración in vivo de P tritiada, la formación

de compuestos 5 $\beta$  reducidos, tales como 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (epipregnanolona) y 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (pregnanolona) en el tejido cerebral. Estos compuestos junto con la 5 $\beta$ -pregnan-3,20-diona (5 $\beta$ -pregnandiona) fueron encontrados previamente en el SNC por Raisinghani, Dorfman, Forchielli, Gyermek y Genther (1968). Adicionalmente Kawahara, Berman y Green (1975) encontraron la formación de 5 $\beta$ -pregnandiona a partir de progesterona en la corteza cerebral del perro.

#### EFFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTRICA CEREBRAL.

En 1962 Kobayashi, Kobayashi, Takesawa, Oshima y Kawamura demostraron que la inyección intravenosa de 4 mg de P en ratas eleva el umbral para producir la reacción de despertar que se observa en el electroencefalograma con la estimulación hipotalámica.

Por otra parte, en estudios sobre el sueño se ha demostrado que en el gato los implantes de P en el área preóptica producen sueño acompañado de ondas lentas y episodios de sueño paradójico (Heuser, 1967). En la rata ovariectomizada el tratamiento secuencial de estrógenos (E) y progesterona duplican los períodos de sueño con respecto al animal intacto (Branchey,

Branchey y Nadler, 1971). Sin embargo, es de hacer notar que en la actualidad no existen datos consistentes que afirmen una participación de la progesterona o algún otro esteroide en los procesos del sueño.

En estudios de registro de la actividad unitaria del hipotálamo en ratas ciclantes, Barraclough y Cross (1963) encontraron que la responsividad de las neuronas es afectada por el estado hormonal. Además de cambios en el número de neuronas (observado como disminución de la actividad multiunitaria) que responden a ciertos estímulos, encontraron un efecto interesante con la administración intravenosa de progesterona: se observó que las neuronas del área hipotalámica lateral que responden acelerando su patrón de descarga con la estimulación del cervix uterino, disminuyen progresivamente después de la inyección de P, lo cual demuestra una disminución de la excitabilidad como efecto de la progesterona.

El efecto sincronizador de la P sobre el electroencefalograma (EEG) ha sido demostrado en el gato (Kobayashi, Kobayashi, Takesawa, Oshima y Kawamura, 1962; Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976), el conejo (Kawakami y Sawyer, 1959; Beyer, Ramirez, Whitmoyer y Sawyer, 1967) y la rata (Beyer,

Ramirez, Whitmoyer y Sawyer, 1967). Asimismo, se ha demostrado que la P produce inhibición de la actividad neuronal en el diencéfalo de la rata (Barraclough y Cross, 1963; Komisaruk, McDonald, Whitmoyer y Sawyer, 1967; Lincoln, 1969).

Los estudios electroencefalográficos han corroborado la observación de que los compuestos reducidos en la posición 5 de la P, sobre todo los 5 $\beta$ , son más potentes que su precursor para sincronizar la actividad eléctrica cerebral. Así, Gyermek (1967) y Gyermek, Genter y Fleming (1967), demostraron que la 5 $\beta$ -pregnandiona, la epipregnanolona y el 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol no sólo son más potentes que la P sino incluso que el fenobarbital o el pentobarbital. A este conjunto de compuestos y otros que se agregaron, i.e. 20 $\alpha$ -OH-P, 20 $\beta$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona (20 $\beta$ -hidroxi-pregnenona, 20 $\beta$ -OH-P), 5 $\alpha$ -pregnandiona, 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (alopregnanolona), les estudiamos en gatos flaxedilizados (Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976) su capacidad para modificar el patrón eléctrico de diferentes áreas cerebrales, así como su efecto sobre la actividad multiunitaria (AMU). Los resultados mostraron que la administración de progestinas induce la aparición de ondas lentas de alto voltaje generalmente en forma de husos, además de

una caída en la AMU (Fig. 1). Los compuestos más eficaces (epipregnanolona y pregnandiona), produjeron descargas intermitentes de espigas acompañadas de una disminución importante de la AMU (Fig. 2). Un hallazgo consistente fué que los compuestos reducidos en 5 $\beta$  fueron mucho más efectivos que los compuestos 4-pregnen y que los reducidos en 5 $\alpha$ . De hecho los 5 $\alpha$  fueron prácticamente inactivos (Fig. 3).

Otra característica de los compuestos más potentes (5 $\beta$ ) fué su corta latencia de acción (Tabla I) y su efecto bien definido temporalmente.

El análisis de la AMU del efecto de la progestina más eficaz (epipregnanolona) en la formación reticular mesencefálica, demostró que hay una caída brusca de la frecuencia de disparo neuronal. Sin embargo, en el hipocampo se observó un efecto bifásico, es decir, un aumento de la AMU con dosis bajas y una disminución con dosis altas. El hipotálamo (núcleo ventro mediano) fué poco afectado por la acción de la progestina, véase Fig. 4.

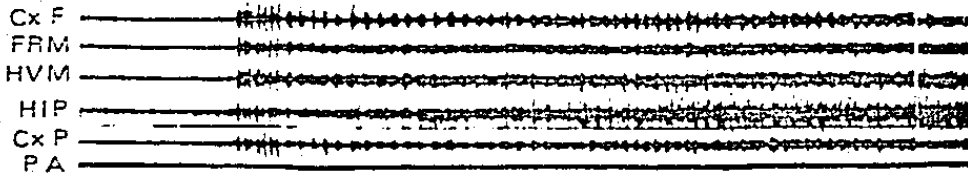
En un intento por localizar el sitio o sitios de la acción depresora de los metabolitos de la P, se utilizó una preparación "cerveau isolé" (Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976) y se administró epipregnanolona. Se observó que esta progestina

deprime la actividad neuronal en aquellas estructuras localizadas rostralmente al corte intercunicular (hipotálamo e hipocampo). Sin embargo no se incrementa la sincronización existente en la corteza cerebral propia de la preparación, lo cual sugiere un efecto predominante en estructuras límbicas.

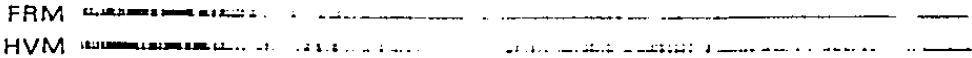


EPIPREGNANOLONA

1mg / Kg

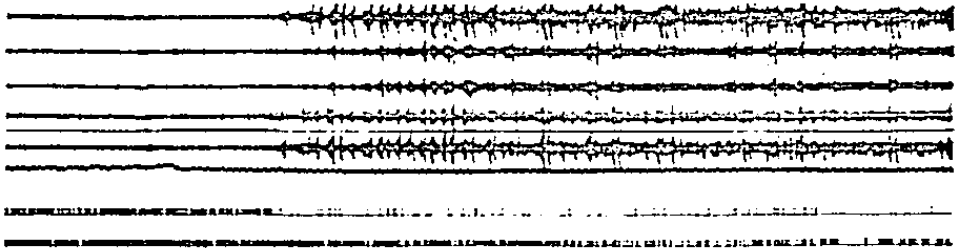


A  
M  
U



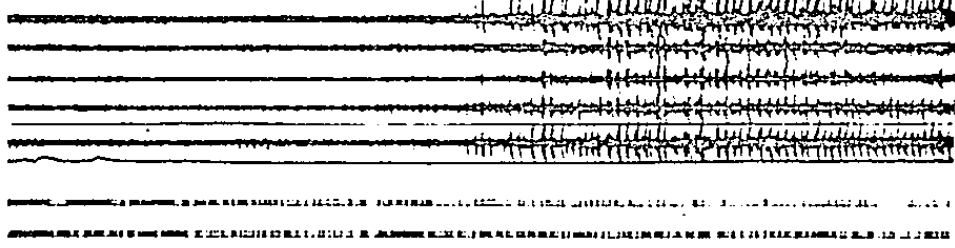
PREGNANDIONA

1mg / Kg



ALOPREGNANOLONA

5mg / Kg



PROGESTERONA

50 mg / Kg

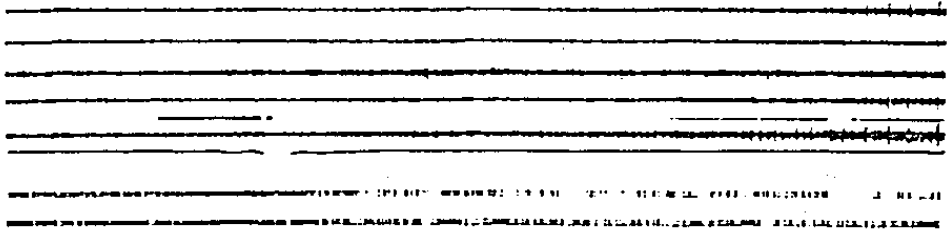
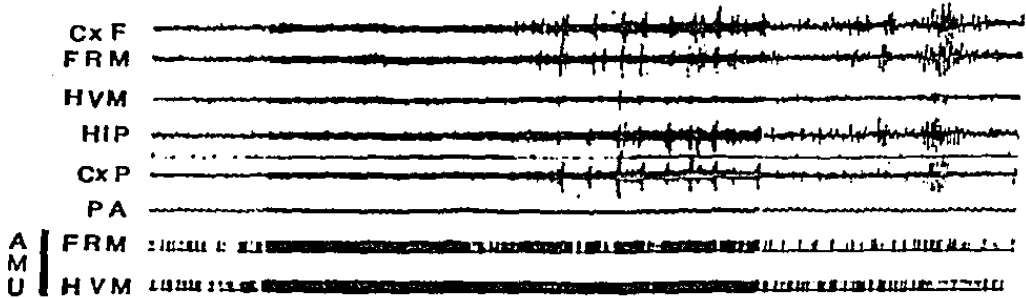


FIGURA 1. Sincronización electroencefalográfica y cambios en la actividad multi-unitaria inducidos por algunas progestinas. Obsérvense los trenes de actividad sincrónica sobre áreas cerebrales como corteza (CxF, CxP) formación reticular mesencefálica (FRM), hipotálamo ventromediano (HVM) e hipocampo (HIP) y la disminución de la activiada multi-unitaria. Nótese la diferencia de dosis de la progesterona con respecto a sus metabolitos para producir el efecto. La pequeña barra negra (trazo 5) representa el tiempo de inyección (1 min.). Tomado de Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976.

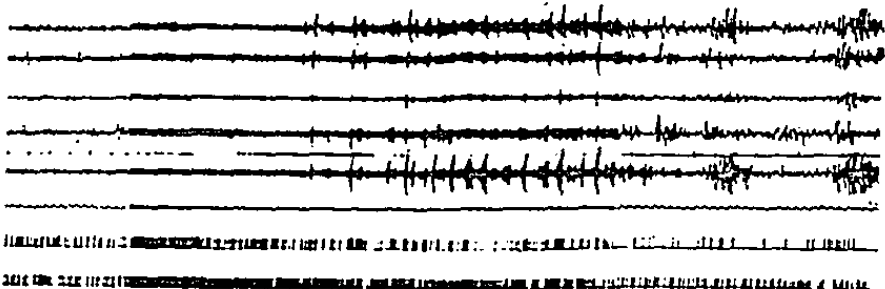
FIGURA 2. Cambios eléctricos cerebrales producidos por 3 dosis crecientes de epipregnanolona (la progestina más potente). Nótese la caída de la actividad multi-unitaria en el hipotálamo ventromediano y la formación reticular mesencefálica, esta caída precede aparición de los husos en las dosis bajas y las espigas producidas por las dosis altas. Tomado de Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976.

# EPIPREGNANOLONA

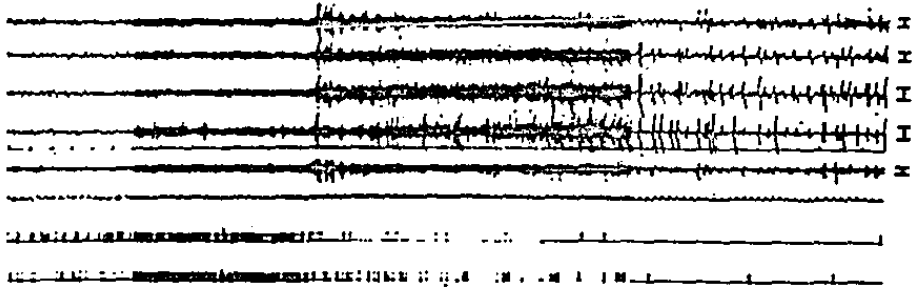
.1 mg/Kg



.25 mg/Kg



2.5 mg/Kg



60 SEG

5 SEG

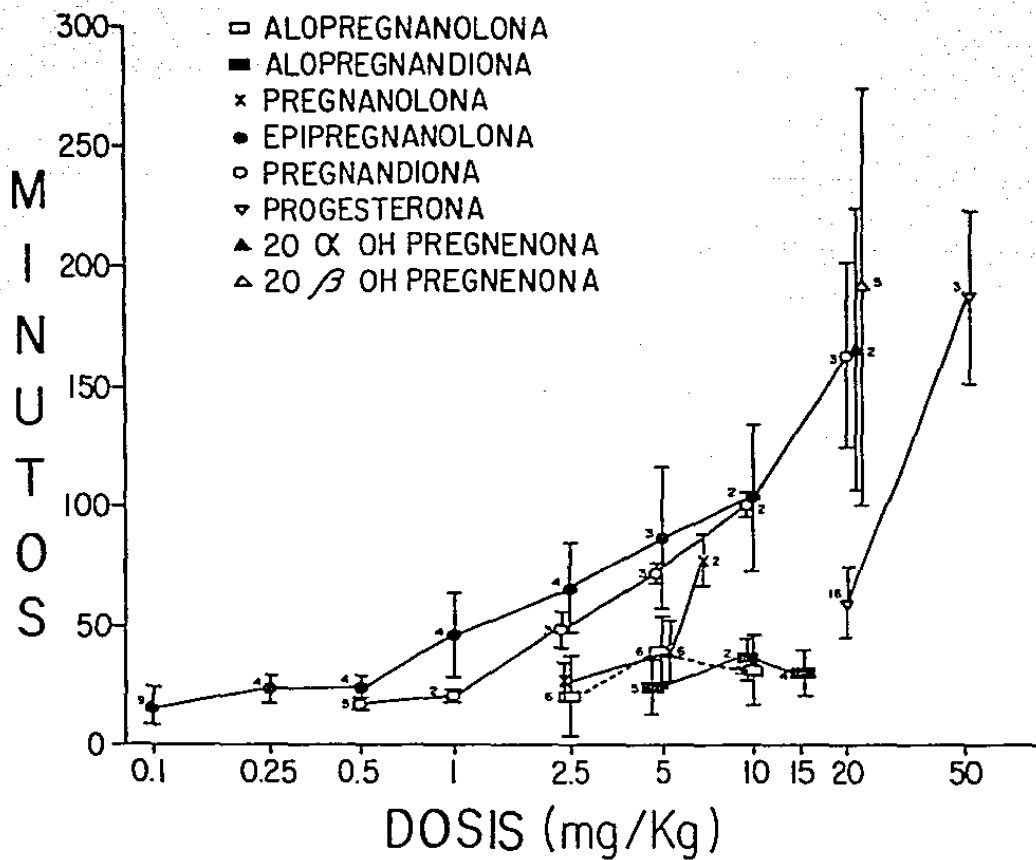


FIGURA 3. Curvas del efecto de diversas progestinas 5 $\alpha$  y 5 $\beta$  reducidas sobre la actividad eléctrica cerebral. En las ordenadas se marca la duración del efecto en minutos, mientras que las abscisas corresponden a la dosis. Nótese las dosis menores para los compuestos 5 $\beta$ . Tomado de Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976.


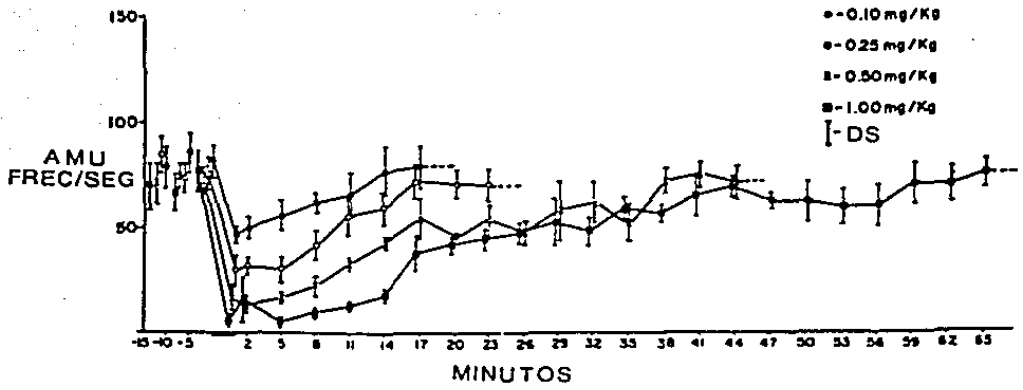
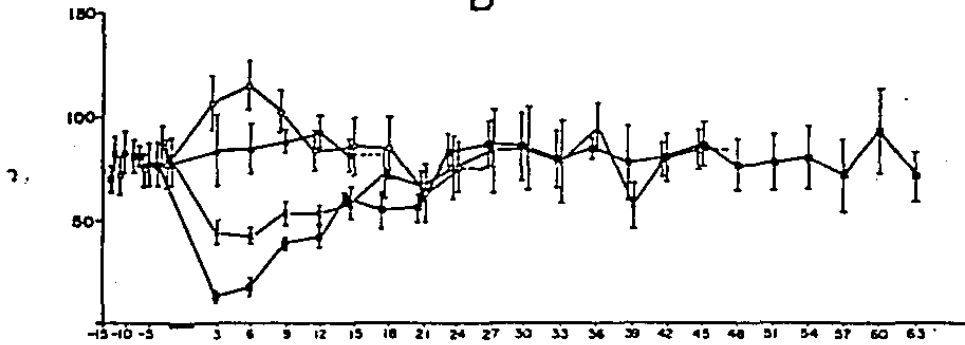


FIGURA 4. Efectos de la epipregnanolona sobre la actividad multi-unitaria (AMU). Obsérvese la caída significativa en la formación reticular mesencefálica (A), así como el efecto bifásico en el hipocampo (B) y la casi ausencia de efecto en el hipotálamo (C). Las barras negras indican el período de inyección. Tomado de Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976.

A



B



C

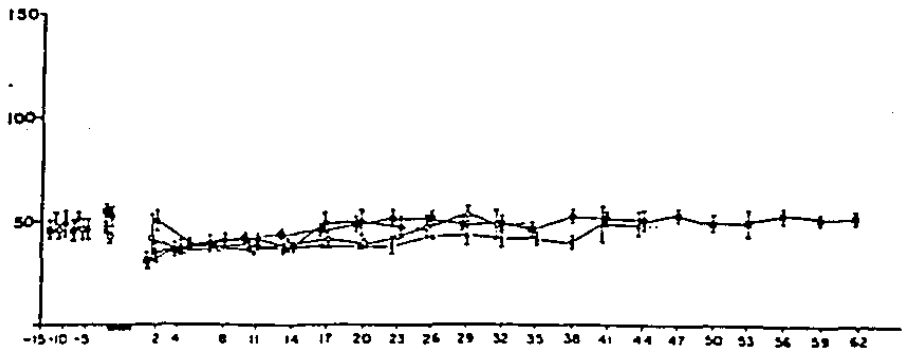


TABLA I. Latencias (seg) del efecto de las progestinas sobre la sincronización electroencefalográfica.

Dosis mg/ml	Progesterona	20 $\alpha$ -OH-P	20 $\beta$ -OHP	5 $\beta$ -pregnan- diona	5 $\alpha$ -pregnan- diona	Epipreg- nanolona	Pregnano- lona	Allopreg- nanolona
0.10	-	-	-	-	-	38 17-48(9)	-	-
0.25	-	-	-	-	-	27 16-37(5)	-	-
0.50	-	-	-	71*60-90(6)	-	28 20-48(5)	-	-
1.0	-	-	-	48 35-75(6)	-	23 18-30(5)	-	-
2.5	-	-	-	52*37-70(4)	-	21 17-28(5)	107**58-180(4)	111* 60-162(4)
5.0	-	-	-	40*36-45(4)	-	24 22-25(4)	193**72-190(6)	160*120-300(4)
10.0	-	-	-	38 30-48(5)	92*35-150(4)	35 32-38(4)	91 42-140(2)	147*100-170(3)
15.0	-	-	-	-	116 75-190(4)	-	-	-
20.0	130 79-220(8)	337 305-360	293 180-480	40 33-48(3)	-	-	-	-
50.0	305 280-330(4)	-	-	-	-	-	-	-

Promedios y Rangos. Las figuras entre paréntesis indican el número de pruebas. Las comparaciones estadísticas de las latencias fueron hechas de epipregnanolona versus todas las progestinas 5-reducidas. Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. Tomado de Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976.

\* P < 0.05

\*\* P < 0.01



## ESTROGENOS, PROGESTERONA Y CONDUCTA SEXUAL.

Existen muchas evidencias acerca de la acción sinérgica de la P para facilitar la receptividad sexual en la rata estrogenizada. Los datos de Schwartz y Talley (1965) y Powers (1970) demuestran que el aumento endógeno de niveles de progesterona poco antes del estro es crítica para la aparición de la respuesta de lordosis y que el efecto de la hormona puede ser mimetizado por la administración de progesterona exógena. Aunque los estrógenos pueden por sí mismos, en dosis altas, producir conducta estral (Green, Luttge y Whalen, 1970), el esquema de tratamiento óptimo es la inyección de estrógenos (E) seguido uno o dos días después por progesterona (Beach, 1942; Green, Luttge y Whalen, 1970).

Algunos hallazgos sugieren que los efectos neuronales de la P tienen un mecanismo diferente al de los estrógenos en la inducción de la conducta estral, ya que la inducción de conducta sexual femenina por estrógenos requiere un período de cuando menos de 16 horas (Green, Luttge y Whalen, 1970). La progesterona administrada intravenosamente o implantada intracerebralmente a ratas previamente estrogenizadas, puede inducir lordosis dentro de un período de 15

minutos (Lisk, 1969; Ross, Claybaugh, Clemens y Gorski, 1971; Meyerson, 1972; Kubli-Garfias y Whalen, 1977). Por lo tanto, parece poco probable que el efecto conductual casi inmediato de la P requiera de un mecanismo que involucre la translocación de un receptor citoplasmático al núcleo y altere la expresión genética, resultando finalmente en una síntesis de proteínas, como es aparentemente el caso de los estrógenos. Más aún, se ha demostrado que el sustrato neural para inducir la conducta sexual con implantes de estrógenos solos es el hipotálamo anterior, extendiéndose rostralmente hacia la banda diagonal de Broca, mientras que la zona cerebral para producir el mismo efecto con P en ratas estrogenizadas es la formación reticular mesencefálica (Ross, Claybaugh, Clemens y Gorski, 1971).

A pesar de que la rata ha demostrado ser un buen modelo experimental para el estudio de las bases neurales del efecto de E y P sobre la conducta sexual, existen diferencias de especies que hacen más complejo el estudio. A este respecto se sabe, por ejemplo, que la hembra hamster ovariectomizada solo presenta lordosis si es tratada con el binomio secuencial de E y P (Lisk, 1969; Martin, comunicación personal). En la cobaya el estro se presenta con un intervalo de 2 a 3

semanas y con una duración de 4 a 5 días. Después de la ovulación se forma el cuerpo lúteo en esta especie secretándose grandes cantidades de progesterona (Feder, Resko y Goy, 1966). Al igual que en la rata hay un aumento de la P poco antes del estro, pero además existe un incremento de P dos días después del estro el cual permanece estable hasta alrededor del día 15. Goy, Phoenix y Young (1966) probaron la respuesta conductual sexual en esta especie a la administración secuencial de E y P a diferentes tiempos durante el ciclo estral. Aunque la cobaya ovariectomizada muestra conducta estral como respuesta a la administración secuencial de E y P, este tratamiento es inefectivo durante la fase lútea del ciclo. Esto demuestra que existe una inhibición de la respuesta conductual a la administración exógena de hormonas, lo cual sugiere la posibilidad de una acción bifásica de la progesterona en esta especie. La acción inhibitoria de la P ha sido verificada por Zucker (1966, 1968) y Zucker y Goy (1967). Un tipo similar de acción bifásica ha sido demostrada en el ratón (Edwards, 1970) y en el hamster (Ciaccio y Lisk, 1967 y 1971 a,b; Lisk, 1969). Por lo anterior se podría pensar que en estas especies la progesterona controla la duración de la conducta receptiva durante el ciclo

estral.

Si se explora el efecto de los metabolitos de la P sobre la conducta sexual, siguiendo el camino de la  $5\alpha$  reducción hacia la  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -pregnan-20-ona y el  $5\alpha$ -pregnane- $3\alpha,20\alpha$ -diol se observa una disminución progresiva de la potencia para producir el despliegue de la conducta sexual en las ratas estrogenizadas (Meyerson, 1967; Whalen y Gorzalka, 1972; Gorzalka y Whalen, 1974; Kubli-Garfias y Whalen, 1977). La  $5\alpha$ -pregnandiona es una excepción ya que no presenta ningún efecto (Fig. 5). A pesar de que los metabolitos  $5\alpha$ -reducidos son menos potente que la P, podrían sin embargo interactuar con la P para producir esta acción.

Con respecto a la inducción de conducta sexual la vía metabólica de la P hacia  $20\alpha$ -OH-P podría ser más importante que la  $5\alpha$ -reducción ya que ratas tratadas previamente con  $5\mu\text{g}$  de estradiol responden a la prueba conductual más rápidamente con la inyección intravenosa de  $20\alpha$ -OH-P que con progesterona (Kubli-Garfias y Whalen, 1977). Más aún, la  $20\alpha$ -OH-P tiene una latencia menor que la P, aunque la respuesta máxima de este compuesto es menor que el efecto de la P (Fig. 6). El hallazgo de que la  $20\alpha$ -OH-P es más efectiva que la P, contrasta con los reportes previos

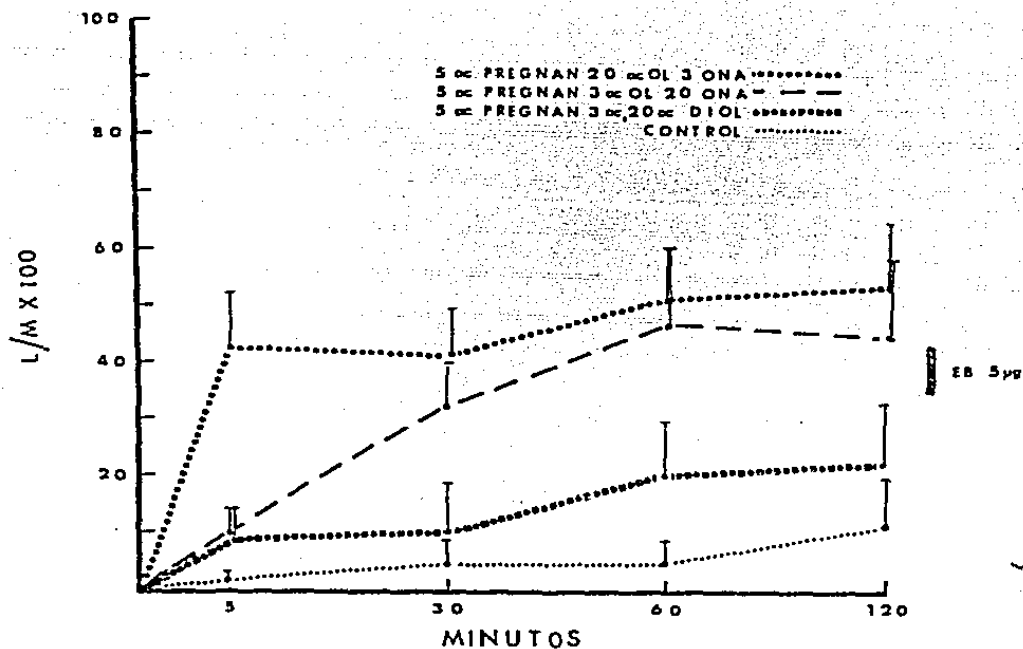


FIGURA 5. Cambios temporales en la conducta de lordosis despues de la inyeccion intravenosa de varias progesterinas o propilen glicol. Las ratas recibieron 5 ug de estradiol y 200 ug de cada progesterina. Se tomo el cociente de lordosis-monta como indice de respuesta. Tomado de Kubli-Garfias y Whalen 1977.

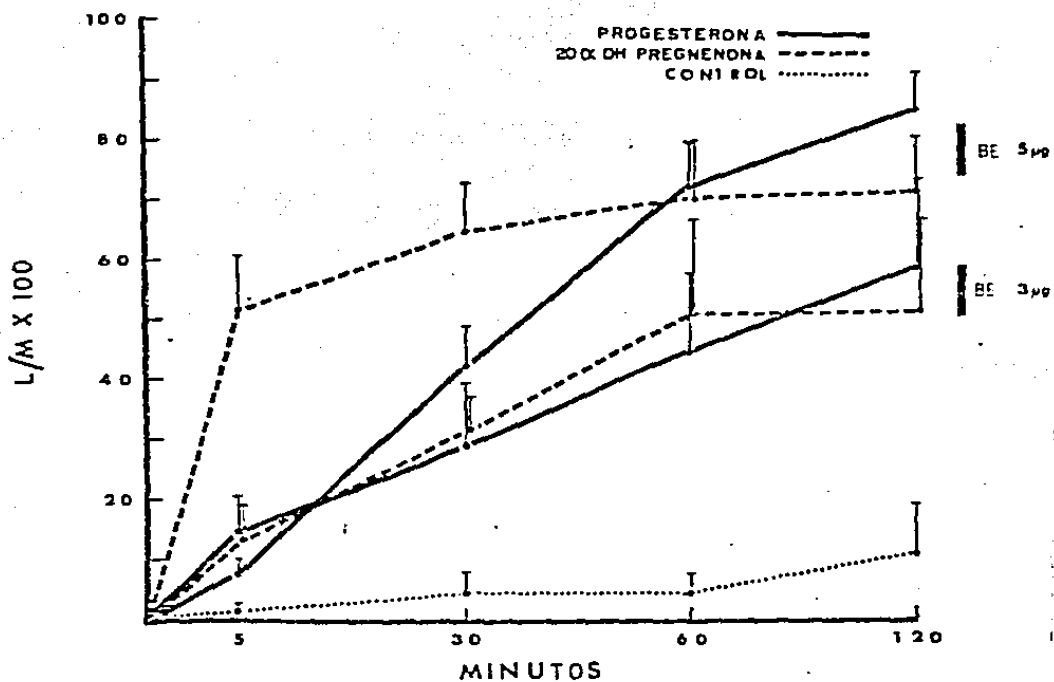


FIGURA 6. Cambios temporales en la conducta de lordosis después de la inyección intravenosa de progesterona o 20 $\alpha$ -OH-pregnenona. Las ratas recibieron 3 o 5  $\mu$ g de benzoato de estradiol (BE marcado con barra negra) y 200  $\mu$ g de progesterona o 20 $\alpha$ -hidroxi-pregnenona. La respuesta fue medida como cociente lordosis-monta (L/M). Tomado de Kubli-Garfias y Whalen 1977.

de Langford y Hilliard (1957), Zucker (1967), Meyerson (1972), Whalen y Gorzalka (1972) y Henrik y Gerall (1976) quienes reportaron a este compuesto como inefectivo. Con la excepción de Meyerson todos inyectaron la 20 $\alpha$ -OH-P por vía subcutánea sin ningún éxito. Aunque Langford y Hilliard (1967) observaron que en algunos casos la 20 $\alpha$ -OH-P induce receptividad sexual poco después de la inyección. El hecho de que la 20 $\alpha$ -OH-P sea muy efectiva para producir el despliegue de la conducta sexual cuando es inyectada por vía intravenosa, hace pensar en la posibilidad de que su vida media es muy corta y que posiblemente el efecto de la P sea incrementado por su biotransformación gradual y sostenida hacia esta progestina.

#### EL CONCEPTO DE "PREHORMONA" Y LA IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS DE LA PROGESTERONA.

Fue Emmens (1941) quien postuló el concepto de "prohormona" definiéndolo como "una sustancia que ejerce su efecto biológico a través de una conversión periférica a un compuesto más activo".

Con el hallazgo de Baulieu (1970) de que la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, un derivado de la

testosterona, tiene efectos definidos sobre la próstata, se retomó este concepto de prohormona. Sin embargo en 1968, Baird, Horton, Longcope y Tait propusieron el concepto de "prehormona" el cual es más amplio y que se define como sigue: una prehormona es una substancia normalmente presente en el organismo y usualmente secretada por glándulas endócrinas, las cuales tienen poca o ninguna potencia biológica por sí mismas pero que son convertidas periféricamente a compuestos más activos y que contribuyen significativamente al efecto biológico total.

La importancia biológica de los metabolitos de la progesterona la hemos destacado en nuestros trabajos de conducta sexual en la rata (Kubli-Garfias y Whalen, 1977) y en nuestros trabajos sobre el efecto relajante de estos compuestos sobre la actividad uterina (Kubli-Garfias, Medrano-Conde, Beyer y Bondani, 1979). En el miometrio, que es un tejido excitable y órgano blanco de esteroides, los metabolitos 5 $\beta$ -reducidos de la progesterona producen una marcada inhibición de la actividad espontánea in vitro del útero de la rata. Interesantemente, al igual que en el sistema nervioso central los compuestos 5 $\alpha$ -reducidos resultan prácticamente ineficaces para producir algún efecto excepto la 3 $\alpha$ -hidroxi-



5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (Tabla II).

Contrariamente, en el despliegue de la conducta sexual los derivados 5 $\alpha$ -reducidos parecen ser los más eficaces. Lo mismo sucede en el control de gonadotrofinas (Karavolas y Nuti, 1976). Esto sugiere que los mecanismos para deprimir la excitabilidad son diferentes a los de las otras acciones biológicas.

Por otra parte, es bien conocido que durante el ciclo estral el ovario no solo produce grandes cantidades de P, sino 20 $\alpha$ -OH-P y compuestos reducidos en posición 5 e.g. alopregnanolona, 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona y 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -diol. Los rangos de aumento de estos compuestos van desde 140 hasta 365% (Holzbauer, 1971). Esta evidencia es quizá una de las más importantes, ya que muestra una abundante y variada producción de metabolitos, algunos de ellos con comprobada acción biológica.

En conclusión se podría decir utilizando el criterio de prehormona y conociendo que la progesterona produce efectos genómicos y no-genómicos tales como cambios en la excitabilidad cerebral, regulación de gonadotrofinas, ovulación, lactación y conducta sexual, entre otras, y que dá origen a metabolitos biológicamente activos, los cuales en ocasiones resultan más eficaces que su precursor, se

Tabla II Potencia inhibitoria de las progestinas sobre la contractilidad uterina de la rata

COMPUESTO	DE <sub>50</sub> *	LIMITES	PENDIENTE	POTENCIA
Progesterona	8.0	3.8-16.6	5.3	1.00
20 $\alpha$ -OHP	16.0	4.9-52.1	4.3	0.50
Alopregnandiona	200.0**			
5 $\alpha$ -androstandiona	250.0**			
3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona	10.5	3.5-31.1	5.7	0.76
Alopregnanolona	400.0**			
Pregnanolona	2.3	1.3-3.4	3.4	3.47
Pregnandiona	3.8	2.3-6.3	3.6	2.10
Epi-pregnanolona	5.2	2.1-13.0	3.7	1.53

\* Dosis Efectiva 50

\*\* Valores teóricos.

Valores obtenidos a través del método de Litchfield y Wilcoxon. Las progestinas utilizados fueron comparados con la progesterona por medio de la fórmula  $DE_{50}/DE_{50}$ . Los valores teóricos fueron calculados por medio de la extrapolación de la recta obtenida. (Tomada de Kubli-Garfias, Medrano-Conde, Beyer y Bondani, 1979).

justifica cuando menos en estos casos llamarle prehormona a la progesterona.

#### MECANISMO DE ACCION Y RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD

La progesterona por su estructura química posee entre sus propiedades físico-químicas la de ser liposoluble. Esto permite pensar que su difusión a través de la membrana hacia el interior de la célula no presente ninguna barrera; de hecho esto sucede en el oviducto de pollo (O'Malley, Sherman y Toft, 1970). Asimismo, la demostración de la existencia de receptores específicos a la P en el SNC (Leavitt, 1976; Kato y Onuchi, 1977; Moguilewski y Raynaud, 1977; MacLusky y McEwen, 1978; Blaustein y Feder, 1979) hacen pensar en un efecto sobre el núcleo celular. Así, la P se comportaría como cualquier otra hormona esteroide, es decir: atraviesa la membrana celular, se une a un receptor en el citoplasma, el complejo hormona-receptor es translocado al núcleo celular, en el núcleo se une a un sitio aceptor en la cromatina y altera la transcripción genética induciendo la síntesis protéica.

A pesar de que la P actúa en el núcleo celular, existen evidencias de que hay un efecto directo sobre

la membrana celular. Se sabe, por ejemplo, que en el músculo uterino la P inhibe la contractilidad actuando a nivel membranal (Csapo y Takeda, 1965). En nuestros experimentos *in vitro* con progestinas sobre la actividad contráctil del útero, se observó sistemáticamente que al lavar con Ringer el tejido que estaba bajo la influencia del esteroide se recuperaba rápidamente (Kubli-Garfias, Medrano-Conde, Beyer y Bondani, 1979). Esta recuperación puede ser debida a la imposibilidad de la P para salir de la célula a pesar de su gran coeficiente en la relación lípido/agua, ya que existen receptores que captan este compuesto intracelularmente.

En el SNC hay evidencias indirectas de que las progestinas deprimen la actividad neuronal produciendo estabilización membranal (Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976). Esta aseveración está basada en la marcada correlación entre el efecto de pérdida de la conciencia y la sincronización electroencefalográfica con disminución de la actividad neuronal producido por las progestinas y su capacidad para producir estabilización membranal en varios sistemas celulares (Seeman, 1966 y 1972).

El hecho de que en ambos tejidos i.e. tejido neural y miometrio, las progestinas más activas fueran

las 5 $\alpha$ -reducidas y que en ambos casos su efecto fuera una disminución en la excitabilidad, hace pensar que posiblemente el mecanismo de acción sea a través de interferir con la permeabilidad a los iones, lo cual modificaría la excitabilidad. A este respecto, datos obtenidos en nuestro laboratorio (Kubli-Garfias, Ponce-Monter, Medrano-Conde, López-Fiesco y Bondani, 1982) sugieren que cuando menos en el útero los derivados 5 $\beta$  de la progesterona actúan inhibiendo la contractilidad modificando los sitios de afinidad del influjo de calcio, probablemente a través de un antagonismo mixto entre el esteroide y el ión.

Para discutir la relación estructura-actividad es necesario recurrir a otra familia de esteroides, los andrógenos, que han demostrado tener un efecto depresor de la excitabilidad similar al de las progestinas, tanto en sistema nervioso como en útero (Kubli-Garfias, Canchola, Arauz-Contreras y Feria, enviado a publicación; Kubli-Garfias, López-Fiesco, Pacheco-Cano, Ponce-Monter y Bondani, 1980).

A este respecto hemos demostrado en ambos tejidos que compuestos que tienen el sistema 4-en-3-ona, como la testosterona, la androstendiona, la P y la 20 $\alpha$ -OH-P son inhibidores débiles. La dehidroepiandrosterona, que tiene una doble ligadura

en posición 5, es también un inhibidor débil.

Si la conformación de la unión de los anillos A y B es trans (5 $\alpha$ ) con un grupo 3-ceto, como en la 5 $\alpha$ -androstandiona, la 5 $\alpha$ -DHT y la 5 $\alpha$ -pregnandiona, el efecto inhibitorio desaparece casi por completo. Asimismo, si existe un grupo 3 $\beta$ -hidroxilo ocurre un importante descenso en la potencia, como es el caso de la epiandrosterona, el 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol y la alopregnanolona. Sin embargo un radical 3 $\alpha$ -hidroxi produce un incremento marcado en la potencia, por ejemplo androsterona, androstandiol y la 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona.

Generalmente las progestinas son inhibidores más potentes que los andrógenos, siendo esto más evidente cuando se comparan compuestos 5 $\beta$ . Así, la epipregnanolona es varias veces más potente que la etiocolanolona. De igual manera la pregnanolona es más activa que la epietiocolanolona y la 5 $\beta$ -pregnandiona es más potente que la 5 $\beta$ -androstandiona o la 5 $\beta$ -dihidrotestosterona. Esta notable diferencia en cuanto a la capacidad inhibitoria entre compuestos que tienen la misma estructura en el anillo A, parece depender de la cadena lateral del C-17. Además en el C-20 debe haber un grupo cetónico, como lo demuestra la falta de potencia de la 20 $\alpha$ -OH-P y el

5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol.

Los hallazgos anteriores concuerdan con la hipótesis propuesta por Willmer (1961), quien enfatizó la importancia de los grupos de los carbonos 3 y 17 para la acción fisiológica de los esteroides. Además de esto, pensamos que el anillo A es también importante para la acción biológica, ya que los esteroides con unión A/B trans son inhibidores más débiles que compuestos con la conformación cis A/B. Este incremento en la potencia puede deberse a el ángulo que forma el anillo A con el anillo B en la conformación 5 $\beta$  (cis). Este cambio probablemente permite al anillo A interactuar con la membrana celular de una manera diferente que su epímero trans (Fig. 7).

#### POSTULACION DE UN CODIGO.

Sin la introducción de oxidaciones funcionales adicionales, hay esencialmente 20 metabolitos posibles de la progesterona. Un esquema general que ilustra las vías metabólicas reductivas en el metabolismo de la P se muestra en la figura 8.

Con la posibilidad anterior y la variedad de efectos mencionados a lo largo de este trabajo, se

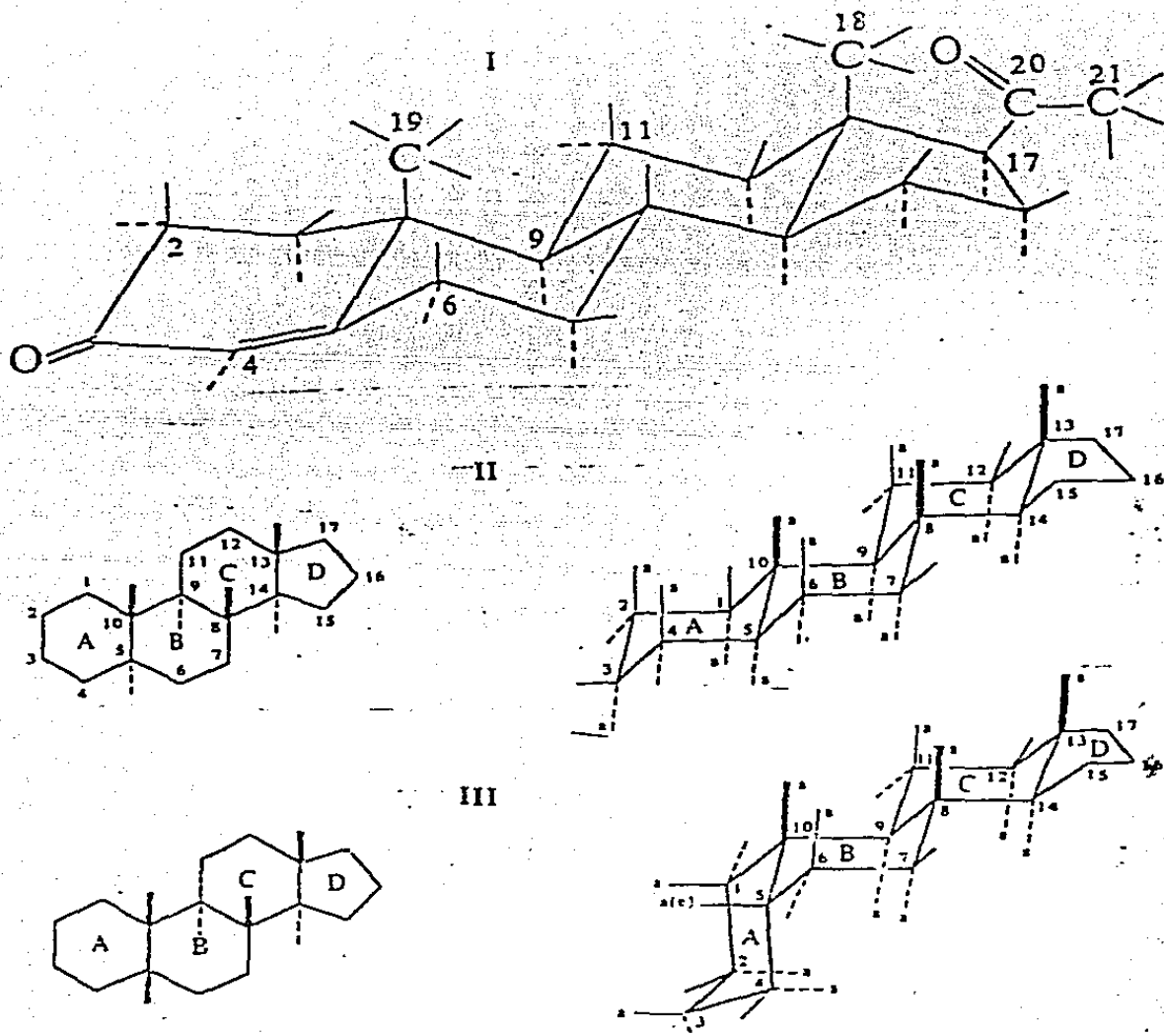


FIGURA 7. I Estructura estereoquímica de la progesterona. II y III representan dos compuestos  $5\alpha$  y  $5\beta$  androstano. A la izquierda se presenta la forma convencional y a la derecha se representa la molécula con los hidrógenos en su posición natural. Nótese la diferencia en los tres compuestos de la conformación del anillo "A". En I el anillo pierde su planaridad por la doble ligadura en posición 4. En II se observa la unión trans de los anillos A y B y la planaridad de la molécula y en III la unión de los anillos A y B es de tipo cis formándose como consecuencia un ángulo muy pronunciado. Tomado de Briggs y Brotherton (1970).



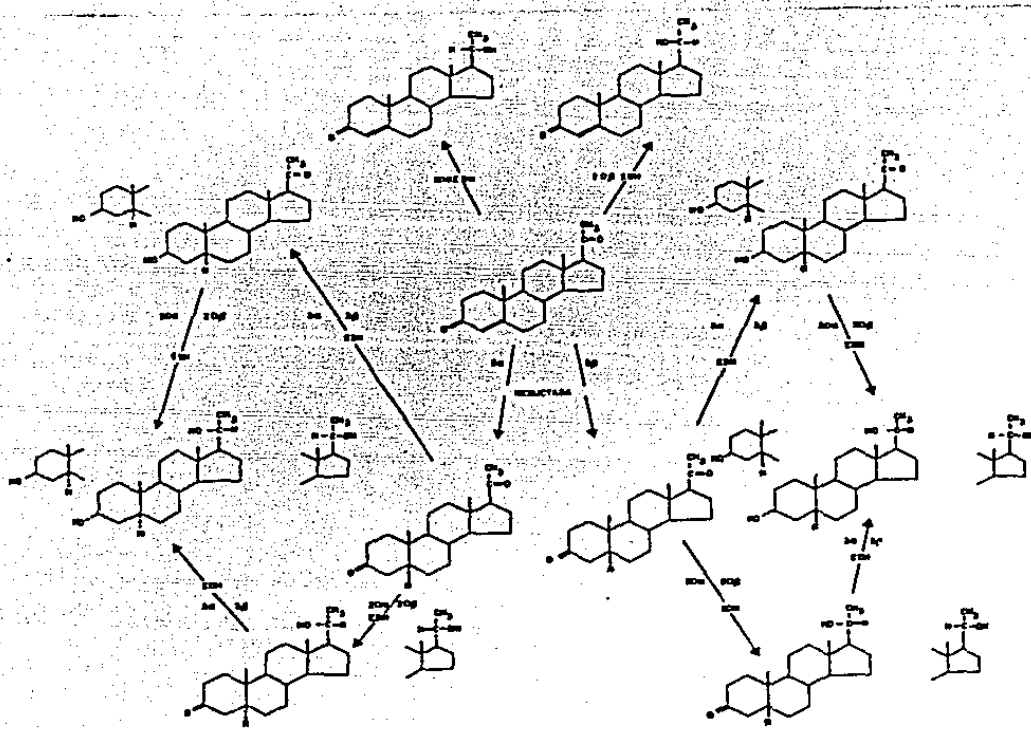


FIGURA 8. Diferentes vías metabólicas de la progesterona (centro). Nótese las vías 5 $\alpha$  y 5 $\beta$  a través de la acción de reductasas. Asimismo obsérvese la participación de las Esteroido-deshidrogenasas (EDH) en la 3 $\alpha$ , 3 $\beta$  y la 20 $\alpha$ , 20 $\beta$  hidroxilaciones.

antoja postular la posibilidad de que los metabolitos no son solo desechos orgánicos productos de la acción y descomposición de sus precursores, sino que son verdaderos engranes de una maquinaria adecuadamente calibrada.

Si se considera que cada uno de los compuestos derivados de la progesterona es el producto de pasos metabólicos bien definidos y que estos compuestos no se producen al azar y que además se van produciendo en cadena con una secuencia temporal que depende de acciones enzimáticas, el resultado sería la producción de distintos compuestos a diferentes tiempos y posiblemente en diferentes lugares. Esta situación podría ser equiparable a un codificador que generaría y enviaría señales específicas en este caso los metabolitos que se distinguen por sus diferentes radicales químicos como señales diferentes. Estas señales solo podrían ser reconocidas por las células blanco y en tiempos determinados es decir cuando existiera un receptor específico y que éste no estuviera ocupado. De esta manera es posible pensar en una acción coordinada entre el codificador, las señales y el decodificador. Más aún el decodificador en estas circunstancias mandaría también señales específicas al codificador notificándole el estado del

flujo de la información. Este modelo de generación y reconocimiento de señales biológicas puede ser aplicado a cualquier otra familia de hormonas. La dimensión de las señales estaría dada por sus propios parámetros de producción y acción y serían: número, es decir cantidad de moléculas de P transformada a ese determinado metabolito, tiempo, o sea el momento en que se produce y su vida media o subsecuente biotransformación, espacio, es decir el lugar en que se produce y lugar donde actúa, especificidad, dada por la estructura química o tipo de radical o señal y reconocimiento específico por la célula blanco.

Con este modelo heurístico sería posible correlacionar en el tiempo y en el espacio acciones hormonales tan aparentemente lejanas como es la modificación en la excitabilidad cerebral con cambios en la conducta sexual, por mencionar solo un ejemplo.

Para lograr el objetivo de decodificar la importancia fisiológica de la progesterona y sus metabolitos en el sistema nervioso central, se ha seguido la estrategia de conocer primero sus efectos, y utilizar los metabolitos inmediatos de la progesterona en varios sistemas biológicos donde se sabe actúa la progesterona. Sin embargo, hace falta conocer mejor los perfiles metabólicos de esta hormona

en el tejido nervioso; conocer específicamente la magnitud y el tipo de efecto de cada metabolito la relación de su estructura química con su actividad biológica y/o sus posibilidades sinérgicas o de interacción con otras sustancias endógenas e.g. neurotransmisores, endorfinas etc.; las estructuras nerviosas que afecta y de qué manera, así como su relación temporal con otros eventos concatenados. De esta manera al aumentar los conocimientos acerca de la importancia fisiológica de estos compuestos se obtendría en forma paralela un modelo de acción de hormonas aplicable a otras familias de sustancias biológicas así como una mayor información sobre el funcionamiento del sistema nervioso central.

APENDICE 1

NOMBRES DE LOS ESTEROIDES MENCIONADOS

NOMBRE COMUN	NOMBRE SISTEMICO (IUPAC 1968)
<b>ANDROGENOS:</b>	
Testosterona	17 $\beta$ -hidroxi-4-androsten-3-ona
DHEA, dehidroepiandrosterona	3 $\beta$ -hidroxi-5-androsten-17-ona
Androstenediona	4-androsten-3,17-diona
5 $\alpha$ -DHT, 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona	17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona
5 $\alpha$ -androstandiona	5 $\alpha$ -androstan-3,17-diona
Androsterona	3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona
Androstandiol	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol
5 $\beta$ -androstandiona	5 $\beta$ -androstan-3,17-diona
Etiocolanolona	3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -androstan-17-ona
5 $\beta$ -DHT, 5 $\beta$ -dihidrotestosterona	17 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -androstan-3-ona
Epi-eticolanolona	3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -androstan-17-ona
<b>PROGESTINAS:</b>	
Progesterona, P	4-pregnen-3,20-diona
20 $\alpha$ -hidroxipregnenona, 20 $\alpha$ -OH-P	20 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona
20 $\beta$ -hidroxipregnenona, 20 $\beta$ -OH-P	20 $\beta$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona
Alopregnandiona	5 $\alpha$ -pregnan-3,20-diona
S/N	3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona
Alopregnanolona	3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona
S/N	5 $\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ ,20 $\beta$ -diol
Pregnandiona	5 $\beta$ -pregnan-3,20-diona
Epipregnanolona	3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona
Pregnanolona	3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona
Pregnandiol	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol

## APENDICE 2

### TECNICA UTILIZADA EN LOS EXPERIMENTOS DE REGISTRO DE LA ACTIVIDAD UTERINA *in vitro*.

Se utilizaron ratas hembras vírgenes, albinas adultas de la cepa Sprague Dawley de noventa días de edad, con un peso entre 180 y 200 gramos. En un cuarto especial los animales fueron mantenidos en cajas de poliuretano en grupos de cinco. La temperatura ambiente fué regulada entre 21 y 22°C y con períodos de luz-obscuridad de 14 y 10 horas respectivamente. El alimento consistió en comida especial para roedores marca Purina y agua filtrada para beber *ad libitum*.

Después de un período de adaptación de dos semanas, se estudió el ciclo estral a todos los animales. Se tomaron frotis vaginales diariamente con solución salina al 0.9%. Las muestras fueron colocadas en portaobjetos numerados y observados en un microscopio de contraste de fases. En base a las características histológicas del frotis se hizo la clasificación de la fase del ciclo estral de acuerdo con el método descrito por Long y Evans (1922). Solo se utilizaron ratas que tuvieran ciclos normales. Todos los experimentos fueron hechos en la fase de

diestro.

Después de sacrificar al animal se extrajeron ambos cuernos uterinos, colocándolos en una caja de Petri con solución de tris buffer a temperatura ambiente. Los úteros se separaron y dividieron en anillos de aproximadamente un centímetro de largo.

Los tejidos fueron atados con un hilo en cada extremo, introducidos en una camisa de jeringa de 10 ml y colocados en cámaras de vidrio de pared doble por las que circula agua a 37°C. El hilo que emerge de la boca de la jeringa se amarra a un transductor Grass FT .03 para sensar las contracciones que se enviarán al polígrafo.

Una vez que los tejidos se encuentran en las cámaras se agregan 5 ml de tris buffer que contiene: NaCl 115 mM, KCl 4.7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, glucosa 50 mM, tris (hidroximetil) aminometano 50 mM y con un pH de 7.4 . A lo largo del experimento el tejido es burbujeado con carbógeno (98% O<sub>2</sub> y 2% CO<sub>2</sub> ). Los transductores están conectados directamente a un polígrafo Grass Modelo 7B con 8 canales.

Antes de iniciarse cualquier maniobra experimental se espera un lapso de 45 minutos para la estabilización del tejido, y después se inicia el proceso de calibración: se aplica una carga de 1 gr

por 2 cms de desplazamiento de la pajilla del polígrafo y se hace una "escalera" con un incremento de pesos de 1 gramo. De esta manera se obtiene una curva de tensión respuesta, que nos sirve para conocer la tensión en gramos desarrollada por el músculo. La calibración del amplificador fué de 1 milivolt por cm. Una vez calibrado el sistema se deja una segunda estabilización de 30 minutos, después de lo cual se inicia el experimento.



## TECNICA UTILIZADA EN LOS EXPERIMENTOS DE REGISTRO DE LA ACTIVIDAD ELECTRICA CEREBRAL.

Se utilizaron gatos adultos. Bajo anestesia con éter se colocó una cánula en la tráquea y una vena radial fué canulada con una aguja para las inyecciones intravenosas. La presión arterial fué registrada a través de un tubo de polietileno insertado en la arteria femoral. Los gatos fueron colocados en un aparato estereotáxico. Pequeñas agujas de acero inoxidable fueron insertadas en los huesos frontal y parietal con el objeto de registrar el electroencefalograma con respecto a un electrodo en el seno frontal. Para el registro subcortical del electroencefalograma y la actividad multiunitaria, se colocaron electrodos bipolares, hechos de alambre de nicromo (60  $\mu$ m) aislados con diamel y una cánula exterior de calibre 26 aislada con epoxi, excepto la punta. Los electrodos fueron orientados estereotáxicamente a la formación reticular mesencefálica, el hipotálamo ventromediano y el hipocampo dorsal. Se utilizó un discriminador de pulsos altos que seleccionaba espigas de una altura seleccionada a partir de los trenes de actividad neuronal, la cual fué monitoreada continuamente por

medio de un osciloscopio Tektronix. Las espigas seleccionadas fueron amplificadas para activar los sistemas de registro de un polígrafo Grass Modelo 7. Estas fueron contadas cada segundo por medio de un contador de pulsos. En algunos experimentos la salida del discriminador de pulsos fué conectado a un generador de escaleras que se registraban en el polígrafo y se reiniciaba en cero cada 20 pulsos.

En algunos gatos se hizo un corte transversal en el tallo cerebral a nivel intercuncular antes de la colocación de los electrodos subcorticales. En otros animales una pequeña cánula en "T" (calibre 21) fué insertada en la carótida izquierda la cual permitía inyectar sin perturbar la circulación.

Al final de la cirugía se suspendía la anestesia con éter, los puntos de presión y heridas eran infiltrados con xilocaína al 2% y se administraba Flaxedil.

Después de desaparecido el efecto del éter se tomaba una hora de control antes de administrar los esteroides.

Solo una esteroide fué utilizado en cada animal experimental y se administraron en dosis crecientes siempre esperando cuando menos 30 min hasta que desapareciera el efecto anterior.

Dosis menores de 1 mg fueron disueltas en 0.4 ml de solución salina y 0.2 ml de etanol. Dosis mayores fueron disueltas en 0.6-2.0 ml de propilenglicol. Todas las dosis fueron administradas en un lapso de un minuto, y las inyecciones intracarótidas en un lapso de 5-15 segundos.

Al final de la observación los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital. El cerebro fué perfundido con formalina al 10%, y se hizo la localización histológica de la posición de los electrodos.

## TECNICA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE CONDUCTA SEXUAL.

Ratas hembras de 60 días de edad fueron mantenidas con ciclo invertido de luz-obscuridad (12 horas por fase) y con alimento para roedores y agua ad libitum. Los animales fueron ovariectomizados y divididos al azar en grupos de 7 a 12 ratas.

Dos semanas después de la ovariectomía dos grupos fueron inyectados con 3 o 5  $\mu$ g de benzoato de estradiol disuelto en aceite. 24 horas más tarde bajo anestesia con éter se expuso la vena yugular izquierda y se insertó una cánula de "silastic" hacia la aurícula izquierda. La cánula fué fijada y lavada con solución salina heparinizada, el extremo distal de la cánula se deslizó bajo la piel hasta la cúpula del cráneo por donde fué expuesta al exterior.

Dos días después de la inyección del estradiol las hembras fueron puestas frente a machos vigorosos y se les permitió montarlas 10 veces. Cualquier hembra que mostró lordosis en esta prueba fué descartada. Después de la prueba se administró cualquiera de las progestinas estudiadas por la cánula y en un periodo de 10 segundos. La cantidad del esteroide fué de 200  $\mu$ g disueltas 0.2 ml de propilen glicol. Los animales control recibieron solamente propilen glicol además

del estradiol 48 horas antes. Después de la administración de las progestinas se hicieron pruebas de receptividad a los 5, 30, 60 y 120 minutos.

Los cocientes lordosis monta ( $L/M \times 100$ ) fueron calculados y tomados como medidas de receptividad. Los datos así obtenidos fueron sujetos a un análisis de varianza.

## REFERENCIAS

Atkinson, R.M., Davis, B., Pratt, M.A., Sharpe, M.H. and Tomich, E.G. (1965): Action of some steroids on the central nervous system of the mouse. II. Pharmacology, J. Med. Chem., 8: 426-432.

Barraclough, C.A. and Cross, B.A. (1963): Unit activity in the hypothalamus of the cyclic female rat: effect of genital stimuli and progesterone. J. Endocr., 26: 339-359.

Baird, D., Horton, R., Longcope, C. and Tait, J.F. (1968): Steroid Prehormones. Perspect. Biol. Med., 11: 384-410.

Baulieu, E.E. (1970): The action of hormone metabolites: A New Concept in Endocrinology. Annals. of Clin. Res., 2: 246-250.

Beach, F.A. (1942): Importance of progesterone to induction of receptivity in spayed female rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 51: 369-371.

Beyer, C., Ramirez, V.D., Whitmoyer, D.I. and Sawyer, C.H. (1967): Effects of hormones on the electrical activity of the brain in the rat and rabbit. Exp. Neurol., 18: 313-326.

Blaustein, J.D. and Feder, H.H. (1979): Cytoplasmic progestin-receptor in guinea pig brain: characteristics and relationship to the induction of sexual behavior. Brain Research, 169: 481-497.

Branchey, M., Branchey, L. and Nadler, R.D. (1971): Effects of estrogen and progesterone on sleep patterns of female rats. Physiol. and Behav., 6: 743-746.

Briggs, M.H. and Brotherton, J. (1970): Steroid Biochemistry and Pharmacology. Academic Press, London and New York.

Brown-Grant, K. (1974): Failure of ovulation after administration of steroid hormones and hormone antagonists to female rats during the neonatal period. J. Endocrinol., 62: 683-684.

Cashin, M.F. and Moravsek, V. (1927): Physiological

action of cholesterol. Amer. J. Physiol., 82:  
294-299.

Ciaccio, L.A. and Lisk R.D. (1967): Facilitation and inhibition of estrous behavior in the spayed female hamster (Mesocricetus auratus). Am. Zool., 7: 712.

Ciaccio, L.A. and Lisk R.D. (1971a): Hormonal control of cyclic estrus in the female hamster. Am. J. Physiol., 221: 936-942.

Ciaccio, L.A. and Lisk R.D. (1971b): The role of progesterone in regulating the period of sexual receptivity in the female hamster. J. Endocr., 50: 201-207.

Csapo, A.I. and Takeda, H. (1965): Effect of progesterone on the electric activity and intra-uterine pressure of pregnant and parturient rabbits. Amer. J. Obst. Gynec., 91: 221-231.

Dorfman, R.I. and Ungar, F. (1965): Metabolism of Steroid Hormones. Academic Press, London and New York.

Edwards, D.A., Whalen, R.E. and Nadler, R.E. (1968): Induction of estrus: estrogen-progesterone interactions. Physiol. Behav., 3: 29-33.

Edwards, D.A. (1970): Induction of estrus in female mice: estrogen-progesterone interactions. Horm. Behav., 1: 256-264.

Emmens, C.W. (1941): Precursors of oestrogens. J. Endocrinol., 2: 444-456.

Feder, H.H., Resko, J.A. and Goy, R.W. (1966): Progesterin levels in the peripheral plasma of guinea pigs during the estrous cycle. Am. Zool., 6: 597.

Figdor, S.K., Kodet, M.J., Bloom, B.M., Agnello, E.J., P'An, S.Y. and Laubach, G.D. (1957): Central activity and structure in a series of water-soluble steroids. J. Pharmacol. Exp. Ther., 119: 299-309.

Fink, G. and Henderson, S.R. (1977): Steroids and pituitary responsiveness in female, androgenized female and male rats. J. Endocrinol., 157-164.

Gorzalka, B.B. and Whalen, R.E. (1974): Accumulation of estradiol in brain, uterus and pituitary: strain, species, suborder and order comparisons. Brain, Behav., Evol., 9: 376-392.

Goy, R.W., Phoenix, C.H. and Young, W.C. (1966): Inhibitory action of the corpus luteum on the hormonal induction of estrous behavior in the guinea pig. Gen. Com. Endocrinol., 6: 267-275.

Green, R., Luttge, W.G. and Whalen, R.E. (1970): Induction of receptivity in ovariectomized female rats by a single intravenous injection of estradiol 17 $\beta$ . Physiol. Behav., 5: 137-141.

Gyermek, L. (1967): Pregnanolone: a highly potent naturally occurring hypnotic-anesthetic agent. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N.Y.), 125: 1058-1062.

Gyermek, L., Genther, G. and Fleming, N. (1967): Some effects of progesterone and related steroids on the central nervous system. Int. J. Neuropharmacol., 6: 191-198.

Henrik, E. and Gerall, A.A. (1976): Facilitation of receptivity in estrogen primed rats during successive mating test with progestins and methylsergide. J. Comp. Physiol. Psychol., 90: 590-600.

Heuser, G. (1967): Induction of anesthesia seizures and sleep by steroid hormones. Anesthesiology, 28: 173-183.

Holzbauer, M. (1971): In vivo production of steroids with central depressant actions by the ovary of the rat. Brit. J. Pharmacol., 43: 560-569.

Karavolas, H.J. and Herf, S.M. (1971): Conversion of progesterone by rat medial basal hypothalamic tissue to 5 $\alpha$ -pregnane-3,20-dione. Endocrinology, 89: 940-942.

Karavolas, H.J., Hodges, D.R., O'Brien, D.J. and McKenzie, K.M. (1979): In vivo uptake of 3H-progesterone and 3H-5 $\alpha$ -DHP by rat brain and pituitary and effects of estradiol and time: tissue concentration of progesterone itself or specific metabolites?. Endocrinology, 104: 1418-1425.



Karavolas, H.J. and Nuti, K.M. (1976): Progesterone metabolism by neuroendocrine tissues. In Naftolin, L., Ryan, K.J. and Davis, I.J. (Eds.), Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology. Elsevier, Amsterdam.

Kato, J. (1975): The role of hypothalamic and hypophyseal  $5\alpha$ -DHT, estradiol and progesterone receptors in the mechanisms of feedback action. J. Steroid Biochem., 6: 979-987.

Kato, J. and Onuchi, T. (1977): Specific progesterone receptors in the hypothalamus anterior hypophysis of the rat. Endocrinology, 101: 920-928.

Kato, J., Onuchi, T. and Okinaga, S. (1978): Hypothalamic and hypophyseal progesterone receptors: Estrogen-priming effect, differential localization,  $5\alpha$ -dihydroprogesterone binding and nuclear receptors. J. Steroid Biochem., 9: 419-427.

Kawahara, F.S., Berman, M.L. and Green, O.C. (1975): Conversion of progesterone 1,2-3H to  $5\beta$ -pregnane-3,20-dione by brain tissue. Steroids, 25: 459-463.

Kawakami, M. and Sawyer, C.H. (1959): Induction of behavioral and electroencephalographic changes in the rabbit by hormone administration or brain stimulation. Endocrinology, 65: 614-668.

Kobayashi, T., Kobayashi, T., Takesawa, S., Oshima, K. and Kawamura, H. (1962): Electrophysiological studies on the feedback mechanism of progesterone. Endocrin. Jap., 9: 302-320.

Komisaruk, B.R., McDonald, P.G., Whitmoyer, D.I. and Sawyer, C.H. (1967): Effects of progesterone and sensory stimulation on EEG and neural activity in the rat. Exp. Neurol., 19: 497-507.

Kubli-Garfias, C., Canchola, E., Arauz-Contreras, J. and Feria-Velasco, A.: Depressory effect of androgens on the cat brain electrical activity and its antagonism by ruthenium red. Enviado a publicación.

Kubli-Garfias, C., Cervantes, M. and Beyer, C. (1976): Changes in multiunit activity and EEG induced by the administration of natural progestins to flaxedil

immobilized cats. Brain Research, 114: 71-81.

Kubli-Garfias, C., López-Fiesco, A., Pacheco-Cano, M.T., Ponce-Monter, H. and Bondani A. (1980): In vitro effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility. Steroids, 35: 633-641.

Kubli Garfias, C., Magdaleno, V.M., Pacheco Cano, M.T. y Ortega Suárez, P. (1979): Diferencias metabólicas de la progesterona en el sistema nervioso central de la rata tratada con estrógenos y sin estrógenos. XXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Aguascalientes, Ags. Extracto de las Comunicaciones pp. 119.

Kubli-Garfias, C., Medrano-Conde, L., Beyer, C. and Bondani, A. (1979): In vitro inhibition of rat uterine contractility induced by 5 $\alpha$  and 5 $\beta$  progestins. Steroids, 34: 609-617.

Kubli-Garfias, C., Ponce-Monter, H., Medrano-Conde, L., López-Fiesco, A. and Bondani, A.: Kinetics of the antagonism of Ca<sup>++</sup> in the uterine-relaxant effect of gonadal steroids. Enviado a publicación.

Kubli-Garfias, C. and Whalen, R.E. (1977): Induction of lordosis behavior in female rats by intravenous administration of progestins. Horm. Behav., 9: 380-386.

Langford, J. and Hilliard, J. (1967): Effect of 20 $\alpha$ -hydroxy-pregn-4-en-3-one on mating behavior in spayed female rats. Endocrinology, 80: 381-383.

Laumas, K.R (1967): The distribution and localization in tissues of tritium labeled steroid sex hormones. Third Asia and Oceanic Endocrine Congress, 124-135.

Laumas, K.R. and Farooq, A. (1966): The uptake in vivo of 1,2-3H-progesterone by the brain in genital tract of the rat. J. Endocr., 36: 95-96.

Leavitt, W.W. (1976): Presentation to NY Academy of Science Conference on biochemical actions of progesterone and progestins.

Lincoln, D.W. (1969): Effects of progesterone on the electrical activity of the forebrain. J. Endocr., 45: 585-596.

Lisk, R.D (1969): Estrogen: Direct effects on hypothalamus or pituitary in relation to pituitary weight changes. Neuroendocrinology, 4: 368-373.

Litchfield, J.T. Jr. and Wilcoxon, F.A. (1949): A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther., 96: 99.

McEwen, B.S., Krey, L.C. and Luine, B.N. (1978) Steroid hormone action in the neuroendocrine system: when is the genome involved?. In Reichlin, S., Baldessarini, R.J. and Martin, J.B. (Eds.), The Hypothalamus. Raven Press, New York. pp 255-268.

MacLusky, N.J. and McEwen, B.S. (1978): Oestrogen modulates progestin receptor concentrations in some rat brain areas but not in others. Nature, 274: 276-278.

Martin, J.V.: Comunicación personal.

Meyerson, B.J. (1967): Relationship between the anesthetic and gestagenic action and estrous behavior inducing activity of different progestins. Endocrinology, 81: 369-373.

Meyerson, B.J. (1972): Latency between intravenous injection of progestins and the appearance of estrous behavior in estrogen-treated ovariectomized female rats. Horm. Behav., 3: 1-9.

Moguilewsky, M. and Raynaud, J.P. (1977): Progestin binding sites in the rat hypothalamus, pituitary and uterus. Steroids, 30: 99-110.

Nuti, K.M. and Karavolas, H.J. (1977): Effect of progesterone and its 5 $\alpha$ -reduced metabolites on gonadotropin levels in estrogen-primed ovariectomized rats. Endocrinology, 100: 777.

O'Malley, B.W., Sherman, M.R. and Toft, D.O. (1970): Progesterone receptors in the cytoplasm and nucleus of chick oviduct target tissues. Proc. Nat. Acad. Sci., 67: 501-508.

P'An, S.Y. and Laubach, G.D. (1964): Steroid central depressants. In Dorfman, R.E. (Ed): Methods in Hormone Research III. Academic Press, New York.

Powers, J.B. (1970): Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. Physiol. Behav., 5: 831-835.

Raisinghani, K.H., Dorfman, R.I., Forchielli, E., Gyermek, L. and Genther, G. (1968): Uptake of intravenously administered progesterone, pregnanedione and pregnanolone by rat brain. Acta Endocrinologica, 57: 395-404.

Ross, J., Claybaugh, C., Clemens, L.G. and Gorski, R.A. (1971): Short latency induction of estrous behavior with intracerebral gonadal hormones in ovariectomized rats. Endocrinology, 89: 32-38.

Sar, M. and Stumpf, W.E. (1973): Neurons of the hypothalamus concentrate 3H-Progesterone or its metabolites?. Science, 179: 389-391.

Schwartz, N.B. and Talley, W.L. (1965): Effect of acute ovariectomy on mating in the cyclic rat. J. Reprod. Fertil., 10: 463-466.

Seeman, P. (1966) Erythrocyte membrane stabilization by sterols and alcohols; a possible model for anesthesia. Biochem. Pharmacol., 15: 1632-1657.

Seeman, P. (1972) The membrane action of anesthetics and tranquilizers. Pharmacol. Rev., 24: 583-655.

Seiki, K. and Hattori, M. (1973): In vivo uptake of progesterone by the hypothalamus and pituitary of the female ovariectomized rat and its relationship to cytoplasmic progesterone-binding protein. Endocrinol. Jap., 20: 111-119.

Selye, H. (1942): Correlation between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. Endocrinology, 30: 437-458.

Selye, H. (1948): Textbook of Endocrinology. Acta Endocrinologica. Universite de Montreal, Canada, pp. 914.

Whalen, R.E. and Gorzalka, B.B. (1972): The effects of progesterone and its metabolites on the induction of sexual receptivity in the rat. Horm. Behav., 3: 221-226.

Whalen, R.E. and Luttge, W.G. (1971a): Differential localization of progesterone uptake in the brain. Role of sex, estrogen pretreatment and adrenalectomy. Brain Res., 33: 147-155.

Whalen, R.E. and Luttge, W.G. (1971b): Role of the adrenal in the preferential accumulation of progesterin by mesencephalic structures. Steroids, 18: 141-146.

Willmer, N. (1961): Steroids and cell surfaces. Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 36: 368-371.

Zanisi, M. and Martini, L. (1975): Effects of progesterone metabolites on gonadotrophin secretion. J. Steroid Biochem., 6: 1021-1023.

Zucker, I. (1966): Facilitatory and inhibitory effects of progesterone on sexual responses of spayed guinea pigs. J. Comp. Physiol. Psychol., 62: 376-381.

Zucker, I. and Goy, R.W. (1967): Sexual receptivity in the guinea pig: inhibitory and facilitatory actions of progesterone and related compounds. J. Comp. Physiol. Psychol., 64: 378-383.

Zucker, I. (1968): Biphasic effects of progesterone on sexual receptivity in the female guinea pig. J. Comp. Physiol. Psychol., 65: 472-478.