

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

**Participación del sistema  $Ca^{2+}$  / Calmodulina en el  
mecanismo de acción membranal de la Progesterona, para  
Inducir conducta sexual femenina en la rata hembra**

**T E S I S**

**que para obtener el grado de**

**Doctor en Ciencias Biológicas**

**P R E S E N T A**

**J. Enrique Canchola Martínez**

**Julio de 1998**

*E. Canchola 1*

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo, con el convenio Num. PFP-200-93.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis que presentó

**J. ENRIQUE CANCHOLA MARTINEZ**

El día 23 de julio de 1998

**Comité Tutorial:**

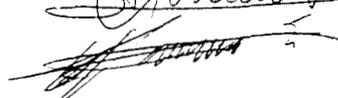
**Tutor: Dr. Efraín Mercado Pichardo**



**Asesor: Dr. Adolfo Rosado García**



**Asesor: Dr. Oscar Ramírez Toledano**



**Sinodal: Dr. Carlos Kubli Garfias**



**Sinodal: Dr. Hector Ponce Monter**

**DEDICATORIA:**

**A MIS PADRES Y HERMANOS**

**A MI ESPOSA CONCEPCION VIOLETA**

**A MIS HIJOS LUIS ENRIQUE**

**JOSE EMILIANO**

**A MIS MAESTROS Y ALUMNOS**

## RESUMEN.

Se estudiaron las modificaciones producidas por la administración de diversas dosis de fármacos que interaccionan con el sistema calcio/calmodulina ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Cam}$ ) sobre la conducta de receptividad sexual caracterizada por facilitación de lordosis inducida por progesterona (P) en ratas ooforectomizadas y pretratadas con estrógenos ( $\text{E}_2$ ). Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar adultas de 200 a 250 g, sin experiencia sexual y ooforectomizadas a las que se les administró 2  $\mu\text{g}$  (0.00531  $\mu\text{moles}$ ) de benzoato de estradiol al tiempo 0 y las 44 h después, les fueron inyectados 2 mg (6.36  $\mu\text{moles}$ ) de P junto con diversas dosis de los siguientes compuestos: pentobarbital, trifluoperazina (TPZ), prometazina (PMZ), clorpromazina (CPZ), haloperidol (HAL), pimozida (PIM) y verapamil (VER). La conducta sexual de las hembras se evaluó con machos experimentados cuatro horas después de la aplicación de la progesterona y con cada uno de los neurolépticos. Las hembras recibieron 10 montas vigorosas y su receptividad se expresó por el cociente de lordosis (CL), que es el resultado de dividir el número de lordosis entre el número de montas. El tratamiento farmacológico se realizó a través de un diseño experimental doble ciego.

Todos los fármacos experimentados a dosis de 4 mg/kg y 8 mg/kg, inhibieron la lordosis inducida por el tratamiento secuencial con  $\text{E}_2$  y P. Únicamente HAL, PIM y VER fueron efectivos para prevenir la lordosis a la dosis de 1 mg/kg.

El máximo nivel de inhibición lo tuvo PIM, aunque a las dosis de 8 mg/kg (17.35  $\mu$ moles), no existió diferencia estadística entre éste y TPZ (19.65  $\mu$ moles) o HAL.(21.33  $\mu$ moles) Los resultados obtenidos con la aplicación de pentobarbital (25 mg/kg = 100.80  $\mu$ moles), no mostraron diferencia estadísticamente significativa con los resultados obtenidos de animales tratados únicamente con solución salina (controles). Los resultados de estos experimentos, muestran que la actividad de los fármacos experimentados sobre la conducta sexual, está aparentemente relacionado con su eficiencia como inhibidores de la fosfodiesterasa, dependiente de calmodulina y como ligandos del complejo  $Ca^{2+}/CaM$ ; así PIM fue el más activo, seguido por TPZ, HAL y CPZ, mientras que PMZ fue solo efectiva en forma discreta. Adicionalmente el VER, un inhibidor de canales lentos para calcio, produjo efectos que fueron comparables a los mostrados por los fármacos que se consideran más efectivos en su efecto anticalmodulina.

## ABSTRACT

Modifications of the progesterone-induced facilitation of lordosis behavior in ovariectomized estrogen primed rats after the systemic administration of various dosages of drugs that participate on the  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin system, were studied. Young, sexually inexperienced, Ovariectomized Wistar female rats were primed with 2  $\mu\text{g}$  estradiol benzoate (time 0) and 44 hr later they were injected with 2 mg progesterone (P) together with one of various dosages of the following compounds: Pentobarbital, Trifluoperazine (TPZ), Promethazine (PMZ), Chlorpromazine (CPZ), Haloperidol (HAL), Pimozide (PIM), and Verapamil (VER). Animals were tested for sexual behavior with experienced males 4 hr after the applications of P plus the neuroleptics. Ten vigorous mounts were allowed to each female and their receptivity expressed as the lordosis quotient (LQ), that is, number of lordosis/number of mounts. The observer was blind as far as the pharmacological treatment of individual females was concerned. All tested drugs at doses of 4 mg/Kg, or higher, inhibited lordosis. Only HAL, PIM and VER were active with the lowest dose utilized (1 mg/Kg). The maximum level of activity was shown by PIM, although at the doses of 8 mg/Kg no statistical differences were found between this compound and TPZ, or HAL. Results obtained by the application of Pentobarbital (25 mg/Kg) showed no statistical significant difference with the animals treated with saline only (controls). The activity of the tested drugs on the facilitation of sexual behavior (as demonstrated by the effects on lordosis), appears to be strictly related to their efficiency as inhibitors of CaM-dependent phosphodiesterase and as ligands for the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex: that is, pimozide was the most active, followed by Trifluoperazine, while Prometazine was only marginally effective. In addition, verapamil, an inhibitor of slow calcium channels, induced effects that were comparable to those elicited by the more effective of the anticalmodulin drugs.

# I N D I C E

RESUMEN	5
INTRODUCCION	9
EFFECTOS RAPIDOS DEL E <sub>2</sub> EN EL EJE HIPOTALAMO HIPOFISIS	11
EFFECTOS RAPIDOS DEL E <sub>2</sub> EN EL SISTEMA CATECOLAMINERGICO	13
EFFECTOS FISIOLÓGICOS DEL E <sub>2</sub> UNIDO A LA ALBUMINA	14
RECEPTORES MEMBRANALES PARA E <sub>2</sub>	15
EFFECTO DE LA PROGESTERONA EN EL CEREBRO	16
MECANISMO DE ACCION DE LA PROGESTERONA	17
MECANISMOS DE ACCION NO GENOMICA DE LA PROGESTERONA	18
RECEPTORES MEMBRANALES PARA LA PROGESTERONA	21
LA PROGESTERONA Y LOS SEGUNDOS MENSAJEROS	31
EL RECEPTOR GABA Y LA PROGESTERONA	34
EL SISTEMA CALCIO CALMODULINA	35
OBJETIVOS	43
HIPOTESIS	45
MATERIAL Y METODOS	46
RESULTADOS	53
DISCUSION	59
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFIA	76
PUBLICACIONES DURANTE EL DOCTORADO	92

## INTRODUCCION.

La conducta sexual femenina en la rata está caracterizada por atractividad, proceptividad y lordosis. La lordosis es el componente de la receptividad sexual, que se caracteriza por un arqueamiento del dorso y es producido como una respuesta refleja a la estimulación copulatoria por parte del macho (Beach, 1976). Esta conducta depende, en las ratas hembras, de la acción secuencial del estradiol ( $E_2$ ) y la progesterona (P) (Boling y Blandau., 1939; Beyer y Larsson., 1979). La extirpación de los ovarios. glándulas donde se sintetizan estos esteroides, provocan la desaparición de la conducta sexual y el tratamiento secuencial de  $E_2$  y P la restablecen en forma adecuada. El tratamiento sólo con estrógenos puede restablecer el comportamiento sexual, aunque con ausencia de algunos de sus componentes o con la disminución de otros por ejemplo, disminuye el tiempo y la intensidad de la lordosis, aumenta el rechazo al macho y desaparece casi por completo la proceptividad. Con respecto a la progesterona, ésta por si sola es incapaz de facilitar la conducta sexual femenina (Powers, 1970; Boling y Blandau., 1939).

El pretratamiento con  $E_2$  a ratas ovariectomizadas provoca la respuesta a la administración de la P, quien a su vez, facilita la receptividad sexual con latencia de horas (Fadem y col., 1979; Whalen, 1974).

Hasta ahora no se ha podido dilucidar el mecanismo mediante el cual estos esteroides modulan la conducta sexual (Delville, 1991). Se ha postulado una forma de acción general para los estrógenos: la unión del E<sub>2</sub> a un acarreador citoplasmático, la translocación de este complejo al núcleo, el inicio de la síntesis de RNA mensajero y la producción subsecuente de proteínas receptoras para P (Tsai y O' Malley, 1994). Esta idea a sido sustentada sobre la base de los siguientes datos experimentales: a) el tiempo previo necesario de acción del E<sub>2</sub> para inducir receptores para P, es de alrededor de 16 horas (Blaustein y Feder., 1980; McGinnis y col., 1981), b) la prevención de la síntesis de estas proteínas receptoras por la administración concomitante de inhibidores específicos (Parsons y col., 1981 y 1982; Rainbow y col., 1980). c) la inhibición de la síntesis de receptores para P, previene la conducta sexual femenina inducida por la administración secuencial de E<sub>2</sub> y P. d) la ausencia de la receptividad sexual femenina, con la utilización de antagonistas de receptores para estrógenos (Etgen, 1979; Landau, 1977).

Esta propuesta ha sido ampliamente aceptada, para explicar el posible mecanismo de acción de estas hormonas para inducir la receptividad, aunque, se ha venido proponiendo que la inducción de la síntesis de proteínas por los estrógenos en el cerebro, y particularmente en el hipotálamo no parece ser un requisito suficiente para inducir conducta sexual femenina, ya que no se ha encontrado una relación directa entre estos dos eventos (Barfield y col., 1984).

Los esteroides gonadales estrógenos y P actúan en muchos órganos y tejidos periféricos, entre ellos, en las células hepáticas, donde el grupo de Pietras y Szego

en 1980 descubrieron que estas hormonas se unen a la superficie externa de la membrana celular y sobre la base de estos hallazgos propusieron, que uno de los probables mecanismos de acción de los estrógenos es a través de receptores membranales. En el sistema nervioso central (SNC) el E<sub>2</sub> es una hormona particularmente ubicua, que como en otros órganos blanco mejor estudiados se une a receptores de membrana (Towley y Sze., 1983), y tiene acciones genómicas y no genómicas claras. En el cerebro también ejerce efectos que influyen sobre el estado emocional (Magi y Pérez, 1985) y sobre la conducta sexual (McEwen, 1994), sobre el control motor y sobre funciones cognitivas (Kimura, 1995)

### **EFFECTOS RÁPIDOS DEL E<sub>2</sub> EN EL EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISIS**

Las gonadotropinas: hormonas luteinizante (LH) y la foliculo estimulante (FSH) son sintetizadas y liberadas en la hipófisis anterior, por la influencia del factor liberador de gonadotropinas (GnRH) producido en el hipotálamo. La liberación de estas gonadotropinas puede ser inhibida o estimulada por el E<sub>2</sub>. El efecto estimulatorio parece estar mediado por un mecanismo genómico en el ámbito del núcleo supraquiasmático y del área preoptica media, ya que su liberación en la rata ocurre unas 16 horas después del tratamiento con E<sub>2</sub> y puede ser bloqueada esta liberación con inhibidores de la síntesis de proteínas, como la actinomicina-D y la cicloheximida, antibióticos que bloquean la síntesis de proteínas a nivel transcripcional y traduccional respectivamente (Schneider y McCann, 1970; Jackson,

1973). En cambio, el efecto inhibitorio del  $E_2$  sobre la liberación de gonadotrofinas es relativamente rápido -menor de 30 minutos- (Negro-Vilar y col., 1973).

Con base en lo anterior, éste efecto rápido del  $E_2$  es difícil de explicar a través de un efecto genómico. Además hasta el momento no se ha podido demostrar que las neuronas hipotalámicas que liberan gonadotrofinas contengan receptores intracelulares para  $E_2$ , (Shivers y col., 1983). Por otra parte éste evento fisiológico del  $E_2$  sobre la inhibición de la liberación de las gonadotrofinas no es bloqueado por el pretratamiento con los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas (Dufy y col., 1978) y la administración intravenosa de  $E_2$  modifica la actividad neuronal espontánea del área preoptica media y de la región septal, con latencias muy cortas que van del orden de milisegundos a segundos (Kelly y col., 1976).

Esta rápida despolarización o hiperpolarización inducida por esta hormona es seguida por un aumento de la adenilato ciclasa que induce la formación de adenosina mono fosfato cíclico (AMPC) (Minami y col., 1990), quien a su vez induce la fosforilación de proteínas del hipotálamo ventromedial con latencias de 15 minutos, tiempo que es considerado no suficiente para un mecanismo de acción genómico (Zhou y Dorsa., 1994). Por lo anterior se ha pensado que la retroalimentación negativa del  $E_2$  sobre la secreción de gonadotrofinas es mediado por un evento membranal AMPC dependiente, en el que podrían estar participando los opiodes como reguladores de este sistema (Ferin y col., 1984).

## **EFFECTOS RÁPIDOS DEL E<sub>2</sub> EN EL SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO**

Se ha informado también acerca de los efectos rápidos del E<sub>2</sub> en el sistema catecolaminérgico nigroestriatal, sistema que participa en la modulación y el control de algunas conductas dependientes de estrógenos por ejemplo cambios en la conducta sexual, estado emocional, actividad y coordinación motora entre otras. El E<sub>2</sub> en ésta región cerebral induce una la liberación de catecolaminas: dopamina (DA) y norepinefrina (NE), con una latencia de 30 min y en el núcleo dimórfico hipotalámico ésta hormona, modifica la unión de la DA a su receptor D<sub>2</sub>, (Hruska y Silbergeld, 1980) motivo por lo cuál algunos autores han propuesto que éste podría ser también uno de los mecanismos de acción de los estrógenos, se ha informado también del efecto rápido del E<sub>2</sub> en el cerebelo, donde los de receptores intracelulares para esta hormona son escasos. (Becker, 1990)

En el hipocampo el efecto de los estrógenos no es bloqueado por antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas ni por el tamoxifen un antagonista estrogénico (Wong y Moss, 1991), tampoco es bloqueado por el ácido cinurenico, un antagonista de los receptores para glutamato aunque curiosamente es bloqueado por un antagonista no-NMDA (N- metil-D-aspartato) y no por un NMDA antagonista.(Wong y Moss, 1994)

En concordancia con una posible acción rápida no genómica de los estrógenos, se ha reportado la unión de esta hormona a la membrana externa del espermatozoide humano (Hernández-Pérez y col., 1979) y a las membranas de las células cancerosas de glándula mamaria (Nenci y col., 1981)

## EFFECTOS FISIOLÓGICOS DEL E<sub>2</sub> UNIDO A LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA

Recientemente, utilizando la unión de esta hormona a la albúmina sérica bovina (ASB) marcada con I<sup>125</sup>, para cambiar su liposolubilidad y transformarla en un complejo hidrofílico, que impida que este complejo pase fácil y rápidamente la membrana celular y poder detectar la unión de este complejo a la membrana. Se ha podido saber que la unión de ASB en el carbón 6 de la molécula del estrógeno, tiene los siguientes efectos fisiológicos:

- 1.- Modula los canales de calcio en neuronas estriatales de la rata
  - 2.- Aumenta la concentración de calcio intracelular, inositol trifosfato y diacilglicerol en osteoclastos de ratas hembras
  - 3.- Incrementa la concentración intracelular del calcio en óvulos
  - 4.- Estimula la liberación de dopamina en rebanadas del estriado in vitro
- para revisión véase Ramírez y Zheng, 1996.

## RECEPTORES MEMBRANALES PARA E<sub>2</sub>

Mediante la técnica de fijación del complejo E<sub>2</sub>-ASB radioactiva a la membrana celular se ha propuesto que existen cinco diferentes proteínas receptoras que tienen un peso molecular de 23kd, 27kd, 30kd, 38kd y 62kd respectivamente. La proteína de mayor afinidad es la de 27kd, este peso molecular es menor que la mitad del peso molecular para el receptor nuclear cuyo valor es de 67kd para esta hormona (Pappas y col., 1995, Zheng y col., 1996)

Podemos mencionar que existen por lo menos cuatro evidencias que apoyan el mecanismo de acción no genómica del E<sub>2</sub> en el cerebro:

1- Efectos rápidos de esta hormona sobre la actividad eléctrica en células hipotalámicas que van de segundos a pocos minutos que podrían excluir la posibilidad de un efecto genómico. (Duffy y col., 1976).

2- Efectos fisiológicos de los estrógenos sobre células nerviosas, sin que estos atraviesen la membrana (Zheng y col., 1996; Shivers y col., 1983)

3- Acciones rápidas de los estrógenos sobre la actividad eléctrica de células piramidales del hipocampo que no son bloqueadas por inhibidores de la síntesis de proteínas (Wong y col., 1991)

4- Efectos estereoespecíficos de los estrógenos que pudieran estar mediados por un receptor membranal

A pesar de todo lo anterior, es sorprendente que no se haya probado el efecto membranal de los estrógenos en el comportamiento sexual masculino o femenino.

## EFEECTO DE LA PROGESTERONA EN EL CEREBRO

La progesterona y sus metabolitos controlan los patrones conductuales relacionados con la reproducción. Las modificaciones de los niveles estas hormonas a través del ciclo ovárico influyen en las funciones normales y patológicas, modulando la excitabilidad cerebral y aumentando el umbral electroconvulsivo, disminuyendo la frecuencia convulsiva. (Laidlaw, 1965). Los estudios de la relación estructura/actividad de estas hormonas, sugieren que dependiendo de su conformación molecular pueden unirse a un receptor intracelular y ejercer efectos a través de mecanismos genómicos o unirse a la membrana y llevar a cabo acciones no genómicas. Los primeros son mediadas por aquellas progestinas que tienen una estructura delta-4-3-ceto, mientras que el efecto membranal es producido por las que tienen el anillo A reducido ( $5\alpha$  o  $5\beta$ ). Para revisión consultar a Beyer y Gonzalez-Mariscal, 1991

El mecanismo genómico aparentemente se realiza en el hipotálamo ventro medial, mientras que los efectos membranales parecen llevarse a cabo en la substancia gris mesencefálica, para inducir la lordosis, aunque esto ha sido probado solo en el hamster (Frye y col., 1992)

## **MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PROGESTERONA**

Hasta el momento tampoco ha sido completamente establecido el mecanismo de acción de la P para inducir la conducta sexual en ratas ovariectomizadas pretratadas con estrógenos, (Delville, 1991). Un número considerable de resultados experimentales en los que se encuentra una relación entre el número de receptores intracelulares para progesterona en el área preoptica y en el hipotálamo ventromedial, zonas cerebrales, donde la administración secuencial de estrógenos y progesterona facilitan la receptividad (Brown y col., 1987), guardan relación con el tiempo para inducir y mantener la conducta sexual (Blaustein y Feder, 1989), evidencia adicional para apoyar el mecanismo de acción genómico de la progesterona se ha obtenido por el bloqueo de la conducta sexual con el antagonista de progesterona RU-486 (Brown y Blaustein, 1986), o con inhibidores de la síntesis de proteínas, cicloheximida o cloranfenicol (Parsons y col., 1981, 1982; Rainbow y col., 1980). Como en el caso de los estrógenos, se ha propuesto que la progesterona pasa la membrana, se une a un acarreador citoplásmico y en el núcleo celular se une a un receptor específico (Tsai y O'Malley, 1994). Sin embargo estos resultados experimentales que apoyan un mecanismo de acción genómico de la P no permiten explicar latencias muy cortas de 5, 10, o 15 minutos de acción de algunas progestinas para inducir conducta sexual, además, de la incongruencia que existe entre la afinidad de algunas progestinas por su receptor intracelular y su potencia para inducir receptividad sexual. Así por ejemplo Lisk en 1960 y Meyerson en 1972 han reportado latencias de 10 minutos para la facilitación de receptividad sexual por

la administración intravenosa de 20 a 400  $\mu\text{g}$  de progesterona, Kubli-Garfias y Whalen en 1977 reportaron latencias de 5 minutos por la administración intravenosa de los metabolitos de la progesterona  $20\alpha$  hidroxiprogesterona o  $5\alpha$  pregnan- $20\alpha$ - $3\beta$  olona y Ross y col., en 1971 reportaron latencias de 15 minutos para inducción de conducta sexual con la implantación de P en el cerebro medio.

Con estas latencias tan cortas, antes mencionadas que presentan estas progestinas, para inducir conducta sexual, parece difícil proponer que estén involucrados los mecanismos genómicos.

### **MECANISMO DE LA ACCIÓN NO GENÓMICA DE LA PROGESTERONA**

Los efectos rápidos de la P. podrían explicarse posiblemente a través de la participación de mecanismos no genómicos (Delville, 1991). En cuanto a la afinidad de las progestinas por sus receptores intracelulares in vitro, y su potencia para inducir receptividad, no necesariamente predice su potencia para facilitar la conducta sexual (Beyer y Larsson, 1989; Glaser y col., 1985.) Así por ejemplo la  $5\beta$  pregnan- $3,20$  diona, que tiene una menor afinidad por los receptores intracelulares, facilita la conducta sexual en forma tan efectiva como la P y es más efectiva que otras progestinas, que tienen mayor afinidad por el receptor intracelular, como es el caso de la  $5\alpha$ -pregnan- $3\alpha$ -ol- $20$  ona (Beyer y Larsson, 1989; Glaser y col., 1985; Smith y col., 1974) Por otra parte también se han observado acciones rápidas a nivel genómico de la P en oviducto de pollo, en el que los niveles de RNA mensajero

inducidos por el proto oncogen *cmyc* disminuyen a los 10 minutos de la inyección intraperitoneal de 250  $\mu$ g. de progesterona (Fink y col., 1988), aunque no se ha determinado si la P bloquea la transcripción o disminuye la vida media del RNA mensajero.

Este efecto rápido de la progesterona, que pudiera estar mediado por eventos genómicos con latencia de menos de 10 minutos, guarda relación con la distribución rápida de la progesterona cuando se administra por vía intravenosa y con latencias muy cortas de algunas progestinas para inducir receptividad sexual cuando se administran por vía intracerebral o endovenosa (Lisk, 1960; Meyerson, 1972; Kubli-Garfias y Whalen, 1977; Beyer y Larsson, 1989). Lo anteriormente expuesto y la facilitación de la conducta sexual inducida por la  $5\beta$  pregnan-3,20 diona, que tiene poca afinidad por el receptor intracelular de P y la inhibición de la lordosis por la administración intracerebral del antagonista de la progesterona, el RU-486 (Gonzalez-Mariscal, G. y col., 1989), podrían sugerir que otros factores además de los mediados por receptores intracelulares, participan en los efectos de la progesterona y sus metabolitos reducidos en el anillo A para inducir la receptividad sexual.

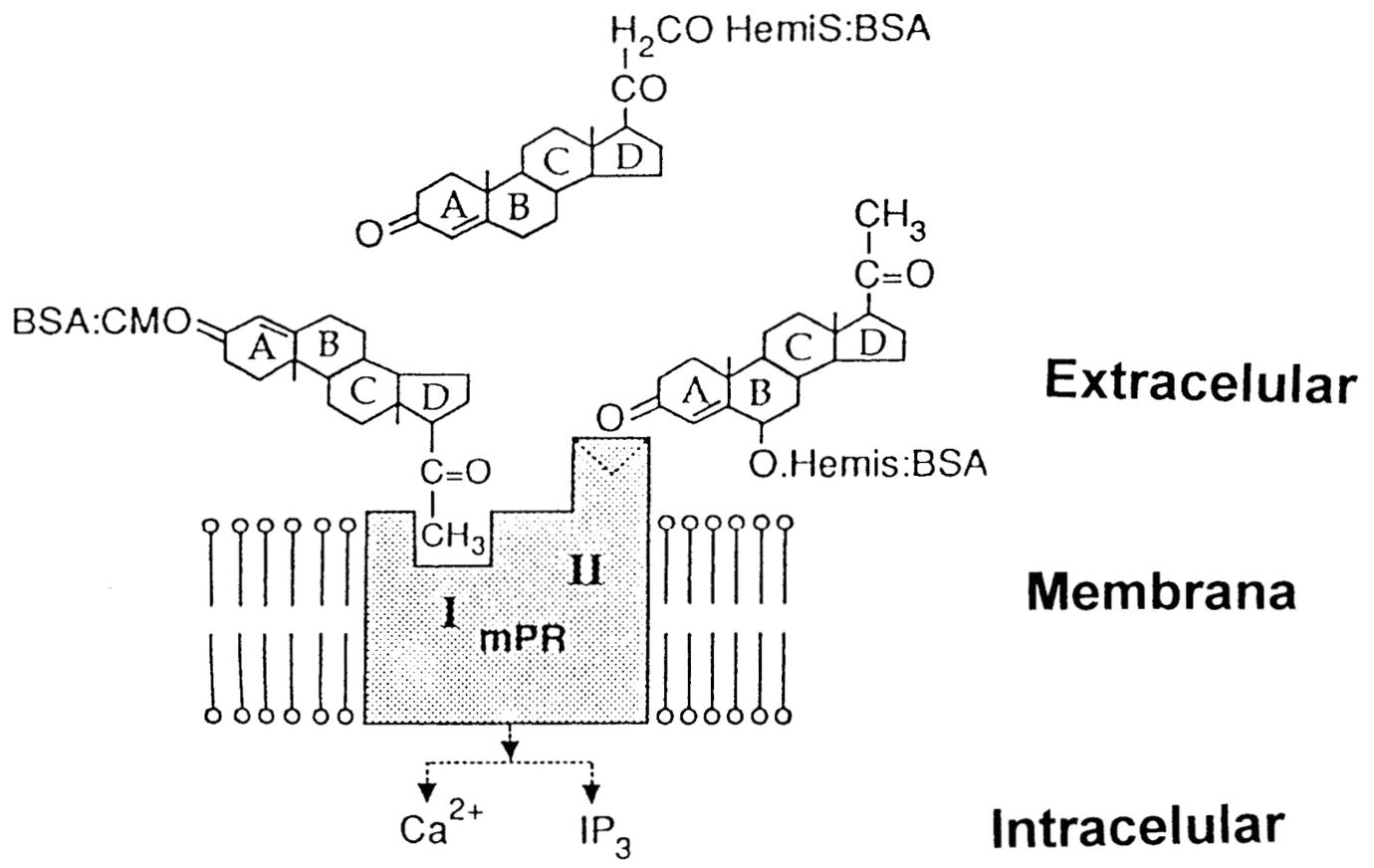
El descubrimiento de los receptores membranales para cortisona y progesterona por Towle y Sze en 1983, han estimulado el estudio de los efectos no genómicos de la progesterona, a través de abordajes electrofisiológicos, mediante los cuales se han encontrado cambios en la excitabilidad neural con latencias muy cortas y estudios farmacológicos en los que se ha reportado una interacción específica de la

progesterona con receptores membranales (Ramírez y Zheng, 1996) Estos resultados los consideramos muy importantes para argumentar a favor de la hipótesis no genómica de acción de la progesterona para facilitar la conducta sexual femenina por lo que a continuación se describen algunas de las acciones no genómicas.

En 1941, Hans Selye, reportó el efecto de la acción anestésica de grandes dosis de progesterona, sugiriendo la posibilidad de que esta induzca cambios en la excitabilidad nerviosa.

Posteriormente se demostró, con registros de actividad unitaria y multiunitaria del hipotálamo y de la corteza cerebral, el efecto inhibitor sobre la actividad neuronal por esta hormona. Se encontraron también diferencias en la excitabilidad neural en las distintas fases del ciclo estral que se correlacionan con los niveles de progesterona (Barraclough, 1963).

La disminución de la actividad neural del hipotálamo lateral inducida por estímulos cervico-vaginales en ratas en estro es amplificada por la administración intravenosa de 400  $\mu\text{g}$  de progesterona. Este efecto dura aproximadamente una hora teniendo su máxima respuesta a los 30 minutos. Los estudios posteriores de Komisaruk y col., 1967, utilizando el electroencefalograma, mostraron que dosis de 100 o 200  $\mu\text{g}$ . de progesterona por vía intravenosa, produce patrones electroencefalográficos de sueño, con latencia de 8 a 16 minutos en corteza, tálamo e hipotálamo de la rata. Kubli Garfias y col., 1976 informaron de latencias más cortas aún con la



ESQUEMA I

administración intravenosa de algunos metabolitos de la progesterona sobre la actividad eléctrica del cerebro en gatos.

Sin embargo, a pesar de toda esta vasta información se le ha dado poca atención a las acciones neurotróficas rápidas de los esteroides que van desde milisegundos a minutos y que incluyen, pero no se limitan solo a inducir cambios en la actividad eléctrica neural y a la modificar específicamente un neurotransmisor y su receptor o efector, sino que también inducen modificaciones de algunas neurohormonas y la respuesta cerebral a ciertos estímulos. Por ejemplo, la administración de progesterona induce la liberación rápida de LHRH del tejido hipotalámico e incrementa la acción estimuladora de la anfetamina en la liberación de dopamina (Ramírez y col 1985), disminuye la respuesta electroencefalográfica al glutamato en el cerebelo y aumenta el número y sitios de receptores para oxitocina en el SNC con un tiempo de 30 minutos.

### **RECEPTORES MEMBRANALES PARA PROGESTERONA**

Ke y Ramírez., 1987 han sugerido la presencia de receptores membranales específicos para P en células del hipotálamo y más recientemente este grupo, utilizando albúmina sérica de bovino (ASB) radioactiva con  $I^{125}$  unida a los carbonos 3, 6 y 11 de la molécula de progesterona; complejos P3-ASB, P6-ASB y P11-ASB respectivamente, han propuesto dos posibles sitios de unión membranal de la P, uno de alta afinidad (sitio I) que es reconocido por la cadena lateral de la progesterona, cuando se le adhiere la ASB en el carbón 3 y otro de baja afinidad

*E. Canchola 21*

(sitio II) que es reconocido por el grupo ceto del carbono 3, como se muestra en el **Esquema I**, cuando se le adhiere la ASB en el carbono 11, o en el carbono 6. También se ha reportado el efecto de P3-ASB es mayor o igual que el complejo P6-ASB y mayor que el complejo P11-ASB. Es posible que estos dos diferentes sitios de unión membranal, con diferente afinidad para la progesterona, tengan que ver con los diferentes mecanismos de acción de esta hormona sobre la retroalimentación positiva o negativa para el control de las gonadotrofinas o con la acción facilitatoria o inhibitoria de la conducta sexual (Feder y Marrone, 1977) Ya que durante el ciclo sexual esta hormona tiene diferentes nivel plasmáticos presentando en el proestro concentraciones de 30nM y de 250nM en la mañana del diestro-1 (Park y Ramírez 1987) y dependiendo de la concentración plasmática esta hormona facilita o inhibe la receptividad sexual (Feder y Marrone, 1977). La unión de la P a sus ligandos membranales depende de la presencia de algunos cationes divalentes como:  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ , o  $Mn^{2+}$  y en cambio es inhibida por la presencia de  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ , o  $Zn^{2+}$ . El  $Cu^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$  cationes que tienen también la capacidad de inhibir la unión de la P a sus receptores nucleares.

Tischkau y Ramírez, 1993 encontraron una proteína membranal ligadora de P, dependiente de la acción del  $E_2$  que tiene un peso molecular entre 40- 50 Kda y que presenta diferencias en cuanto de su concentración dependiendo del sexo. Sin embargo a pesar de que se ha intentado representar en una configuración planar las posibles interacciones de la P-ASB con los sitios membranales I y II, pensamos que es poco probable que la cadena lateral y particularmente el grupo metilo de la

molécula de la P. sea este el responsable de la unión al receptor y menos aún que sea este de alta afinidad

Diferentes autores, que a continuación se citan, utilizando la unión de la ASB a diferentes carbonos de la P han encontrado diferentes acciones biológicas de esta hormona dependiendo donde se le une la ASB:

### **Complejos P-ASB y su efecto Biológico**

#### **P3-ASB**

- 1.-Liberación de LHRH in vitro (Ke y Ramírez, 1990)
- 2.-Modulación de la anfetamina para liberar dopamina in vitro (Dluzen y Ramírez 1990)
- 3.-Media la entrada de  $Ca^{2+}$  en espermatozoides humanos (Blackmore, 1993)
- 4.-Inhibe la conductancia iónica inducida por acetilcolina (Valera y col., 1992)
- 5.-Facilita la receptividad sexual en hamster (Frye y col., 1992)
- 6.-Inhibe la acción de los  $\alpha$  adrenorreceptores para aumentar la formación de AMPc en el hipotálamo (Petitti y Etgen, 1992)
- 7.-Aumenta la fosforilación de proteínas por la tirosina (Tesarik y col., 1993)
- 8.-Modifica la afinidad de los receptores para oxitocina (Caldwell y col., 1994)
- 9.-Potencia el efecto estimulador de la serotonina para liberar LHRH (Héry y col., 1995)

#### **P11-ASB**

- 1.-Modula a la anfetamina para liberar dopamina (Dluzen y Ramírez, 1990)

2.-Inhibe la conductancia ionica inducida por acetilcolina (Valera y col., 1992)

También se han descrito algunos efectos modulados por el estrógeno unido a la ASB en el carbono 6, sobre de los canales ionicos de  $Ca^{2+}$  en neuronas del estriado en la rata, Estimulación en la liberación de la dopamina en rebanadas del cuerpo estriado in vitro y .aumento del  $Ca^{2+}$ . intracelular del inositol trifosfato y del diacilglicerol en osteoclastos de ratas hembras (Ramírez y Zheng, 1996)

De los andrógenos se ha reportado que el complejo ASB testosterona unida en el carbono 3 de esta hormona, aumenta la concentración de  $Ca^{2+}$ . intracelular del inositol trifosfato y del diacilglicerol en osteoclastos de ratas machos (Lieberherr y col., 1994)

En concordancias con estos efectos fisiológicos membranales de algunas hormonas esteroides, en algunos informes se ha comunicado la presencia de receptores membranales específicos para P. en Células del Hipotálamo de la rata (Ramírez y Zheng, 1996), oocitos de caracol (Sadler y Maller, 1982) y en espermatozoides humanos (Tesarik y Mendoza 1993). La unión de la Progesterona a sus receptores membranales induce modificaciones rápidas a la concentración intracelular de iones activos libres, principalmente  $Cl^-$  y  $Ca^{2+}$  por lo que es posible que este sea el mecanismo mediante el cuál la esta hormona actúe en la membrana celular (Delville 1991, Tesarik y Mendoza 1997). Por otra parte, el trabajo nuestro (Beyer y col 1980) y el de Whalen y Lauber 1986, como se indica en la tabla 1 sugieren que la acción de la progesterona para inducir la conducta de lordosis, puede ser substituida en ratas pretratadas con estrógenos por la prostaglandina  $E_2$ ; LH-RH, forskolina, toxina

del cólera, Nucleótidos cíclicos; norepinefrina; agonistas de receptores alfa y beta adrenergicos; algunos agonistas colinérgicos como el carbacol, por algunos agonistas muscarinicos y por algunas otras sustancias que se enlistan en la siguiente tabla

**TABLA 1**

**Hormonas**

LH- RH	Moss y col., 1979,1973
Antisuero LH- RH	Cooper y col., 1984
Substancia P	Dorman y Malsbury, 1984
Prolactina *	Harlan y col., 1983
Oxitocina	Caldwell y col., 1984
Hormona estimulante de los melanocitos	Thody y col., 1981
Estradiol*	Kow y Pfaff, 1975
Dihidroprogesterona	Whalen y Gorzalka, 1972
Desoxicorticosterona	Gorzalka y Whalen, 1977
ACTH	Feder y Ruf, 1969

## Neurotransmisores Agonistas y Antagonistas

Agonistas de Acetilcolina	
Carbacol*	Clemens y col., 1980; Kaufman y col., 1988
Betanecol*	Clemens y col., 1980
Oxotremorina	Clemens y col., 1983
Eserina	Clemens y col., 1983
Pilocarpina	Lindstrom, 1975; Clemens y col., 1983 Rainbow y col., 1984

## Serotonina

<b>Agonistas</b>	
d-LSD	Everitt y col., 1975
Quipizina*	Hunter y col., 1985
5-HTP	Hunter y col., 1985

<b>Antagonistas</b>	
Cinanserina*	Ward y col., 1975
Metisergida*	Semlan y col., 1973; Hunter y col., 1985

### Dopamina

<b>Agonistas</b>	
Apomorfin*	Hamburger-Bar y col., 1975; Foreman y Moss, 1979
Dopamina	Foreman y Moss, 1979.

### Antagonistas

Pimozida*	Everitt y col., 1975
Haldol	Caggiula y col., 1979

### GABA

<b>Agonistas</b>	
Acido Hidracinopropionico	McGinnis y col., 1980

## Norepinefrina

<b>Agonistas</b>	
Norepinefrina	Foreman y Moss, 1978 y 1979
Isoprotereno	Foreman y Moss, 1979
$\alpha$ , $\beta$ adrenergicos	Fernández-Guasti, 1985

<b>Antagonistas</b>	
Piperoxona	Everitt y col., 1975
Yohimbina	Everitt y col., 1975
Fentolamina	Foreman y Moss, 1979
Fenoxibenzamina	Foreman y Moss, 1979
LB-46	Ward y col., 1975

## Opiodes

<b>Antagonistas</b>	
Naloxona	Sirinathsinghji y col., 1983.
Naltrexona*	Allen y col., 1985

## Nucleótidos Cíclicos

AMPc	Beyer y col., 1981
GTP*	Beyer y col., 1982
Inhibidores de Fosfodiesterasa	Beyer y Canchola, 1981
GMPc*	Fernández-Guasti y col., 1983

## Otras Drogas

Prostaglandina E2	Moss y col., 1979; Rodríguez- Sierra, 1977
Cicloheximida	Renner y col., 1981
Tetrahydrocannabinol*	Gordon y col., 1978

(\*) indica que son agentes efectivos solo en ratas hipofisectomizadas, adrenalectomizadas o animales tratados con Dexametasona.

También la P puede ser substituida por algunas drogas que alteran la síntesis, la captura o el almacén de neurotransmisores como se ilustra en la tabla 2.

**-TABLA 2**

**Inhibidores de la triptofano hidroxilasa**

Paraclorofenilalanina	Zemlan y col., 1973
Propildopacetamida	Everitt y col., 1975

**Inhibidores de la tirosina hidroxilasa**

Metil-para-tirosina	Everitt y col., 1975
---------------------	----------------------

**Inhibidores del almacén de monoaminas**

Reserpina	Meyerson, 1964
Tetrabenazina	Meyerson, 1964

**Inhibidores de la captura de Serotonina**

Org 6582	Hamburger-Bar y col., 1978
Fenoxetina	Hamburger-Bar y col., 1978

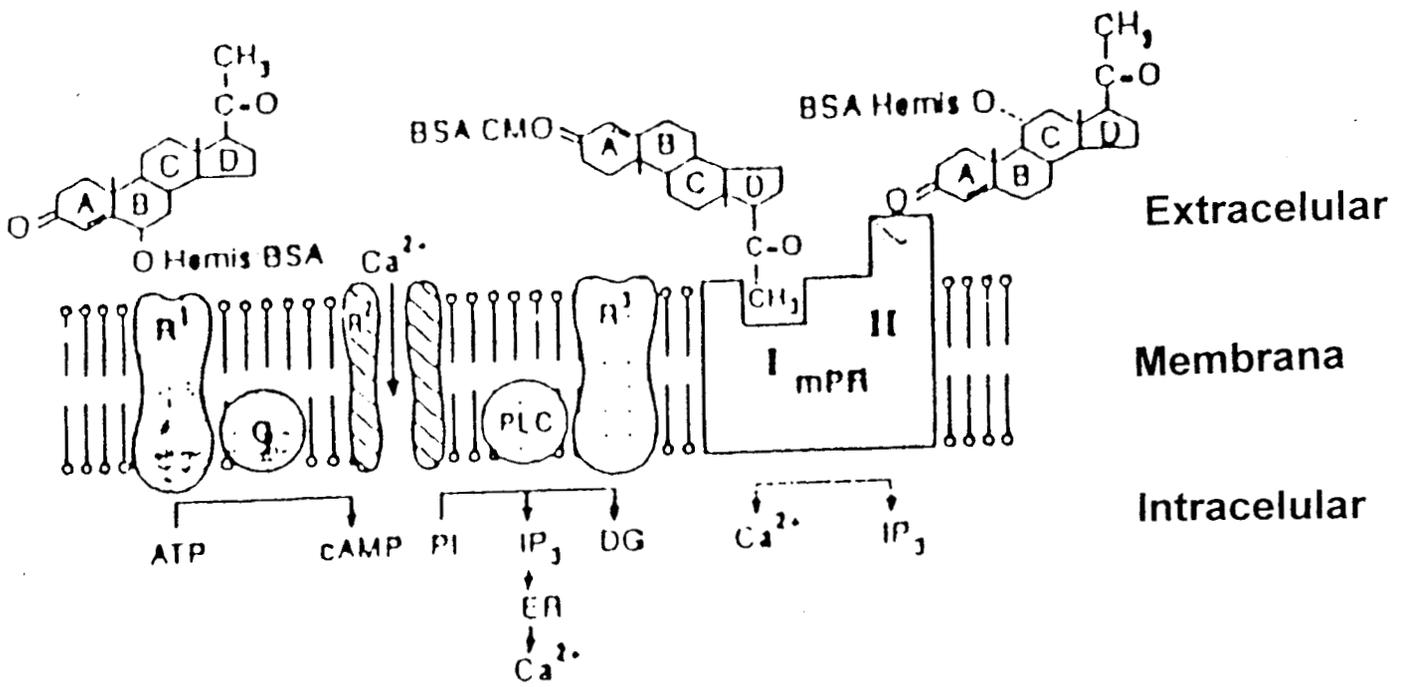
Curiosamente casi todas estas sustancias solo son efectivas en ratas ovariectomizadas y adrenalectomizadas para inducir conducta sexual femenina.

## LA PROGESTERONA Y LOS SEGUNDOS MENSAJEROS.

En cuanto el mecanismo de acción membranal de la progesterona, se ha propuesto que puede interactuar con diferentes proteínas de la membrana unidas a canales iónicos que modifican directa o indirectamente las concentraciones intracelulares del  $Ca^{2+}$ , del inositol trifosfato y de la actividad de la adenilato ciclasa, o a través de proteínas G unidas a receptores para neurotransmisores. El tratamiento con P. modifica la concentración de estos segundos mensajeros en el cerebro y particularmente en el hipotálamo donde se supone que actúa la progesterona para inducir lordosis.

En la activación de la cascada del fosfatidil inositol, como se ejemplifica en el **Esquema II**, el primer evento es la activación de la fosfolipasa C, enzima que cataliza la hidrólisis de los fosfoinosítidos la cual produce dos compuestos: El trifosfato inositol y el diacilglicerol, quienes a su vez inducen la liberación del calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa C respectivamente. El calcio y la proteína cinasa C pueden actuar solos o en forma conjunta para llevar a cabo su función y particularmente el calcio participa en la función de la enzima adenilato ciclasa quién promueva la síntesis de AMPc a partir del ATP.(Kow y col., 1994; Greengard, 1987).

La lordosis, puede ser inducida, como ya, se ha mencionado por la acción de los esteroides gonadales en el cerebro y por muchos otros agentes neuronales como neurotransmisores y algunos neuropéptidos que comparten el mismo efecto facilitando o inhibiendo sistemas de segundos mensajeros que guardan relación con



ESQUEMA II

la activación de la vía del fosfato inositol trifosfato ( $PI_3$ ) y la excitación de neuronas del hipotálamo ventro medial y del Area Ventral Tegmental, donde también se ha encontrado que los estrógenos modulan las enzimas que participan en el metabolismo de esta vía. En cambio la relación del sistema del adenilato ciclasa (AC) y su relación con la lordosis ha sido poco estudiada y los resultados hasta ahora obtenidos guardan una relación con su inhibición y la facilitación de la lordosis, como se muestra en la tabla 3.

TABLA 3

Comparación del efecto de Neurotransmisores y neuropéptidos sobre la conducta de lordosis, actividad neural y enzimas membranales:

Substancia	Lordosis	Actividad Neural	Sistema: Fosfatidil Inositol	Sistema: Adenilato Ciclasa
NE( $\alpha$ 1 $\beta$ )	↑↑	↑↑	↑↑	no estudiado
Ach ( m)	↑↑	↑↑	↑↑	↓.
5- HT2	↑↑	↑↑	↑↑	no estudiado.
LHRH	↑↑	-	↑↑	↑↑
Substancia P	↑↑	↑↑	↑↑	no estudiado
Oxitocina	↑↑	↑↑	↑↑	no estudiado.
Prolactina	↑↑	-	↑↑	no estudiado
TRH	↑↑	↑↑	↑↑	no estudiado
GABAA	↑↑	↓.	↑↑	no estudiado
5-HT1A	↓	↓	↓	↓
DA	↓	↓	↓	↓
Neuropéptido Y	↓	↓	no estudiado.	↓
$\beta$ endorfina	↓	↓	no estudiado	↓
CRF	↓	↓↑	no estudiado	↑↑
$\alpha$ MSH	↓	no estudiado	no estudiado	↑↑
ACTH	↓	-	no estudiado	↑↑
Colecistocinina	↓	↑↑	↓	↑↑
Aminoácidos Excitatorios( NMAD, A.K)	↓	↑↑	↑↑	↓
Péptido vaso activo	↑↑	↑↑	↑↑	↓

↑ Estimulador ↓ Inhibitorio - no efecto - Modulatorio

(Kow, Mobbs y Pfaff, 1994)

## EL RECEPTOR GABA<sub>A</sub> Y LA PROGESTERONA.

Una de las acciones no genómicas más documentadas de la P. es la interacción con el receptor A del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA<sub>A</sub>), receptor modulador de los canales de cloro en el sistema nervioso central, que contiene sitios de modulación alosterica para benzodiazepinas y barbitúricos. Los metabolitos de la P que más se unen a este receptor son 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona y 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ , 21 $\alpha$ -dihidroxi-20-ona y los  $\beta$  derivados de la P (Lan y Gee, 1994). El posible efecto de la P para facilitar la conducta sexual a través de receptores GABAérgicos se sustenta en que el muscimol, agonista del GABA, facilita la conducta sexual mientras que la bicuculina un antagonista GABAérgico la inhibe (McCarthy, 1995). Sin embargo el efecto de estos agonistas y antagonista GABAérgicos pudiera estar mediado por un mecanismo genómico, por las siguientes consideraciones: La inyección de bicuculina en el hipotálamo ventro medial, inhibe también la receptividad inducida por la administración de E<sub>2</sub>, lo cuál sugiere que la modulación de la receptividad por este sistema pudiera ser independiente de la acción de la P, o que las modificaciones sobre la conducta sexual femenina de la rata inducida por los agonistas o antagonistas sea independiente de la modulación del sistema GABAérgico por esta hormona (Delville, 1991). Por otra parte las progestinas "A" reducidas 3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , son las más activas para incrementar la permeabilidad del Cl<sup>-</sup> (Morrow y col., 1987) y curiosamente son muy poco activas para inducir receptividad sexual (Beyer y

González-Mariscal, 1991), es decir no existe una relación directa entre la capacidad de estos esteroides para modificar la permeabilidad del Cl<sup>-</sup> e inducir la conducta sexual.

Muchas de las sustancias utilizadas para inducir receptividad sexual en ratas ovariectomizadas pretratadas con estrógenos, comparten propiedades de acción, actuando, al menos parcialmente, a través de mecanismos modulados por el sistema Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina, quien regula a su vez a otros mensajeros como el sistema inositol-trifosfato el adenilato ciclasa y la expresión de algunos receptores incluyendo a los del GABA (DeLorenzo, 1985).

#### **EL SISTEMA CALCIO- CALMODULINA.**

La Calmodulina (CaM) es una proteína intracelular que liga Ca<sup>2+</sup>, la cual tiene un peso molecular de 16,700 daltones y presente en todas las células, su secuencia está altamente conservada y es casi idéntica entre los animales y los vegetales (Means y col., 1980), posee cuatro dominios de unión para Ca<sup>2+</sup>, con dos sitios de alta afinidad a los cuales se une primero el calcio y conforme se eleva la concentración del ion, se une a los otros dos.

Es el receptor más importante para el calcio y su afinidad por éste depende de las condiciones iónicas.

. Participa en la regulación de muchas de las funciones atribuidas al Ca<sup>2+</sup>, contracción muscular, liberación de neurotransmisores y formación de neurotubulos entre otras (Klee y Vanaman, 1982, Means y Dedman, 1980). Se requiere CaM para

la fosforilación calcio-dependiente de receptores y autoreceptores, mecanismo importante en el ámbito bioquímico relacionados con la inducción de conducta sexual (Pfaff y col., 1994). También se requiere de CaM para la activación de un gran número de enzimas, incluyendo la tirosina hidroxilasa quien participa en la síntesis de catecolaminas (Goldstein y Greene., 1987), adenilato y guanilato ciclasas y otras proteínas cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$ . Adicionalmente los complejos  $Ca^{2+}$ /CaM regulan el proceso de conducción del estímulo nervioso y el transporte axonal (Greengard, 1987; Nair y col., 1987; Nestler y Greengard , 1989) además de participar también en el proceso de secreción de hormonas y neurotransmisores en una gran variedad de células.(DeLorenzo, 1985) y como receptor específico para  $Ca^{2+}$  participa en varios de los procesos celulares atribuidos al  $Ca^{2+}$ .

Con respecto al ion  $Ca^{2+}$ , podemos decir que es uno de los principales segundos mensajeros. El aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico constituye una señal reguladora del metabolismo utilizada por las neuronas, el movimiento de  $Ca^{2+}$  al citosol está controlado por hormonas, neurotransmisores y actividad eléctrica. Además, el inositol trifosfato ( $IP_3$ ) regula el movimiento del  $Ca^{2+}$  hacia afuera de su sitio de almacenaje. La mayoría del  $Ca^{2+}$  intracelular, se encuentra unido a proteínas como la calmodulina, la parvoalbúmina y otras de gran afinidad por este ion. Particularmente, la Calmodulina funciona como intermediario para regular el efecto del  $Ca^{2+}$  sobre muchas proteínas blanco.

El aumento de la concentración citosólica del  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza por medio de dos mecanismos; por transporte a partir del  $\text{Ca}^{2+}$  presente en el fluido extracelular y a través de la liberación del ion de los compartimentos de almacenamiento intracelular

Mediante el primer mecanismo, el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmática se inicia por la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje o conformados por unidades proteicas ligadoras de calcio. Los canales dependientes de voltaje son altamente específicos para  $\text{Ca}^{2+}$  y se encuentran a lo largo de la superficie de la membrana. En el tejido nervioso estos canales se encuentran específicamente concentrados en las terminales presinápticas, de ésta forma, el influjo local de  $\text{Ca}^{2+}$  es causado por la despolarización de las terminales sinápticas y provoca la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana presináptica y, por ende, la liberación de transmisores. En la membrana postsináptica, algunos receptores como el receptor nicotínico de la acetil colina, tienen poros que permiten el paso de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ . El restablecimiento del gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  se realiza a través de mecanismos de extracción activa de  $\text{Ca}^{2+}$  que poseen algunas neuronas y algunos otros tipos de células. Las membranas neuronales, poseen un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  que acopla el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia fuera de la célula contra su gradiente de concentración con el transporte activo de  $\text{Na}^+$  hacia dentro de la célula a favor de su gradiente de concentración.

Mediante el segundo mecanismo de almacenamiento intracelular, las cisternas celulares formadas por retículo endoplásmico liso presentes en las neuronas y otras células contienen, dos proteínas especializadas; una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP que concentra  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la luz de la cisterna y una proteína receptora de  $\text{IP}_3$  que libera calcio al citosol en respuesta a un aumento en la concentración de  $\text{IP}_3$  citosólico.

La liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  del compartimento intracelular es causada por la unión de varios ligandos a receptores asociados a proteínas G en la superficie celular, que activan la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-difosfato ( $\text{PIP}_2$ ) y generan inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ).

Los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico producidos por éstos receptores no requieren de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio externo.

El receptor de inositol trifosfato controla la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del almacén interno y tiene un peso molecular de 313 KDa y siete dominios transmembranales que forman el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  que se abre cuando el  $\text{IP}_3$  se une al receptor.

Como ya se mencionó, la calmodulina es el receptor más importante de calcio y cuando la concentración intracelular de este alcanza niveles de  $10^{-6}$  M se forma el complejo activo  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulina la cual regula a otras proteínas incluyendo a las proteínas cinasas, estas proteínas cinasas catalizan la transferencia de un grupo

fosfato del ATP a un residuo específico de serina, treonina o tirosina. La carga negativa introducida por el grupo fosfato cambia el doblamiento de la cadena polipeptídica, alterando su función. Este mecanismo se utiliza para regular receptores, canales, enzimas y proteínas estructurales.

La proteína cinasa tipo II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulina se encuentra particularmente concentrada en el cerebro, específicamente en las neuronas del cerebro anterior. Forma aproximadamente el 2% de las proteínas del hipocampo y dentro del cerebro anterior aproximadamente la mitad de la cinasa está distribuida en el citosol de la neurona, la restante se encuentra asociada a estructuras particulares incluyendo la "densidad post-sináptica" (especialización del citoesqueleto adherida a la membrana postsináptica). Del 20 al 30 % de la calmodulina se encuentra asociada a ésta y por tanto constituye un blanco probable para el  $\text{Ca}^{2+}$  que entra por canales iónicos abiertos por ligandos. La proteína cinasa calcio calmodulina posee al menos cinco subunidades diferentes, pero sólo la alfa y la beta se expresan en las neuronas (Hidaka y Nairn. 1996).

El descubrimiento de que algunas drogas podrían interferir con la calmodulina, fue realizado por serendípia, cuando se estudiaba el efecto de agentes antipsicóticos sobre el metabolismo de nucleótidos cíclicos, mostrando que los agentes antipsicóticos inhibían la actividad de la adenilato ciclasa, proponiéndose la hipótesis de que la actividad antipsicótica podía estar asociada con la inhibición de la

formación del AMPc (Uzonov, 1971). Posteriormente se demostró que los agentes antipsicóticos no sólo bloqueaban la actividad de la adenilato ciclasa sino también de la fosfodiesterasa. (Levin y Weiss, 1976). Hacia 1976, se demostró que las drogas antipsicóticas inhibían selectivamente formas de fosfodiesterasa  $Ca^{2+}$  - calmodulina dependientes y que en formas independientes de Calmodulina no se alteraba la actividad basal. Este hecho sugería, por tanto, que los antipsicóticos actuaban sobre el sistema  $Ca^{2+}$  - calmodulina más que sobre la fosfodiesterasa (Levin y Weiss, 1976). Más adelante, lo anterior fue confirmado con técnicas de equilibrio de diálisis y ligandos marcados radiactivamente (Levin y Weiss, 1979). Además también se pudo conocer que otros complejos enzimáticos muy importantes que regulan la síntesis de los Nucleótidos cíclicos como son la adenilato y guanilato ciclasas son enzimas  $Ca^{2+}$ - calmodulina dependientes. (Levin y Weiss, 1979)

En cuánto a las acciones bioquímicas de los antipsicóticos podemos decir que gran variedad de drogas clínicamente efectivas se unen a la calmodulina con alta afinidad y que ésta a su vez regula el metabolismo de los nucleótidos cíclicos que median la acción de los neurotransmisores catecolaminérgicos que juegan un papel importante en enfermedades del sistema nervioso como la esquizofrenia y los estados de estado del animo..

La calmodulina también está involucrada en la contracción del músculo liso que es especialmente bloqueada por antipsicóticos. Otras observaciones relacionadas con los efectos colaterales de la terapia con agentes antipsicóticos son la aparición de

alteraciones en la función endocrina principalmente incluyendo neurotransmisores y hormonas; la estimulación de la liberación de noradrenalina y dopamina es un proceso  $\text{Ca}^{2+}$  - Calmodulina dependiente (De Lorenzo y col., 1979) y los antipsicóticos bloquean la liberación de catecolaminas de las terminales nerviosas.

Por otra parte, la terapia con antipsicóticos incrementa la concentración de prolactina y disminuye las concentraciones de hormona de crecimiento, oxitocina y vasopresina en sangre y las de gonadotrofinas en orina.

También se sabe que la liberación de algunas hormonas está relacionada con la función de agentes neurotransmisores y que en éste proceso es indispensable la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , pues la eliminación de  $\text{Ca}^{2+}$  del fluido extracelular bloquea la liberación de neurotransmisores (Trifaro, y Vitale 1993).

Los inhibidores de CaM son antagonistas de la interacción neurotransmisor/receptor, incluyendo receptores dopaminérgicos, adrenérgicos, serotoninérgicos y muscarínicos (Rainbow y col., 1984; Roth y col., 1987; Weiner y Motinoff, 1989).

En base al conocimiento de que la receptividad sexual femenina de la rata hembra puede ser inducida por la administración secuencial de  $\text{E}_2$  y P y que la P puede ser mimetizada por una gran variedad de sustancias como: nucleótidos ciclicos, algunos neurotransmisores, algunos peptidos y prostaglandinas, que tienen en común el utilizar al sistema  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulina como uno de sus mediadores de acción para actuar, consideramos importante estudiar el efecto de algunos inhibidores de este

sistema en la receptividad sexual de ratas ovariectomizadas y pretratadas con  $E_2$  inducida por la progesterona.

## OBJETIVOS

### OBJETIVOS GENERALES:

1.- Contribuir al conocimiento de los mecanismos de acción de las hormonas esteroideas

2.- Conocer si en los mecanismos membranales de acción de la progesterona para inducir conducta sexual femenina participa el sistema Calcio-Calmodulina.

**OBJETIVO PARTICULAR:**

1.- Evaluar el efecto de la administración de algunos fármacos inhibidores del sistema Calcio-Calmodulina sobre la conducta sexual femenina inducida por el tratamiento secuencial de estrógenos y progesterona en la rata hembra adulta.

## **HIPOTESIS:**

El sistema Calcio- Calmodulina participa en el mecanismo de acción membranaral de la progesterona para inducir conducta sexual homotípica en la rata hembra.

## **MATERIAL Y METODOS.**

### **FARMACOS**

Para este experimento utilizamos E<sub>2</sub>, P verapamil, pentobarbital, aceite de cartamo y dos tipos de neurolepticos:

Las fenotiazinas de la cual utilizamos: la prometazina la clorpromazina, la trifluoperazina y la pimozida .

Las butirofenonas de las que utilizamos el haloperidol y un fármaco inhibidor de los canales lentos de Ca<sup>2+</sup> , el verapamil

Las fenotiazinas, son derivados de la tiodifenilamina, en la cual los dos anillos bencenicos están unidos por un átomo de azufre y uno de nitrógeno. Las substituciones usuales se realizan en las posiciones 2 y 10. La fenotiazina, fórmula C<sub>12</sub> H<sub>9</sub> NS, peso molecular 199.3, fue sintetizada en 1883 por la fusión de la difenilamina con azufre y se usó por primera vez como antihelmíntico, antiséptico urinario e insecticida en 1934.

#### **Prometazina (PMZ)**

Al final de la década de los 30's, se sintetizó la prometazina derivado de la fenotiazina, que tiene cualidades antihistamínicas y al igual que muchos otros antihistamínicos también una acción sedante. En 1950 Guiraud y col., probaron la prometazina (con nombre comercial Phenergan) para el tratar la agitación motora de las enfermedades mentales con relativo éxito. Descubriendo en cambio, que la

prometazina es muy eficaz para potenciar el sueño inducido por barbitúricos en la rata y en 1952 el cirujano Francés Laborit, H. y sus col., la emplearon como sustancia potenciadora en la anestesia clínica.

Nombre químico N,N, $\alpha$ -trimetil-10 H-fenotiazina-10-etanamina. Fórmula  $C_{17}H_{20}N_2S$ -HCl. Peso molecular 320.9.d. Se utilizó posteriormente como: sedante, antiemético y antihistamínico.

### **Cloropromazina (CPZ)**

Este hecho tan importante en el ámbito médico y de gran relevancia económica aceleró la búsqueda de otros derivados de la fenotiazina con mayor actividad en el sistema nervioso central y como potenciadoras de la anestesia, y es así como Charpentier en el mismo año de 1952 sintetizó la Cloropromazina, uniéndole un Cl en la posición 2. En el mismo año Laborit y col. Describieron que esta sustancia potenciaba los efectos de los anestésicos y causaba "hibernación artificial". Observaron que la cloropromazina no causaba pérdida de la conciencia, pero producía tendencia a dormir y carencia acentuada de interés en lo que pasaba en el ambiente del individuo.

En 1953, Courvoisier y col., describieron un asombroso número de acciones ejercidas por este medicamento (de ahí el nombre comercial francés de Largactil) gangliolítica, adrenolítica, antifibrilatoria, antiedema, antipirética, antichoque, anticonvulsiva y antiemética. Además que aumentaba la actividad de varios analgésicos y depresores del sistema nervioso central. Este fármaco se usó por

primera vez en el tratamiento de las enfermedades mentales por Delay y col., en 1952.

Nombre Químico: 2-cloro-N, N-dimetil-10H-fenotiazina-10 propanamina. Fórmula  $C_{17}H_{19}ClN_2S$ . peso molecular 318.88 d

### **Trifluoperazina.(TPZ)**

La Trifluoperazina es un derivado de la fenotiazina, que tiene un grupo  $CF_3$  en el sitio 2 y un anillo de piperazina en el sitio 10, esta fenotiazina tiene una aumentada potencia antiémética y antipsicótica y la tendencia a causar signos extrapiramidales en comparación con las otras fenotiazinas.

Nombre químico N, N-dimetil-trifluorometil-10H-fenotiazina-10 propanamina. Fórmula:  $C_{18}H_{19}F_3N_2S \cdot HCl$ . peso molecular = 407.4 d

### **Pimozida (PIM)**

La pimozida cuyo nombre químico es: 1-(4-(4-bis(4-fluorofenil)butil)piperidinil)-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-ona y su fórmula:  $C_{28}H_{29}F_2N_3O$  peso molecular = 461.5d fue sintetizado por Janssen y col., como una variante de la butirofenona, represento en su momento una alternativa muy interesante para el tratamiento de las psicosis resistentes a las fenotiazinas o al haloperidol una butirofenona, fue ampliamente utilizada en Europa y los Estados Unidos, actualmente está parcialmente fuera de mercado ya que se descubrió que produce alteraciones en células de la sangre, particularmente leucopenia..

### **Haloperidol (HAL)**

Este fármaco surgió de las investigaciones para aumentar la potencia analgésica de las 4-piperidinas afines a la meperidina.

Fue sintetizado por Janssen en 1958 e introducido en la terapéutica para el tratamiento de las psicosis en Europa y 10 años más tarde en los Estados Unidos de Norteamérica, alterna eficazmente con las fenotiazinas su nombre químico es: 4-4-4-clorofenil-4-hidroxi-1-piperidinil-1-butanona, su fórmula:  $C_{21} H_{23} ClFNO_2$  y su peso molecular = 375.8d

### **Verapamil (VER)**

Es un fármaco inhibidor de los canales lentos o "L" del calcio. Su principal acción es impedir el movimiento a través de la membrana del calcio ionico extracelular, que participa en la contracción de las células de la musculatura lisa vascular, lo que produce una reducción de la resistencia vascular sistémica disminuyendo la presión arterial. El verapamil es uno de los fármacos mas utilizados en los Estados Unidos de Norteamérica en el tratamiento de la hipertensión arterial. Su nombre químico es: 5-(3-4-dimetoxifenil-etil-metil-amino) -2-(3-4-dimetoxi-fenil)-2-isopropil valeronitrilo., su fórmula es:  $C_{27} H_{38} N_2 O_4$  y su peso molecular = 454.5 d

## **Pentobarbital**

El pentobarbital fue uno de los primeros fármacos utilizados en los problemas del insomnio y en los problemas convulsivos y posteriormente fue utilizado como un anestésico, su nombre químico es: 5-etil-5-(1-metilbutil)-2, 4, 6 (1H, 3H,5H)-pirimidinatriona , 5-(1metilbutil) barbiturato

Fórmula  $C_{11}H_{17}N_2Na O_3$  Peso Molecular 248.26d

## **Estradiol Benzoato ( $E_2$ )**

Nombre químico:

3, 17  $\beta$  dihidroxi-1, 3, 5 (10) estratieno 3- benzoato.

Fórmula  $C_{25}H_{28}O_3$ . Peso Molecular 376.5 d

## **Progesterona (P)**

Nombre químico  $\Delta_4$  pregnan-3, 20 diona Fórmula  $C_{21}H_{30} O_2$  Peso Molecular 314.5 d

La trifluoperazina (TPZ) y la pimozida (PIM) con grado de reactivo para análisis fueron donados por Laboratorios Janssen (Bélgica). El verapamil (VER) fue obtenido de Laboratorios Knoll (México, D.F.) en su presentación parenteral. La clorpromazina (CPZ) Laboratorios Rhone Poulenc México, prometazina (PMZ) donada por el Laboratorio DIBA México. El benzoato de estradiol ( $E_2$ ) y la progesterona (P) provienen de Sigma Chemical Co. (San Luis Missouri, EEUU).

Para estos experimentos utilizamos ratas hembras de la cepa Wistar, jóvenes y sexualmente inexpertas de  $250 \pm 20$ g. de peso, provenientes del bioterio de la

*E. Canchola 50*

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, fueron cuidadas desde su nacimiento y se les mantuvo en condiciones de bioterio bajo un ciclo normal de luz/oscuridad. A los 90 días de edad se les ooforectomizó y se les cambió al cuarto de observación del mismo bioterio, que tiene un ciclo controlado e invertido de luz/oscuridad (12hr/12hr) la luz se apaga a las 8:0 AM, a una temperatura de  $21 \pm 1$  °C fueron colocados 4 animales por jaula de acrílico de 23 cm. de ancho, 38 cm largo y 19 cm de altura y se les alimentó con purina y agua ad libitum. Las ooforectomías se practicaron en forma bilateral bajo anestesia con éter. Dos o tres semanas después de este procedimiento, recibieron un pretratamiento con  $2 \mu\text{g}$  ( $0.00531 \mu\text{moles}$ ) de BE al tiempo 0 y a las 44 h., después les fueron inyectados  $2 \text{ mg}$  ( $6.36 \mu\text{moles}$ ) de P disueltos en 0.2 ml de aceite de cártamo y divididos en grupos de 10 animales. Inmediatamente después de la aplicación de P, cada grupo recibió, una administración intraperitoneal de alguno de las siguientes sustancias (ver Tabla 4): Solución salina (controles); Pentobarbital sódico ( $25 \text{ mg/kg} = 100.80 \mu\text{moles}$ ); Trifluoperazina (TPZ 1, 2, 4, y  $8 \text{ mg/kg} = 2.45, 4.91, 9.82$  y  $19.65 \mu\text{moles}$ ); Prometazina (PMZ 1, 2, 4, y  $8 \text{ mg/kg} = 3.11, 6.23, 12.46$  y  $24.89 \mu\text{moles}$ ); Clorpromazina (CPZ 1, 2, 4 y  $8 \text{ mg/kg} = 3.14, 6.28, 12.57$  y  $25.15 \mu\text{moles}$ ); Haloperidol (HAL 1, 2, 4 y  $8 \text{ mg/kg} = 2.66, 5.33, 10.66$  y  $21.33 \mu\text{moles}$ ); Pimozide (PIM 1, 2, 4 y  $8 \text{ mg/kg} = 2.16, 4.33, 8.67$  y  $17.35 \mu\text{moles}$ ) y Verapamil (VER 1, 2, 4 y  $8 \text{ mg/kg} = 2.20, 4.40, 8.81$  y  $17.62 \mu\text{moles}$ ) disueltos en un volumen de 0.2 ml de la manera previamente descrita (Rodríguez Medina y col 1993)

Las pruebas de conducta sexual de las hembras tratadas se realizaron 4 h. Después de la aplicación de P más uno de los neurolépticos, utilizando machos con experiencia sexual. Las observaciones de la conducta sexual se realizaron bajo luz roja tenue siempre durante la fase de oscuridad del ciclo diario en arenas circulares de Plexiglas (de 53cm de diámetro y 45 cm de altura). Después de 10 montas vigorosas se midió en cada hembra su receptividad, representada por el cociente de Lordosis (CL), calculado de la siguiente manera: Número de lordosis/Número de montas.

Los diferentes tratamientos farmacológico utilizados en los sujetos experimentales se realizaron utilizando un diseño experimental doble ciego..

Para discriminar el efecto sedante de los fármacos, cada hembra fue cuidadosamente probada inmediatamente antes del estudio de conducta sexual para detectar si existía alguna afectación significativa en su locomoción o sus reflejos posturales. Aquellas cuyos reflejos no eran considerados normales fueron descartadas del experimento.

Como una comprobación adicional de que los animales no presentaran un efecto sedante importante, se midió la calidad de la lordosis en una escala de 0 a 3: sin lordosis, ligera, moderada y dorsiflexión completa respectivamente de acuerdo con Hardy y DeBold. 1971. Cualquiera correspondiente a los grados 2 y 3 fueron considerados positivos.

Se tomaron observaciones adicionales de los patrones conductuales precopulatorios femeninos, o sea: presentación de saltos cortos(hoping) carreras cortas(darting) y movimientos de orejas (wiggling), tal como fue propuesto por Madlafousek y Hlinák 1977.

El análisis estadístico fue realizado en una PC 486DX2, compatible con IBM, utilizando el paquete estadístico Microstat II. La información fue procesada por un Análisis Multifactorial de Varianza (ANOVA) para dos variables: la administración del compuesto y la dosis. Se utilizó un intervalo de confianza del 95% para la comparación entre grupos Las tablas de la Prueba Exacta de Fisher fueron utilizadas para establecer las diferencias significativas de la proporción de ratas que presentaron conducta sexual. Los grupos se compararon con la prueba "t" de Student.

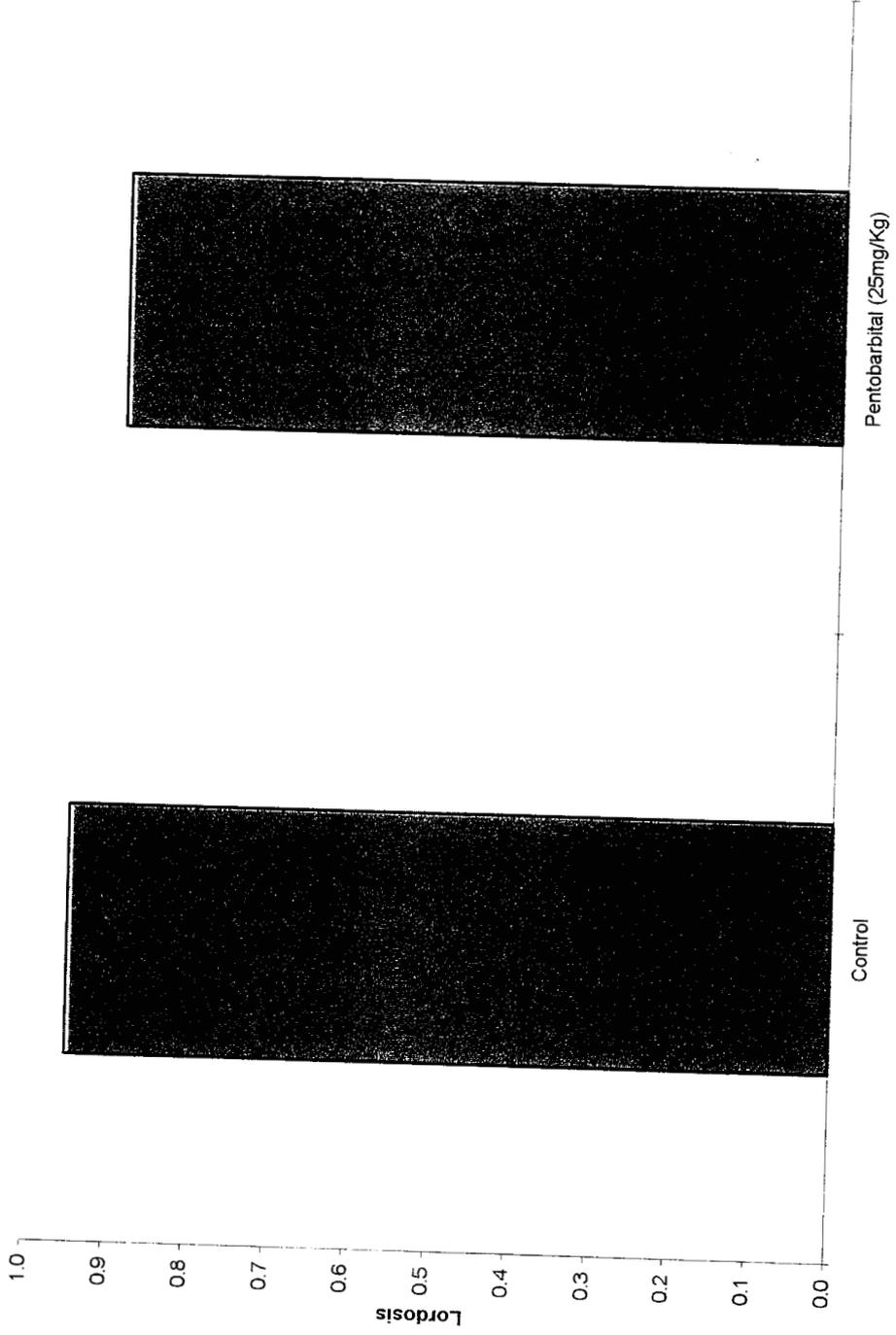
## **RESULTADOS.**

Los resultados de estos experimentos se muestran en las gráficas 1 al 9 y en las tablas 4 y 5.

La cuidadosa observación de los sujetos experimentales, mostró que los fármacos con bajo efecto antipsicótico, como la prometazina, mostraron los niveles más altos de sedación en el período inmediato a su aplicación (Hollister, 1973). Así mismo,

*E. Canchola 53*

# Pentobarbital

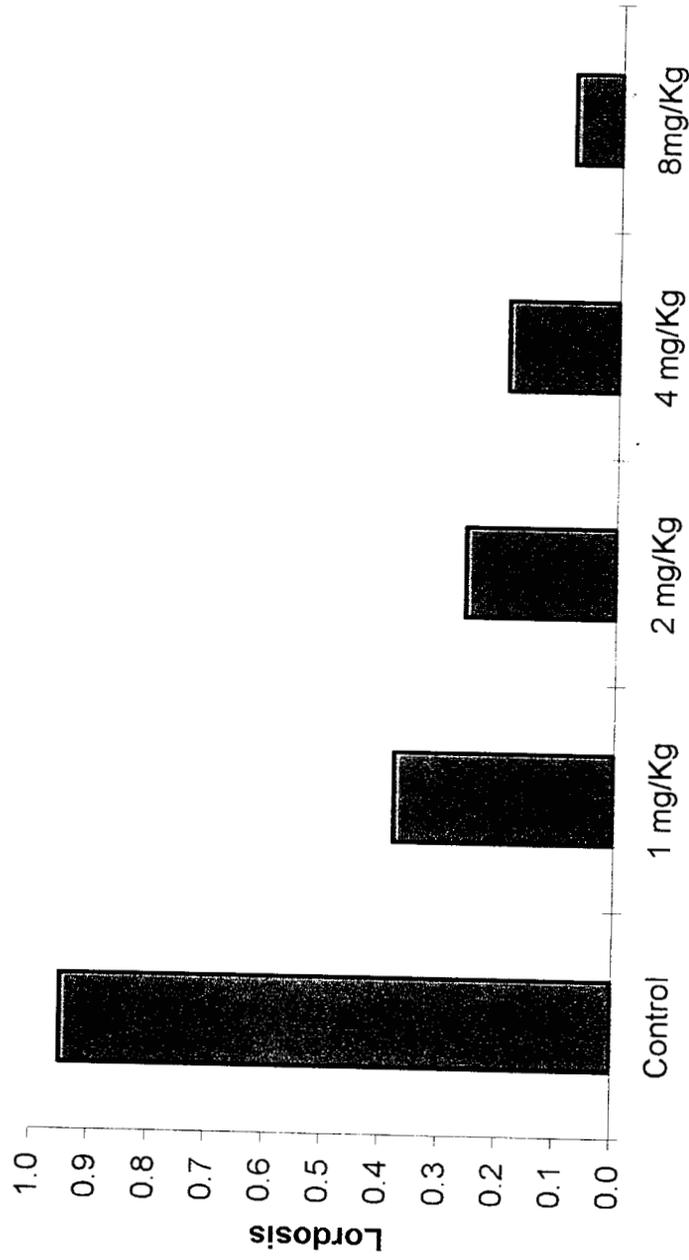


Control

Pentobarbital (25mg/Kg)

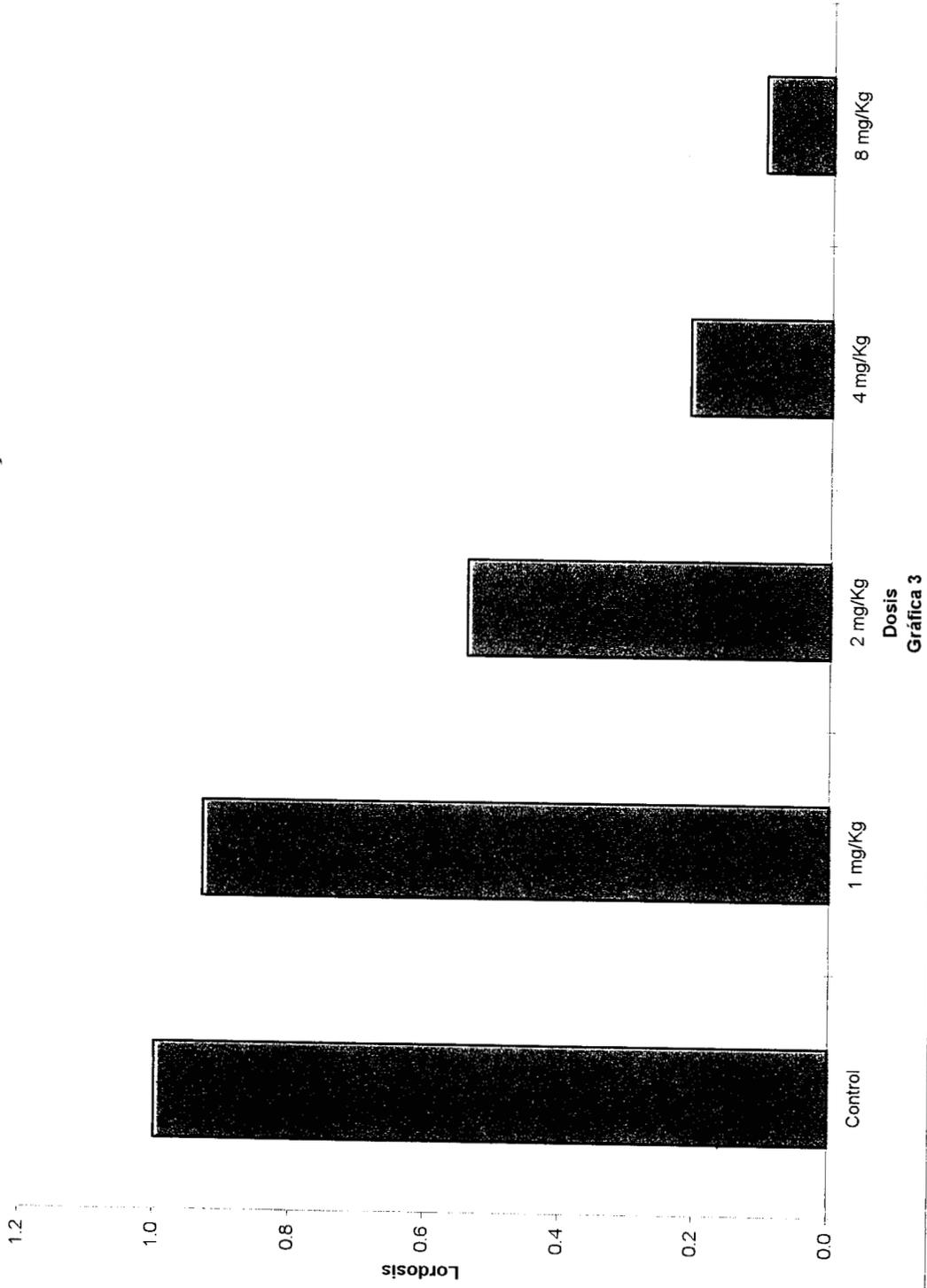
compuestos  
Gráfica 1

# PIMOZIDA

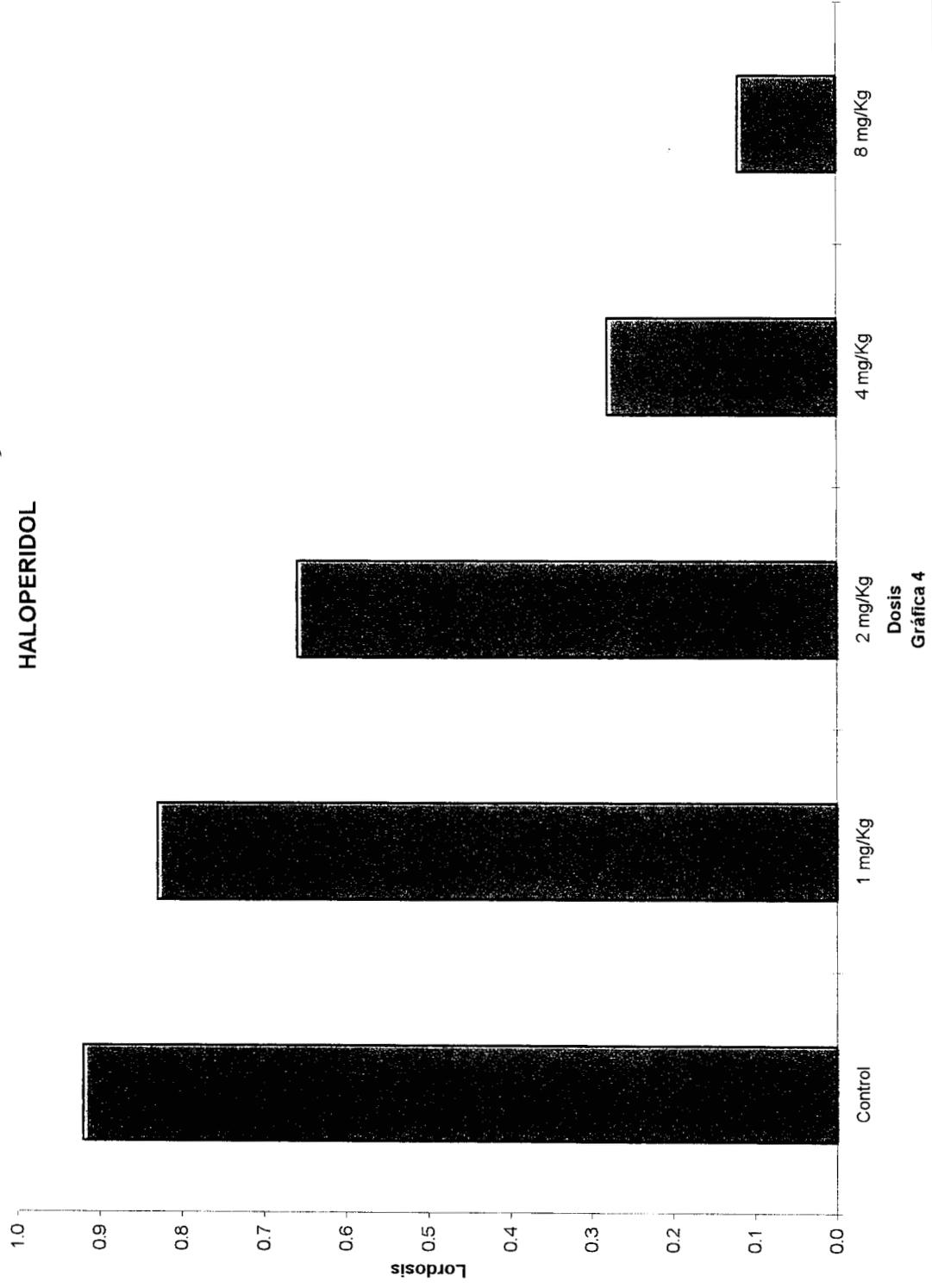


Dosis  
Gráfica 2

TRIFLUOPERAZINA

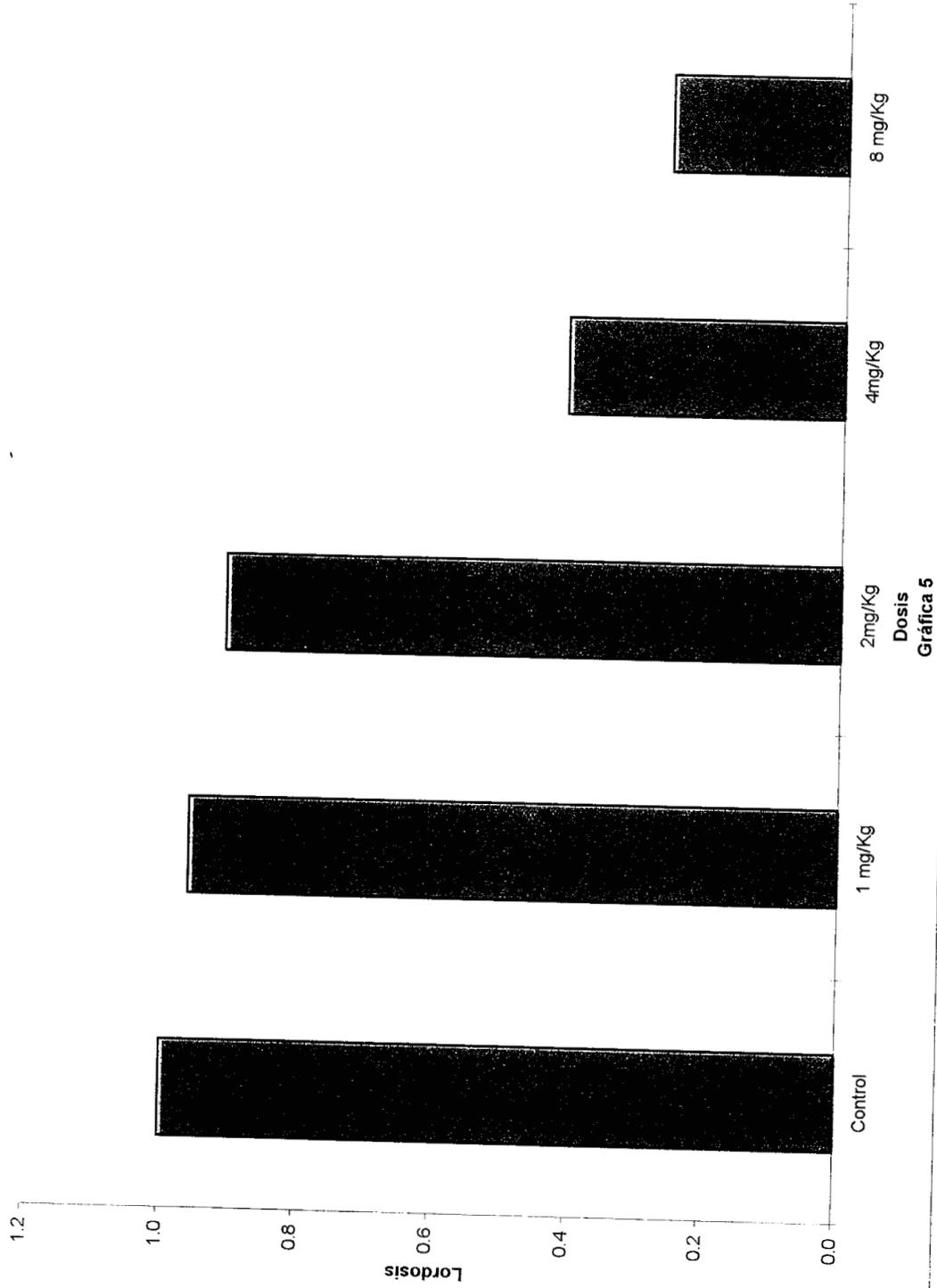


# HALOPERIDOL

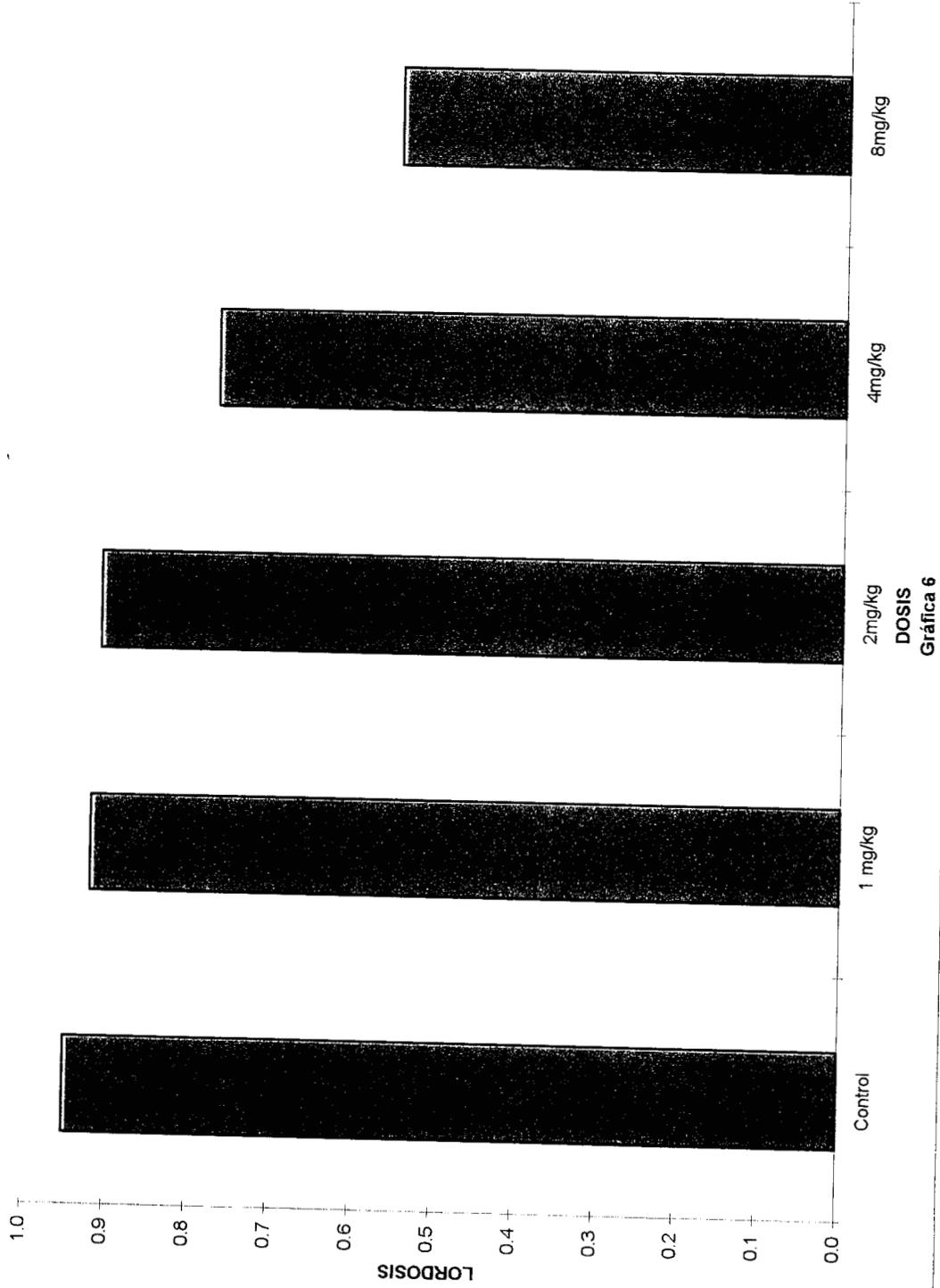


Dosis Gráfica 4

# CLOROPROMAZINA

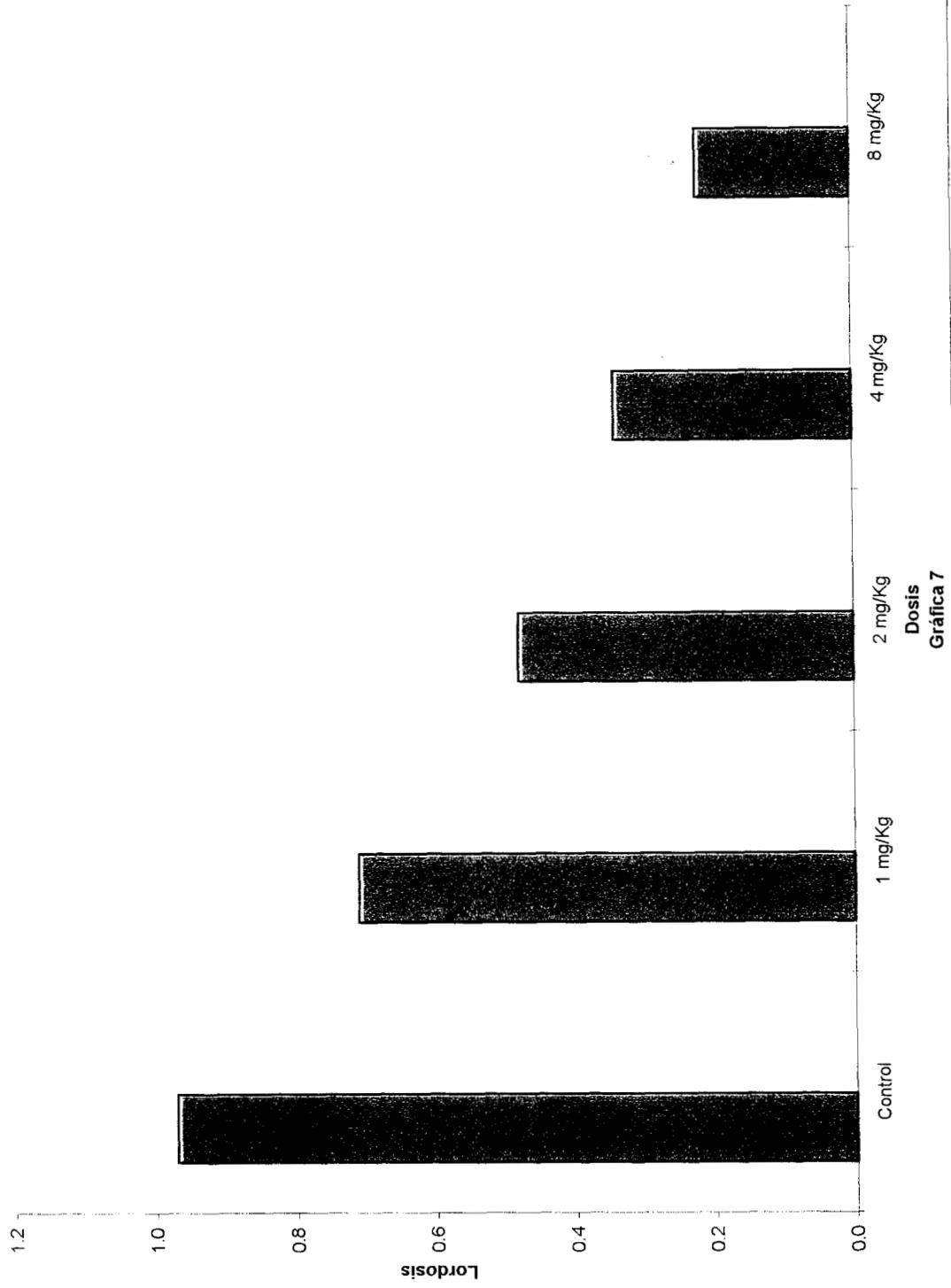


PROMETAZINA

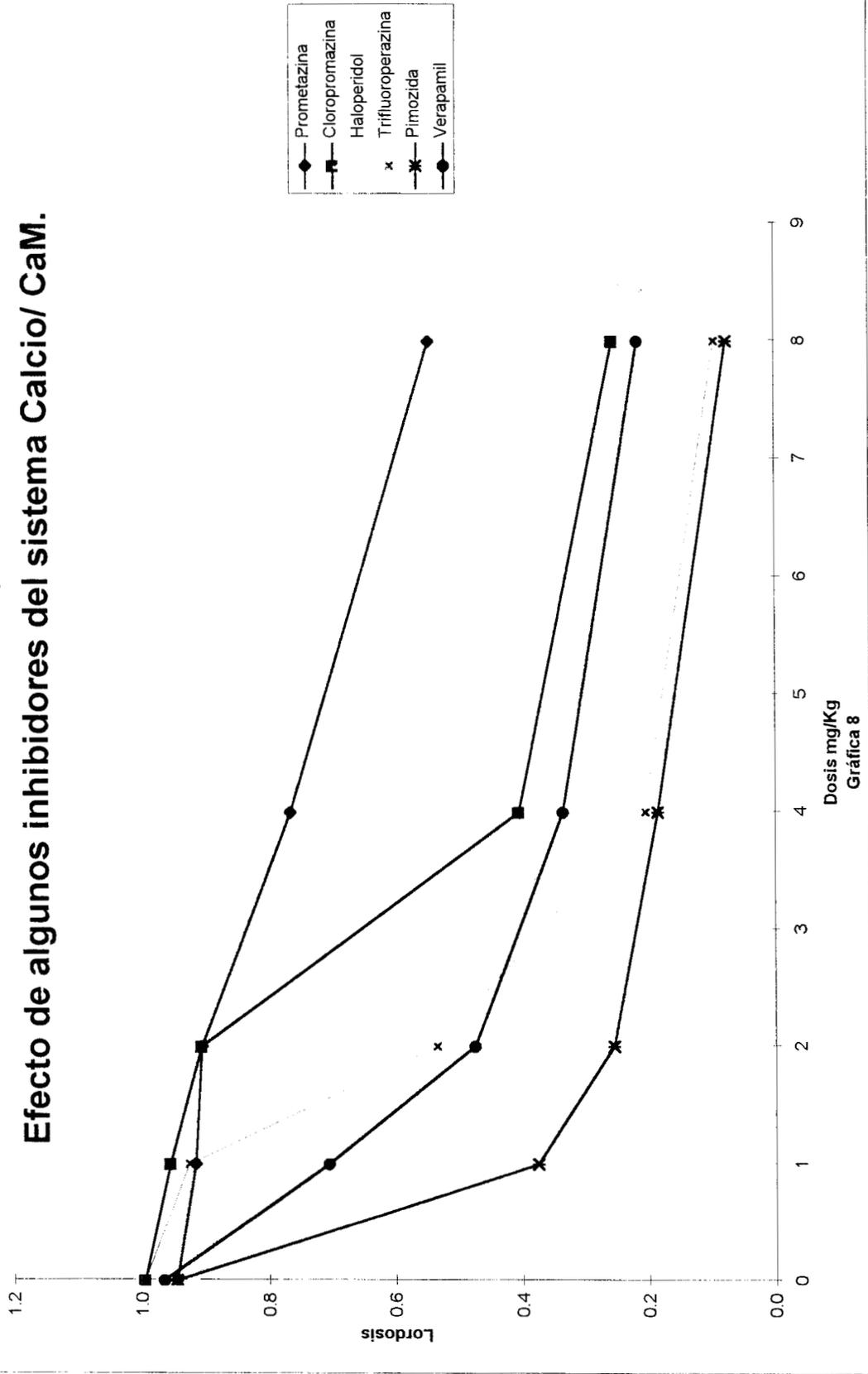


DOSIS  
Gráfica 6

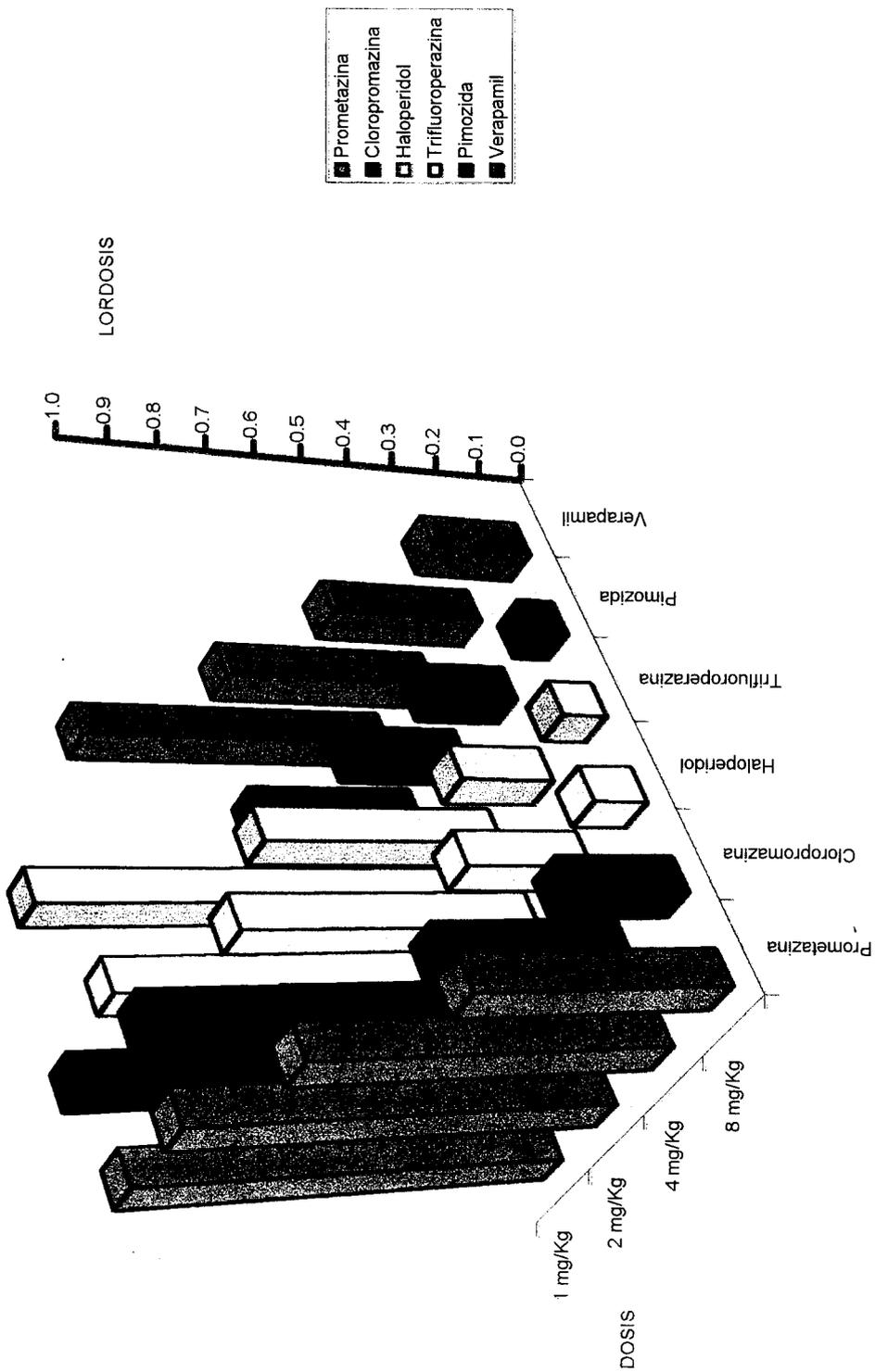
VERAPAMIL



# Efecto de algunos inhibidores del sistema Calcio/ CaM.



EFFECTO DE INHIBIDORES SOBRE EL SISTEMA CALCIO /CaM



Gráfica 9

éste fármaco también fue el menos efectivo en la modificación de la conducta lordótica inducida por progesterona. El pentobarbital también tiene un efecto hipnótico tan importante o mayor y más prolongado que cualquiera de los inhibidores del sistema calcio-calmodulina que se utilizaron y solo algunos de los animales tratados con esta sustancia mostraron ligeras alteraciones en sus reflejos durante la prueba de conducta sexual. Los resultados obtenidos mostraron que el nivel de esta alteración no fue suficiente como para interferir con la producción del reflejo lordótico. Estas observaciones nos permitieron dar por descontado el efecto sedante de los fármacos como una posible causa de las modificaciones observadas en la conducta sexual. Adicionalmente, es importante mencionar que existió un balanceado patrón de actividad precopulatoria (Madiafousek y col., 1977) en todos los animales que mostraron una conducta lordótica.

La Figura 1 muestra una comparación gráfica entre nuestros resultados sobre la efectividad de los fármacos probados como inhibidores de conducta sexual facilitada por progesterona y la información previamente publicada por Levin-y Weiss en 1979 sobre su actividad como inhibidores del sistema  $Ca^{2+}/CaM$  dependiente de fosfodiesterasa y como inhibidores de la unión de iones de  $Ca^{2+}$  por parte de la CaM. La actividad de los fármacos, experimentales en la inhibición del efecto facilitatorio de la conducta sexual femenina, demostrada por su efecto sobre la lordosis, inducido por progesterona en ratas ooforectomizadas y pretratadas con estrógenos, parece estar específicamente relacionado con su eficiencia como inhibidores de la CaM

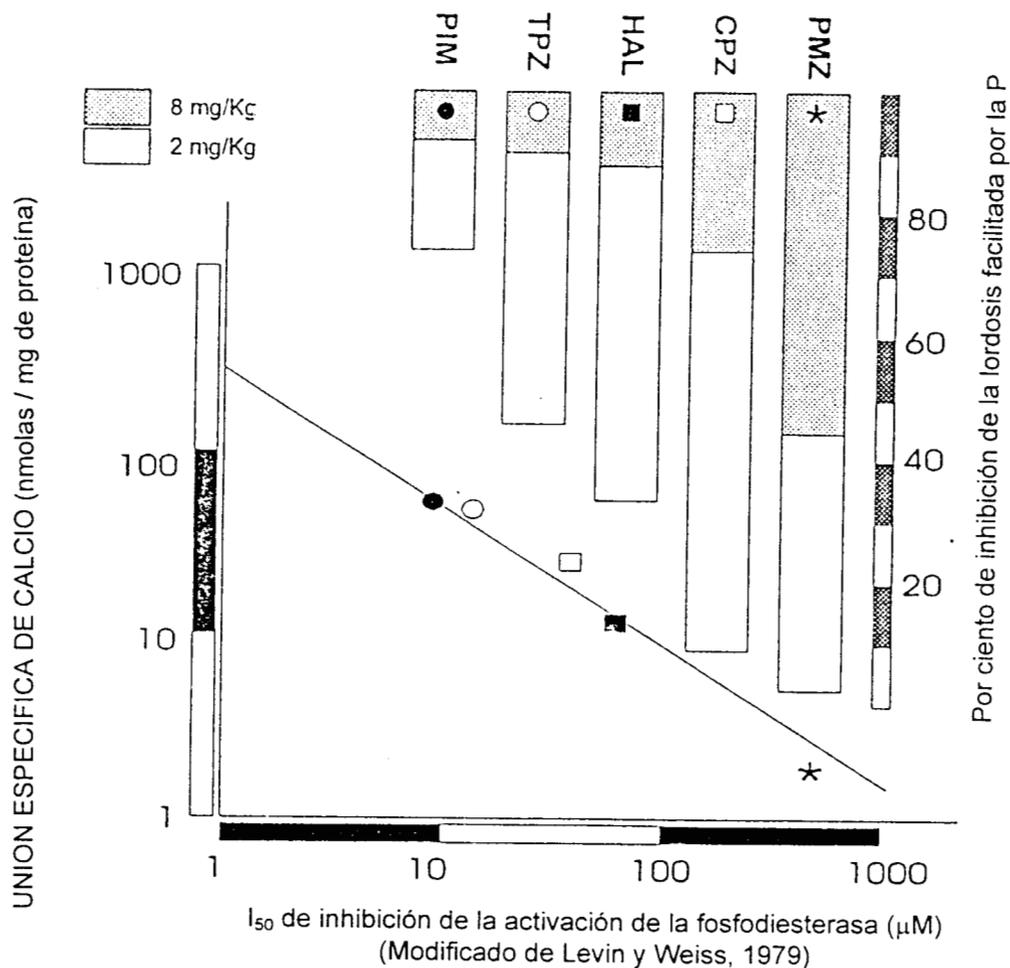


Figura 1.- Comparación de la efectividad de los fármacos probados (2 y 8 mg/kg de peso) como inhibidores de la receptividad inducida por P en ratas ovariectomizadas pretratadas con  $E_2$ , con su potencia inhibitoria de la fosfodiesterasa dependiente del sistema Calcio-Calmodulina y su union especifica al calcio-calmodulina

Los símbolos de cada barra corresponden a los indicados en la línea de afinidad Calcio-Calmodulina y la actividad fosfodiesterasa

Fármaco	1 mg/Kg. = $\mu$ moles	2 mg/Kg. = $\mu$ moles	4 mg/Kg. = $\mu$ moles	8 mg/Kg. = $\mu$ moles
PIM (461.5)	2.16	4.33	8.67	17.35
TPZ (407.0)	2.45	4.91	9.82	19.65
HAL (375.8)	2.66	5.33	10.66	21.33
CPZ (318.8)	3.14	6.28	12.57	25.15
PMZ (320.9)	3.11	6.23	12.46	24.49
VER (454.5)	2.20	4.40	8.81	17.62
Pent. (248)	100.80			

dependiente de fosfodiesterasa y como ligandos para el complejo  $Ca^{2+}/CaM$ , siendo la PIM el más activo, seguido de la TPZ, HAL y CPZ, mientras que la PMZ solo fue marginalmente efectiva; el VER (un inhibidor de los canales lentos de calcio), indujo efectos comparables a los producidos por los fármacos anticalmodulina más efectivos.

La Tabla 4 resume los resultados obtenidos de estos experimentos. Como se puede observar todos los fármacos a dosis de 4 mg/kg. o mayores inhibieron la lordosis. Únicamente el HAL, el PIM y el VER fueron activos con la dosis inferior utilizada (1 mg/kg.). El nivel máximo de actividad fue mostrado por la PMZ, aunque a dosis de 8 mg/kg. no se encontró diferencia estadística entre este compuesto y la TPZ o el HAL. Los resultados obtenidos por la aplicación del pentobarbital (25 mg/kg.) no mostraron diferencia estadística significativa con el grupo de animales tratados solo con solución salina (controles).

**TABLA 4**

**Efecto de algunos compuestos inhibidores del sistema  $Ca^{2+}$  Calmodulina sobre la conducta de lordosis inducida por el tratamiento secuencial de E2 y P. en ratas ovariectomizadas**

COMPUESTO	CONTROL	1 mg/kg.	2mg/kg	4mg/kg	8mg/kg
Prometazina	0.95±0.08	0.92±0.07 <sup>a</sup>	0.91±0.06 <sup>a</sup>	0.77±0.22 <sup>*a</sup>	0.55±0.28 <sup>*a</sup>
Cloropromazina	1.00±0.00	0.96±0.03 <sup>a</sup>	0.91±0.05 <sup>a</sup>	0.41±0.26 <sup>*b</sup>	0.26±0.10 <sup>*b</sup>
Haloperidol	0.92±0.08	0.83±0.06 <sup>*b</sup>	0.66±0.14 <sup>*b</sup>	0.28±0.16 <sup>*b</sup>	0.12±0.05 <sup>*c</sup>
Trifluoperazina	1.00±0.00	0.93±0.06 <sup>a</sup>	0.54±0.25 <sup>*b</sup>	0.21±0.07 <sup>*c</sup>	0.10±0.03 <sup>*c</sup>
Pimozida	0.95±0.05	0.38±0.07 <sup>*c</sup>	0.26±0.11 <sup>*c</sup>	0.19±0.06 <sup>c</sup>	0.08±0.02 <sup>*c</sup>
Verapamil	0.97±0.02	0.71±0.13 <sup>*b</sup>	0.48±0.09 <sup>*b</sup>	0.34±0.13 <sup>b</sup>	0.22±0.05 <sup>*b</sup>
Pentobarbital	0.89±0.10				

Cociente de lordosis (promedio ± desviación estándar)

\*<0.05 comparado con el grupo inmediato de la izquierda.

Letra diferente del supraíndice indica que existe diferencia estadística significativa (p<0.05 o menor) entre los valores de la misma columna.

La Tabla 5 muestra una comparación entre nuestros resultados sobre la efectividad de los agentes farmacológicos probados como inhibidores de la facilitación de la conducta sexual femenina inducida por la P, y los datos previamente publicados por Levin y Weiss en 1979, sobre su actividad, como inhibidores de la fosfodiesterasa dependiente del sistema  $Ca^{2+}/CaM$  y como inhibidores de la unión específica de la CaM con el  $Ca^{2+}$ .

La actividad de las drogas probadas sobre la facilitación de la conducta sexual caracterizada por lordosis, inducida por la P. en ratas ovariectomizadas pretratadas con  $E_2$ , con la posible excepción de la CPZ, están aparentemente relacionadas con su eficacia para inhibir la actividad de la fosfodiesterasa dependiente del sistema  $Ca^{2+}/CaM$  y de su capacidad para unirse al complejo  $Ca^{2+}/CaM$ : PIM fue el fármaco más efectivo seguido de la TPZ y la PMZ tuvo solo efectos marginales. Adicionalmente el VER inhibidor de los canales lentos de  $Ca^{2+}$ , mostró efectos que son comparables con los del fármaco más potente la PIM en su acción anticalmodulina.

**TABLA 5**

**Efectividad inhibitoria de los fármacos probados sobre la facilitación de la conducta sexual femenina, comparados con su actividad como inhibidores del sistema Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina**

COMPUESTO	Inhibición ID <sub>50</sub> : Activación de la fosfodiesterasa (μM)	Unión específica de Ca <sup>2+</sup> (nmol/mg Proteína)	Inhibición ID <sub>50</sub> : Cociente de Lordosis (mg/Kg)
Pimozida	7.5	68.7	0.82
Trifluoperazina	10.4	58.3	1.8
Clorpromazina	42.2	22.7	3.8
Haloperidol	63.0	12.8	2.4
Prometazina	334.0	3.8	10.3

Dato calculado del trabajo de Levin y Weiss 1979.

## DISCUSION.

Nuestros resultados indican que, existe una buena correlación entre la efectividad de los fármacos antipsicóticos utilizados como inhibidores de la conducta sexual facilitada por progesterona y la actividad de los mismos fármacos como inhibidores del sistema  $Ca^{2+}/CaM$  dependiente de la actividad de la fosfodiesterasa y como inhibidores específicos de la unión de iones de calcio con calmodulina. Esta correlación valida la posible participación del sistema  $Ca^{2+}/CaM$  en el mecanismo de acción de la progesterona como facilitador de la respuesta lordótica de la rata ooforectomizada y pretratada con estrógenos. Como una posibilidad adicional para sustentar lo anterior se tiene la acción inhibitoria mostrada por el VER, un bloqueador de los canales de transporte lento de  $Ca^{2+}$ . Se ha demostrado por espectroscopia de resonancia magnética nuclear que los bloqueadores de canales de  $Ca^{2+}$  como la felodipina, nifedipina, diltiazem y prenilamina, entre otros, interactúan con la CaM (Boström y col., 1981, Johnson, 1983). Estos resultados conducen a la posibilidad de que la CaM pueda servir como un sitio intracelular de acción para este tipo de agentes farmacológicos, tal vez siendo el elemento responsable de sus principales efectos farmacológicos (Roufogalis, 1985).

Se ha sugerido que el sistema de transmisión adrenérgica central está involucrado en el mecanismo de acción de esteroides para inducir la conducta lordótica en roedores (Pfaff y col., 1994). Por lo que, la administración de norepinefrina, epinefrina

o de agonistas adrenérgicos puede substituir a la progesterona en la inducción de lordosis en roedores pretratados con estrógenos (Foreman y Moss, 1978). Es más, el bloqueo de la síntesis de norepinefrina o los antagonistas adrenérgicos previenen la expresión de la lordosis producida por la acción secuencial de estrógenos y progesterona (Fernández-Guasti y col., 1985). Es bastante claro que cualquier hipótesis que aspire a explicar el mecanismo por el cual se induce conducta lordótica con estrógenos más progesterona, debe dilucidar como la estimulación adrenérgica activa la producción de lordosis en la ausencia de progesterona en ratas ooforectomizadas pretratadas con estrógenos. (Para revisión ver a Whalen y Lauber, 1986).

Muchos antagonistas de CaM tienen una gran potencia como antagonistas de receptores dopaminérgicos, adrenérgicos, serotoninérgicos y muscarínicos (Rainbow y col., 1984; Roth y col., 1987; Weiner y Molinoff, 1989). Muchas de las acciones de estos fármacos, independientemente de la que tienen sobre la CaM, pueden entenderse por su actividad sobre otros parámetros del metabolismo del calcio, como: a) inhibición de las proteínas cinasas dependientes de calcio, proteínas fosfatasas y fosfodiesterasas; b) movilización del calcio de sus sitios específicos en la membrana; c) interacciones con otras proteínas que ligan calcio, participando con ello en eventos tales como la síntesis de transmisores y su liberación (Roth y col., 1987) d) bloqueo tanto de los procesos de transporte activo como del pasivo de

calcio, incluyendo el transporte no regulado por CaM del retículo endoplásmico (Roufogalis, 1985).

Es bien conocido que el proceso de fosforilación de proteínas se encuentra involucrado en la regulación de la función neuronal (Nairn y col 1985, Nair y Pelfrey, 1987) y constituye un paso muy importante en la activación genética por los complejos receptor-hormona, este proceso es también importante para facilitar la conducta sexual, ya que el dibutyryl AMPc la induce en forma similar que la progesterona (Beyer y col., 1981) y el efecto inductor de lordosis por la progesterona, es también potenciado por inhibidores de la fosfodiesterasa (Beyer y Canchola, 1981). Al menos tres clases diferentes de proteínas cinasas se encuentran involucradas en la fosforilación de un gran número de proteínas neuronales: Cinasa A, Cinasa C y la Cinasa II dependiente de CaM. La primera, que es al mismo tiempo el paso limitante en el proceso de biosíntesis de catecolaminas, es catalizada por la tirosina hidroxilasa (thx), (Weiner y Molinoff, 1989, Hidaka y Nairn, 1996). La thx es una oxidasa mixta cuya actividad es modulada por fosforilación reversible (Goldstein y col 1987). Las propiedades cinéticas de la enzima fosforilasa la hacen cambiar de tal manera que adquiere una mayor afinidad por el cofactor de hidropteridina y se vuelve menos sensible a la inhibición por producto final. thx es un substrato para los tres tipos de cinasas mencionadas anteriormente (Goldstein y col., 1987; Hidaka y col., 1996). Existe considerable evidencia que sugiere que los procesos de fosforilación dependientes de  $Ca^{2+}$ , mediados por la cinasa del sistema  $Ca^{2+}/CaM$

y/o la proteína cinasa C, que son los responsables principales de la activación in vivo e in situ de thx (Nestler y Greengard, 1989).

Los procesos dependientes del sistema  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  también parecen estar involucrados en el mantenimiento de la actividad basal de la tirosina hidroxilasa (thx) medida en rebanadas de tejido de cuerpo estriado. Es conocido que la actividad sostenida de neuronas simpáticas causa un incremento en el movimiento interno de  $\text{Ca}^{2+}$  y consecuentemente incrementa la fosforilación de thx a través de la activación de la proteína cinasa dependiente de CaM (Goldstein y col 1987). Las diversas evidencias sugieren que la modificación en la activación de thx posterior a la administración de neurolépticos también puede ser debida a la fosforilación de la enzima (Goldstein y col., 1987). Esta activación enzimática puede resultar de la inhibición de la proteína cinasa  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  dependiente y un incremento en el proceso de fosforilación por una proteína cinasa independiente del sistema AMPc (Nestler y Greengard, 1989). Los cambios inducidos por neurolépticos en la actividad de thx pueden reflejar el estado de equilibrio entre las formas fosforilada y defosforilada de la enzima. A este respecto se ha postulado que la thx activada por haloperidol, representa una mezcla de las formas fosforilada y defosforilada de la enzima (Lazar y col. 1982). La interpretación de estos resultados se complica por la posibilidad de que la thx pueda ser regulada en forma diferente por otros efectores. Por ejemplo, los ésteres de forbol incrementan la actividad de thx en células cromafines y del

ganglio cervical superior, pero no en rebanadas de núcleo estriado (Naim y col 1985).

Aunque los estrógenos sean administrados en dosis elevadas no son suficientes per-se para estimular la lordosis en ratas ooforectomizadas. Los resultados publicados por Beyer, Canchola y Larsson en 1981, muestran que el dibutiril AMPc administrado en forma directa el cerebro o administrado sistémicamente produce conducta lordótica solo en ratas previamente tratadas con estrógenos. La administración del dibutiril AMPc únicamente en ratas ooforectomizadas, aún por períodos prolongados, no es suficiente para producir lordosis. Estos resultados sugieren que la mayor parte de las moléculas proteicas inducidas por estrógenos se encuentran en una forma "inactiva" y requieren de otro estímulo para ser "activas" para la inducción de conducta lordótica (Beyer y col., 1981; Fernández-Guasti y col., 1985). Aparentemente la activación se lleva a cabo a través de fosforilación de proteínas debida a la inducción de actividad de proteínas cinasa C. De hecho, la fosforilación de proteínas produce cambios substanciales en el funcionamiento neuronal (Nestler y col 1989) y los estudios recientes han demostrado su papel en los procesos conductuales complejos como el aprendizaje y la formación de memoria (Kincaid y col., 1992; Tsien y col., 1990; Wu y col 1992).

El factor liberador de la hormona luteinizante (LHRH) puede facilitar la conducta lordótica en ratas hembra (Moss y McCann, 1973; Beyer, y col., 1982a) y ha sido

*E. Canchola 63*

sugerido que, participa también en la sincronización de la conducta sexual y de la ovulación (Pfaff y col., 1994). Debido a que la facilitación de la conducta lordótica se puede llevar a cabo en animales hipofisectomizados, el efecto de LHRH debe efectuarse directamente sobre las neuronas hipotalámicas (Pfaff, 1973).

La administración de progesterona a ratas ooforectomizadas y pretratadas con estrógenos, es capaz de estimular la liberación de LHRH del hipotálamo mediobasal (Levin y Ramírez., 1980). Por otra parte la administración de progesterona in vitro es capaz de producir un aumento marcado en la liberación de LHRH por rebanadas del hipotálamo mediobasal obtenidas de ratas adultas y ooforectomizadas y que recibieron un tratamiento con estrógenos antes del sacrificio (Drouva y col., 1985). Se ha demostrado que los estrógenos al cambiar las propiedades membranales de manera selectiva y específica, se encuentran involucrados tanto en el proceso de despolarización de la terminal nerviosa, como en la liberación de LHRH (Drouva y col., 1984). Como en todos los otros procesos de secreción inducidos por despolarización, el incremento en la liberación de LHRH debe ser dependiente de  $Ca^{2+}$ . Así, la omisión de  $Ca^{2+}$  en el medio o la adición de un bloqueador de canales de calcio (D600,  $10^{-4}$  M), o de un inhibidor de proteína cinasa dependiente de CaM como la trifluoperazina, o un inhibidor de proteínas-cinasas dependiente de CaM-, como la fenitoína a dosis de  $50 \mu M$ , fármacos que inducen una completa prevención del efecto estimulador de la progesterona sobre la liberación de LHRH. Cuando los

canales de sodio son bloqueados con tetrodotoxina ( $5 \times 10^{-7}$  M), el efecto estimulador de la progesterona también es completamente abolido (Drouva y col., 1985).

Estos resultados indican que la secreción de LHRH debida a progesterona, necesita del pretratamiento con estrógenos, y que es un proceso dependiente de  $Ca^{2+}$  e implica la modificación de CaM y de un sistema de cinasas dependiente de CaM, todos estos procesos fisiológicos de las hormonas gonadales esteroides es muy posible que sean mediados por procesos no genómicos.

Adicionalmente al posible papel de la participación en la producción de conducta lordótica por LHRH inducida por P (Moss y McCann, 1973) por nucleótidos cíclicos o por ésta vía (Beyer y col., 1982), es posible sugerir que la acción de la progesterona en la facilitación de la conducta sexual puede estar mediada por mecanismos no genómicos similares a los ya mencionados. El reconocimiento membranal directo de la P (Ramírez y Zheng 1996) sería seguido por modificaciones en el metabolismo intracelular de  $Ca^{2+}$  mediado por CaM. Si esto es así, podríamos sugerir que el tiempo necesario (cuatro horas) para el efecto facilitatorio de la P puede ser explicado por la participación de procesos complejos que involucran: primero, la unión de los sitios de reconocimiento del esteroide a las enzimas y/o a los receptores directamente involucrados en la regulación de flujos ionicos y, segundo, la subsecuente modificación de los procesos intracelulares dependientes de  $Ca^{2+}$ . Uno

de estos procesos puede ser la fosforilación de una tubulina del citoesqueleto por enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$

Se ha demostrado que el bloqueo farmacológico del transporte axoplásmico por infusión intracraneal de colchicina, afecta tanto a la inducción como el mantenimiento de la respuesta lordótica mediada por estrógenos (Harlan y col., 1982). Aunque la inhibición del transporte axoplásmico por colchicina ha sido adecuadamente demostrada (Schwartz, 1980), también es importante tomar en cuenta la participación de esta sustancia como un inhibidor de la secreción exocítica de productos celulares entre ellos neurotransmisores (Woosten y col., 1975), ya que como previamente se mencionó éstos participan también en el mecanismo de acción de la progesterona para facilitar la receptividad sexual en la rata.

En tejidos excitables, los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, acompañados por cambios en nucleótidos cíclicos, son responsables del proceso de transmisión nerviosa y de la transducción de señales (Berridge, 1984). Dentro de los sistemas que son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , los mediados por CaM y parecen ser particularmente importantes en la función neuronal (Kincaid y col 1992). Es posible proponer entonces que en forma similar al mecanismo de acción de la colchicina, los inhibidores del Sistema  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  afectan la respuesta lordótica al interferir con las funciones citoesqueléticas incluyendo: el recambio y liberación de neurotransmisores regulados por  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (DeLorenzo, 1985; Roth y col., 1987; Weiner y Molinoff,

1989), así como la dinámica citoesquelética (Van Eldik y Vattérson, 1985; Miller y Kennedy, 1987), la función de las vesículas sinápticas (incluyendo la exocitosis) y la fosforilación de las proteínas sinápticas (Nestler y Greengard, 1989). El Sistema  $Ca^{2+}/CaM$  también puede interferir, al menos parcialmente, con el transporte axoplásmico rápido de sustancias provenientes del hipotálamo medial al mesencéfalo dorsal, proceso que ha sido postulado como importante en la acción inductora de lordosis de los estrógenos (Harlan y col 1982). Con respecto a esto es importante recordar que la inhibición de la proteína cinasa II CaM-dependiente, bloquea la inducción de la potenciación en el largo plazo de la transmisión sináptica (Miller y Kennedy, 1986; Tsien y col., 1990) y que la fosfodiesterasa del GMPc estimulada por  $Ca^{2+}/CaM$  juega un importante papel en la regulación de la transducción de señales excitatorias mediada por óxido nítrico/GMPc (Wu y col 1992).

Aunque los resultados presentados pueden fundamentar la hipótesis de que la actividad de la progesterona en la facilitación de la conducta sexual de la rata hembra puede ser mediada a través de mecanismo no genómicos, debemos recordar que ha sido demostrado que la CaM tiene algunas actividades genéticas importantes (Miller y Kennedy, 1987; Rodríguez-Medina y col., 1993). Entre ellas, podemos mencionar la inhibición de la síntesis de proteínas producida por la fosforilación del Factor 2 de alargamiento, proceso que es catalizado por una proteína cinasa III dependiente de CaM- (Hidaka y col., 1996; Nair y Pelfrey, 1987).

***E. Canchola 67***

Este tipo de actividad debe también ser considerada como una vía importante en la regulación de la síntesis de proteínas, particularmente en los tejidos cerebrales con altas concentraciones de CaM. Lo anterior fundamenta, por tanto, la posibilidad de que los fármacos anticalmodulina puedan actuar interfiriendo con las propiedades estimuladoras a nivel genómico de síntesis de proteínas de las hormonas esteroides.

Los iones calcio participan en la regulación de un gran número de procesos celulares.

Aunque su mecanismo de acción, particularmente a nivel del sistema nervioso central, se conoce poco, es posible que su efecto regulador sea mediado, a través de su fijación a proteínas específicas, de las cuales la más abundante en el tejido cerebral es la calmodulina (CaM).

La fosforilación de proteínas, la cual provoca aumento o disminución de la actividad de algunas enzimas, desempeña también un papel muy importante en la regulación del metabolismo celular. Este mecanismo participa en varios procesos de regulación homeostática mediada por receptores membranales, tales como la regulación hormonal, la actividad de factores de crecimiento y de los neurotransmisores. Todos estos procesos desempeñan su acción mediante la transducción de su reconocimiento membranal por medio de la activación de las proteínas cinasas intracelulares (Hunter y col., 1990).

En el momento actual se conocen 5 tipos de proteinocinasas dependientes del Sistema  $Ca^{2+}/CaM$  (Blackshear y col., 1988). Estas son la fosforilasa cinasa, la

cinasa de la cadena ligera de la miosina y las llamadas cinasas I, II y III. La cinasa III, cuya concentración es particularmente elevada en el tejido cerebral, llamada también cinasa multifuncional dependiente de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , está constituida por un grupo de isoenzimas de gran importancia para el funcionamiento del sistema nervioso central. Esta cinasa se encuentra localizada presinápticamente y regula la actividad de la enzima clave en la biosíntesis de las catecolaminas, la tirosina hidroxilasa (Waymire y col, 1988); la liberación de neurotransmisores por exocitosis depende de calcio por medio de la fosforilación de la sinapsina I (Llinas y col., 1985); El fenómeno de conducción nerviosa, modificando la estructura de los neurotúbulos por fosforilación de la proteína MAP-2; la llamada potenciación de tiempo largo, un fenómeno de gran importancia en el establecimiento de circuitos facilitados, mediante la fosforilación de la membrana post-sináptica (Kennedy y col., 1983).

La  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  cinasa III, parece poseer un solo substrato, el factor de alargamiento EF-2 que cataliza la translocación del peptidil-tRNA sobre el ribosoma. La fosforilación de este factor inhibe fuertemente su actividad, interrumpiendo la síntesis de proteínas (Nairn y Palfrey, 1987). Los trabajos del grupo de Nairn han demostrado que una de las acciones iniciales de las hormonas sobre las células nerviosas es la inhibición de la síntesis de proteínas provocada por la fosforilación del factor EF-2 (Nairn, 1990). Esta inhibición es habitualmente transitoria y depende del equilibrio existente entre los procesos de fosforilación y defosforilación

del tejido; es decir, entre la activación de la cinasa III (sistema  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) y la activación de la proteína fosfatasa.

Nuestros resultados previos sobre la posible participación de mecanismos  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  dependientes en la acción de las hormonas gonadales para inducir diferenciación hipotalámica (Rodríguez y col., 1993), están de acuerdo con el creciente número de observaciones que indican la presencia de diferencias sexuales en la morfología del sistema nervioso central (Gorsky y col., 1978; MaC Lusk y Naftolin, 1981). Estas diferencias son sobre todo notables en algunas estructuras hipotalámicas (Gorsky y col., 1978). Este fenómeno, que comprende fundamentalmente el área anterior del hipotálamo y el área preóptica, ha dado lugar al concepto de dimorfismo sexual hipotalámico. De particular importancia son los resultados de cariometría realizados en algunas regiones del hipotálamo (Dörner y Staudt, 1968; Staudt y Dörner, 1976) demostrando que los núcleos de las neuronas presentes en la región medial del área preóptica y en el núcleo ventromedial del hipotálamo son significativamente más grandes en las hembras que en los machos. Las ratas machos castradas durante el primer día de vida extrauterina demostraron un aumento en el volumen nuclear de las neuronas de estas regiones, de manera que alcanzan un tamaño semejante al de las ratas hembras. Por el contrario, las ratas hembras inyectadas con testosterona durante los primeros días de vida mostraron núcleos celulares de tamaño menor, semejante al de los machos. Estos resultados son relacionables con la presencia de una cantidad significativamente

mayor de DNA en el hipotálamo de las ratas hembras, diferencia que es anulada por la inyección de testosterona.

Es importante resaltar que en los trabajos mencionados anteriormente se estableció la existencia de una correlación positiva entre el volumen nuclear de las neuronas de estos centros hipotalámicos y la frecuencia de presentación de conducta sexual de tipo femenino, lo cual puede también relacionarse con la actividad que algunos de los fármacos utilizados en el presente trabajo tuvieron sobre el desarrollo de la conducta sexual (Rodríguez y col., 1993) y su efecto sobre la concentración de DNA del hipotálamo (Canchola y col., 1997).

Se ha descrito que las lesiones del núcleo septal en la rata son seguidas por un crecimiento acelerado de axones con inervación simpáticos que van al hipocampo (Loy y Milner y Loy 1980). Este crecimiento post-lesión es significativamente más rápido en las hembras que en los machos. Las observaciones cuantitativas de Raisman y Field 1973 demostraron que el número de sinapsis en el área preóptica es cerca de dos veces mayor en las hembras que en los machos. La gonadectomía del macho, o la inyección de testosterona a la hembra, en el periodo neonatal es capaz de invertir estas conductas de crecimiento neuronal (Milner y Loy, 1982; Arnold y Breedlove, 1985). Estos resultados reflejan, posiblemente, la mayor capacidad de síntesis de RNA y proteínas que poseen las hembras adultas, diferencia que es abolida por el tratamiento con testosterona al animal recién nacido. Prácticamente todos los fármacos inhibidores del sistema  $Ca^{2+}/CaM$  utilizados, son

capaces de interferir con la actividad de la testosterona en el animal recién nacido (Canchola y col., 1997).

Estas observaciones constituyen pues la primera evidencia de que el sistema  $Ca^{2+}$ /CaM suele participar de manera importante en el proceso de diferenciación sexual del hipotálamo.

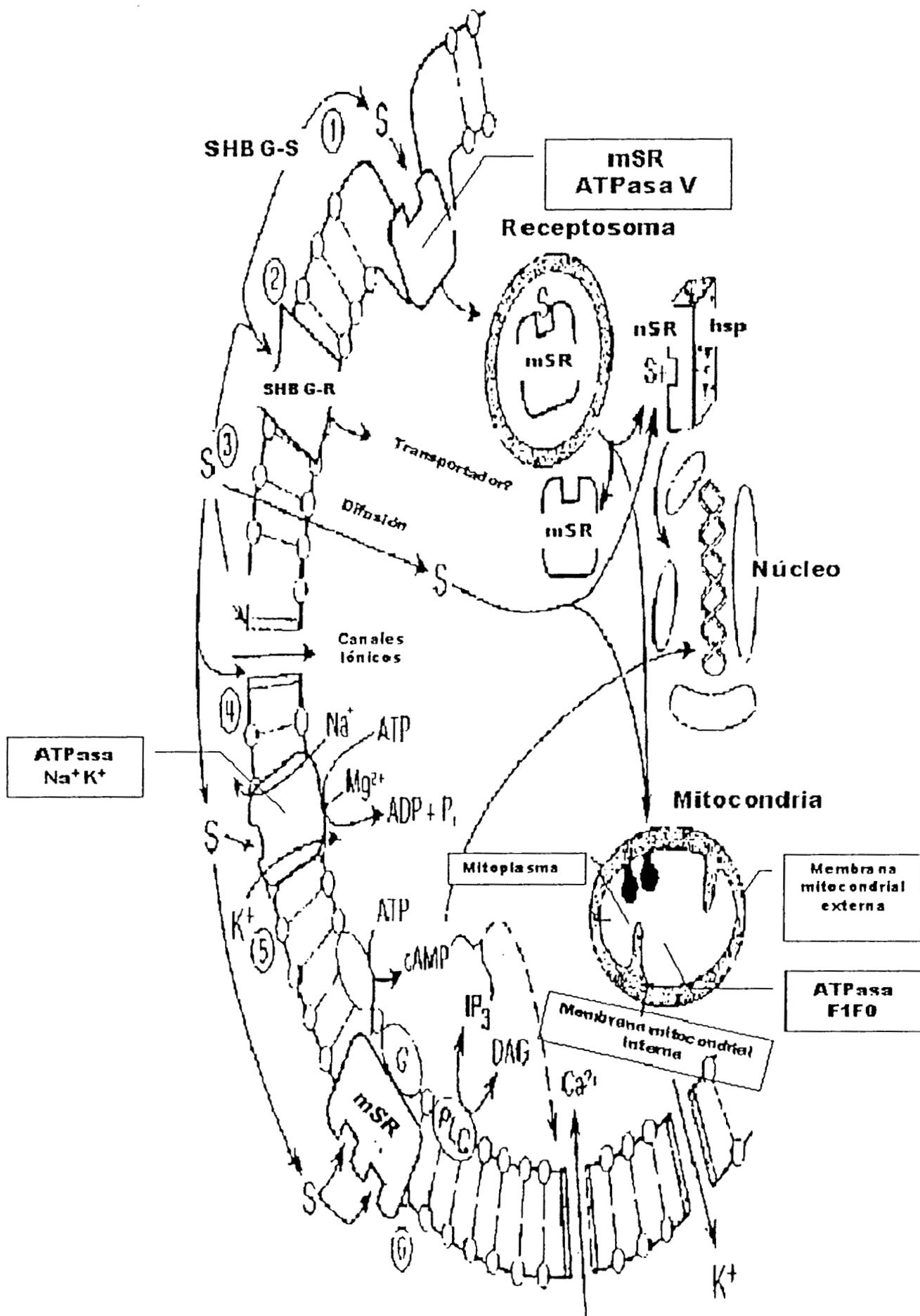
## CONCLUSIONES

Toda la evidencia de la acción de los esteroides sexuales sobre el SNC es una confirmación sólida de la relevancia y la generalidad del concepto de continuidad para la acción de los esteroides de Clara Szego, 1994 el cuál trata de explicar la diversidad de mecanismos involucrados en la acción de los esteroides en el ámbito celular.

Hemos intentado resumir este concepto universal en el **Esquema III** considerando la captura inicial del esteroide (S) en la superficie de la célula y su destino final a diferentes puntos terminales dentro de la célula.

Los datos de la fijación específica de S a la membrana de las células neurales junto con los mecanismos de acción nos han llevado a considerar seis rutas importantes involucradas en el reconocimiento y en la acción membranal de las hormonas liposolubles.

La hormona es transportada por proteínas plasmáticas (plasma sanguíneo), por ejemplo la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHGB.S en inglés) Ya sea que



la fracción libre de S (S=, estrógenos (E), testosterona (T), progesterona (P) es capturada por un receptor membranal específico con una constante de afinidad dentro de los niveles fisiológicos de S (ruta 1), o que el complejo SHBG-S sea reconocido por la célula (ruta 2). La ruta 1 se ha demostrado para el E en el hipotálamo (García-Segura y col., 1994) donde esta molécula es endocitada. El hecho de que ciertas ATPasas, la llamada del tipo V (Forgac, 1987), así como las proteínas G relacionadas (Rothman, 1994), estén involucradas en tales mecanismos, indica que este reconocimiento inicial y el subsecuente transporte intracelular de S constituyen una vía metabólica muy importante. El colesterol, "la molécula progenitora de todos los esteroides" tanto en el hígado como en otras células (Goldstein, J. L. y col., 1985) es un ejemplo sin duda alguna de este tipo de mecanismo. Subsecuentemente, el receptosoma intracelular después de la digestión enzimática por la actividad lisosomal (Schumacher, 1990), libera al receptor (el cual puede ser reciclado) y el S libre se vuelve accesible a las acciones celulares, incluyendo la degradación enzimática. El S obtenido ya sea por esta vía o por la vía de la difusión (ruta 3), la ruta convencional, se puede encontrar con el receptor de esteroides nuclear (nSR) el cual esta a su vez unido con proteínas de choque calórico (hsp), en su estado de reposo, para ser activado e iniciar una cascada de eventos llevando a la activación genómica al nivel nuclear (Beato, 1989) o puede encontrarse con la proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina (OSCP en inglés), una subunidad de la ATPasa sintasa al nivel mitocondrial para regular la producción de ATP (Pedersen y Amzel, 1993)

Parece obvio, de los datos en la literatura, que en varias células incluyendo las neuronas, S dispara cambios rápidos en los flujos de  $\text{Ca}^{+2}$  (Blackmore, 1993) o en otros canales iónicos dependientes de cloro (Wong, y Moss, 1994; Hardy y Valverde., 1994), particularmente algunos metabolitos de S. Muy probablemente esos canales iónicos (ruta 4) se activan ya sea directa (Valera, y col., 1992) o indirectamente después de la fijación de S a su receptor membranal específico (ruta 6) para activar los mecanismos de transducción, llevando a la formación de AMPcíclico o  $\text{IP}_3$ , los cuales indirectamente podrían alterar la apertura de canales.(los canales abiertos).

Otra enzima membranal que parece estar regulada directamente por los esteroides gonadales es la ATPasa dependiente de sodio y de potasio (ATPasa  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ) ruta 5 cuyo ejemplo típico es el efecto de la testosterona sobre la próstata (Farnsworth, 1990) y probablemente también sobre los sinaptosomas. También resulta interesante que la unión de la P a su receptor membranal específico en las células neurales está modulada por los iones de  $\text{Mg}^{2+}$ , un catión clave en la función de esta ATPasa. Colateralmente a estas rutas hay suficiente evidencia que indica que los esteroides actúan a nivel membranal para inducir la formación rápida y transitoria de mensajeros intracelulares. La formación de los mensajeros AMPc,  $\text{IP}_3$  y DAG constituye la ruta 6, la cual probablemente involucre a un receptor específico para esteroides unido a través de una proteína G a la adenilato ciclasa (AC) o a la fosfolipasa C (PLC) para aumentar los niveles ya sea de AMPc,  $\text{IP}_3$  y DAG. Ejemplos de esta ruta son los efectos de  $\text{E}_2$  y P sobre algunas células (Kostellow y col., 1993)

y la acción de la corticosterona en el cerebro de anfibios (Orchinik y McEwen, 1995). Un aspecto muy excitante de esta vía es que el AMPc puede activar eventos genómicos como sucede con el Estradiol (Aronica y col 1994), estableciendo, por lo tanto, una unión directa entre eventos membranales y eventos nucleares. Recientemente se ha mostrada también que la administración de dopamina en el SNC puede inducir lordosis (Mani y col., 1994) por un evento membranal que sin embargo, depende de la activación de receptores nucleares para P. La característica intracelular de esteroides es la vía nuclear convencional (Beato, 1989) y/o la vía mitocondrial recientemente adicionada a los mecanismos de acción de las hormonas esteroides (Ramírez y Zheng, 1996). Otros componentes celulares como el citoesqueleto, el retículo endotelial y el aparato de Golgi, pueden también ser órganos blancos de los esteroides (Zsego, 1994).

En resumen parece que los mecanismos de acción membranal de los esteroides vía receptores membranales, junto con los receptores nucleares para estas hormonas forman parte de un mecanismo convergente continuo que unifica la acción de los esteroides en el ámbito celular.

Finalmente en resumen, nuestros resultados sugieren que las modificaciones en el funcionamiento del sistema  $Ca^{2+}/CaM$  pueden tener importantes acciones sobre la actividad facilitatoria de la conducta sexual femenina que la progesterona tiene en ratas ooforectomizadas y pretratadas con estrógenos.

## BIBLIOGRAFIA

**Allen, D. L., Renner, K. J., Luine, V. N.** Naltrexone facilitation of sexual receptivity in the rat. *Horm. Behav.* 19:98-103; 1985

**Arnold, A. y Breedlove, M.:** Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior: a Reanalysis. *Horm and Behav*, 19; 469-498, 1985.

**Aronica, S. M., Kraus, W. L., Katzenellenbogen, B. S.** Estrogen action via the cAMP signalling pathway-stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8517-8521; 1994.

**Barfield, R. J.; Glasser, J. H.; Rubin, B. S.; Etgen, A. M.** Behavioral effects of progesterin in the brain. A review. *Psychoneuroendocrinology*, 9:217-231; 1984.

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

**Beach, F. A.** Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in female mammals. *Horm Behav.* 7:105-138; 1976.

**Beato, M.** Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* 56:335-344; 1989

**Becker, B. J.** Direct effect of 17 $\beta$ -estradiol on striatum: sex differences in dopamine release. *Synapse* 5: 157-164 1990.

**Berridge, M. J.** Cellular control through interactions between cyclic nucleotides and calcium. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res.* 17:329-335, 1984.

**Beyer, C.; Larsson, K.** Endocrine control of sexual behavior. Raven Press. New York 1979.

**Beyer, C.; Canchola, E.; Cruz, M. L., Larsson, K.** A model for explaining estrogen-progesterone interactions in the induction of lordosis Behavior. In *Endocrinology 1980*. Edited by I A. Cumming., J. W. Funder and F.A. O. Mendelsohn. Amsterdam: Elsevier/North holland. pp-615-618; 1980 .

**Beyer, C.; Canchola, E.** Facilitation of progesterone induced lordosis behavior by Phosphodiesterase inhibitors in estrogen primed rats *Physiol Behav.* 27: 731-733 1981

**Beyer, C.; Canchola, E.; Larsson, K.** Facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen primed rat by Dibutyryl cAMP. *Physiol Behav.* 26:249-251. 1981.

**Beyer, C. Fernández-Guasti, A., Rodríguez-Manzo, G.** Induction of female sexual behavior by GTP in ovariectomized estrogen primed rats. *Physiol Behav* 28:1073-1076; 1982

**Beyer, C. Gomora, P. Canchola, E. Sandoval, Y.** Pharmacological evidence that LH-RH action on lordosis behavior is mediated through a rise in cAMP. *Horm. Behav.* 16: 107-112; 1982a

**Beyer, C.; Gonzalez-Mariscal, G; Eguibar, J. R.; Gomora, P.** Lordosis facilitation in estrogen primed rats by intrabrain injection of pregnanes. *Pharmacol Biochem Behav.*31:919-926; 1989.

**Beyer, C.; Gonzalez-Mariscal, G;** Effect of progesterone and natural progestins in brain. In *Reproduction, growth and Development.* Eds. Negro-Vilar, A., Pérez-Palacios, G. Raven Press, New York pp. 199-208; 1991

**Blackshear, P.; Naim, A. y Kuo, J.:** Protein-Kinases, A current perspectiva. Review. *J. Faseb.* 2; 2957-2969, 1988.

**Blackmore, P. F.** Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate  $Ca^{2+}$  influx and acrosome reaction in human sperm. *Cell Signal* 5: 531-538; 1993.

**Blaustein, J. D.; Feder, H.H.** Nuclear progestin receptors in guinea pig brain measured by an in vitro exchange assay after hormonal treatments that affect lordosis. *Endocrinology* 106: 1061-1069; 1980.

**Boling, J. L. ; Blandau, R. J.** The estrogen-progesterone induction the mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology* 25: 359-364; 1939

**Boström, S. L.; Jung, B.; Mardh, S.; Forsen, S.; Thulin, E.** Interaction of the antihypertensive drug felodipine with calmodulin. *Nature* 292:777-778, 1981

**Brown, T. J.; Blaustein, J. D.** Abbreviation of the period of sexual behavior in female guinea pigs by the progesterone receptor antagonist RU 486. *Brain. Res.* 373:103-113 1986.

**Brown, T. J.; Moore, M. J. ; Blaustein, J. D.** Maintenance of progesterone-facilitated sexual behavior in female rats requires continued hypothalamic protein

synthesis and nuclear progesterin receptor occupation. *Endocrinology* 121: 198-304; 1987.

**Caggiula, A. R., Antelman, S. M., Lineberry, C. G.** Brain dopamine and sexual behavior: Psychopharmacological and electrophysiological evidence for an antagonism between active and passive components. In *Catecholamines: Basic and clinical frontiers*. Edited by E. Usdin, Y. Kopin and J. Barchas. New York: Plenum, pp. 1765-1767; 1979

**Caldwell, J. D., Pedersen, C. A., Prange, A. J.** Oxytocin facilitates lordosis behavior in estrogen-treated rats. *Soc. Neurosci. Abst.*: 170. 1984

**Caldwell, J. D., Walker, C. H., Pedersen, C. A., Barakat, A. S., Mason, G. A.** Estrogen increases affinity of oxytocin receptors in the medial preoptic area and anterior hypothalamus. *Peptides* 15: 1079-1084; 1994.

**Canchola, E., Vergara Onofre, M., Rodríguez-Medina, M. A.,** Mercado Sánchez, G. Inhibidores del sistema calcio-calmodulina y diferenciación sexual hipotalámica en la rata. *Parámetros bioquímicos. Ginecología y Obstetricia de Méx.* 65: 508-514 1997.

**Clemens, L. G., Humphrys, R. R., Dohanish, G. P.** Cholinergic brain mechanisms and the hormonal regulation of female sexual behavior in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95: 763-770; 1981

**Clemens, L. G., Dohanish, G. P., Barr, P.** Cholinergic regulation of feminine sexual behavior in laboratory rats. In *Hormones and behavior in Higher Vertebrates*, Edited by J. Balthazart., E. Prove and R. Gilles. Berlin: Springer-Verlag. pp. 56-67; 1983.

**Cooper, R. L., Seppala, M., Linnoila, M.** Effect of luteinizing-hormone-releasing antiserum on sexual behavior in the female rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20: 527-530; 1984

**Courvoisier H. y col.** Propriétés pharmacodynamiques du phenothiazine. *Archs. Int. Pharmacodyn. Théor.* 92: 305-361; 1953,

**Delay y col.,** Trente-huit cas de psychoses traitées par la cure prolongée de 4560 RP. *Annls. Méd-Psychol.* 110: 112-117;1952

**DeLorenzo, R. J.** Calcium and calmodulin control of neurotransmitter synthesis and release. In: Marmé, D., ed. *Calcium and cell physiology.* Berlín: Springer-Verlag; 1985:265~284

**Delville, Y.** Progesterone-Facilitated sexual receptivity: A review of arguments supporting a Nongenomic mechanism. *Neurosci Biobehav Rev.* 15:407-414, 1991.

**Dluzen, D. E., Ramírez, V. D.** In vitro progesterone modulates amphetamine-stimulated dopamine release from the corpus striatum of castrated male rats treated with estrogen. *Neuroendocrinology* 52: 517-520; 1990.

**Dorman, W., Malsbury, C. W.** Facilitation of lordosis by infusion of substance P in the midbrain central gray. *Soc. Neurosci. Abstr.* 10:172; 1984

**Dörner, G. y Staudt, J.:** Structural changes in the preoptic anterior hypothalamic area on the male rat. Following neonatal castration and androgen treatment, *Neuroendocrinol.*, 3; 136-140, 1968.

**Drouva, S. V.; Laplante E.; Kordon, C.** Progesterone-induced LHRH release in vitro is an estrogen as well as Ca<sup>++</sup>- and calmodulin-dependent secretory process. *Neuroendocrinology* 40:325-331; 1985

**Drouva, S. V.; Laplante, E.; Gautron, J. P.; Kordon, C.** Effects of 17 $\beta$  estradiol on LHRH release from rat mediobasal. hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* 38:152-157; 1984

**Dufy, B., Partouche, C., Poulain, D., Dufy-Barbe, L., Vincent, J. D.** Effects of estrogen on the electrical activity of identified and unidentified hypothalamic units. *Neuroendocrinology*. 22:38-47; 1976.

**Dufy, B., Dufy-Barbe, L., Vincent, J. D.** Effects of the protein synthesis inhibitors on the negative feedback effect of estrogen on LH release. *Hormone Res.* 9:279-291; 1978

**Etgen, A. M.** Antiestrogens: effects of tamoxifen, nafoxidine, and CI-628 on sexual behavior, cytoplasmic receptors, and nuclear binding of estrogen. *Horm. Behav.* 13: 97-112; 1979.

**Everitt, B. J. Fuxe, K., Hokfelt, T., Jonsson, G.** Role of monoamines in the control by hormones of sexual receptivity in the female rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 89: 556-572; 1975

**Fadem, B. H; Barfield, R. J.; Whalen, R. E.** Dose response and time-response relationships between progesterone and the display of patterns of receptive and proceptive behavior in the female rat. *Horm. Behav.* 13: 40-48; 1979

**Farnsworth, W. E.** The porostate plasma membrane as an androgen receptor membrane. *Biochemistry* 9: 141-162; 1990.

**Feder, H. H., Ruf, K. B.** Stimulation of progesterone release and estrous behavior by ACTH in ovariectomized rodents. *Endocrinology* 84: 171-174; 1969

**Feder, H. H., Marrone, B. L.** Progesterone: its role in the central nervous system as facilitator and inhibitor of sexual behavior and gonadotropins release. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 286: 331-354; 1977

**Ferin, M., Van, V. D., Nardlow, S.** The hypothalamic control of the menstrual cycle and the role of endogenous opioids peptides. *Recent Prog.Horm. Res.* 40:441-485; 1984.

**Fernández-Guasti, A., Rodríguez-Manzo, G., Beyer, C.** Effect of guanine derivatives on lordosis behavior in estrogen primed rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31: 589-592; 1983.

**Fernández-Guasti, A.; Larsson, K.; Beyer, C.** Potentiative action of alpha and beta adrenergic receptor stimulation in inducing lordosis behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 22:613-617; 1985.

**Fink, K.L.; Wieben, E. D.; Woloschak, G. E.; Spelberg, T.C.** Rapid regulation of -C-MYC- protooncogene expression by progesterone in in the avin oviduct. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA.* 85: 1760-1800; 1988

**Foreman, M. M.; Moss, R.L.** Role of hypothalamic alpha and beta adrenergic receptors in the control of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen primed rat. *Pharmacol Biochem Behav* 9:235241, 1978.

**Forgac, M.** Structure and function of vacuolar class of ATP- driven proton pumps. *Physiol. Rev.* 69: 765-796; 1989

**Frye, C. A., Mermelstein, P. G., DeBold, J. F.** Evidence for a non-genomic action of progestins on sexual receptivity in hamster ventral tegmental area but not hypothalamus. *Brain Res.* 478: 87-93; 1992

**García- Segura, L. M., Chowen, J. A., Parducz, A., Naftolin, F.** Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: Cellular mechanisms. *Prog.Neurobiol.* 44: 279-307; 1994.

**Glaser, J. H.; Etgen, A. M.; Barfield, R. J.** Intrahypothalamic effect of progestin agonist on estrous behavior and progestin receptor binding. *Physiol. Behav.* 34: 871-877; 1985.

**Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, G. W., Russell, D. W., Schneider, W. J.** Receptor-mediated endocytosis *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1: 1-40; 1985

**Goldstein, M., Greene, L. A.** Activation of tyrosine Hydroxyase by phosphorylation. in: *Psychopharmacology. The-third generation of progress.* H. Y. Meftzer, Ed. Raven Press LTD, NewYork, 1987: 75-80

**González-Mariscal, G., González-Flores, O., Beyer, C.** Intrahypothalamic injection of Ru 486 antagonizes the lordosis induced by ring A-reduced progestins *Physiol. Behav.* 46: 435-438; 1989.

**Gordon, J. H., Bromley, B. L. Gorski, R. A., Simmerman.**  $\Delta$  Tetrahydrocannabinol enhancement of lordosis behavior in estrogen treated female rats *Pharmacol. Biochem. Behav.* 8: 603-608; 1978

**Gorsky, R. A.: Gordon, D. y Shryne, E.:** Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. *Brain Res.*, 148; 333-346, 1978.

**Gorzalka, B. B., Whalen, R. E.** The effects of progestins, mineralocorticoids, glucocorticoids and steroid solubility on the induction of sexual receptivity in rats *Horm Behav* 8: 94-99; 1977

**Greengard, P.** Neuronal phosphoproteins: Mediators of signal transduction. *Mol Neurobiol.* 1:81-120; 1987.

**Guiraud y David XLVIII** Congrès des Al. et Neurol de Langue Fr. In, *Compte rendu du congrès.* Masson et Cie, Paris, 1950.

**Hamburger-Bar, R. H., Rigter, H.** Apomorphine: Facilitation of sexual behavior in female rats *Eur. J. Pharmacol.* 32: 357-360; 1975.

**Hardy, D. F.; DeBold, J. F.** The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. *Horm Behav* 2:287-297; 1971

**Hardy, S. P., Valverde, M. A.** Novel plasma membrane action of estrogen and antiestrogens revealed by their regulation of a large conductance chloride channel. *FASEB. J.* 8: 760-765; 1994.

**Harlan, R. E.; Shivers, B. D.; Kow, L. M.; Pfaff, D. W.** Intrahypothalamic colchicine infusion disrupt lordotic responsiveness in estrogen-treated rats. *Brain Res* 238:153-167; 1982

**Harlan, R. E., Shivers, B. D., Pfaff, D. W.** Midbrain microinfusion of prolactin increase the estrogen-dependent behavior lordosis. *Science* 219: 1451-1453,1983.

**Hernández-Pérez, O., Ballesteros, L. M., Rosado, A.** Binding of  $17\beta$ -estradiol to the outer surface and nucleus of human spermatozoa. *Arch. Androl.* 3: 23-29 1979

**Héry, M., Becqut, D., Francois-Bellan, A. M., Deprez, P., Fache, M. P. , Héry, F.** Stimulatory effects of SHT<sub>1A</sub> receptor agonists on luteinizing hormone-releasing hormone from cultured fetal rat hypothalamic cells: Interactions with progesterone. *Neuroendocrinology* 61:11-18 1995.

**Hidaka, H., Nairn, A. C., y Col** Intracellular signal transduction *Advances in Pharmacology* Vol. 36 Academic Press New York 1996.

**Hoflister, L. E.** Clinical use of psychotherapeutic drugs. Charles C. Thomas, Springfield, U.S.A. 1973

**Hruska, R. E., Silbergeld, E. K.** Estrogen treatment enhances dopamine receptor sensitivity in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol* 61:397-400 1980

**Hunter, A. J., Hole, D. R., Wilson, C. A.** Studies into the dual effects of serotonergic pharmacological agents on female sexual behavior in the rat: Preliminary evidence that endogenous 5HT is stimulatory. *Pharmacol. Biochem. Behav.*22: 5-13; 1985.

**Hunter, T.; Lindberg, R. y, Middlemas, D.:** Novel receptor protein tyrosine Kinases. In: *The Biology and Medicine of signal transduction* (Nishizuka, Y, Ed). Raven Press. New York. pp. 260-262, 1990.

**Jackson. G. L.** Time interval between injection of estradiol benzoate and LH release in the rat and effect of actinomycin D or cycloheximide *Endocrinology* 93: 887-892; 1973

**Janssen, P. A. J.** The pharmacology of Haloperidol *Inter.J. Neuropsychiat.* 3: S10 - S18 1967

**Johnson., J. D.** Allosteric interaction among drug-binding sites on calmodulin. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 112:787-793: 1983

**Kaufman, L. S.; Pfaff, D. W.; McEwen, B. S.** Cholinergic mechanisms of lordotic behavior in rats. *Physiol Behav.* 43:507-514, 1988

**Ke, F. C.; Ramírez, V. D.** Membrane mechanism mediates progesterone stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinology* 45:514-517; 1987.

**Ke, F. C.; Ramírez, V. D.** Binding of progesterone to nerve cell membrane of rat brain using progesterone conjugated to <sup>125</sup>I- bovine serum albumin as a ligand. *J. Neurochem* 54: 467-472; 1990.

**Kelly, M. J., Moss, R. L., Dudley, C. A.** Differential sensitivity of preoptic-septal neurons to microelectrophoresed estrogen during the estrous cycle. *Brain Res.* 114: 152-157; 1976

**Kennedy, M.; Bennett, M., y Erondü, N.** Biochemical and immunochemical evidence that the major postsynaptic density protein is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80; 7357-7361, 1983.

**Kimura, D.** Estrogen replacement therapy may protect against intellectual decline in postmenopausal women. *Horm. Behav.* 29: 312-321; 1995.

**Kincaid, R. L.; Balaban, C. D.; Billingsley, M. L.** Regional and developmental expression of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat brain. *Adv Second Messenger and Phosphoprotein Res.* 25:111-122, 1992

**Klee, C. B.; Vanaman, T. C.** Calmodulin. *Adv. Protein Chem.* 35:213-321, 1982

**Komisaruk, B. R., McDonald, P. G., Whitmoyer, D. I., Sawyer, Ch.** Effects of progesterone and sensory stimulation on EEG and neuronal activity in the rat. *Exp. Neurol.* 19: 494-507; 1967.

**Kostellow, A. B., Ma, G-Y., Morrill, G. A.** Steroid action at the plasma membrane: progesterone stimulation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C following release of the prophase block in amphibian oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 92:33-44; 1993.

**Kow, L. M., Pfaff, D, W.** Induction of lordosis in female rats: Two modes of estrogen action and the effects of adrenalectomy *Horm. Behav.* 6: 259-276; 1975.

**Kow, L. M., Mobbs, C. V., Pfaff, D, W** Roles of second-messenger systems and neuronal activity in the regulation of lordosis by neurotransmitters, neuropeptides, and estrogen: A Review *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 251-268; 1994

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

**Kubli-Garfias , C.; Cervantes, M., Beyer, C.** Changes in multiunit activity and EEG induced by the administration of natural progestins to flaxedil immobilized cats. *Brain. Res.* 114: 71-81; 1976.

**Laborit, H. y col.,** *Presse Méd.* 60: 206-208; 1952

**Landau, I. T.** Relationships between the effects of antiestrogen, CI-628, on sexual behavior, uterine growth, and cell nuclear estrogen retention after estradiol-17 $\beta$ -benzoate administration in the ovariectomized rat. *Brain Res.* 113: 119-138; 1977.

**Laidlaw, J.** Effects of phenothiazine tranquilizers on the brain. *Lancet* 271:1235-1237; 1965

**Lan, N. C., Gee, K. W.** Neuroactive Steroid actions at the GABA<sub>A</sub> Receptor Horm.. *Behav.* 28:537-544; 1994

**Lazar, M.; Mefford, I. N.; Barchas, J. D.** Tyrosine Hydroxylase activation. Comparison of in vitro phosphorylation and in vivo administration of haloperidol. *Biochem Pharmacol* 31:2599-2607; 1982.

**Levin, R. M.; Weiss, B.** Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase of brain. *Mol Pharmacol.* 12: 581-589; 1976

**Levin, R. M.; Weiss, B.** Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents on the calcium-dependent activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Pharmacol Exp Ther.* 208:454-459; 1979.

**Levin, R. M.; Ramírez, V. D.** In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalamus of ovariectomized, steroid primed rats. *Endocrinology* 107:1782-1790; 1980

**Lindstrom, L.** Cholinergic mechanisms and sexual behavior in the female rat. In: *Sexual Behavior : Pharmacology and Biochemistry*, edited by M. Sandler and G. L. Gessa. New York: Raven Press. pp 161-167; 1975.

**Lisk, R. D.** A comparison of the effectiveness of intravenous, as opposed to subcutaneous, injection of progesterone for the induction of estrous behavior in the rat. *Can. J. Biochem. Physiol.* 38: 1381-1383; 1960.

**Loy, R. y Milner, T.:** Sexual dimorphism in extent of axonal sprouting in rat hippocampus. *Brain Res.* 243; 180-185, 1980.

**Llinas, R.; Guinness T. y Leonard, C.:** Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3035-3039, 1985.

**Maclusky, N. y Naftolin, F.:** Sexual differentiation of the central nervous system. *Science*, 211; 1294-1303, 1981.

**Madiafousek, J.; Hlinák, Z.** Sexual behavior of female laboratory rat: Inventory, patterning, and measurement. *Behavior* 63:129-174; 1977.

**Magi, A, Perez. J.** Role of female gonadal hormone in the CNS: Clinical and experimental Aspects. *Life Sci.* 37:893-906; 1985

**Mani, S. K., JMC, A., Clark, J. H. ,Blaustein, J. D., O'Malley, B. W.** Convergent pathways for steroid hormone and neurotransmitter- induced rat sexual behavior. *Science* 265: 1246-1249 1994.

**McCarthy, M. M.** Functional significance of steroid modulation of GABAergic neurotransmission: Analysis at the behavioral, cellular, and molecular levels. *Horm. Behav.* 29: 131-140; 1995.

**McEwen, B.S.** Steroid hormone actions on the brain: when is the genome involved? *Horm.behav.*28: 396-405; 1994

**McGinnis, M. Y., Gordon, J. H., Gorski, R. A.** Influence of gamma-aminobutyric acid on lordosis behavior and dopamine activity in estrogen primed sprayed female rats. *Brain Res.* 184: 179-191;

**McGinnis, M. Y; Parsons, B.; Rainbow, T. C.; Krey, L. C.; McEwen, B. S.** Temporal relationship between cell nuclear progesterin receptor levels and sexual receptivity following intravenous progesterone administration. *Brain Res.* 218: 365-371; 1981.

**Means, A.; Dedman, J.** Calmodulin: an intracellular calcium receptor. *Nature.* 285:73-77, 1980

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

**Milner, T. y Loy, R.:** Hormonal regulation of the axonal sprouting in the hippocampus.

Brain Res., 243; 180-185, 1982.

**Miller, F. D.; Naus, C. C. G.; Durand, M.; Bloom, F. E.; Milner, R. J.** Isotypes of  $\alpha$ -tubulin are differentially regulated during neuronal maturation. J Cell Biol 105:3065-3073, 1987.

**Miller, S. G.; Kennedy, M.B.** Regulation of brain Type II  $Ca^{2+}$ / Calmodulin dependent Protein Kinase by autophosphorylation: A  $Ca^{2+}$  -Triggered molecular Switch. Cell. 44: 861; 1986

**Minami, T., Oomura, Y., Nabekura, J., Fukuda, A.**  $17\beta$ -Estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP Brain Res. 519: 301-307; 1990

**Morrow, A. L., Suzdak, P. D., Paul, S. M.** Steroid hormone metabolites potentiate GABA receptor-mediated chloride ion flux with nanomolar potency. Eur. J. Pharmacol. 142: 483-485; 1987.

**Moss, R. L.; McCann, S. M.** Induction of mating behavior in rats by futeinizing hormone-releasing factor. Science 181:177-179;1973.

**Naim, A. C.; Hemmings, H. C. Jr.; Greengard, P.** Protein Kinases in brain. Ann Rev Biochem. 54:931-976, 1985.

**Nair, A.; Pelfrey, C.** Identification of the mejor Mr. 100 000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. J Biol Chem. 262:17299-17303, 1987

**Nairn, A.:** Role of calcium/calmodulin dependent protein phosphorylation in signal trasduction. In: The Biology and Medicine of signal trasduction (Nishizuka, Y. Ed). Raven Press. New York. pp. 202-205, 1990.

**Negro-Vilar. A., Orias.R., McCann. S. M.** Evidence for a pituitary site of action for the acute inhibition of LH release by estrogen in the rat. Endocrinology 92:1680-1684; 1973

**Nenci, Y., Marchetti, E., Marzola, A., Fabris, G.** Affinity cytochemistry visualizes specific estrogen binding sites on the palasma membrane of breast cancer cells. J. Steroid Biochem. 14: 1139-1149 1981.

**Nestler, E.J.; Greengard, P.** Protein Phosphorylation and the regulation of neuronal function. In: Brain Neurochemistry Molecular, Cellular and Medical Aspects, 4th Ed. G.J. Siegel et al, Eds. Raven Press LTD, New York, 1989:373-398

**Orchinik, M., McEwen, B. S.** Rapid actions in the brain: A critique of genomic and nongenomic mechanism. In: Wehling, M. De. Genomic and non-genomic effects of aldosterone. London: CRC Press. 77\_ 108; 1995.

**Park, O. P., Ramírez, V. D.** Circulation blood progesterone is pulsatile throughout the rat estrous cycle. Acta Endocrinologica 116:121-128; 1987.

**Pappas, T. C., Gametchu, B., Watson, C. S.** Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. FASEB. J. 9: 404-410 1995

**Parsons, B.; Rainbow, T. C.; Pfaff, D. W.; McEwen, B. S.** Hypothalamic protein synthesis essential for the activation of the lordosis reflex in female rat. Endocrinology 110:620-624; 1982.

**Parsons, B.; Rainbow, T. C.; Pfaff, D. W.; McEwen, B. S.** Oestradiol, sexual receptivity and cytosol progesterin receptors in rat hypothalamus. Nature 292:58-59; 1981.

**Pedersen, P. L., Amzel, L. M.** ATP synthase: structure, reaction center, mechanism, and regulation of one of nature's most unique machines. J. Biol. Chem. 268:9937-9940;1993

**Petitti, N., Etgen, A. M.** Progesterone promotes rapid desensitization of  $\alpha_1$ -adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. Neuroendocrinology. 55:1-8; 1992.

**Pfaff, D. W.** Luteinizing hormone releasing factor (LRF) potentiates lordosis in hypophysectomized ovariectomized female rats. Science 182:1148-1149 ;1973

**Pfaff, D. W.; Schwartz-Giblin, S.; McCarthy, M. M.; Kow, L. M.** Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behavior. In: The Physiology of Reproduction, 2nd edition. E. Knobil and J.D. Neill Eds. Raven Press Ltd, New York 1994: 107-220.

**Pietras, R. J., Szego, C. M:** Partial purification and characterization of estrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. Biochem. J. 191: 743-760 1980

**Powers, J. B.** Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiol. Behav.* 5: 831-836; 1970.

**Rainbow, T. C.; Davis, P. G.; McEwen, B. S.** Anisomycin inhibits the activation of sexual behavior by estradiol and progesterone. *Brain Res.* 194: 548-555; 1980.

**Rainbow, T. C.; Davis, P. G.; McEwen, B. S.** Anisomycin inhibits the activation of sexual behavior by estradiol and progesterone. *Brain Res.* 194: 548-555; 1980.

**Rainbow, T. C.; Snyder, L.; Berck, D. J.; McEwen, B.S.** Correlation of muscarinic receptor induction in the ventromedial hypothalamic nucleus with the activation of feminine sexual behavior by estradiol. *Neuroendocrinology* 39:476-480, 1984

**Raisman, G., Field, P.:** Sexual dimorphism in the neuropil preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. *Brain Res.*, 54; 1-29, 1973.

**Ramirez, V. D.; Kim, K.; Dluzen, D.** Progesterone action on the LHRH and nigrostriatal dopamine neural system : In vitro and in vivo studies . *Recent Prog. Horm. Res.* 41:421-472; 1985

**Ramírez, V. D., Zheng, J.** Membrane Sex Steroid Receptors in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinol.* 17: 402- 439; 1996.

**Rodríguez-Medina, M.; Canchola, E.; Vergara-Onofre, M.; Rosado, A.** Ca / Calmodulin System: Participation on rat sexual-hypothalamic differentiation. *Pharmacol Biochem Behavior* 46:697-702; 1993.

**Rodríguez-Sierra, J. F.; Komisaruk, B. R.** Effect of prostaglandin E2 and indomethacin on sexual behavior in the female rat. *Hormones Behav* 9:281-289; 1977.

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

**Roth, R. H.; Wolf, M. E.; Deutch, A. Y.** Neurochemistry of midbrain dopamine systems. In: *Psychopharmacology. The third generation of progress.* H. Y. Meitzer, Ed. Raven Press LTD, New York, 1987: 81-94.

**Rothman, J. E.** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372: 55-63; 1994.

**Roufogalis, B.D.** Calmodulin antagonism. In: Marmé. E., ed. Calcium and cell physiology. Berlin: Springer-Verlag; 1985:148-169

**Sadler, S. E.; Maller, J. L.** Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocytes by photoaffinity labeling. *J Biol Chem* 257:355-361; 1982.

**Schneider. H.P.G., McCann, S. M.** Estradiol and the neuroendocrine control of LH release in vitro. *Endocrinology* 87:330-338; 1970

**Schumacher, M.** Rapid membrane effects of steroid hormones: An emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci.* 13: 359-362; 1990.

**Schwartz, J. H.** The transport of substances in nerve cells. *Sci. Amer.* 242 (4):152-171, 1980.

**Selye, H.** Studies concerning the anesthetic action of steroid hormones . *J. Pharm. exp.Ther.* 73: 127-141; 1941.

**Shivers.B. D.,Harlan. R.E., Morrell. J.I., Pfaff. D. W.** Absence of estradiol concentration in the cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 304:345-347; 1983.

**Smith, H. E.; Smith, R. G. ; Toft, D. O.; Neegard, J. R.; Burrows, E. P.; O'Malley, B. W.** Binding of steroids to progesterone receptor proteins in chick oviduct and human uterus. *J. Biol Chem.* 249:5924-5932; 1974

**Smith. S.S.** Female steroid hormones: From receptors to networks to performance-actions on the sensorimotor system. *Prog.Neurobiol.* 44: 55-86; 1994.

**Staudt, J. y Dörner, G.:** Structural changes in the medial and central amygdala of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment. *Endokrinologie,* 67:296-300, 1976.

**Szego, C. M., Pietras, R. J.** Membrane recognition and effector sites in steroid hormone action. In : Litwack, G. De. *Biochemical actions of hormones, Vol VIII.* New York: Academic Press 308-463;1981.

**Szego, C. M.** Cytostructural correlates of hormone action: New common ground in receptor-mediated signal propagation for steroid and peptide agonists. *Endocrine* 2: 1079-1093; 1994

**Tesarik, J.; Moos, J.; Mendoza, C.** Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 133:328-335; 1993.

**Tesarik, J.; Mendoza, C.** Direct Non- genmic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: Oestrogen versus androgen antagonism. *Human Reproduction Update* : 95-100; 1997.

**Tischkau, S.A., Ramírez, V. D.** A specific membrane binding protein for progesterone in rat brain: Sex differences and induction by estrogen *Proc.Natl. Acad.Sci.USA* 90:1285-1289;1993.

**Towle, A.C., Sze, P. Y.** Steroid binding to synaptic plasma membrane :Differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids *J. Steroid Biochem* 18: 135-143;1983

**Trifaro, J. M., Vitale, M. L.** Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci* 16: 466-472; 1993.

**Tsai, M. J.; O'Malley, B: W.** Molecular mechanisms of action of steroid/ thyroid receptor superfamily members, *Ann.rev. Biochem.* 63: 451-486; 1994.

**Tsien, R. W.; Schulman, H.; Malinow, R.** Peptide inhibitors of PKC and CAMK block induction but not expression of long-term potentiation. In: *The biology and medicine of signal transduction.* Y. Nishizuka et al, Eds. Raven Press, 1990:101-107.

**Uzonov, P., Weiss, B.** Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate. *Neuropharmacol* 10: 697-780; 1971

**Valera, S., Ballivet, M., Bertrand, D.** Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9949-9953; 1992.

**Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M.** Calmodulin structure and function. In: *Marmé, D., ed. Calcium and cell physiology.* Berlín: Springer-Verlag; 1985:105-126.

**Waymire, J.; Johnson, J., y Hummer-Lickteig, K.:** Phosphorylation of Bovine Adrenal Chromaffin Cell Tyrosine Hydroxylase. *J. Biol. Chem.*, 263; 12439-12447, 1988.

**Weiner, N.; Molinoff, P.B.** Catecholamines. In: *Brain Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 4th Ed. G.J. Siegel et al, Eds. Raven Press LTD, New York, 1989: 233-251

**Whalen, R. E.** Estrogen-progesterone induction of mating in female rats. *Horm. Behav.* 5:157-162; 1974

**Whalen, R. E., Lauber, A. H.** Progesterone Substitutes: cGMP Mediaton *Neurosci.Biobehav. Rev.*10: 47-53; 1986.

**Wong, M., Moss, R: L.** Electrophysiological evidence for a rapid membrane action of the gonadal steroid, 17 $\beta$ -estradiol, on Ca 1 pyramidal neurons of the hippocampus. *Brain Res.* 543: 148-152; 1991

**Wong, M., Moss, R: L.** Path-clamp analysis of direct steroidal modulation of glutamante receptor-Channels *J. Neuroendocrinol.* 6: 347-355 1994.

**Woosten, G. F.; Kopin, I. J.; Axelrod, J.** Effect of colchicine and vinblastine on axonal transport and transmitter release in sympathetic nerves. *Ann. N. Y. Acad Sci.* 253:528-534, 1975.

**Wu, Z; Sharma, R. K.; Wang, J'. H.** Catalytic and regulatory properties of calmodulin-stimulated phosphodiesterase isozymes. *Adv Second Messenger and Phosphoprotein Res.* 25:29-43, 1992.

**Zheng, J., Ali, A., Ramirez, V. D.** Steroid conjugated to bovine serum albumin as tools to demonstrate specific steorid neural membrane binding sites. *J. Psychiatry Neurosci.* 21:187-197 ; 1996.

**Zhou, Y., Dorsa, D. M.** Rapid effects of estrogen on the phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) in the rat brain. *Soc Neurosci. Abstr* 20: 92; 1994

## **Publicaciones Realizadas Durante el Curso del Doctorado:**

**Canchola, E., Mercado, E., Dueñas-Tentori, H. y Rosado, A.**

Avances recientes en el estudio biológico del alcoholismo

Ciencia 47:333-343; 1996

**Canchola, E., Rodríguez-Medina, M. A., Dueñas-Tentori, H., Mercado, E., and Rosado, A.**  $Ca^{2+}$  / Calmodulin system: Participation in the progesterone-induced facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen-primed rat.

Pharmacol. Biochem. Behav. 54: 403-407; 1996

**Canchola, E., Vergara-Onofre, M., Rodríguez-Medina, M. A.,**

**Mercado-Sánchez, G.,** Inhibidores del sistema calcio-calmodulina y diferenciación sexual hipotalámica en la rata.

Parámetros Bioquímicos. Ginec Obst Mex 65: 508-514; 1977

**Rodríguez-Medina, M. A., Chavarria, M. A., Vergara-Onofre, M., Canchola, E., Rosado, A. and Reyes, A.** Changes in hypothalamic calmodulin concentration induced by perinatal hormone manipulation in the rat.

Aceptado Pharmacol. Biochem. Behav. 1998.

# Avances recientes en el estudio biológico del alcoholismo

Enrique Canchola, Efraín Mercado, Héctor Dueñas-Tentori  
y  
Adolfo Rosado

---

Se revisa el conocimiento actual acerca de las causas de un complejo grupo de alteraciones conductuales que incluyen al alcoholismo y secundariamente a otros trastornos conductuales, que se reflejan en la farmaco-dependencia, la tendencia a comer con exceso, el deseo patológico de apostar y en algunas otras alteraciones patológicas más difíciles de clasificar, como la personalidad obsesivo-compulsiva (trastorno bipolar), la deficiencia en la atención y el síndrome de Tourette (Tics faciales y alteración del lenguaje).

La revisión concluye que no se puede decir aún que exista un factor específico determinante único para este grupo importante de trastornos de la conducta, denominado "Síndrome de deficiencia recompensatoria", sin embargo el estudio de todos ellos permite ahora visualizar las adicciones como un grupo heterogéneo de enfermedades de causas multifactoriales que podrían expresarse a través de una vía nerviosa final común: la dopamina y la expresión de los varios alelos que codifican para la síntesis de su receptor D2. Estos nuevos conocimientos presentan una mejor oportunidad para lograr la prevención y el tratamiento de este nuevo síndrome y la solución a uno de los problemas más grandes al que se ha enfrentado la especie humana.

---

## Introducción

---

**E**l alcoholismo, junto con otros muchos desórdenes adictivos: abuso de drogas, tabaquismo, comer con exceso, deseo patológico de apostar y algunas otras alteraciones patológicas más difíciles de clasificar, como la personalidad obsesivo-compulsiva (trastorno bipolar), la deficiencia en la atención y el síndrome de Tourette (Tics faciales y alteración del lenguaje), hasta hace poco tiempo, se habían considerado trastornos conductuales determinados en su aparición y progreso más por factores sociales, ambientales y familiares que por factores hereditarios. Sin embargo, la tendencia actual tiende a englobar este complejo grupo de trastornos conductuales dentro de un nuevo síndrome, para el cual se ha propuesto el nombre de "Síndrome de deficiencia recompensatoria" (Blum y

col, 1996). La principal razón para esta nueva tendencia es la propuesta de que todas estas alteraciones tienen, aparentemente, un substrato anatómico-bioquímico común consistente en modificaciones del funcionamiento de algunas neuronas y moléculas neuro-transmisoras responsables de la producción de la sensación de satisfacción y placer. Bajo condiciones normales estos circuitos mesocorticolímbicos participan en el reforzamiento de conductas normales.

Hasta ahora, se ha considerado que el alcoholismo depende de factores predisponentes y desencadenantes y que refleja una interacción compleja de factores sociales, psicológicos, fisiológicos y económicos. Sin intentar llegar a la definición de una "personalidad

prealcohólica", Plaut (citado por Velasco, 1988) señala como factores personales predisponentes a aquellos que determinan que algunos individuos tengan mayores posibilidades de convertirse en alcohólicos; dichos individuos responden a las bebidas alcohólicas con una mayor sensación de alivio, placer, entusiasmo y relajación. Poseen también ciertas características de la personalidad que les impide enfrentar con éxito los estados depresivos, la ansiedad y la frustración. A estas características podríamos añadir las siguientes: son individuos incapaces de manejar de manera adecuada sus conflictos personales, sus impulsos y sus tendencias, y acusan graves desajustes en su fisiología sexual.

Desde el punto de vista sociocultural, Velasco cita el concepto de *anomia* (Velasco, 1988), en el cual se propone que hay individuos que se sienten alienados de la sociedad en que deben vivir, y no aceptan, no comprenden o no se adaptan con facilidad ni a sus valores éticos, ni a sus conceptos de relación interpersonal. Este concepto de anomia ha sido utilizado con frecuencia para explicar la génesis de muchas conductas desviadas, como la delincuencia juvenil, la drogadicción y el alcoholismo.

Desde el punto de vista de los factores predisponentes y desencadenantes del ambiente sociocultural, se ha mencionado que los sujetos alcohólicos pertenecen a culturas en las que la ingestión de bebidas alcohólicas se acompaña de rechazo social y provoca culpabilidad y angustia en el bebedor, a pesar de que se le da a dicha ingestión la expresión de conducta viril, machista. El medio social en que se desarrolla la tendencia a beber es habitualmente un medio ambiente agresivo, el cual crea sentimientos de frustración, confusión, rechazo y desubicación en el bebedor. De estas alteraciones las más destacadas son las distorsiones de las relaciones interpersonales que repercuten directamente en la vida familiar. El alcoholismo es más acentuado en grupos familiares desunidos, donde los padres son grandes consumidores de alcohol. Es frecuente o habitual la disarmonía sexual y social de la pareja conyugal, la pérdida del respeto familiar a la figura de los padres y también frecuentes la pobreza y la marginación, aunque su importancia en la generación

del alcoholismo ha sido un poco exagerada (Calderón, 1985), pues por ellas mismas, en ausencia de las características personales predisponentes, no parecerían capaces de desencadenar esta patología. Todo lo que hace que los sujetos sustituyan su adaptación social por el alcohol, el cual funciona como un medio sustitutivo para la lubricación social, proveedor de satisfacción y placer y satisfactor de necesidades

Aunque estas características medio ambientales que fortalecen la decisión de buscar alivio en la bebida han sido siempre consideradas de la mayor importancia, no hay duda de que por debajo de todos los factores etiológicos que se han propuesto para el alcoholismo, subyacen las características de alteración de la personalidad que han llamado la atención de todos los investigadores interesados en este problema (Velasco, 1985, 1988; Calderón, 1985; Tarter y col., 1984). De todo lo anterior, es posible concluir que aquellos individuos que presentan alteraciones del circuito de reforzamiento compensatorio que provoca la sensación de placer, son personas con gran predisposición a graves alteraciones conductuales, entre las cuales se encuentra el alcoholismo.

El "Síndrome de deficiencia recompensatoria" (Blum y col., 1996) comprende formas de privación sensorial cerebral de placer y puede tener manifestaciones clínicas discretas o severas, que llevan al individuo a no experimentar recompensa por las actividades ordinarias y cotidianas, expresando como regla general, no encontrar gusto por vivir. Según esta propuesta, este grupo de desórdenes, que al parecer comienza a establecerse desde la infancia y se consolida a través de la vida, es debida a la acumulación de experiencias desagradables, las cuales alteran el sustrato celular y molecular de las zonas cerebrales responsables del proceso de reforzamiento. La suma de estas experiencias, debidas al ambiente más o menos agresivo en que se desarrolla el individuo, conduce finalmente a la alteración de la conducta normal del individuo, sustituyendo la esperada sensación de recompensa por ansiedad, hambre, o por la necesidad de sustancias que compensen o alivien estas alteraciones.

Recientemente se ha propuesto que la causa de este síndrome es la presencia de un alelo específico del gen que codifica para la síntesis del receptor D2 de la dopamina (una de las sustancias que funcionan como transmisoras de los impulsos nerviosos entre neuronas). De los cuatro alelos hasta ahora descritos de este gene, uno de ellos, el llamado A<sub>1</sub>, presenta una fuerte asociación con la presencia de alcoholismo y su expresión se ha encontrado ligada a ciertas alteraciones de las vías cerebrales dopaminérgicas responsables de la sensación de recompensa. Dicha variación genética se ha encontrado también asociada a los otros desórdenes adictivos antes expuestos.

La publicación original de Blum y sus colaboradores en 1990, en donde se llamaba la atención sobre la asociación de alcoholismo severo y prolongado y la presencia del alelo A<sub>1</sub> del receptor D2 de la Dopamina, llevó a la idea equivocada de que estos investigadores habían descubierto el "gen del alcoholismo", lo cual implicaría que hubiera una relación uno a uno entre la presencia del gen y la conducta alcohólica, idea que hasta el momento no ha podido ser sustentada, es decir que no existe un gen específico para el alcoholismo o un tipo particular de personalidad (Blum y col, 1990).

La posibilidad de que existan factores genéticos asociados directamente a la ocurrencia de abuso y dependencia de sustancias, cambia la perspectiva de estudio de este problema e impone la necesidad de considerar la importancia de factores genéticos como causantes del alcoholismo en relación a los otros factores postulados por Jellinek y otros autores en los años cuarentas: ambiente, desarrollo y circunstancias sociales, y que hasta ahora habían sido aceptados como determinantes de este trastorno.

El interés por el estudio del alcoholismo, ahora renovado por el descubrimiento de Blum y Col. (1990) es apenas el que debía necesariamente dedicarse al estudio de un trastorno conductual que figura entre las causas más importantes de problemas socio-económicos en todas las naciones del mundo.

Aunque no parecería necesario tratar de destacar la importancia del alcoholismo en el mundo actual, es obvio que, a pesar de las enormes cantidades de dinero

---

***El medio social en que se desarrolla la tendencia a beber es habitualmente un medio ambiente agresivo, el cual crea sentimientos de frustración, confusión, rechazo y desubicación en el bebedor.***

---

y esfuerzo dedicados a su prevención, intereses iguales, o más fuertes, han propiciado un aumento notable en el número de personas que tratan de encontrar su satisfacción en el alcohol, o en el consumo de otras drogas. Por tal razón queremos hacer resaltar tres hechos que nos parecen de importancia fundamental para justificar esta revisión:

1o. La frecuencia del alcoholismo ha aumentado sobre todo en la población de jóvenes adultos, en 1992, en los Estados Unidos de América 13.8 millones de personas entre 18 y 48 años de edad, más del 9% de la población de estas edades, tuvieron problemas ocasionados por la ingestión de alcohol. En este mismo país, el alcoholismo provoca anualmente la muerte de más de 100 000 personas jóvenes por su participación en la producción de accidentes, principalmente automovilísticos, pero también aumentando notablemente el número de homicidios y de suicidios. El alcoholismo constituye la causa principal de muerte accidental y la tercera causa de mortalidad evitable en nuestro país vecino.

2o. Es de fundamental interés la demostración de que el consumo habitual de alcohol durante el embarazo constituye la causa principal de retraso mental en los recién nacidos. Este hecho adquiere mayor importancia porque se sabe que el 74% de las mujeres alcohólicas, o con otras farmacodependencias, son objeto de abuso sexual, lo cual ha producido un aumento alarmante en la frecuencia de niños nacidos con retraso mental.

3o. Finalmente, aunque a nosotros las causas económicas no nos parecen las fundamentales, no debe olvidarse que, también en los Estados Unidos de América en donde las estadísticas son más confiables que en nuestro país, el impacto económico del alcoholismo subió 40% entre 1985 a 1990, alcanzando la fabulosa cantidad de 98.6 miles de millones de dólares en el último año. Si este costo se ha seguido elevando al mismo ritmo, en la actualidad el costo de esta alteración conductual debe llegar a casi 150 miles de millones de dólares por año.

La intención de esta revisión es presentar un panorama actual de conocimientos acerca de la participación de los diferentes factores genéticos y ambientales en el origen del alcoholismo y de otros trastornos relacionados con las alteraciones del reforzamiento conductual.

### **El alcoholismo como un modelo para estudiar la vulnerabilidad genética al abuso de sustancias**

#### **Estudio en familias**

El diseño básico de estos estudios es comparar el riesgo de desarrollo del trastorno en los parientes de los individuos que manifiestan el problema. Se compara también la incidencia de presentación de la adicción en los parientes de grupos controles o en la población general. Los resultados han demostrado que la tendencia a desarrollar alcoholismo es significativamente mayor en parientes de pacientes alcohólicos, que en parientes de individuos no alcohólicos, encontrándose un riesgo de tres a cuatro veces mayor en el desarrollo del problema en los hijos de alcohólicos. Este riesgo parece ser específico para el alcoholismo, ya que, en los mismos grupos no se encontró la misma incidencia para el trastorno bipolar (Schuckit, 1987; Cotton, 1979; Schuckit, 1986).

Aunque estos estudios familiares provean de una evidencia preliminar de la concordancia entre los factores genéticos y el alcoholismo, no son *per se* concluyentes, ya que pudieran también reflejar las influencias sociales, de desarrollo y de educación en el mismo ambiente que los parientes alcohólicos. Por otra

parte se conoce también que sujetos marginados son los que mayor predisposición presentan a la ingesta de alcohol y otras drogas, aunque no provengan de parientes alcohólicos.

#### **Estudios de concordancia en gemelos monocigotos y dicigotos**

El objetivo de este tipo de estudios es comparar la similitud de determinadas características entre gemelos que comparten absolutamente toda su información genética (monocigotos) con gemelos que solo comparten la mitad de su información (dicigotos). De esta manera si la similitud entre los factores estudiados es más alta en el caso de los primeros, se podría inferir que existe un factor genético detrás del problema estudiado. Con respecto a lo anterior se ha encontrado una concordancia mayor en gemelos monocigotos: 58% contra 28% en los dicigotos, con respecto al desarrollo del alcoholismo (Kail, 1960). De manera interesante esta similitud también se encuentra respecto a la severidad del alcoholismo, dando una información adicional acerca de que la posibilidad de la transmisión genética de esta enfermedad sea importante, única, especialmente en caso del alcoholismo severo y crónico, en lo cual coinciden otros autores. (Hrubec y Omenn, 1981).

Asimismo, se han realizado estudios que intentan concentrarse en otros factores, como son los patrones en la forma de beber, y en los ritmos de absorción y eliminación del alcohol. En el caso de estas investigaciones, se ha descubierto una gran disparidad en los resultados, dado que se encuentran frecuencias y cantidades poco relacionables (Partanen y col, 1966; Johnsson y Nilsson, 1968). Algunos estudios de concordancia con respecto a la absorción o eliminación del alcohol, muestran altos niveles de posible heredabilidad (Vesell y col, 1971), (Radlow y Conway 1978); en cambio, otros muestran que no existe tal relación (Kopun y Propping, 1977).

Como se puede apreciar, la disparidad en estos resultados refleja los múltiples factores que afectan el metabolismo del alcohol y la importante interacción entre los factores genéticos y ambientales, siendo, de hecho el principal problema a resolver, lo cual exige el desarrollo de nuevas metodologías de estudio que

intenten separar los factores genéticos de los factores ambientales.

### Estudios en individuos adoptados.

Estas investigaciones estudian a individuos separados de sus padres después del nacimiento y que se desarrollan bajo el cuidado de padres adoptivos que no tienen ninguna relación de parentesco con los padres biológicos. Schuckit y sus colaboradores (1972) evaluaron a un grupo de individuos que habían sido adoptados y los agruparon en dos subgrupos, el primero cumplía con las características de que por lo menos uno de sus padres biológicos era alcohólico y el segundo, en el que ninguno de los padres tenía esta característica, pero cumplía con la circunstancia de que por lo menos uno de los padres adoptivos, era alcohólico. Los resultados que encontraron comparando ambos subgrupos fueron que aquellos sujetos que tenían un padre biológico con problemas de alcoholismo lo desarrollaban con mayor frecuencia. También se han hecho otros estudios de estas características en lugares en donde se encuentran muy desarrollados y tecnificados los sistemas de registro civil, como son Dinamarca, Suecia y los Estados Unidos de América, con resultados similares a los encontrados por Schuckit. Goodwin y sus colaboradores (Goodwin, 1979; y 1983). Encontraron que los hijos de alcohólicos tenían cuatro veces más incidencia de alcoholismo que en los hijos de no alcohólicos, y que éstos no presentaban riesgo de alcoholismo a pesar de que uno, o ambos, de sus padres adoptivos eran alcohólicos (Goodwin, 1979). Otro dato importante que reportan es que aunque los hijos de alcohólicos tienen una mayor probabilidad de desarrollar esta adicción, no parece haber una tendencia similar para desarrollar otros trastornos psiquiátricos. De manera consistente con los anteriores resultados son los datos de Cloninger y cols. (1981), así como los de Cadoret y Cols (1980) y los de otros grupos de investigación (Goodwin, 1985; Cloninger y col, 1986; Anthenelli y Schuckit, 1990).

### Marcadores fenotípicos en el alcoholismo

En general, en esta técnica se utilizan marcadores estables, fácilmente medibles y que estén bajo un

control genético, ya sea influenciando el riesgo de presentar alcoholismo o estar ligados a las variaciones genéticas en relación al desarrollo del trastorno. Se utiliza más frecuentemente el paradigma de la población de alto riesgo y se parte de las siguientes premisas principales:

1. Son características asociadas con el factor de riesgo a desarrollar el trastorno y difieren en su frecuencia de presentación en grupos de alto y bajo riesgo.
2. Son características que se encuentran antes del desarrollo de la enfermedad y que pueden seguir siendo observadas durante la fase activa de ella, o durante los períodos de remisión de la misma.
3. Algunos marcadores de estado nosológico, es decir durante la enfermedad activa, dependen para ser detectados de la presencia de la sustancia a la cual se es dependiente.

### Marcadores bioquímicos

Los sistemas enzimáticos plaquetarios han sido muy estudiados pese a las referencias de su inespecificidad (Schuckit, 1987; Anthenelli y Schuckit, 1990) o la puesta en duda de su correlación con los niveles enzimáticos realmente presentes en las células cerebrales (Young y col, 1986). Se ha encontrado disminución en la actividad de monoamino-oxidasa (MAO) plaquetaria en los pacientes con dependencia alcohólica (Sullivan y col, 1978; Von Knorring y col, 1985; Tabakoff y col, 1988) y se tienen reportes del mismo hallazgo en hijos de alcohólicos (Raush y col, 1991). Se han reportado también aumentos en la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de recaptura de serotonina (McBride y col, 1989), especialmente en los hijos varones de alcohólicos. Se encuentran en espera de confirmación los resultados positivos de los trabajos que comparan a pacientes alcohólicos, o sus parientes en primer grado, con sujetos controles con respecto a: el gen D del grupo Rh, la arilsulfatasa A, el AMPcíclico (Hill y col, 1980; Hulgalkar y col; 1984, Diamond y col, 1989), los antígenos de histocompatibilidad (Devor y Cloninger, 1989; Tabakoff y Hoffman, 1989; Corsico y col, 1988) y la  $\beta$  endorfina (Topel, 1988; Genazzani y col, 1982).

Monteiro y Cols. (1990) reportan en un grupo de hijos de pacientes alcohólicos, un aumento en la respuesta a la hormona estimulante de la tiroides (TSH), como respuesta a la aplicación exógena del factor liberador de las hormonas tiroideas (TRH), mientras que la respuesta es normal en los hijos de los sujetos no alcohólicos utilizados como grupo control. Moss y col (1990), demuestra que los hijos de alcohólicos tienen una menor actividad del ácido gama amino butírico (GABA) plasmático con respecto a los controles y que el alcohol aumenta dicha actividad, lo que sugiere un posible mecanismo bioquímico reforzador de los efectos del alcohol. De hecho, se plantea la hipótesis de la presencia de alteraciones en la reactividad de algunas variables neurohormonales y de la respuesta electro-encefalográfica (EEG), como una circunstancia que bloquea la retroalimentación natural que debería permitir al paciente susceptible, percatarse de las fases iniciales de la intoxicación (O Malley y Maisto, 1985; Pollock y col, 1986; Schuckit, 1991). Con respecto a la reactividad del Sistema Nervioso Simpático, se ha encontrado en alcohólicos y en los hijos de pacientes alcohólicos, un aumento en la conductancia eléctrica de la piel, habituación a series de tonos, aumento en la frecuencia cardíaca y vasoconstricción periférica. En los pacientes estudiados, esta actividad incrementada del Sistema Nervioso Simpático se atenúa después del consumo de alcohol (Finn y col, 1990).

Los estudios que se han realizado con respecto a diferencias en el desempeño cognocitivo, aunque importantes, presentan todavía demasiadas incongruencias entre sí, por lo que su asociación con el riesgo de alcoholismo necesita de mayor información para poder ser aceptada con firmeza (Gabrielli y Mednick, 1983; Knop y col, 1984; Tarter y col, 1984). Hasta el momento no se ha demostrado una asociación específica entre un perfil de personalidad dado y el riesgo para desarrollar alcoholismo (Anthenelli y Schuckit, 1990; Kammeier y col, 1973; Schuckit, 1973; Schuckit, 1983).

#### Genes y alcoholismo

Las evidencias de las bases genéticas del alcoholismo se han venido acumulando a lo largo de las últimas

cinco décadas, los primeros indicios de una participación importante del genoma en el desarrollo del alcoholismo fueron proporcionados en 1952 por Blum y col, (1996). Este investigador encontró que ciertos ratones, si se les deja elegir, prefieren tomar alcohol que agua. La primera evidencia clara de la heredabilidad del alcoholismo fue presentada por McLearn en 1959. Este autor desarrolló una cepa híbrida de ratones que tienen una marcada preferencia por el alcohol, la cepa es conocida como C57 y queda perfectamente claro que esta preferencia por el alcohol es heredada a sus descendientes (McLearn y col, 1996). En 1972, Schuckit y colaboradores obtienen las primeras evidencias de que el alcoholismo en humanos también tiene ciertas bases genéticas y demuestran que niños adoptados cuyos padres biológicos eran alcohólicos presentaban mayor susceptibilidad a desarrollar alcoholismo, que los adoptivos provenientes de padres no alcohólicos. Como ya señalamos, esta participación de la información genética en el desarrollo del alcoholismo ha sido confirmada por los trabajos de Goodwin y col (1979), Goodwin, 1983, Goodwin, 1985). Goodwin (1979) y Cloninger (1985) sugieren que pudieran existir diferencias genéticas importantes entre alcohólicos y no alcohólicos. Sin embargo, los intentos iniciales de Blum y col. (Blum y col, 1996 y 1990), para demostrar la veracidad de esta tesis utilizando marcadores genéticos asociados con varios neurotransmisores tales como, serotonina, opiodes endógenos, GABA, transferrina, acetilcolina, alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, no pudieron demostrar alguna relación importante entre genes y alcoholismo.

A pesar del fracaso antes mencionado, Oliver Civelli (1993), clona y secuencia el gen que codifica para el receptor D2 de la Dopamina, receptor que se expresa en neuronas de la corteza cerebral y en el sistema límbico, incluyendo el núcleo accumbens, la amígdala y el hipocampo, zonas cerebrales, a excepción de la corteza, que participan en el alcoholismo. El gen que codifica al receptor D2 de la dopamina, está localizado en el brazo largo (q) del cromosoma 11. El estudio de los patrones electroforéticos producidos mediante la digestión de gen con enzimas de restricción ha permitido llegar a

conclusión de que existen 4 alelos diferentes de este gen (A1, A2, A3, A4). Más importante todavía es la demostración de que las diferencias entre estos alelos se expresan justo en el sitio que determina la secuencia de aminoácidos donde el receptor D2 fija la dopamina. El alelo A1, se encuentra aproximadamente en el 25% de la población, el A2 en cerca del 75% y los alelos A3 y A4, son raros. Cuantificando estos alelos, Blum y Cols. (1996), encuentran que en 35 pacientes con alcoholismo severo (que incluso los había llevado a la cirrosis), 69% tienen alelo A1 y solo el 31% presentan el alelo A2, mientras que en un grupo de sujetos no alcohólicos predomina ampliamente el alelo A2 (80%), mientras que el alelo A1 se encuentra en solo el 20% de los sujetos no alcohólicos estudiados. Lo anterior ha permitido a este grupo de investigadores asociar al abuso de drogas en general, y al alcoholismo en particular, con la presencia del alelo A1 y, más aún, el incremento de este alelo por la ingesta de alcohol y otras drogas.

Sin embargo, es importante mencionar que estos resultados no han podido ser claramente reproducidos y que, como dijimos arriba, solo el 75% de los pacientes alcohólicos graves presentan esta variación genética, por lo que la presencia del alelo A1 en el gen del receptor D2 no puede ser la única causa del alcoholismo, aunque pudiera estar asociado.

E. P. Noble en 1996 (Noble, 1996), encuentra que solo el 27% de los alcohólicos podrían asociarse con una alteración del alelo A1, mientras que el 33% están asociados a otros alelos y el 40% a ninguna alteración genética, lo que podría asociar a la enfermedad con el medio ambiente.

#### **Alcoholismo, neurotransmisores y hormonas**

Los grupos de investigación comandados por Cloninger (Cloninger y col, 1986) y Blum (Blum y col, 1990), estudiando las bases biológicas de la

dependencia a drogas han demostrado que los núcleos cerebrales y las moléculas transmisoras de la recompensa están íntimamente relacionadas. El alcohol, por ejemplo, activa el sistema noradrenérgico en el circuito límbico, a través de la cascada intercelular que involucra a la serotonina, a las

encefalinas (opioides endógenos) y a la dopamina. O bien, puede actuar directamente sobre la producción de neuroaminas que actúan sobre receptores opioides (encefalinas) o sobre el sistema dopaminérgico (Alvaksinen y col, 1984; Blum y col, 1990). En concordancia con la propuesta de cascada de neurotransmisores y alcoholismo, una serie de experimentos en ratas alcohólicas han permitido conocer que este tipo de animales tiene pocas neuronas serotoninérgicas y altos niveles de encefalinas en el hipotálamo, poseen un mayor número de neuronas Gabaérgicas y relativamente, pocas neuronas dopaminérgicas en el núcleo accumbens y baja densidad de receptores dopaminérgicos D2 (Russell y col, 1988; McBride y col, 1990; McBride y col, 1993). La administración de sustancias que aumenten la actividad de las sinápsis serotoninérgicas o que estimulen los receptores dopaminérgicos D2, reducen la preferencia por el alcohol en sujetos que padecen esta enfermedad y, por el contrario, la administración de sustancias que inhiben la actividad de los receptores dopaminérgicos D2, aumentan la preferencia por el alcohol y la adicción a drogas (Russell y col, 1988; McBride y col, 1990; McBride y col, 1993).

La cascada de neurotransmisores y núcleos nerviosos del sistema límbico involucra conexiones excitatorias e inhibitorias que se expresan a través de una vía nerviosa final común: la dopamina y su receptor D2 en el núcleo accumbens y en el hipocampo. La cascada comienza en el hipotálamo liberando serotonina, la cual causa la liberación de encefalinas (opioides) en el área ventral tegmental que inhiben a su vez, la actividad de las neuronas que liberan el neurotransmisor inhibitorio del GABA, proveniente de la sustancia negra mesencefálica. Esta acción, consecuentemente, desinhibe a las neuronas que contienen dopamina en el área ventral tegmental y en la amígdala, aumentándose la liberación de la dopamina en el núcleo accumbens y en ciertas partes del hipocampo, permitiendo todo este complejo de eventos neurales, la activación de la vía final común (D2), posiblemente relacionada con el alcoholismo. (Fig 1)

También se conoce que la ingesta de alcohol altera los niveles de secreción de hormonas, lo que conduce a una serie de trastornos metabólicos y de comportamiento de todo tipo, incluyendo la alteración de los componentes apetitivos y consumatorios de la conducta sexual; se conoce que incrementa el apetito y disminuye la posibilidad de consumir la conducta (Dueñas-Tentori y col, 1980).

### Conclusiones

La demostración realizada por McCaul y col. (1990) y Blum y col (1996) acerca de que la administración de secobarbital, cuyo mecanismo de acción radica en la modificación de las membranas celulares y su interacción con neurotransmisores específicos, induce efectos de reforzamiento en sujetos con una historia positiva familiar de alcoholismo, mientras que tal reforzamiento no se manifiesta en un grupo control de sujetos no alcohólicos, inició una nueva línea de investigación enfocada a la demostración de si la vulnerabilidad al desarrollo del alcoholismo es específica para el etanol, o puede estar relacionada con una vulnerabilidad generalizada del sistema de estímulo recompensatorio que puede conducir a cualquier tipo de adicción y/o al

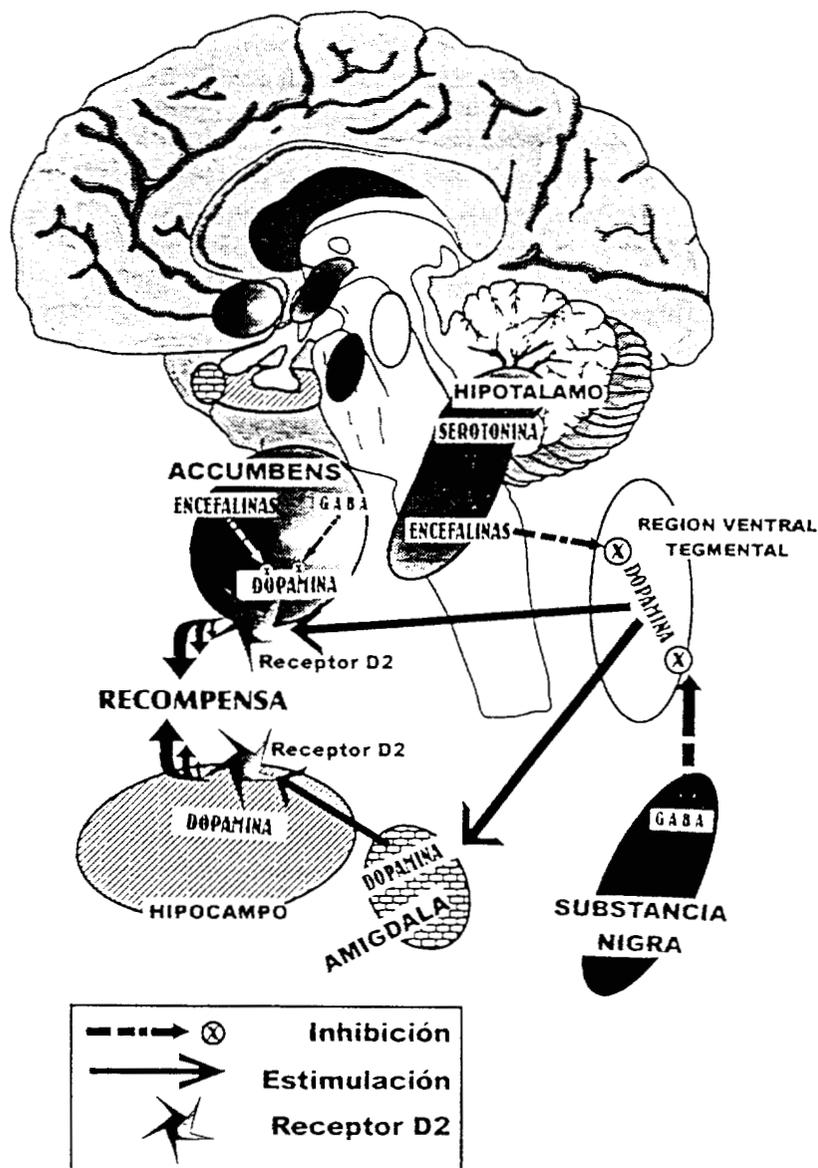


Fig 1 En la parte superior se muestran los centros nerviosos y su localización en el cerebro, en la parte inferior las vías nerviosas y los mediadores químicos que participan en el circuito del reforzamiento que utiliza a la Dopamina como vía final común.

abuso de otros tipos de sustancias. En la actualidad se propone que esta susceptibilidad conductual involucra un cortejo de centros nerviosos y sus neurotransmisores correspondientes, que se activan en forma de cascada y utilizan a la dopamina, o más específicamente a su receptor D2, como vía final común.

A pesar de la enorme trascendencia que tiene para el mejor entendimiento de varias alteraciones importantes de la conducta el tratar de englobarlas todas en un mecanismo común, la deficiencia del sistema biológico de producción de la sensación de recompensa y autovaloración, nosotros consideramos que estas propuestas, y las relaciones que postulan entre los aspectos genéticos, neurobioquímicos y psicosociales que participan en el alcoholismo, no son aún completamente aceptables. Para empezar pensamos que existe cierta deficiencia en los diseños experimentales seguidos con respecto a la incidencia y vulnerabilidad específica del alcoholismo entre sexos.

Hasta ahora la mayoría de los estudios realizados han sido hechos en varones y no se ha analizado la incidencia del problema en hijas de pacientes alcohólicos y más aún, no se ha determinado por cuál de los padres podría transmitirse esta predisposición genética.

Es evidente la necesidad de realizar estudios en que se distinga entre los diferentes tipos de alcohólicos, empezando por establecer una clara diferencia entre los pacientes con alcoholismo severo, de larga duración, y los pacientes con alcoholismo temprano, ocasional o susceptible al tratamiento. También se requiere establecer con mayor claridad la existencia de farmacodependencia en una estricta relación con la triada ambiente, genética y circunstancia social. Consideramos que serían provechosos más estudios longitudinales para establecer las diferencias existentes entre los múltiples niveles de organización biológica presentes en alcohólicos y no alcohólicos, y de ésta forma poder integrar un mejor campo conceptual de la conjunción de todos los factores importantes que participan en la producción de adicciones y otros trastornos

conductuales. La realización de este tipo de estudios redundaría en mejores estrategias de prevención y tratamiento.

## Referencias

- ALVAKSINEN, M.N., V. SAANO, H. JUVONENE, A. HUHTIKANGAS and J. GUNTHER. Binding of beta-carbolines and tetrahydroisoquinolines by opiate receptors of the d-type. *Acta Pharmacol. toxicol.* (1984); 55: 380-385
- ANTHENELLI R. M., SCHUCKIT M. A. Genetic studies of alcoholism. *Int J. Addict* (1990); 25:31-94.
- BLUM K, CULL J. G., BRAVERMAN E. R. y COMINGS D.E. *Reward Deficiency Syndrome American Scientist* (1996); 84: 132-145.
- BLUM K, NOBLE E. P., SHERIDAN P.J. MONTGOMERY, A., RITCHEE T, JAGADEESWARAN P, NOGAMI H, BRIGGS A.H., COHN J. B. Allelic association of human dopamine receptor gene in alcoholism. *J. Am. Med. Ass.* (1990); 263: 2055- 2060.
- CADORET R. J, CAIN C. A, GROVE W. M. Development of alcoholism in adopted tees raised apart from alcoholic biological relatives. *Arch Gen Psychiatry* (1980); 37:561-563.
- CALDERÓN N. G. Contribución de la psiquiatría comunitaria para la atención integral del alcoholismo. En: V. MOLINA-PINEIRO, L. A. BERRUECOS y L. SÁNCHEZ-MEDAL, Editores. *El Alcoholismo en México. II. Aspectos Sociales, Culturales y Económicos.* (1985). Fundación de Investigaciones Sociales A. C. México. Pp.53-70.
- CIVELLI O. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1993) 33:231-307.
- CLOINGER C. R, BOHMAN M, SIGVARDSSON S. Inheritance of alcohol abuse: cross-fostering analysis of adopted men. *Arch Gen Psychiatry* (1981); 36:861-868.
- CLOINGER C. R, SIGVARDSSON S, REICH T, BOHMAN M. Inheritance of risk to develop alcoholismo. In: BRAUDE M. C, CHAO H. M, eds. *Genetic and biological markers in drug abuse and alcoholismo* (1986). NIDA Research Monograph 66. Rockville, MD: Department of Health and Human Services.
- CORSICO R., PESSINO O. L, MORALES V, JMELNISKY A. Association of HLA antigens with alcoholic disease. *J Studies Alcohol* (1988); 149: 546-550.
- COTTON N. S. The familiar incidence of alcoholismo a review. *J. Studies Alcohol* (1979); 40:89-115.
- DEVOR E. J, CLOINGER C. R. *Genetics of alcoholismo Annu Rev Genet* (1989); 23:19-36.
- DIAMOND I, NAGY L. E. GORDON A. S. Adenosine receptor activates cAMP signal transduction: a possible genetic marker for alcoholismo. In: Kiiianma K. Tabakoff B. Saito T. eds. *Genetics aspects of alcoholismo.* (1989). Helsinki, Finland: Finnish Foundation for Alcohol Studies.

- DUEÑAS-TENTORI H, GUTIERREZ-ESTENOU R, CANCHOLA E, MACHADO-SALAS J. P. Modificaciones de la conducta sexual observadas en ratas macho sometidas a la ingesta crónica de etanol (1980). Memorias del XXIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.
- FENN P, ZEITOUNI N, PHEL R. Effects of alcohol on psychophysiological Hyperreactivity Nonaversive and aversive stimuli in men at high risk for alcoholism. *J Abnorm psychol* (1990); 99:79-85.
- GABRIELLI W. F, MEDNICK S. A. Intellectual performance in children of alcoholics. *J Nerv Ment Dis* (1983); 171:444-447.
- GENAZZANI A. R, NAPPI G, FACCHINETTI F. Central deficiency of beta-endorphin in alcohol addicts. *Clin Endocrinol Metab* (1982); 55:583-586.
- GOODWIN D. W. Alcoholism and genetics: the sins of fathers. *Arch Gen Psychiatry* (1985); 42:171-174.
- GOODWIN D. W. Alcoholism and heredity. *Arch Gen Psychiatry* (1979); 36: 57-61.
- GOODWIN D. W. Familial alcoholism: a separate entity; Substance and Alcohol Actions/Misuse (1983); 4:129-136.
- HILL S. Y, GOODWIN D. W, CADORET R, OSTERLAND C. K, DONER S. M. Association and linkage between alcoholism and eleven serological markers. *J Studies Alcohol* (1980); 36:981-989.
- HRUBEC Z, OMENN G. S. Evidence of genetic predisposition to alcohol cirrhosis and psychosis: twin concordances for alcoholism and its biological end points by zygosity among male veterans. *Alcohol Clin Exp. Res* (1981); 5:207-212.
- HULGALKAR A. R, NORA R, MANOWITZ P, Arylsulfatase A variants in patients with alcoholism. *Alcohol Clin Exp. Res* (1984); 8:337-341.
- JONSSON E, NILSSON T. Alcoholism in monozygotic and dizygotic twins. *Nord Hyg Tidskr* (1968); 49: 21-27.
- KAIL L. *Studies on the etiology and sequels of abuse of alcohol*. (1960). Lund, Sweden: University of Lund Press.
- KAMMEIER M, HOFFMAN H, LOPEZ R. Personality characteristics of alcoholics as college freshmen and at the time of treatment. *Q J Studies Alcohol* (1973); 34:390-399.
- KNOP J, GOODWIN D. W, TEASDALE T. W, MIKKELSEN U, SCHULSINGER F. A Danish prospective study of young males at high risk for alcoholism. In GOODWIN D.W, VAN DUSEN K, MEDNICK S.A. eds. *Longitudinal Research in Alcoholism*. (1984). Boston: Kluwer-Nijhoff.
- KOPUN M, PROPPING P. The kinetics of ethanol absorption and elimination in twins and supplementary repetitive experiments in singleton subjects. *Eur J. Clin Pharmacol* (1977); 11:337-344.
- MC BRIDE W. J, MURPHY J. M, LUMENG L, LI T. K. Serotonin and ethanol preference. *Recent Devel Alcohol* (1989); 7:187-209.
- MCBRIDE, J. W., E. CHERNET., W. DYR., L. LUMENG., T. K. LI Densities of dopamine D2 receptors are reduced in CNS regions of alcohol preferring P rats. *Alcohol* (1993); 10: 390.
- MCBRIDE, J. W., X. M GUAN., E. CHERNET., L. LUMENG., T. Regional differences in the densities of serotonin 1 receptors between P and NP rats. *Alcoholism: Clin. Exp* (1990); 14: 316.
- MCCAUL M, TURKKAN J, SVIKIS D, BIGELOW G: Alcohol anobarbital effects as a function of familiar alcohol acute psychophysiological effects. *Alcohol Clin Exp* (1990); 14:704-712.
- MCLEARN, G.E, and RODGERS D.A. Differences in alcohol preferences among hybrid strains of mice. *Q J. Studies Alc* (1959); 20: 691-695.
- MONTEIRO M, IRWIN M, HAUGER R, SCHUCKIT M. TSH response to TRH and Family history of Alcoholism. *Biol Psych* (1990); 27:905-910.
- MOSS H, YAO J, BURNA M, MADDOCK J, TARTER R. Plasma BA like activity in response to Ethanol Challenge in at High Risk of Alcoholism. *Biol Psychiatry* (1991); 127:617-625.
- NOBLE, E. P. The gene that rewards alcoholism, Scientific American: *Science/Medicine* (1996), 3: 52-61.
- O. MALLEY S. S, MAISTO S.A. Effects of Family Drinking Expectancies on response to Alcohol in Men. *J Studies Alcohol* (1985), 46:289-297.
- Partanen J, Bruun K, Markkanen T. Inheritance of drinking behavior; a study intelligence, personality, and use of alcohol of adult twins. (1966). Helsinki, Finland: Finn Foundation for Alcohol Studies.
- Pollock V.E, Teasdale T. W, Gabrielly W. F, Knpo J. Subjective and Objective Measures of Response to Alcohol among Young Men at Risk for Alcoholism. *J Studies Alcohol* (1986); 47:297-304.
- RADLOW R, CONWAY T. L. Consistency of alcohol absorption in human subjects. Paper presented at the Reunion of American Psychological Association, (1978). Toror Canada.
- RAUSH J. L, MONTEIRO M. G, SCHUCKIT M. A. Platelet serotonin uptake in men with family histories of alcoholism. *Neuropsychopharmacology* (1991); 4:83-86.
- RUSSELL, V. A, LANIN, M.C.L, TALJAARD J.F. Effect of ethanol on 3H-dopamine release in rat nucleus accumbens and striatum. *Neurochem. Res.* (1988); 13: 487-492.
- SCHUCKIT M. A. Alcoholism and affective disorders: gene and clinical implications. *Am. J. Psychiatry* (1986); 143: 140-147.
- SCHUCKIT M. A. Biological vulnerability to alcoholism. *J. Consult Clin Psychol* (1987); 55:301-309.
- SCHUCKIT M. A. Advances in understanding the vulnerability to alcoholism. (1991). In: O'Brien C.P eds. *Advances in understanding the addictive states*. New York: Raven Press.

- SCHUCKIT M.A. Extroversion and neuroticism in young men. *Am. J. Psychiatry* (1983); 140:1223-1224.
- SCHUCKIT M. A., GOODWIN D. W., WINOKUR G. A. A study of alcoholism in half-siblings. *Am J Psychiatry* (1972); 128:1132-1136.
- SCHUCKIT M.A. Alcoholism and sociopathy-diagnostic confusion. *Q. J. Studies Alcohol* (1973); 34:167-164.
- SULLIVAN J.L., STANFIELD C. N., MALTBIE A. A., HAMMETT E., CAVENAR J. O Stability of low blood platelet monoamine oxidase activity in human alcoholics. *Biol Psychiatry* (1978); 13:391-397.
- TABAKOFF B., HOFFMAN P.L. Genetics and biological Markers of risk for alcoholism. In: KILANMAA K., TABAKOFF B., SAITO T, eds. *Genetic Aspects of Alcoholism*. (1989). Helsinki. Finland; Finnish Foundation for Alcohol Studies.
- TABAKOFF B., HOFFMAN P. L., LEE J. L., SAITO T, WILLARD B, DE LEON-JONES F. Differences in platelet enzyme activity between alcoholics and non alcoholics. *N Engl J Med* (1988); 318:134-139.
- TARTER R.E., HEGEDUS A. M., GOLDSTEIN G, SHELLY C, ALTERMAN A. Adolescent sons of alcoholics: neuropsychological and personality characteristics. *Alcohol Clin Exp Res* (1984); 8:216-222.
- TOPEL H. Beta-endorphin genetics in the etiology of alcoholism. *Alcohol* (1988); 5:159-165.
- VELASCO-FERNÁNDEZ R. Los factores sociales del alcoholismo desde el punto de vista de la psiquiatría. En: V. MOLINA-PINEIRO, L. A. BERRUECOS y L. SÁNCHEZ-MEDAL, Editores. *El Alcoholismo en México. II. Aspectos Sociales, Culturales y Económicos*. (1985). Fundación de Investigaciones Sociales A. C. México. pp.39-52.
- VELASCO-FERNÁNDEZ R. *Esa Enfermedad Llamada Alcoholismo*. (1988). Trillas. México.
- VESELL E. S., PAGE J. G., PASSANCANTI G. T. Genetic and environmental factors affecting ethanol metabolism in man. *Clin Pharmacol Ther* (1971); 12:192-201.
- VON KNORRING A. L., BOHMAN M, VON KNORRING L, ORELAND L. PLATELET MAO activity a biological marker in subgroups of alcoholism. *Acta Psychiatry Scand* (1985); 72:51-58.
- YOUNG W. F, LAWS E. R, SHARBROUGH F. W, WEINSHILBOUM R. M. Human monoamine oxidase: lack of brain and platelet correlation. *Arch Gen Psychiatry* (1986); 43:604-609.

# Los recursos forrajeros tropicales nativos de México y su potencial de aprovechamiento ganadero

Jorge Pérez Pérez

Adrián R. Quero Carrillo

En este trabajo se señalan las principales especies forrajeras tropicales nativas de México que se emplean más frecuentemente en los sistemas de producción animal, en climas cálidos húmedos; se describe su capacidad productiva, tanto de forraje, como de carne o leche en pastoreo, bajo diferentes estrategias de manejo de las praderas. Los datos obtenidos por investigadores mexicanos con diversas especies de gramíneas y leguminosas forrajeras, evidencian que son de aceptable a buen rendimiento y valor nutritivo, al compararlas con especies introducidas de otros países. Lamentablemente, se han desatendido las especies nativas, dándose preferencia a las introducidas, por considerar a las locales con menor rendimiento y calidad nutritiva, lo cual es erróneo, ya que las comparaciones efectuadas pueden no ser válidas al estudiar especies de porte y hábito de crecimiento diferentes. Se discute también, la problemática para mejorar las especies nativas tropicales, dado sus caracteres reproductivos y presencia de esterilidad en la semilla producida, principalmente en numerosas especies de gramíneas, por lo que la siembra se efectúa con material vegetativo a base de tallos, estolones, etc. Tampoco existe a nivel nacional un programa de mejoramiento genético de especies forrajeras nativas, por lo que se importa semilla de diferentes países, para satisfacer las necesidades nacionales. Los problemas señalados deben atenderse por los organismos y personal capacitado correspondientes y así mejorar los sistemas de producción animal en praderas tropicales.

## Introducción

Las regiones con clima cálido húmedo en México, comprenden aproximadamente el 25% del territorio nacional y se localizan principalmente en las franjas costeras, desde el nivel del mar, hasta alrededor de los 1000 m de altitud y abarcan desde el sur de Sinaloa y Tamaulipas, hasta la frontera con Guatemala y el Mar Caribe y algunas áreas de la depresión central del Río Balsas. En estas regiones existen diversas variantes del clima cálido, destacando el cálido subhúmedo, con precipitación que fluctúa entre 1000 a

2500 mm anuales, según la región y ocupa la mayor superficie, mientras que el cálido húmedo, con presencia en regiones pequeñas de los Estados de Chiapas, Veracruz y Tabasco, con lluvias todo el año, en las que el mes más seco, durante el periodo de sequía, presenta una precipitación superior a 60 mm y con más de 2500 mm promedio anual. En todas estas regiones la temperatura del mes más frío es mayor de 18°C (García, 1988), lo que caracteriza este tipo de clima.

# Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin System: Participation in the Progesterone-Induced Facilitation of Lordosis Behavior in the Ovariectomized Estrogen-Primed Rat

E. CANCHOLA,\*<sup>1</sup> M. RODRÍGUEZ-MEDINA,† H. DUEÑAS-TENTORI,\* E. MERCADO\*  
AND A. ROSADO\*

\*División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Mexico City, Mexico and †Becario Sistema Nacional de Investigadores, ENEP Zaragoza, U.N.A.M. División de Químico Biológicas, Mexico City, Mexico

CANCHOLA, E., M. RODRÍGUEZ-MEDINA, H. DUEÑAS, R. MERCADO AND A. ROSADO. *Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin system: Participation in the progesterone-induced facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen-primed rat.* PHARMACOL BIOCHEM BEHAV 54(2) 403-407, 1996. — We studied the effect some drugs that participate in the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin system have on the progesterone (P) facilitation of lordosis behavior in ovariectomized estradiol (E<sub>2</sub>) primed rats. We injected rats 44 h after E<sub>2</sub> priming with 2 mg P together with various dosages of one of the following compounds: pentobarbital, trifluoperazine (TPZ), promethazine (PMZ), Chlorpromazine (CPZ), haloperidol (HAL), pimozide (PIM), and verapamil (VER). Then 4 h after treatment, animals were tested for sexual behavior, expressed as the lordosis quotient (LQ). All drugs at 4 mg/kg or higher inhibited lordosis, but only HAL, PIM, and VER were active at 1 mg/kg. The maximum level of activity was shown by PIM, although at the dose of 8 mg/kg no statistical differences were found between this compound and TPZ or HAL. Pentobarbital (25 mg/kg) showed no significant difference from saline-treated controls. The activity of the tested drugs on the facilitation of sexual behavior appears to be related to their efficiency as inhibitors of calmodulin (CaM)-dependent phosphodiesterase and as ligands for the Ca<sup>2+</sup>-CaM complex.

Lordosis behavior    Sexual behavior    Rat

LORDOSIS is an estrogen-dependent essential reflex for reproduction in rats and many other mammals. This characteristic sexual behavior is produced as a response to copulatory stimulation by the male (2). It has been shown experimentally that in ovariectomized (Ovx) females, adequate sexual behavior depends on the sequential action of estradiol (E<sub>2</sub>) and progesterone (P) (4). However, despite numerous experiments (36), the intimate brain mechanisms of these steroids on the modulation of sexual behavior are still insufficiently understood. A generalized mechanism of action for estrogens involves an association between estrogen and a cytoplasmic receptor, translocation of this estrogen complex to the nucleus,

initiation of messenger RNA synthesis, and eventual production of new proteins. However, it seems that this increase in protein synthesis is insufficient to induce female sexual behavior (1).

There is more uncertainty concerning the mechanism of action of P (8). As in the case of estrogens, P is generally thought to pass through the plasma membrane and act at the level of the nucleus. However, some experimental results seem to be better explained by the participation of nongenomic mechanisms (8). Recent reports have clearly shown the presence of specific membrane receptors for P in some cells, including hypothalamic (20), oocytes (42), and spermatozoa

<sup>1</sup> Request for reprints should be addressed to E. Canchola, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División C.B.S. Dpto. Biología de la Reproducción. Av. Michoacán y Purísima, México, D.F., México. C.P. 09340.

(44). P binding to these cells induced immediate modifications on the intracellular concentration of free active ions, mainly  $Cl^-$  and  $Ca^{2+}$  (3,44).

Beginning with the pioneering work of Meyerson (28), an increasing number of research papers have approached the study of neural regulation of rodent sexual behavior from the pharmacologic point of view. In effect, our work and that of other groups indicates that the participation of P in lordosis behavior can be mimetized, in  $E_2$ -primed rats, by P- $E_2$  (39), luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) (31), forskolin, cholera toxin, cyclic nucleotides, both cyclic AMP and cyclic GMP (5), norepinephrine (12),  $\alpha$ - and  $\beta$ -receptor agonists (11), and cholinergic agonists such as carbachol (19), and also presumably through muscarinic receptors (37). On the other hand, the sexuality-inducing behavior of P can be inhibited by some antagonist of these reagents (8,36). Reviewing these works, Whalen and Lauber (48) came to the conclusion that because serotonergic, dopaminergic, and noradrenergic agonists and antagonists, as well as cholinergic agonists, all facilitate sexual receptivity, it is possible that drugs from a variety of neurotransmitter categories act through a common nonspecific mechanism, possibly one involving increasing neural levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) (48). On the other hand, most of these active substances share the property of acting, at least partially, through mechanisms modulated by the calcium/CaM system (7).

Calmodulin, a widely distributed  $Ca^{2+}$ -binding protein, participates in the regulation of many of the functions previously ascribed to intracellular  $Ca^{2+}$  (22,27). Among other important biochemical mechanisms related to the induction of sexual behavior, CaM is required in the calcium-dependent phosphorylation of receptors and autoreceptors (36). CaM is also required for the activation of a great number of enzymes, including the rate-limiting step in catecholamine synthesis, tyrosine hydroxylase (TS) (13), adenylate and guanylate cyclases, the  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinases, and so forth. CaM inhibitors behave as important antagonist of neurotransmitter-receptor interactions, including dopaminergic, adrenergic, serotonergic, and muscarinic cholinergic receptors (37,40,47). In addition,  $Ca^{2+}$ -CaM complexes participate in nerve conduction and/or transport (14,33,34) and also as promoters of hormonal and neurotransmitter secretion in a wide variety of cells (7).

On basis of these data, we considered it interesting to study the effects of some inhibitors of the  $Ca^{2+}$ -CaM system on the P-facilitated sexual receptivity of ovariectomized estrogen-primed rats.

#### METHOD

##### Chemicals

Analytic-grade haloperidol, trifluoperazine (TFP), and pimozide were graciously donated by Janssen Pharmaceuticals (Beerse, Belgium). Verapamil was obtained from Knoll Pharmaceutical (Mexico City, Mexico), on its therapeutic parenteral presentation. Estradiol benzoate (EB) and P ( $P_4$ ) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Young, sexually inexperienced Wistar female rats (250  $\pm$  20 g) were used in this study. They were maintained at 23°C under a controlled reverse 14 L : 10 D and fed with Purina chow (BioServ, Frenchtown, NJ) and water ad lib. Ovariectomies were performed under ether anesthesia. Then, 2-3 weeks after ovariectomy, rats were primed with 2  $\mu$ g EB (time 0), and 44 h later, they were injected with 2 mg P and divided into groups of 10 animals each. Immediately after the application

of P, each group received, contralaterally, one of the following treatments (Table 1): saline (controls), sodium pentobarbital (25 mg/kg body wt.), TFP, promethazine (PMZ), chlorpromazine (CPZ), haloperidol (HAL), pimozide (PIM), a verapamil (VER). All injections were given subcutaneous. EB and P were dissolved in sesame oil and injected in a volume of 0.2 ml. The active agents were used at concentration of 2, 4, and 8 mg/kg body wt. and were dissolved and applied the manner previously described (38).

Animals were tested for sexual behavior with experienced males 4 h after the applications of P plus the neuroleptic. Observations were performed under subdued light, always during the dark phase of the life cycle, in circular Plexiglas arenas (53 cm in diam. and 45 cm in height). We allowed vigorous mounts for each female; their receptivity was expressed by their lordosis quotient (LQ), or the number of lordosis per number of mounts. The observer was blinded the pharmacologic treatment of individual females.

To discriminate between sedative and behavioral effect each female was carefully checked immediately before the study of sexual behavior to detect any significant impairment of locomotor and/or postural reflexes. Animals whose reflexes were not considered normal were discarded from a subsequent observations. To further detect the presence of undesired sedation, the lordosis quality (15) was scored on a scale from 0 to 3, representing no lordosis, and light, moderate, and full dorsiflexion, respectively. Only lordosis corresponding to grades 2 and 3 were considered positive. In addition, we also observed the occurrence of precopulatory patterns of behavior on the part of the female: presentin posture, hopping, and darting, in the way proposed by Madlafousek and Hlinák (26).

We performed statistical analysis using a 486DX2 IBM compatible PC and the Microstat II, Ecosoft Inc. (Indianapolis, IN, USA) statistical Package. Data were processed by multivariate analysis of variance (ANOVA) for two factors compound administration and dose. We used 95% confidence for the mean test for post hoc comparison between groups. Fisher's exact tables were used to assess the significance of differences in the proportion of rats showing sexual behavior. Group comparisons were carried out by the Student's *t*-test.

#### RESULTS

Careful observation of the treated animals indicated that, as was previously observed (17), drugs with a low antipsychotic effect, such as promethazine, showed the highest levels of sedation of the tested drugs in the period immediately following the injection. This drug was also the least effective in modifying P-induced lordosis behavior. In addition, pentobarbital had a sedative effect equal to, and frequently more than, any of the anticalmodulin agents tested. Also, the hypnotic effect of pentobarbital was more prolonged, and some of the animals treated with this substance showed mild alterations of postural reflexes at the time of the sexual behavior test. The obtained results show that this mild impairment was not enough to interfere with the occurrence of the lordosis reflex. These findings allowed us to eliminate the role played by the sedative effect of the tested drugs as the main cause for the modifications observed in the sexual behavior. In addition, a balanced pattern of precopulatory activity (26) was generally observed in all animals that showed lordosis behavior.

Table 1 summarizes the results obtained in these experiments. All drugs tested at doses of 4 mg/kg or higher inhibited

TABLE 1  
EFFECT OF SOME COMPOUNDS THAT INHIBIT THE  $Ca^{2+}$ -CaM SYSTEM ON THE  
HOMOTYPIC SEXUAL BEHAVIOR OF OVARIECTOMIZED RATS SEQUENTIALLY TREATED WITH EB AND P

Compound	Control	1 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg	8 mg/kg
Prometazine	0.95 ± 0.08	0.92 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.22 <sup>a,b</sup>	0.55 ± 0.28 <sup>a,b</sup>
Chlorpromazine	1.00 ± 0.00	0.96 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.26 <sup>a,b</sup>	0.26 ± 0.10 <sup>a,b</sup>
Haloperidol	0.92 ± 0.08	0.83 ± 0.06 <sup>a,b</sup>	0.66 ± 0.14 <sup>a,b</sup>	0.23 ± 0.16 <sup>a,b</sup>	0.12 ± 0.05 <sup>a,b</sup>
Trifluoperazine	1.00 ± 0.00	0.93 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.25 <sup>a,b</sup>	0.21 ± 0.07 <sup>a,b</sup>	0.10 ± 0.03 <sup>a,b</sup>
Pimozide	0.95 ± 0.05	0.38 ± 0.07 <sup>a,b</sup>	0.26 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	0.19 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.02 <sup>a,b</sup>
Verapamil	0.97 ± 0.02	0.71 ± 0.13 <sup>a,b</sup>	0.48 ± 0.09 <sup>a,b</sup>	0.34 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.22 ± 0.05 <sup>a,b</sup>
Pentobarbital (25 mg/kg)	0.89 ± 0.10				

Lordosis quotient (mean ± SD).

<sup>a</sup> $p < .05$  compared with the group immediately to the left. Different superscript letters indicate the existence of a statistically significant difference ( $\leq p < .05$ ) between the values on the same column.

lordosis. Only HAL, PIM, and VER were active with the lowest dose used (1 mg/kg). The maximum level of activity was shown by pimozide, although at a dose of 8 mg/kg, no statistical difference was found between this compound and TPZ or HAL. Results obtained by the application of pentobarbital (25 mg/kg) showed no statistically significant difference from the animals treated with saline only (controls).

Table 2 shows a comparison between our data on the effectiveness of the pharmacologic agents tested as inhibitors of P-facilitated sexual behavior and the data previously published by Levin and Weiss (24) on their activity as inhibitors of  $Ca^{2+}$ -CaM-dependent phosphodiesterase activity, and as inhibitors of the CaM-specific binding of calcium ions. The activity of the tested drugs on the facilitation of sexual behavior (as demonstrated by the effects on lordosis) induced by P in Ovx estrogen-primed rats, with the possible exception of chlorpromazine, appeared to be strictly related to their efficiency as inhibitors of CaM-dependent phosphodiesterase and as ligands for the  $Ca^{2+}$ -CaM complex: pimozide was the most active, followed by trifluoperazine, whereas prometazine was only marginally effective. In addition, verapamil, an inhibitor of slow calcium channels, induced effects that were comparable to those elicited by the more effective anticalmodulin drugs.

#### DISCUSSION

A good correlation exists between the effectiveness of the antipsychotics drugs tested as inhibitors of P-facilitated sexual behavior and the activity of these same drugs as inhibitors

of  $Ca^{2+}$ -CaM-dependent phosphodiesterase activity, and as inhibitors of the CaM-specific binding of calcium ions. This correlation validates the possible participation of the  $Ca^{2+}$ -CaM system on the mechanism of action of P as a facilitator of the sexual copulatory responsiveness of the Ovx estrogen-primed rat. This possibility is further sustained by the similar inhibitory activity shown by verapamil, a blocker of the slow  $Ca^{2+}$  channels. In effect, nuclear magnetic resonance spectroscopy has recently shown that  $Ca^{2+}$ -channel blockers (felodipine, nifedipine, diltiazem, prenylamine, etc.) interact with CaM (6,18). These results lead to the possibility that CaM may act as an intracellular site of action for this kind of pharmacologic agent, perhaps even accounting for its major pharmacologic effects (41).

It has been suggested that the central adrenergic transmission system is involved in the steroid induction of lordosis behavior in rodents (36); for example, the administration of norepinephrine, epinephrine, or adrenergic agonists may substitute for P in inducing lordosis in estrogen-primed rodents (12). Many CaM antagonists have great potency as receptor antagonists, including dopaminergic, adrenergic, serotonergic, and muscarinic cholinergic receptors (37,40,47). However, many of the seemingly indirect CaM activities of the drugs tested may be interpreted as their action upon other parameters of the calcium metabolism (40,41).

Protein phosphorylation is known to be involved in the regulation of neuronal function (32,34). At least three distinct classes of well-characterized protein kinases are involved in the phosphorylation of a large number of neuronal proteins: kinase A, kinase C, and CaM-dependent kinase II. The first,

TABLE 2  
EFFECTIVENESS OF PHARMACOLOGIC AGENTS TESTED AS INHIBITORS OF  
P-FACILITATED SEXUAL BEHAVIOR COMPARED WITH THEIR ACTIVITY  
AS INHIBITORS OF THE  $Ca^{2+}$ -CaM BIOCHEMICAL SYSTEM

Agent Tested	ID <sub>50</sub> Inhibition: Activation of Phosphodiesterase ( $\mu$ M)*	Specific Calcium Binding (nMol/mg Protein)*	ID <sub>50</sub> Inhibition: Lordosis Quotient (mg/kg)
Pimozid	7.5	68.7	0.82
Trifluoperazin	10.4	58.3	1.8
Chlorpromazin	42.2	22.7	3.8
Haloperidol	63.0	12.8	2.4
Prometazin	334.0	3.8	10.3

\*Data are calculated from the work of Levin and Weiss (24).

rate-limiting step in the biosynthesis of catecholamines is catalyzed by tyrosine hydroxylase (TH) (47). TH is a mixed-function oxidase whose activity is modulated by reversible phosphorylation (13), and is a substrate for all three kinases mentioned earlier (13,34). However, it is known that  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-dependent events are involved in maintaining basal TH activity in striatal slices (13). Also,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phosphorylation processes mediated by  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-dependent kinase, and/or protein kinase C, are primarily responsible for the *in vivo* and *in situ* activation of TH (34).

Several lines of evidence suggest that the activation of TH following neuroleptic administration might also be due to phosphorylation of the enzyme (13). Therefore, neuroleptic-induced changes in TH activity might reflect the state of equilibrium between phosphorylated and dephosphorylated forms of the enzyme (13,34). In this regard, it was postulated that HAL-activated TH represents a mixture of phosphorylated and nonphosphorylated forms of the enzyme (23). The interpretation of these results is complicated by the possibility that TH may be regulated differently in different systems. For example, phorbol esters increase TH activity in adrenal chromaffin cells and superior cervical ganglion but not in striatal slices (32).

Luteinizing hormone-releasing hormone, like noradrenaline, can mediate the lordosis-facilitating effect of P (11, 12,35), and its release seems to be stimulated by the steroid activity on the  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM system. Progesterone applied *in vivo* to estrogen-primed ovariectomized rats is able to stimulate LHRH release from mediobasal hypothalamus (25). *In vitro* administration of P is able to produce a marked increase in LHRH release by mediobasal hypothalamic slices obtained from adult Ovx rats, provided the animals has received  $\text{E}_2$  before sacrifice (10). It has been shown by changing membrane properties,  $\text{E}_2$  appears selectively and specifically to be involved in the process coupling nerve-ending depolarization and LHRH release (9). As in all other instances of depolarization-induced secretion, enhancement of LHRH release must be  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent. In effect, the omission of  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium or the addition of a  $\text{Ca}^{2+}$ -channel blocker (D600,  $10^{-4}$  M) or a CaM-dependent protein kinase inhibitor (trifluoperazine, 30  $\mu\text{M}$ ) results in a complete cancellation of the stimulator effect of P on LHRH release. When sodium channels were blocked with tetrodotoxin ( $5 \times 10^{-7}$  M), the stimulatory effect of the steroid was completely abolished (10). These results indicate that the secretor response of LHRH to P requires priming with estrogens, is  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent, involves the mediation of CaM and a CaM-dependent kinase system, and may be mediated through a nongenomic process.

In addition to the potential assisting role of P-induced LHRH release on lordosis behavior (31), it is possible that the direct participation of P on the facilitation of sexual behavior may be realized through nongenomic mechanisms similar to those mentioned earlier. Direct membrane recognition of the

steroid (3) would be followed by modifications of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism mediated by CaM. If this is so, we suggest that the delayed response to the facilitating effect of P could be explained by the participation of a complex process involving: a) coupling of recognition sites of the steroid to enzymes and/or receptors directly involved in the regulation of ionic fluxes; and b) the subsequent modification of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent processes. One of these processes may be the  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-dependent phosphorylation of the neurocytoskeleton protein tubulin.

In excitable tissues, changes in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, frequently accompanied by changes in cyclic nucleotides, provide an important mechanism for nerve transmission and signal transduction (3). Among the systems that are  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent, those mediated by calmodulin appear to be particularly important in neuronal function (21). Blockade of axoplasmic transport by the intracranial infusion of colchicine disrupts both estrogenic induction and maintenance of lordotic responsiveness (16,43). It is thus possible to propose that, similarly to the mechanism of action of colchicine, inhibitors of the  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM system disrupt lordotic responsiveness by interfering with cytoskeletal functions, including  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-regulated neurotransmitter turnover and release (7,40-47,49), cytoskeletal dynamics (46,29), synaptic vesicle function (including exocytosis), and synaptic protein phosphorylation (34). The  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM system may also interfere, at least partially, with the fast axoplasmic transport of substances from the medial hypothalamus to the dorsal midbrain, a process that has been proposed to be important for estrogenic action on lordosis (16). Also, inhibition of CaM-dependent protein kinase II blocks the induction of long-term potentiation of synaptic transmission (30,45), and the  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-stimulated cGMP phosphodiesterase plays an important role in the regulation of nitric oxide/cGMP-mediated excitatory signal transduction (50).

Although the results presented here may support the hypothesis that the activity of P on the facilitation of rodent sexual behavior may be realized through nongenomic mechanisms, it has been shown that CaM has some important genetic activities (29,38). Of these, the most crucial is the inhibition of protein synthesis produced by phosphorylation of elongation factor 2, a process that is catalyzed by the CaM-dependent protein kinase III (33). This CaM-related activity must be carefully considered as an important way of regulating protein synthesis, particularly in CaM-rich brain tissues, and therefore, as supporting the possibility that anticalmodulin drugs act by interfering with the genomic protein synthesis-stimulating properties of the steroid hormones.

In summary, our results suggest that modifications to the function of the  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM system may have important effects on the sexual behavior facilitatory activity of P on estrogen-primed rats.

## REFERENCES

1. Barfield, R. J.; Glasser, J. H.; Rubin, B. S.; Etgen, A. M. Behavioral effects of progestin in the brain: A review. *Psychoneuroendocrinology* 9:217-231; 1984.
2. Beach, F. A. Sexual attractiveness, proceptivity and receptivity in female mammals. *Horm. Behav.* 7:105-138; 1976.
3. Berridge, M. J. Cellular control through interactions between cyclic nucleotides and calcium. *Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res.* 17:329-335; 1984.
4. Beyer, C.; Larsson, K. *Endocrine control of sexual behavior*. New York: Raven Press; 1979.
5. Beyer, C.; Canchola, E.; Larsson, K. Facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen primed rat by dibutyryl cAMP. *Physiol. Behav.* 26:249-251; 1981.
6. Boström, S. L.; Jung, B.; Mardh, S.; Forsen, S.; Thulin, E. Interaction of the antihypertensive drug felodipine with calmodulin. *Nature* 292:777-778; 1981.
7. DeLorenzo, R. J. Calcium and calmodulin control of neurotransmitter synthesis and release. In: Marmè, D., ed. *Calcium and cell physiology*. Berlin: Springer-Verlag; 1985:265-284.
8. Delville, Y. Progesterone-facilitated sexual receptivity: A review

- of arguments supporting a nongenomic mechanism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 15:407-414; 1991.
9. Drouva, S. V.; Laplante, E.; Gauron, J. P.; Kordon, C. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on LHRH release from rat mediobasal hypothalamic slices. *Neuroendocrinology* 33:152-157; 1984.
  10. Drouva, S. V.; Laplante, E.; Kordon, C. Progesterone-induced LHRH release in vitro is an estrogen as well as Ca<sup>2+</sup>- and calmodulin-dependent secretory process. *Neuroendocrinology* 40:325-331; 1985.
  11. Fernández-Guasti, A.; Larsson, K.; Beyer, C. Potentiative action of alpha and beta adrenergic receptor stimulation in inducing lordosis behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22:613-617; 1985.
  12. Foreman, M. M.; Moss, R. L. Role of hypothalamic alpha and beta adrenergic receptors in the control of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen primed rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 9:235-241; 1973.
  13. Goldstein, M.; Greene, L. A. Activation of tyrosine hydroxylase by phosphorylation. In: Meltzer, H. Y., ed. *Psychopharmacology: The third generation of progress*. New York: Raven; 1987:75-80.
  14. Greengard, P. Neuronal phosphoproteins: Mediators of signal transduction. *Mol. Neurobiol.* 1:31-120; 1987.
  15. Hardy, D. F.; DeBold, J. F. The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. *Horm. Behav.* 2:237-297; 1971.
  16. Harlan, R. E.; Shivers, B. D.; Kow, L. M.; Pfaff, D. W. Intrahypothalamic colchicine infusion disrupt lordotic responsiveness in estrogen-treated rats. *Brain Res.* 233:153-167; 1982.
  17. Hollister, L. E. *Clinical use of psychotherapeutic drugs*. Springfield, MA: Charles C. Thomas; 1973.
  18. Johnson, J. D. Allosteric interaction among drug-binding sites on calmodulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112:787-793; 1983.
  19. Kaufman, L. S.; Pfaff, D. W.; McEwen, B. S. Cholinergic mechanisms of lordotic behavior in rats. *Physiol. Behav.* 43:507-514; 1988.
  20. Ke, F. C.; Ramirez, V. D. Membrane mechanism mediates P stimulatory effect on LHRH release from superfused rat hypothalamus in vitro. *Neuroendocrinology* 45:514-517; 1987.
  21. Kincaid, R. L.; Balaban, C. D.; Billingsley, M. L. Regional and developmental expression of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase in rat brain. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 25:111-122; 1992.
  22. Klee, C. B.; Vanaman, T. C. Calmodulin. *Adv. Protein Chem.* 35:213-321; 1982.
  23. Lazar, M.; Mefford, I. N.; Barchas, J. D. Tyrosine Hydroxylase Activation. Comparison of in vitro phosphorylation and in vivo administration of Haloperidol. *Biochem. Pharmacol.* 31:2599-2607; 1982.
  24. Levin, R. M.; Weiss, B. Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents on the calcium-dependent activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208:454-459; 1979.
  25. Levin, R. M.; Ramirez, V. D. In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalamus of ovariectomized, steroid primed rats. *Endocrinology* 107:1782-1790; 1980.
  26. Madlafousek, J.; Hlinák, Z. Sexual behavior of female laboratory rat: Inventory, patterning, and measurement. *Behavior* 63:129-174; 1977.
  27. Means, A.; Dedman, J. Calmodulin: An intracellular calcium receptor. *Nature* 285:73-77; 1980.
  28. Meyerson, B. J. Central nervous monoamines and hormone induced estrous behavior in the spayed rat. *Acta Physiol. Scand.* 63:5-32; 1964.
  29. Miller, F. D.; Naus, C. C. G.; Durand, M.; Bloom, F. E.; Milner, R. J. Isoforms of  $\alpha$ -tubulin are differentially regulated during neuronal maturation. *J. Cell Biol.* 105:3065-3073; 1987.
  30. Miller, S. G.; Kennedy, M. B. Regulation of Brain Type II Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase by Autophosphorylation: A Ca<sup>2+</sup>-Triggered Molecular Switch. *Cell* 44:361; 1986.
  31. Moss, R. L.; McCann, S. M. Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. *Science* 181:177-179; 1973.
  32. Nairn, A. C.; Hemmings, H. C., Jr.; Greengard, P. Protein kinases in brain. *Annu. Rev. Biochem.* 54:931-976; 1985.
  33. Nair, A.; Pelfrey, C. Identification of the major Mr. 100 000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2. *J. Biol. Chem.* 262:17299-17303; 1987.
  34. Nestler, E. J.; Greengard, P. Protein phosphorylation and the regulation of neuronal function. In: Siegel, G. J., Agranoff, B. W.; Albers, R. W. and Molinoff, P. B., eds. *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, 4th ed. New York: Raven; 1989:373-398.
  35. Pfaff, D. W. Luteinizing hormone releasing factor (LRF) potentiates lordosis in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science* 182:1148-1149; 1973.
  36. Pfaff, D. W.; Schwartz-Giblin, S.; McCarthy, M. M.; Kow, L. M. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behavior. In: Knobil, E.; Neill, J. D., eds. *The physiology of reproduction*, 2nd ed. New York: Raven; 1994:107-220.
  37. Rainbow, T. C.; Snyder, L.; Berck, D. J.; McEwen, B. S. Correlation of muscarinic receptor induction in the ventromedial hypothalamic nucleus with the activation of feminine sexual behavior by estradiol. *Neuroendocrinology* 39:476-480; 1984.
  38. Rodríguez-Medina, M.; Canchola, E.; Vergara-Onofre, M.; Rusado, A. Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin system: Participation in rat sexual hypothalamic differentiation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 46:697-702; 1993.
  39. Rodríguez-Sierra, J. F.; Komisaruk, B. R. Effect of prostaglandin E<sub>2</sub> and indomethacin on sexual behavior in the female rat. *Hormone Behav.* 9:281-289; 1977.
  40. Roth, R. H.; Wolf, M. E.; Deutch, A. Y. Neurochemistry of midbrain dopamine systems. In: Meltzer, H. Y., ed. *Psychopharmacology: The third generation of progress*. New York: Raven; 1987:81-94.
  41. Roufogalis, B. D. Calmodulin antagonism. In: Marmé, E., ed. *Calcium and cell physiology*. Berlin: Springer-Verlag; 1985:143-169.
  42. Sadler, S. E.; Maller, J. L. Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocytes by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 257:355-361; 1982.
  43. Schwartz, J. H. The transport of substances in nerve cells. *Sci. Am.* 242:152-171; 1980.
  44. Tesarik, J.; Moos, J.; Mendoza, C. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a P receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology* 133:328-335; 1993.
  45. Tsien, R. W.; Schulman, H.; Malinow, R. Peptide inhibitors of PKC and CaMK block induction but not expression of long-term potentiation. In: Nishizuka, Y., Endo, M.; and Tanaka, Ch., eds. *The biology and medicine of signal transduction*. New York: Raven; 1990:101-107.
  46. Van Eldik, L. J.; Watterson, D. M. Calmodulin structure and function. In: Marmé, D., ed. *Calcium and cell physiology*. Berlin: Springer-Verlag; 1985:105-126.
  47. Weiner, N.; Molinoff, P. B. Catecholamines. In: Siegel, G. J., Agranoff, B. W.; Albers, R. W. and Molinoff, P. B., eds. *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*, 4th ed. New York: Raven; 1989:233-251.
  48. Whalen, R. E.; Lauber, A. H. Progesterone substitutes: cGMP mediation. *Neurosci. Behav. Rev.* 10:47-53; 1986.
  49. Woosten, G. F.; Kopin, I. J.; Axelrod, J. Effect of colchicine and vinblastine on axonal transport and transmitter release in sympathetic nerves. *Ann. NY Acad. Sci.* 253:528-534; 1975.
  50. Wu, Z.; Sharma, R. K.; Wang, J. H. Catalytic and regulatory properties of calmodulin-stimulated phosphodiesterase isozymes. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 25:29-43; 1992.

## Inhibidores del sistema calcio-Calmodulina y diferenciación sexual hipotalámica en la rata. Parámetros bioquímicos

ENRIQUE CANCHOLA-MARTÍNEZ,\*\* MARCELA VERGARA-ONOFRE\*,  
MARCO ATONIO RODRÍGUEZ-MEDINA \*, GLORIA MERCADO-SÁNCHEZ, \*

### RESUMEN

Se estudió el efecto de la administración perinatal de algunos fármacos psicotrópicos (haloperidol, penfluridol, trifluoperazina, pimocida y verapamil) sobre algunos parámetros morfológicos y bioquímicos del hipotálamo, en ratas machos y en hembras androgenizadas por la administración de propionato de testosterona a las 72 horas de vida extrauterina. El verapamil indujo el crecimiento hipotalámico tanto en machos como en hembras androgenizadas. Todos los fármacos disminuyeron el peso testicular, siendo más eficaces el haloperidol ( $1.50 \pm 0.49$  g) y la pimocida ( $2.00 \pm 0.11$  g). En las hembras neonatas, la testosterona disminuyó el desarrollo ovárico ( $46.3 \pm 4.5$  vs  $23.1 \pm 2.7$  mg). El haloperidol y la pimocida revirtieron parcialmente dicho efecto mientras que el verapamil fue ineficaz. Las concentraciones de proteínas, DNA y RNA fueron mayores en el hipotálamo de la hembra adulta, tanto normal como tratada, que en el macho (fig. 1). La testosterona disminuyó las concentraciones de las tres macromoléculas al nivel encontrado en los machos; todos los fármacos utilizados revirtieron este efecto. En los machos, todos los tratamientos mostraron tendencia a elevar la concentración de proteínas, DNA y RNA a los niveles encontrados en la hembra adulta; la trifluoperazina, el verapamil y el penfluridol fueron los más eficaces, la pimocida sólo elevó las proteínas y el haloperidol únicamente elevó el DNA.

(Canchola M, E y col.: *Inhibidores del sistema calciocalmodulina y diferenciación sexual hipotalámica en la rata. Parámetros bioquímicos. Ginec Obst Mex 1997; 65:508*).

### SUMMARY

The systemic action of certain psychotropic drugs (haloperidol, penfluridol, trifluoperazine pimozide and verapamil) inhibitors of calcium-calmodulin-system, some biochemical and morphological parameters during the sexual differentiation of hypothalamus in neonatal (72 hours) male and androgenized female rats were studied. The hypothalamic weight in normal adult rats of both sexes not changed ( $39.7 \pm 3.79$  vs  $40.57 \pm 7.60$  mg); however, verapamil increased the hypothalamic weight (table II), haloperidol and pimozide were the most effective ( $1.50 \pm 0.49$  g and  $2.00 \pm 0.11$  g respectively). The testosterone administered to newborn females decreased the ovary development ( $46.3 \pm 4.5$  mg. vs  $23.1 \pm 2.7$  mg), the haloperidol and pimozide partially reverted this effect.

División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Biología de la Reproducción. UAM-Iztapalapa.

México. D.F. C.P. 09340. Correspondencia. E-mail: Cancho@xanum.uam.mx

\*Becario de la Unidad de Investigación. Centro Médico Nacional. Siglo XXI. IMSS.

\*\* Profesor Titular de Tiempo Completo del Departamento de Biología de la Reproducción, UAM-Iztapalapa.

While verapamil was ineffective (table II). The proteins, DNA and RNA concentrations were greater in the hypothalamus of the adult female rat, both normal and under all treatment, than in the male (fig. 1). The testosterone decreased the concentrations of all the macromolecules at the levels found in the adult males (fig. 1); all psychotropic compounds reverted this effect. In the males (fig. 2) all treatments increased the concentrations of the proteins, DNA and RNA to the levels found in the adult female rat; trifluoperazine, verapamil and penfluridol were most effective. The pimozide increased only proteins and haloperidol increased only DNA.

(Canchola M. y col: *Inhibitors of calcium-calmodulin system and hypothalamic sexual differentiation. Biochemical parameters.* Ginec Obst Mex 1997; 65:508).

El desarrollo dimórfico de la conducta sexual y del patrón de secreción de gonadotropinas en los roedores es el resultado de la presencia (masculinización) o ausencia (feminización) de andrógenos (o metabolitos de andrógenos, principalmente estradiol), durante los últimos días de la vida intrauterina y/o los primeros días después del nacimiento.<sup>1</sup>

El hipotálamo, una estructura perteneciente al diencefalo, es el órgano encargado de controlar o regular los procesos reproductivos antes mencionados.<sup>2</sup> En relación con esto, se han encontrado en este órgano importantes diferencias morfológicas en relación al sexo: tamaño de algunos núcleos, número de neuronas, estructura neuronal, volumen neuronal, número y localización de sinapsis.<sup>3</sup>

La importancia del ambiente hormonal para dirigir u organizar el dimorfismo sexual hipotalámico ha sido demostrada por dos tipos de experimentos: a) la castración de ratas machos recién nacidas, «desmasculiniza» o «feminiza» tanto el patrón de secreción de gonadotropinas, como la conducta sexual del animal adulto; y b) la administración de andrógenos a ratas hembras recién nacidas, «masculiniza» o «desfeminiza» tanto el patrón de secreción de gonadotropinas como la conducta sexual del animal adulto.

Se ha propuesto que, por lo menos en los roedores, los andrógenos actúan durante la diferenciación sexual hipotalámica primero «organizando» vías o sustratos nerviosos que serán los responsables del desarrollo neurobioquímico acorde con la maduración posterior de una función sexual adecuada y, posteriormente, en el estado adulto «activando» o regulando las vías o sustratos neuronales previamente «organizados», lo que hace posible la función reproductiva normal.<sup>4</sup> Según esta hipótesis, todos los individuos, sin importar su sexo genético, seguirán un proceso de diferenciación inherentemente femenino, a menos que durante el periodo perinatal existan, en el ambiente hormonal del hipotálamo, concentraciones adecuadas de testosterona o de otras hormonas derivadas de este andrógeno, fundamentalmente estrógenos.<sup>5</sup>

La «masculinización» del hipotálamo, provocada por la administración de testosterona a ratas hembras recién nacidas, se manifiesta en el estado adulto, por alteraciones en el ciclo estral, estro persistente, presentación de altos niveles de conducta sexual heterotípica (conducta sexual no acorde al sexo genético gonadal y somato fenotípico),<sup>6</sup> así como la presencia de ovarios de menor tamaño, anovulatorios y polifoliculares.<sup>7</sup> La inhibición de la «masculinización» del macho, provocada en ratas machos recién nacidas por orquidectomía o por la aplicación de fármacos anti-estrogénicos como el tamoxifeno, se manifiesta en la edad adulta por la ausencia de conducta sexual homotípica, masculina,

y la presentación de altos índices de conducta sexual heterotípica, femenina.

En cuanto al sustrato bioquímico mediante el cual los andrógenos regulan la diferenciación funcional del hipotálamo se conoce sólo parcialmente.<sup>8,9</sup> La participación del sistema calcio-calmodulina (S-Ca<sup>2+</sup>/Cam), en varios de los procesos neurobioquímicos y de neurotransmisión que participan, directa o indirectamente, en el proceso de diferenciación sexual hipotalámica<sup>10</sup> hace interesante investigar la función que esta molécula puede tener sobre los componentes bioquímicos del hipotálamo durante este importante proceso. El S-Ca<sup>2+</sup>/Cam participa, no sólo en la activación de algunas enzimas importantes para el fenómeno de interacción receptor/ligando,<sup>11</sup> sino en eventos como la neurosecreción hormonal,<sup>12</sup> síntesis y transmisión sináptica,<sup>13</sup> acople eléctrico,<sup>14</sup> transporte de calcio,<sup>15</sup> recambio de receptores postsinápticos.<sup>16</sup>

En el presente trabajo presentamos algunos datos que permiten comprobar la acción que tiene la utilización de algunos fármacos psicotrópicos que actúan selectivamente sobre la actividad del S-Ca<sup>2+</sup>/Cam (haloperidol, penfluridol, trifluoperazina, verapamil y pimocida),<sup>17</sup> sobre algunos parámetros morfológicos y bioquímicos que acompañan a la diferenciación sexual del hipotálamo en la rata.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron crías de la cepa Wistar, de ambos sexos. Las madres seleccionadas eran ratas adultas, sanas, multíparas, mantenidas a lo largo de su embarazo en cajas individuales, bajo condiciones estándares de bioterio (12 h de luz por 12 h de oscuridad ciclo normal), sanitización programada y alimentadas con agua y purina *ad libitum*. Para asegurar cuanto fuera posible la hora del nacimiento y consecuentemente la edad al aplicar el tratamiento, el parto de las crías se registró (mediante inspección visual) cada hora dentro de un horario de 6:00 AM a 22:00 PM (los partos registrados fuera de este horario se excluyeron del experimento). Después del parto, madres y crías fueron transferidas a nuestro cuarto de observación, dentro del mismo bioterio de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana.

A las 24 horas de vida extrauterina las crías fueron sexadas de acuerdo al criterio de la distancia anogenital (mayor en los machos por el descenso posterior de los testículos). Después de cualquier manipulación se frotó a las crías con un poco de aceite de cártamo para ocultar el olor del sudor de las manos y evitar el rechazo de la cría. A las 72 horas de vida extrauterina, las crías de ambos sexos fueron tratadas sistémicamente (administración subcutánea) de acuerdo al siguiente esquema:

**Experimento 1 (machos)**

- Grupo I. Control: solución salina 30 ml /rata (7 ratas).  
 Grupo II. 150 mg/rata de haloperidol en 30 ml ( $\pm 10$  ratas).  
 Grupo III. 20 mg/rata de pimocida en 40 ml ( $\pm 10$  ratas).  
 Grupo IV. 190 mg /rata de trifluoperazina en 40 ml (10 ratas).  
 Grupo V. 37.5 mg/rata de verapamil en 15 ml (10 ratas)  
 Grupo VI. 200 mg/rata de penfluridol en 40 ml (10 ratas).

**Experimento 2 (hembras)**

- Grupo I. Control: aceite de cártamo 50 ml (16 ratas).  
 Grupo II. Aceite + haloperidol 150 mg en 30 ml /rata (6 ratas).  
 Grupo III. PT 30 mg/rata en 50 ml aceite más 50 ml salina (16 ratas).  
 Grupo IV. PT 30 mg/rata en 50 ml aceite más verapamil 37.5 mg/rata en 15 ml (4 ratas)  
 Grupo V. PT 30 mg/rata en 50 ml aceite más Haloperidol 150 mg/rata en 30 ml (4 ratas)  
 Grupo VI. PT 30 mg/rata en 50 ml aceite más pimocida 20 mg/rata en 50 ml (11 ratas)

La vía de administración fue subcutánea para todos los tratamientos. En el caso de las hembras se administró el andrógeno o el aceite (en los casos controles) y, 20 minutos después, el fármaco con actividad anticalmodulina o la solución fisiológica. Los sitios de administración para la testosterona y la droga fueron diferentes. Para todos los tratamientos se utilizaron microjeringas.

Los fármacos penfluridol, trifluoperazina y pimocida, fueron generosamente donados por los Laboratorios Janssen Pharm., de Bélgica. Los otros fármacos con actividad anticalmodulina, haloperidol y verapamil, fueron adquiridos en su presentación comercial como solución inyectable y los esteroides de Sigma Chemical Company (Mass, U.S.A.).

Posteriormente a la administración del tratamiento elegido, se formaron camadas de ocho crías (ambos sexos), utilizándose de ser necesario, crías «forasteras», siempre y cuando éstas tuviesen el mismo tratamiento. En el estado adulto (120 días de edad en los machos y 125 en las hembras), se estudió la conducta sexual homotípica (conducta sexual mostrada acorde a su sexo genético, gonadal y somatofenotípico), y heterotípica (conducta sexual mostrada no acorde con su sexo genético, gonadal y somatofenotípico). Posteriormente (135 días de edad en los machos y 140 en las hembras) se pesaron los animales y se les practicó la gonadectomía bilateral bajo anestesia con éter, los ovarios y los testículos fueron pesados por triplicado utilizando una balanza con exactitud de 0.1 mg.

Una vez concluidos los estudios de conducta sexual, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical (previo registro de su peso corporal) y se procedió a disecar el hipotálamo de acuerdo a la técnica propuesta por Vangalla.<sup>18</sup> Los hipotálamos aislados fueron pesados y divididos en mitades para formarse pozas que fueran sus propios controles, los hipotálamos fueron homogeneizados utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem con émbolo de teflón; se extrajeron proteínas y ácidos nucleicos mediante el método propuesto por Munro<sup>19</sup> y se procedió a cuantificarlos:

Proteínas,<sup>20</sup> DNA (ácido desoxirribonucleico),<sup>21</sup> y RNA (ácido ribonucleico).<sup>22</sup>

**RESULTADOS**

Los resultados del presente trabajo pueden agruparse en dos grandes grupos: anatómicos y bioquímicos. Dentro de los primeros encontramos el efecto de las drogas administradas sobre el peso del hipotálamo y de las gónadas. En la Tabla I puede observarse que el peso del hipotálamo entre machos ( $39.7 \pm 3.9$ ) y hembras ( $40.6 \pm 7.6$ ) en condiciones normales no presenta diferencia significativa. Estos datos están completamente de acuerdo con los datos publicados anteriormente por May y Grenell.<sup>23</sup>

Se ha descrito que en las ratas de cinco días de edad el hipotálamo de las hembras ( $17.5 \pm 2$ ) es notablemente menor que el de los machos ( $21.7 \pm 1.6$ ).<sup>24</sup> Esto quiere decir que el crecimiento postnatal de este órgano es mayor en las hembras que en los machos.

También puede observarse que de los tratamientos utilizados en el macho, los animales tratados con verapamil presentaron un hipotálamo de mayor tamaño que el de los machos controles. Este resultado parece ser importante porque el verapamil tuvo un efecto semejante en las hembras tratadas con testosterona (Tabla I)

En el caso del peso testicular (Tabla II), todos los compuestos disminuyeron significativamente el desarrollo testicular, siendo los más eficaces el haloperidol y la pimocida. En este caso es necesario recalcar que la pimocida y el verapamil se administraron a una dosis mucho menor que la utilizada para los fármacos restantes. La aplicación de testosterona a las hembras recién nacidas disminuyó notablemente el desarrollo ovárico (de  $46.3 \pm 4.5$  a  $23.1 \pm 2.7$  mg) (tabla II). Haloperidol y pimocida fueron capaces de revertir parcialmente esta acción de la testosterona, mientras que el verapamil fue ineficaz desde este punto de vista (tabla II). Cabe mencionar que la aplicación de haloperidol solo, sin testosterona, indujo un pequeño, pero significativo, retardo en el crecimiento ovárico.

En cuanto a las determinaciones bioquímicas, la figura 1 muestra que las concentraciones de las tres macromoléculas estudiadas, proteínas, DNA y RNA, son mayores en el hipotálamo de la hembra adulta, tanto en condiciones normales como bajo todos los tratamientos estudiados. La concentración de estas tres macromoléculas en el hipotálamo de las hembras adultas fue disminuida significativamente, llegando a ser semejante al nivel encontrado en los machos normales, por el tratamiento con testosterona (Figura 1)

El tratamiento con los inhibidores del S-Ca<sup>2+</sup>/Cam fue capaz, en la mayoría de los casos, de revertir este efecto inhibitorio de la testosterona, siendo en todos los casos el verapamil el más eficaz y la pimocida la que presentó el menor efecto.

En los machos (Figura 2), el tratamiento con los fármacos mostró tendencia a elevar la concentración de proteínas, DNA y RNA a los niveles encontrados en la hembra adulta. En el caso de los machos, las drogas más eficaces fueron la trifluoperazina, el verapamil y el penfluridol, mientras que la pimocida sólo fue eficaz en el caso de la concentra-

**Tabla I**EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE FÁRMACOS INHIBIDORES DEL S<sub>CA2</sub>+/  
CAM SOBRE EL PESO DEL HIPOTÁLAMO DE RATAS ADULTAS

	n	TRATAMIENTO	Peso hipotalámico (mg)
Machos	7	Salina	39.7 ± 4.0 <sup>a</sup>
	10	Haloperidol	40.1 ± 9.3 <sup>a</sup>
	11	Penfluridol	42.3 ± 9.5 <sup>a</sup>
	10	Pimocida	42.9 ± 7.2 <sup>a</sup>
	10	Trifluoperazina	44.5 ± 9.6 <sup>a,b</sup>
	10	Verapamil	51.6 ± 8.6 <sup>b</sup>
Hembras	16	A	40.6 ± 4.60 <sup>a</sup>
	16	PT	40.9 ± 5.4 <sup>a</sup>
	11	PT + Pimocida	37.1 ± 6.3 <sup>a</sup>
	4	A + Haloperidol	43.8 ± 6.1 <sup>a</sup>
	6	PT + Haloperidol	47.8 ± 2.4 <sup>b</sup>
	4	PT + Verapamil	49.0 ± 1.8 <sup>b</sup>

PT = Propionato de testosterona

A = Aceite

Los datos indican el promedio (la desviación estándar). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los datos del mismo grupo. Anova más prueba de Tukey

**Tabla II**EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE FÁRMACOS  
INHIBIDORES DEL S<sub>CA2</sub>+/  
CAM SOBRE EL PESO GONADAL

	n	Tratamientos	Peso gonadal (mg)
Machos	7	Salina	2.0 ± 0.1
	10	Haloperidol	1.5 ± 0.5
	10	Pimocida	1.6 ± 0.2
	10	Trifluoperazina	1.7 ± 0.1
	11	Penfluridol	1.8 ± 0.1
	10	Verapamil	1.8 ± 0.2
Hembras	16	PT	23.1 ± 2.7
	4	PT+ Verapamil	25.0 ± 2.2
	6	PT+ Haloperidol	29.6 ± 1.1
	11	PT+ Pimocida	30.9 ± 7.1
	4	A + Haloperidol	41.2 ± 2.8
	16	A	46.3 ± 4.5

PT = Propionato de testosterona

A = Aceite

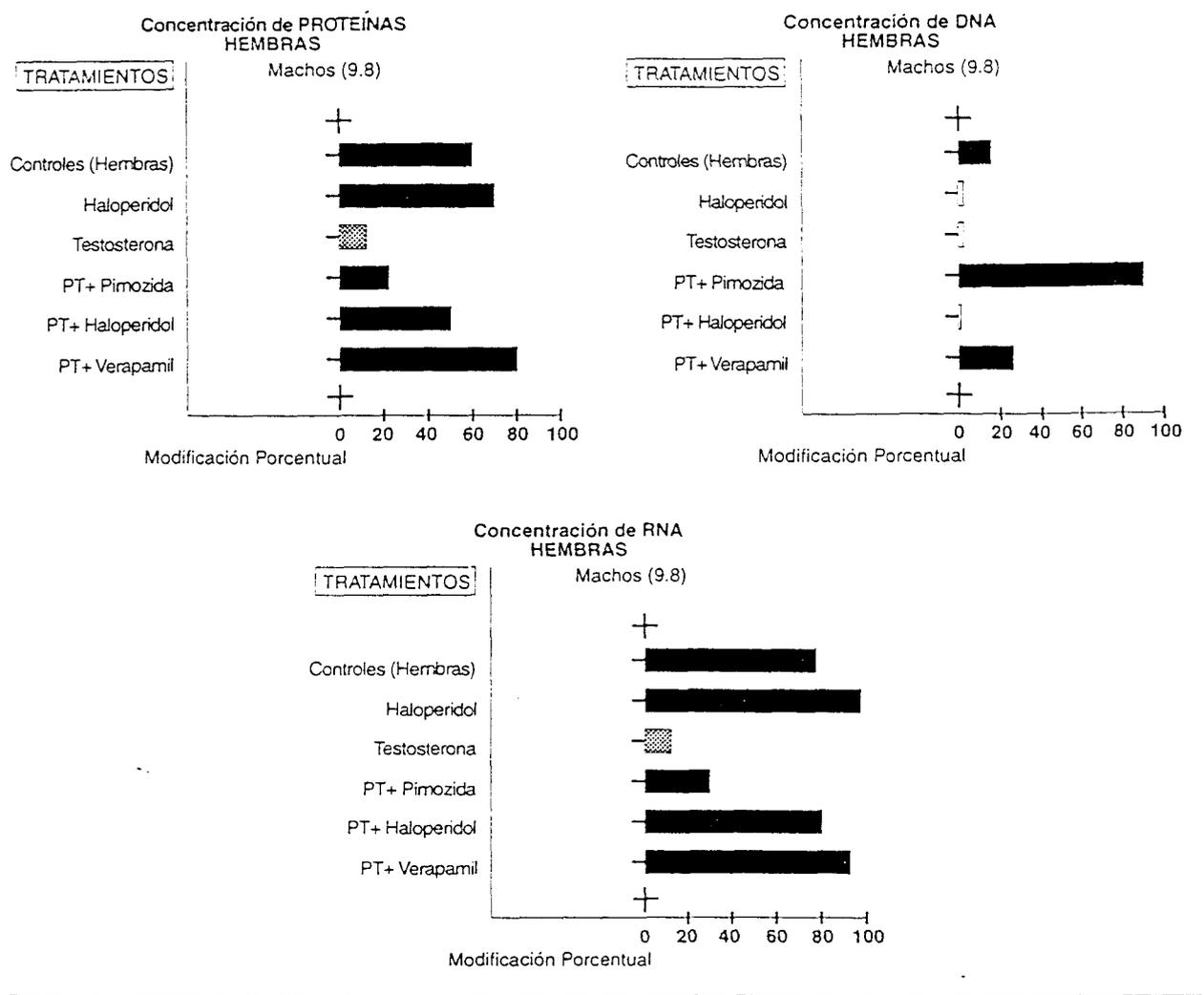
Los datos indican el promedio ± la desviación estándar

ción de proteínas y el haloperidol sólo en el caso de la concentración de DNA.

**COMENTARIO**

Nuestros resultados están de acuerdo con el creciente número de observaciones que indican la presencia de diferencias sexuales en la morfología del sistema nervioso central.<sup>25</sup> Estas diferencias son sobre todo notables en algunas estructuras hipotalámicas.<sup>2</sup> Este fenómeno, que comprende fundamentalmente el área anterior del hipotálamo y el área preóptica, ha dado lugar al concepto de dimorfismo sexual hipotalámico. De particular importancia para noso-

ros son los resultados de carimetría realizados en algunas regiones del hipotálamo<sup>26</sup> demostrando que los núcleos de las neuronas presentes en la región medial del área preóptica y en el núcleo ventromedial del hipotálamo son significativamente más grandes en las hembras que en los machos. Las ratas machos castradas durante el primer día de vida extrauterina demostraron aumento en el volumen nuclear de las neuronas de estas regiones, de manera que alcanzan un tamaño semejante al de las ratas hembras. Por el contrario, las ratas hembras inyectadas con testosterona durante los primeros días de vida mostraron núcleos celulares de tamaño menor, semejante al de los machos. Estos resultados se



**Figura 1.** Cambios de los parámetros bioquímicos, proteínas, DNA y RNA. Se presentan las diferencias porcentuales entre los valores encontrados en las hembras tratadas y el valor promedio obtenido en los machos normales, que está indicado en la parte superior de cada gráfica. Se indican los tratamientos utilizados. Las barras claras indican que los valores encontrados no son significativamente diferentes del valor encontrado en los machos normales. Las barras oscuras, significativamente diferentes de los valores del macho normal, indican que el tratamiento utilizado fue capaz de inhibir el efecto de la aplicación exógena de Propionato de Testosterona.

relacionan con la presencia de una cantidad significativamente mayor de DNA en el hipotálamo de las ratas hembras. Diferencia que es anulada por la inyección de testosterona (Figura 1).

Es particularmente importante resaltar que en los trabajos mencionados anteriormente se estableció la existencia de una correlación positiva entre el volumen nuclear de las neuronas de estos centros hipotalámicos y la frecuencia de presentación de conducta sexual de tipo femenino, lo cual puede también relacionarse con la actividad que algunos de los fármacos utilizados en el presente trabajo tuvieron sobre el desarrollo de la conducta sexual<sup>10</sup> y su efecto sobre la concentración de DNA del hipotálamo (Figuras 1 y 2).

Se ha descrito que las lesiones del septum en la rata son seguidas por un crecimiento acelerado de axones simpáticos que van a inervar el hipocampo.<sup>27</sup> Este crecimiento post-

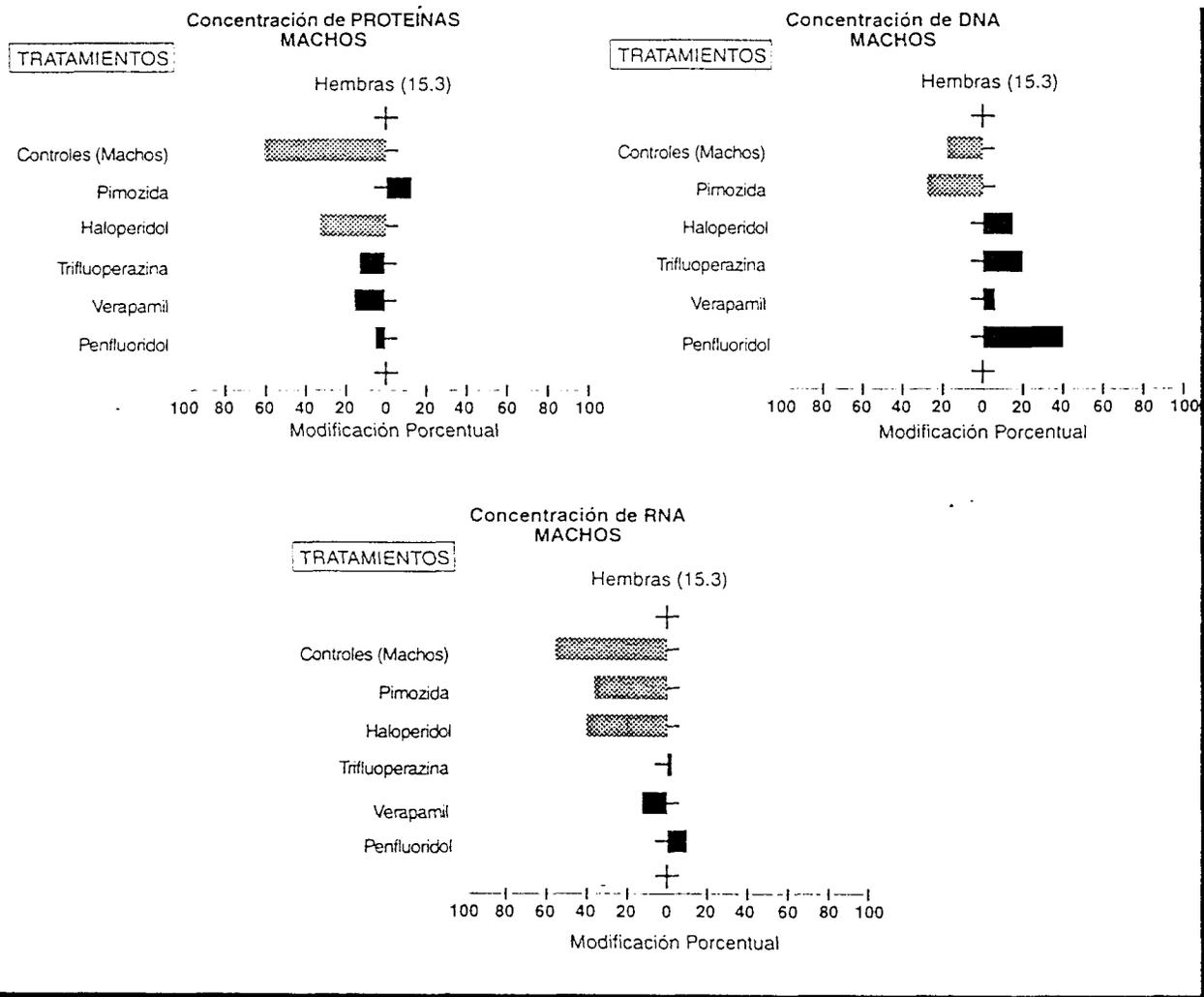
lesión es significativamente más rápido en las hembras que en los machos. Las observaciones cuantitativas de Raisman y Field<sup>28</sup> demostraron que el número de sinapsis en el área preóptica es cerca de dos veces mayor en las hembras que en los machos. La gonadectomía del macho, o la inyección de testosterona a la hembra, en el periodo neonatal, son capaces de invertir estas conductas de crecimiento neuronal.<sup>29</sup> Estos resultados reflejan, posiblemente, la mayor capacidad de síntesis de RNA y proteínas que poseen las hembras adultas (Figura 1), diferencia que es abolida por el tratamiento con testosterona del animal recién nacido. Las figuras 1 y 2, indican que prácticamente todos los fármacos inhibidores del S-Ca<sup>2+</sup>/Cam utilizados, son capaces de interferir con la actividad reguladora de la diferenciación sexual hipotalámica de la testosterona en el animal recién nacido.

**Agradecimientos**

Dr. Adolfo Rosado García por su colaboración en la realización de este trabajo. Investigador Emérito del S.N.I. y Coordinador de la Maestría en Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

**REFERENCIAS**

1. Dorner, G.: *Sexual differentiation of the brain*. Vitam. Horm.(1981) 38; 325-381.
2. Gorsky, R. A.; Harland, H. y Gispén, B.: *Perinatal effects of steroids on brain development and function*. Progress in brain Research (1973) 39; 149-163.
3. Gorski, R. A.: *Sexual differentiation of the brain, possible mechanisms and implications*. Can. J. Physiology. Pharmacol. (1985)63: 577-594.
4. Phoenix, J.: *Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female Guinea pig*. Endocrinol.(1959)65:369-382.
5. McEwen, B., Lieberburg, I., y Chaptal, C. A: *Aromatization: Importance for sexual differentiation of the neonatal rat brain*. Horm Behav.(1977)9:249-263.
6. Sheridan, P. y Zarrow, M.: *The role of the gonadotropins in the development of the cyclicity in the rat*. Endocrinology(1973)92: 500-506.
7. Salaman, D. y Birkett, S.: *Androgen-induced sexual differentiation of the brain is blocked by inhibitors of DNA and RNA synthesis*. Nature (1974)247: 109-112.
8. Stanley, H., y Watts, A.: *Changes in catecholamine concentrations in the hypothalamus and region of the mid brain raphe in male and female rats during postnatal development*. Neurosci. Letters(1985)62: 75-80.
9. Beyer, C.; Pilgrim, C. y Reiser, I.: *Dopamine content and metabolism in mesencephalic and diencephalic cell cultures: sex differences and effects of sex steroids*. J. of Neuroscience.(1991) 11: 1325-1333.
10. Rodríguez-Medina, M., Canchola, E., Vergara, M. y Rosado, A. *Calmodulin system: Participation on rat sexual hypothalamic differentiation*. Pharmacol. Biochem. and Behav. (1993)46:697-701.



**Figura 2.** Se presentan las diferencias porcentuales entre los valores encontrados en los machos tratados y el valor promedio obtenido en las hembras normales, que está indicado en la parte superior de cada gráfica. Se indican los tratamientos utilizados. Las barras claras indican que los valores encontrados no son significativamente diferentes del valor encontrado en los machos normales. Las barras oscuras, significativamente diferentes de los valores del macho normal, indican que el tratamiento utilizado fue capaz de inhibir el efecto de la testosterona endógena sobre los parámetros bioquímicos estudiados.

11. Means A., Tash, J., y Chafouleas, S.: *Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in the eucaryotic cell.* *Physiol. Rev.* (1982)62: 1-9.
12. Douglas, W. y Nemeth E.: *On the calcium receptor activation exocytosis. inhibitory effects of camodulin interacting drugs on rats mast cell.* *J. Physiol.* (1982)38: 229-244.
13. Roufogalis, B.: *Calmodulin its role in synaptic transmission.* *Trends in Biochem. Sci.* (1980)48: 238-241.
14. Less-Miller, J. y Cavaney, J.: *Drugs that block calmodulin activity inhibit cell-to-cell coupling in the epidermis of Tenebrio Molitor.* *J. Membr. Biol.* (1982)69: 233-245.
15. Waisman, D.; Gimble, J., y Goodman, B.: *Studies of the calcium transport mechanism of human erythrocyte in inside out plasma membrane vesicles.* *J. Biol. Chem.* (1981)256: 409-414.
16. De Lorenzo, R.; Freedman, S., y Yohe, W.: *Stimulation of Ca dependent neurotransmitter release and presynaptic nerve terminal protein phosphorylation by calmodulin and a calmodulin like protein isolated from synaptic vesicles.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1979)76: 1838-1842.
17. Levin, J. y Weiss, B.: *Selective binding of antipsychotics and other psychoactive agents on the calcium dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase.* *J. Pharmacol. and Exp. Therap.* (1978)208: 454-459.
18. Vangalla, VR.; Naftolin, F., y Ryan, KJR.: *Aromatization in the central nervous system of rabbits: Effects of castration and hormone treatment.* *Endocrinology.* (1973)92:589-594.
19. Munroe, H.: *Nucleic acids and proteins.* *Methods for Biochem. Analys.* (1966)14: 113-116.
20. Lowry, O.: *Protein Measurement with the folin phenol reagent.* *J. Biol. Chem.* (1951)193: 256-275.
21. Giles, K.: *An improved diphenylamine method for the estimation of desoxiribonucleic acid.* *Nature, London* (1965)206: 931-14.
22. Mejbbaum, W.: *Microestimation of RNA by the cupric ion catalyzed orcinol reaction.* *Annual. Biochem.* (1969)27: 473-483.
23. May, L., y Grenell, R.: *Nucleic acid content of various areas of the rat brain.* *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1956)12: 235-239.
24. Vergara, M.; Canchola, E., y Rosado, A.: *Dimorfismo sexual hipotalámico de la rata en los diferentes estadios de maduración.* *Memorias del Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.* Queretaro, México. C-105, 1988.
25. Maclusky, N. y Naftolin, F.: *Sexual differentiation of the central nervous system.* *Science.* (1981)211: 1294-1303.
26. Staudt, J. y Dörner, G.: *Structural changes in the medial and central amygdala of the male rat, following neonatal castration and androgen treatment.* *Endocrinology* (1976)67:296-300.
27. Loy, R. y Milner, T.: *Sexual dimorphism in extent of axonal sprouting in rat hippocampus.* *Brain Res.* (1980)243: 130-185.
28. Raisman, G., y Field, P.: *Sexual dimorphism in the neuropil preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen.* *Brain Res.* (1973)54: 1-29.
29. Arnold, A y Breedlove, M.: *Organizational and activational effects of sex steroids on brain and behavior; a Reanalysis.* *Horm. and Behav.* (1985)19:469-498.