

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA

“RESTITUCION DE LA CONDUCTA SEXUAL MASCULINA DE
LA RATA MACHO CASTRADA POR LA ADMINISTRACION
DE LOS ESTEROIDES SINTETICOS
7 α -METIL-19-NORTESTOSTERONA Y LEVONORGESTREL”

T E S I S

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL)

P R E S E N T A E L

M . V . Z . R A U L M U N G U I A A C E V E D O

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GABRIELA MORALI DE LA BRENA

MEXICO, D.F.

2002

INDICE

	pag
I RESUMEN	2
II INTRODUCCION	4
III JUSTIFICACION	16
IV HIPOTESIS DE TRABAJO	16
V OBJETIVOS	17
VI MATERIAL Y METODOS	18
Estudio I	20
Estudio II	21
VII RESULTADOS	24
Estudio I	24
Estudio II	28
VIII DISCUSION	39
Estudio I	39
Estudio II	41
IX CONCLUSIONES	45
X REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	46
XI PUBLICACIONES RESULTANTES DE ESTA TESIS	56

I. RESUMEN

La principal hormona involucrada en la expresión de la conducta sexual masculina en mamíferos es la testosterona, aunque diversas evidencias experimentales han demostrado la participación de los estrógenos en la expresión de esta conducta. Se ha descrito que andrógenos y estrógenos ejercen acciones sinérgicas en la restitución de esta conducta en la rata macho castrada y este hecho se ha utilizado experimentalmente para evaluar las acciones androgénicas y/o estrogénicas de diversos compuestos. Por otra parte, se ha demostrado que algunos andrógenos sintéticos como la 7α -metil-19-nortestosterona (MENT), no susceptibles de ser metabolizados a compuestos con actividad estrogénica, son efectivos para restituir la conducta sexual masculina en algunas especies. Algunas progestinas sintéticas como el levonorgestrel (LNG), ejercen además de su propia acción progestacional, efectos androgénicos potentes y efectos estrogénicos muy débiles a través de su metabolismo, que no han sido evaluados en el sistema nervioso central. El objetivo de este trabajo fue evaluar la efectividad de esteroides sintéticos con acciones androgénicas potentes, pero con efectos estrogénicos prácticamente nulos (MENT) o muy débiles (LNG y sus derivados), para restituir la conducta sexual masculina de la rata macho castrada. En el primer estudio se comparó la conducta sexual inducida por la administración de 5, 10 o 100 μg diarios de MENT con la inducida por 200 μg diarios de testosterona (T) y con la mostrada por un grupo de ratas intactas. Al cabo de 28 días de tratamiento se comparó el peso de los órganos sexuales accesorios de las ratas de los diferentes grupos experimentales. En el segundo estudio se investigó el efecto *per se* de la administración del LNG o de sus metabolitos reducidos en los carbonos 3 y 5 ($5\alpha\text{LNG}$, $3\alpha,5\alpha\text{LNG}$ y $3\beta,5\alpha\text{LNG}$), en dosis diarias de 500 o de 1000 μg por 21 días, sobre la restitución de la conducta sexual masculina de grupos de ratas macho castradas, así como el efecto androgénico o el efecto estrogénico de estos compuestos (300 μg diarios) al probar su capacidad para sinergizar con estradiol (E_2 , 5 μg diarios) o con 5α -dihidrotestosterona (DHT, 300 μg diarios), respectivamente. Se evaluó también el efecto de los diferentes tratamientos sobre los pesos de los órganos sexuales accesorios. MENT a las dosis diarias de 100 μg , 10 μg y aún a 5 μg fue efectiva para restituir la conducta sexual incluyendo eyaculación, en la mayor parte de los sujetos (84 a 100%). Los animales castrados que recibieron 10 μg de MENT mostraron un nivel de

conducta sexual similar al presentado por las ratas tratadas con 200 µg de T y al del grupo de ratas intactas, pero mostraron pesos de los órganos sexuales accesorios significativamente menores a los de estos dos grupos. Esto indica que la potencia de MENT sobre la estimulación de la conducta sexual es 20 veces mayor que la de T pero sólo 3 a 4 veces mayor para estimular el crecimiento de los tejidos periféricos. El LNG a la dosis de 1000 pero no de 500 µg diarios, restituyó la expresión de la conducta sexual masculina en un nivel similar al de animales tratados con la misma dosis de testosterona, aunque con un curso temporal más lento, mientras que el 5αLNG estimuló la conducta sexual masculina en un número significativamente menor de los sujetos. Los derivados 3α,5αLNG y 3β,5αLNG estimularon actividad de monta pero no de intromisión ni de eyaculación. La administración de LNG + E₂ activó completamente la actividad de monta y de intromisión, pero la conducta de eyaculación sólo se restituyó en forma parcial. La combinación de 5αLNG + E₂ y las combinaciones de 3α,5αLNG o de 3β,5αLNG + E₂ fueron significativamente menos efectivas, al estimular un número menor de intromisiones y de eyaculaciones. El 3α,5αLNG y el 5αLNG en combinación con DHT restituyeron parcialmente la conducta sexual masculina. El LNG (1000 µg diarios), pero no sus metabolitos, indujo un incremento significativo de los pesos de los órganos sexuales accesorios. Los resultados demostraron que altas dosis de LNG inducen un efecto androgénico conductual potente y que la reducción del anillo A disminuye esta potencia y da lugar a un efecto estrogénico débil. En su conjunto, los resultados de los dos estudios indican que estos compuestos sintéticos, a través de un efecto androgénico potente, fueron capaces, a las dosis utilizadas, de restituir la conducta sexual de las ratas castradas.

II. INTRODUCCION

La conducta sexual de los mamíferos ha sido objeto de numerosos estudios como parte del análisis integral de su conducta (Beach, 1967; Dewsbury, 1979; Hart, 1978; Heimer y Larsson, 1964; Kurtz y Adler, 1973; Larsson, 1956; Larsson, 1979; Meisel y Sachs, 1994; Sachs y Barfield, 1976). El comportamiento sexual es el resultado de una serie de interacciones continuas entre la hembra y el macho con características y secuencias muy particulares en cada especie, estando a menudo constituidas por conductas altamente estereotipadas (Dewsbury, 1979).

Al igual que otras expresiones conductuales, el comportamiento sexual representa la actividad de estructuras particulares en el sistema nervioso central (SNC), sobre las cuales actúan las hormonas gonadales modificando su función.

Este comportamiento es desencadenado en respuesta a un estímulo sexual adecuado, presentando variaciones durante la vida del individuo en función de la edad y la experiencia y es modulado por factores sociales y ambientales (Dahlöf y Larsson, 1978; Dewsbury, 1979; Larsson, 1973; Larsson, 1978; Larsson, 1979; Rosenblatt y Aronson, 1958; Södersten y cols., 1977).

Así como otras funciones reproductivas dependen de las acciones de las hormonas gonadales sobre los diferentes órganos blanco sensibles a ellas, el comportamiento sexual se modifica al variar los niveles de hormonas gonadales circulantes. Como ejemplo, en algunas especies la reproducción se presenta en forma estacional (Saltiel, 1988; Valencia y Bustamante, 1988) y los periodos de quiescencia en la función gonadal están acompañados por la ausencia de comportamiento sexual, manifestándose éste sólo en la estación reproductiva.

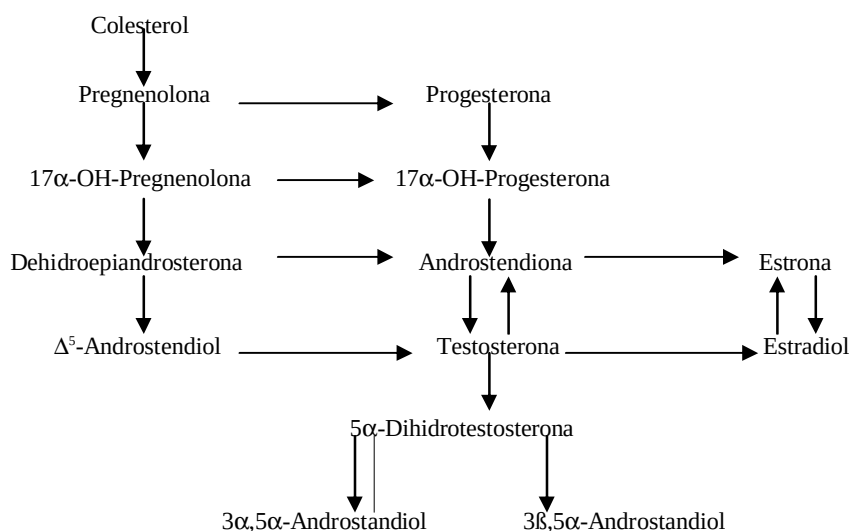
En relación a la conducta sexual masculina y revisando las primeras evidencias experimentales sistemáticas que dieron información acerca de la influencia de las hormonas sobre este comportamiento, en la generalidad de las especies de mamíferos estudiadas, se ha descrito que la castración suprime la actividad sexual del macho y esta actividad puede ser restituida mediante la administración de hormonas testiculares (Beach y Holtz, 1946; Beach y Holtz, 1949; Beach y Pauker, 1949; Grunt y Young, 1953; Michael y Wilson, 1974; Sachs y Barfield, 1976).

Sin embargo, aún cuando se han realizado numerosos estudios para identificar cual o cuales de las hormonas secretadas por el testículo son las hormonas activas para la expresión de la conducta sexual masculina, esto es actualmente todavía un punto en estudio.

Diversos autores han investigado igualmente, la posible participación de las hormonas resultantes del metabolismo extragonadal de los esteroides testiculares para la expresión de este comportamiento (Luttge, 1979; Whalen y cols., 1985), así como la participación de esteroides de origen extragonadal (Bloch y Davidson, 1968; Thompson y cols., 1976) e inclusive productos de origen vegetal o animal que pueden formar parte de la dieta (Santti y cols., 1998).

Los principales esteroides secretados por el testículo son andrógenos y la testosterona (T) es el andrógeno más importante debido a su mayor actividad biológica. La androstendiona y la dehidroepiandrosterona son también secretadas por el testículo, teniendo menor actividad androgénica (Eik-Nes, 1965; Hall, 1988). Estas hormonas son sintetizadas por las células de Leydig. El testículo también secreta estrógenos, que son sintetizados tanto por las células de Leydig como por las células de Sertolli, como ha sido demostrado en cultivo (Dorrington y Armstrong, 1975), pero una parte importante de los estrógenos que se encuentran en el plasma proviene de la conversión extratesticular de esteroides no estrogénicos (Fishman y cols., 1967).

Los esteroides testiculares son productos metabólicos de la conversión enzimática del colesterol mediante una serie de reacciones que se muestran esquemáticamente a continuación:



El colesterol es una molécula con 27 átomos de carbono dispuestos en una estructura llamada ciclo pentano perhidro fenantreno que consta de cuatro anillos: A, B, C y D y una cadena lateral de ocho carbonos. El colesterol es metabolizado por enzimas mitocondriales, lo que resulta en el rompimiento de la unión que existe entre los carbonos 20 y 22 y con ello, en la separación de una parte de la cadena lateral, dando origen a un esteroide de 21 átomos de carbono, la pregnenolona, y a partir de ella, a la progesterona.

En la vía metabólica de las hormonas esteroides, la progesterona es el primer compuesto con actividad biológica y es la molécula a partir de la cual habrán de derivar otras progestinas, los gluco- y mineralocorticoides, también de 21 átomos de carbono, los andrógenos con 19 átomos de carbono y los estrógenos con 18 (Loza-Arredondo y cols., 1988).

Las transformaciones metabólicas estructurales que ocurren en las progestinas determinan cambios en su actividad biológica, pudiendo modificarse sus acciones progestacionales, resultando moléculas con acciones androgénicas y subsecuentemente esteroides con actividad estrogénica.

Los esteroides naturales tienen una vida media corta en la circulación, por lo que se ha estudiado el efecto de la modificación de su estructura en esteroides sintéticos que mantengan su actividad biológica, que tengan una vida media más larga, que puedan ser activos cuando se administran por vía oral, transdérmica o en depósitos subcutáneos y en algunos casos, que tengan una mayor capacidad de interaccionar con los receptores intracelulares de hormonas esteroides (Cravioto y cols., 1997; Brenner, 1982; Goldfien 1991; Garza-Flores y cols, 1991; Pérez-Palacios y cols, 1988). Los esteroides sintéticos, por sus características estructurales, metabólicas y de interacción con los diferentes receptores, han sido una herramienta farmacológica muy útil para el estudio de los mecanismos de acción de los esteroides naturales sobre el SNC en la regulación de la expresión del comportamiento sexual (Baum, 1979; Sodersten y Gustafsson, 1980)

Algunos esteroides sintéticos con actividad progestacional que han sido desarrollados para su uso en la clínica, como la noretisterona (NET), el levonorgestrel (LNG) y el gestodeno, tienen también el núcleo básico del ciclopentanoperhidrofenantreno y son reconocidos como sustrato por las enzimas de las progestinas naturales (Larrea y cols., 1987; Lemus y cols., 1992; Pérez-Palacios y cols, 1981; Lemus y cols., 2001).

La actividad biológica de las hormonas esteroides depende de su estructura molecular y de su interacción con receptores específicos intracelulares que se encuentran en los órganos blanco a los esteroides. Existen receptores para cada tipo de hormona esteroide, por ejemplo, hay receptores para progestinas, receptores para andrógenos, receptores para estrógenos y ya se han descrito subtipos de algunos de ellos (Pérez-Palacios y cols., 1988; Kuiper y cols, 1997).

Dentro de cada grupo de hormonas esteroide (progestinas, andrógenos, estrógenos), los distintos compuestos exhiben diferentes afinidades por el receptor correspondiente y de ello depende, en gran parte, su actividad biológica. Una vez que una hormona esteroide se une a su receptor específico, el complejo esteroide-receptor induce una respuesta biológica determinada (Loza-Arredondo y cols., 1988; Pérez-Palacios y cols, 1988).

En algunos casos una hormona esteroide puede expresar diferentes respuestas al unirse a receptores diferentes. Así por ejemplo, algunos esteroides, tanto naturales como sintéticos, ejercen acciones diferentes a las descritas inicialmente para ellos en relación a su afinidad por los receptores intracelulares; por lo tanto, algunas progestinas sintéticas ejercen colateralmente a su acción progestacional, acciones androgénicas y/o estrogénicas; tal es el caso de la NET, una progestina sintética potente, que ejerce además de sus efectos progestacionales, acciones androgénicas (Garza-Flores y cols., 1986; Grumbach y cols., 1959; Suchowsky y Junkmann, 1961) y estrogénicas (Garza-Flores y cols., 1986; Larrea y cols., 1984; Vilchis y cols., 1986) debido a su metabolismo y a la interacción de sus metabolitos con receptores diferentes a los receptores para progestinas (Chávez y cols., 1985; Pérez-Palacios y cols., 1981; Pérez-Palacios y cols., 1988). Igualmente, algunas acciones de los andrógenos naturales están mediadas por sus metabolitos, mientras que otras dependen de la molécula del andrógeno *per se* (Eik-Nes, 1965; Coffey, 1988).

En la expresión de la conducta sexual masculina de los mamíferos, participan al menos dos componentes: un componente motivacional que impulsa a la búsqueda de la pareja y al inicio de la interacción con ella y un mecanismo consumatorio o de ejecución, que permite la realización de la cópula (Beach, 1967). Se ha reportado la participación adicional de un mecanismo modulador que puede inhibir o facilitar a los dos componentes previamente mencionados, de acuerdo con estímulos ambientales y sociales (Beyer, 1976).

El modelo experimental de la restauración de la conducta sexual masculina en la rata macho castrada, conducta que de acuerdo a numerosas evidencias es regulada por un efecto sinérgico de andrógenos y estrógenos, es útil para la identificación de las diferentes acciones que ejercen los esteroides, ya que, a través de los numerosos estudios que se han realizado con diversos tratamientos hormonales, se ha demostrado que algunos de los parámetros de la conducta sexual masculina, indicativos de la ejecución, son principalmente estimulados por andrógenos en tanto que otros parámetros, indicativos de la motivación, son estimulados en forma óptima bajo la acción de estrógenos (Davidson, 1969).

En la rata macho, las evaluaciones tradicionales de la actividad copulatoria se han basado en la identificación de tres patrones conductuales diferentes: monta, intromisión y eyaculación, así como en la descripción de su curso temporal (Dewsbury, 1979; Larsson, 1956; Larsson, 1979). Una serie copulatoria incluye varias montas y respuestas de intromisión que culminan en una respuesta de eyaculación. Esta es seguida de un período de cuatro a diez minutos, durante el cual el macho permanece refractario a la estimulación sexual. El número y curso temporal de las respuestas copulatorias permite reconocer y cuantificar los siguientes parámetros:

- 1) Latencia de monta: tiempo transcurrido desde la entrada de la hembra al área de observación hasta la primera monta realizada por el macho (monta: acción del macho en que se trepa sobre la grupa de la hembra realizando movimientos pélvicos pero sin lograr la inserción peneana intravaginal);
- 2) Número de montas: las veces que el macho realiza la respuesta de monta hasta la presentación de la eyaculación;
- 3) Latencia de intromisión: tiempo transcurrido desde la entrada de la hembra a la jaula del macho hasta la presentación de la primera respuesta de intromisión (intromisión: monta con las características motoras correspondientes a la inserción peneana intravaginal realizada por el macho, o sea, un movimiento pélvico profundo hacia adelante seguido por la desmonta y separación brusca del macho con dos o tres pasos hacia atrás);
- 4) Número de intromisiones: las veces que el macho realiza la respuesta conductual de intromisión hasta la presentación de la eyaculación;

- 5) Latencia de eyaculación: tiempo transcurrido desde la primera respuesta de intromisión hasta la respuesta de eyaculación (eyaculación: monta con intromisión que culmina en un movimiento pélvico profundo que es sostenido por 1 a 2 segundos y acompañado por la flexión repetida de los cuartos posteriores, movimientos que caracterizan a la expulsión seminal. Estos movimientos son seguidos por la separación de las patas delanteras, terminando con ello la sujeción de la hembra);
- 6) Intervalo posteyaculatorio: tiempo transcurrido desde la respuesta de eyaculación hasta la realización de una nueva respuesta de intromisión.

En la conducta sexual de la rata macho se puede evaluar también el intervalo interintromisión. Con este parámetro, en una serie copulatoria se puede estimar la rapidez con la que se suceden unas respuestas a otras, al relacionar el número de intromisiones observadas con el tiempo transcurrido para su realización (Meisel y Sachs, 1994. Sachs y Barfield, 1976).

Otro parámetro evaluado es la relación entre el número de intromisiones realizadas respecto al número total de montas + las respuestas de intromisión en una serie copulatoria. Esta estimación, denominada proporción de aciertos (Meisel y Sachs, 1994), aporta información sobre la eficiencia en la ejecución de la copulación y se calcula en la siguiente forma:

$$\text{proporción de aciertos} = \frac{\text{No. de intromisiones}}{\text{No. de montas} + \text{No. de intromisiones}}$$

La latencia de monta y el intervalo posteyaculatorio son parámetros que reflejan la motivación y son principalmente estimulados por compuestos con actividad estrogénica; por otra parte, la latencia de intromisión, el número de intromisiones, la proporción de aciertos y la latencia de eyaculación son parámetros de ejecución y son principalmente estimulados por componentes con actividad androgénica (Davidson, 1969; Meisel y Sachs, 1994).

Los diversos estudios sobre la regulación hormonal de la conducta sexual masculina de la rata macho han mostrado que el primer componente afectado por la gonadectomía es la eyaculación; posteriormente se pierde la capacidad para lograr la inserción vaginal del pene

durante las montas y finalmente el animal deja de montar y de realizar actividades precopulatorias como el olfateo genital (Beach y Holtz, 1946; Madlafousek y cols., 1976; Stone, 1939). En la rata macho sexualmente experta, aunque existen diferencias interindividuales respecto al tiempo que tarda en alterarse y finalmente desaparecer cada uno de los componentes de la conducta sexual, la conducta de eyaculación deja de manifestarse en un promedio de 18 días después de la castración (Larsson, 1979) y aproximadamente a los 3 meses después de la cirugía el animal no muestra ya interés por la hembra ni realiza montas (Larsson, 1979; Meisel y Sachs, 1994).

Los efectos de la castración sobre la actividad sexual pueden revertirse mediante la administración exógena de testosterona (Beach y Holz, 1946; Beach y Holz, 1949; Stone, 1939) que es el principal andrógeno producido por el testículo (Hall, 1988), sugiriendo que la disminución y subsecuente eliminación de la conducta sexual que resultan de la castración, se deben principalmente a la falta de esta hormona androgénica.

Cuando se inicia la administración de un tratamiento hormonal una vez que la actividad sexual ha desaparecido por completo después de la castración, un estímulo hormonal adecuado es capaz de restablecer la conducta sexual del individuo a los niveles de actividad que presentaría estando intacto. Los tratamientos con dosis subóptimas de testosterona o con otras hormonas menos androgénicas, restablecen solo parcialmente la conducta sexual (Beyer y cols., 1973; Larsson, 1979; Whalen y cols., 1985), lo cual puede manifestarse con alteraciones en algunos parámetros indicativos de ejecución o de motivación (Meisel y Sachs, 1994).

La testosterona puede biotransformarse a diversos metabolitos y éstos han sido implicados en el mecanismo de acción de testosterona sobre el SNC. Por la acción de la enzima 5α -reductasa, la testosterona se puede metabolizar a 5α -dihidrotestosterona (DHT), hormona que es biológicamente muy activa en la hipófisis para la regulación de la secreción de gonadotrofinas (Martini, 1982), en músculos dependientes de andrógenos para su crecimiento y función (Vida, 1960) y en tejidos del tracto reproductor masculino cuyas características anatomofuncionales son estimuladas por este metabolito (Bruchowsky y Wilson, 1968; Coffey, 1988; Wilson y Glyona, 1970). Por otra parte, la testosterona puede biotransformarse a E_2 por la actividad del sistema enzimático de aromatasas (Hall, 1988; Loza-Arredondo y cols., 1988). Aún cuando la DHT ejerce una actividad biológica periférica

muy importante en los órganos sensibles a andrógenos, en general es poco efectiva para estimular la actividad sexual de los sujetos, pero esta restitución no es comparable a la que se presenta al administrar testosterona (Davidson y cols., 1971; Feder, 1971; MacDonald y cols., 1970; Whalen y Luttge, 1971).

MacDonald y cols. (1970) compararon inicialmente el efecto de la testosterona y de la DHT para inducir conducta sexual en ratas macho castradas y posteriormente Beyer y cols (1973), compararon el efecto de diez andrógenos naturales, observando que solamente aquellos que se pueden aromatizar, o sea, que se pueden convertir a estrógenos, son efectivos para inducir la expresión del comportamiento sexual después de la castración en ratas macho, en tanto que los andrógenos 5α y 5β reducidos no estimularon la conducta sexual aún cuando los primeros fueron muy potentes para estimular respuestas androgénicas en tejidos periféricos. Esto sugirió que la 5α reducción de los andrógenos no es suficiente para ejercer su acción sobre las estructuras neurales relacionadas con la expresión de la actividad sexual en la rata macho. A la vez, estos dos estudios sugirieron la participación importante de la aromatización en el mecanismo de acción de la testosterona sobre la actividad sexual masculina de la rata macho.

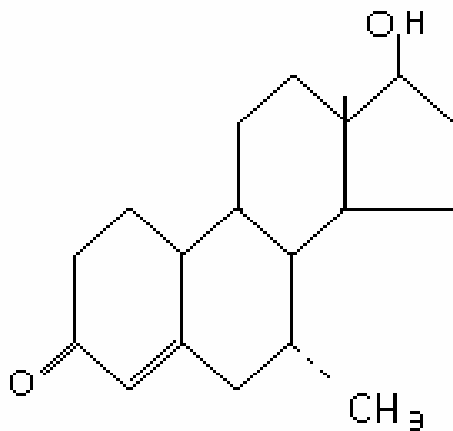
Varias evidencias han apoyado la teoría de la aromatización, o sea, la participación de estrógenos en el mecanismo de acción de la testosterona para la expresión del comportamiento sexual masculino, no solo de mamíferos sino también de otros grupos zoológicos (Alexandre y Balthazart, 1986; Luttge, 1979; Whalen y cols., 1985). Así por ejemplo, se ha demostrado de que en las zonas del SNC implicadas en la expresión de este comportamiento, hay actividad de aromatasas (Naftolin y cols., 1975). En estas zonas del SNC se ha identificado al E_2 como metabolito después de la administración de testosterona (McEwen, 1976). Estas zonas captan selectivamente tanto testosterona como E_2 (McEwen y cols., 1979). La administración de estrógenos a ratas macho castradas es capaz de restituir la actividad sexual de los individuos aún cuando se requieren dosis relativamente elevadas (50 μ g diarios) de esta hormona (Davidson, 1969; Sodersten, 1973). La administración de bloqueadores de aromatasas interfiere con la estimulación de la conducta sexual inducida por el propionato de testosterona (PT) en la rata macho castrada (Beyer y cols., 1976; Morali y cols., 1977) y esta inhibición se revierte al administrar simultáneamente benzoato de E_2

(BE), indicando que la inhibición de la aromatización de los andrógenos impidió la expresión de la conducta sexual masculina (Moralí y cols., 1977).

Por otro lado, la participación de ambos metabolitos de la testosterona, DHT y E₂ en forma sinérgica para la expresión de la conducta sexual masculina, ha sido demostrada en varias especies, especialmente en la rata (Baum y Vreeburg, 1973; Feder y cols., 1974; Larsson y cols. 1973a; Larsson y cols, 1973b). Así con la idea inicial de que el E₂ estimulara a nivel del SNC la motivación sexual pero que no fuera totalmente efectivo para restituir la conducta copulatoria por su falta de acciones androgénicas periféricas, se realizaron estudios en los que se administró simultáneamente E₂ y DHT y se observó que la combinación de estos dos esteroides daba como resultado la restitución total de la conducta sexual masculina en dosis que, por sí solas, solo estimulaban en forma parcial la conducta sexual (Baum y Vreeburg, 1973; Feder y cols. 1974; Larsson y cols, 1973a; 1973b). Posteriormente, se demostró que la acción sinérgica de estas dos hormonas ocurre en el SNC, ya que la DHT se forma en el tejido cerebral a partir de testosterona (Martini, 1982) y la implantación intracerebral de DHT es capaz de restituir la conducta sexual cuando se administra en forma simultánea con E₂ por vía sistémica (Baum y cols., 1982). Los mecanismos celulares por medio de los cuales se ejerce este sinergismo no han sido esclarecidas. Sin embargo, recientemente se ha postulado que, en condiciones fisiológicas, la expresión de la conducta sexual masculina en la rata está mediada por la interacción de la testosterona con los receptores intracelulares de andrógenos. Esta idea fue demostrada por McGinnis y Dreifuss (1989) en un estudio en el que encontraron que la administración de testosterona en dosis suficientes para interactuar con los receptores androgénicos, restituía la actividad sexual en forma comparable a la de las ratas intactas; en cambio, la administración de E₂ de DHT o de la combinación de ambos, en dosis suficientes para interaccionar con los receptores respectivos, no era suficiente para restituir la conducta sexual completa, requiriéndose para ello, dosis más altas, que estos autores consideran como no fisiológicas.

El andrógeno sintético 7 α -metil-19-nortestosterona (MENT) ofrece una herramienta farmacológica adecuada para explorar esta posibilidad. Este esteroide sintético es captado con alta afinidad por los receptores de andrógenos en la próstata de la rata (Liao y cols., 1973), es un esteroide efectivo en la regulación de la liberación de gonadotrofinas (en particular LH) (Kumar y cols., 1992) y ejerce acciones androgénicas moderadas en tejidos

sexuales accesorios debido a que no se 5α reduce (Agarwal y Monder, 1988). Esto hace que la actividad biológica de MENT no se amplifique en los órganos periféricos, como ocurre en cambio con la actividad de T (Kumar y cols., 1992). Se ha sugerido que este andrógeno sintético puede ser útil como terapia hormonal de reemplazo en humanos que así lo requieran, o con fines anticonceptivos en el varón (Sundaram y cols, 1993). Efectivamente, en un estudio realizado en un número pequeño de pacientes, se demostró que MENT ejerce efectos androgénicos a dosis menores que las de testosterona (Anderson y cols, 1999). Por otra parte, se ha descrito recientemente que MENT presenta una muy baja afinidad de unión relativa por los receptores de estrógenos (0.03 %) en comparación con el estradiol (100%) y que carece de efectos estrogénicos de acuerdo a varios parámetros estudiados (Beri y cols., 1998).



7 α -METIL-19-NORTESTOSTERONA

Por otro lado, la NET que ha sido utilizada comúnmente como una progestina con fines anticonceptivos, ejerce también algunas acciones androgénicas y estrogénicas. Por ejemplo, induce un crecimiento parcial de tejidos andrógeno-dependientes, como la próstata ventral y las vesículas seminales en la rata macho castrada (Moralí y cols, 1990), e induce virilización en fetos femeninos de madres tratadas con este esteroide durante la gestación (Grumbach y cols, 1959, Suchowsky y Junkmann, 1961). También NET estimula el crecimiento uterino de la rata ovariectomizada, e induce en la hipófisis de la rata la síntesis de receptores de progesterona estrógeno-dependientes (Vilchis y cols, 1986). Todas estas acciones son mediadas a través de los productos de su conversión metabólica reducidos en el

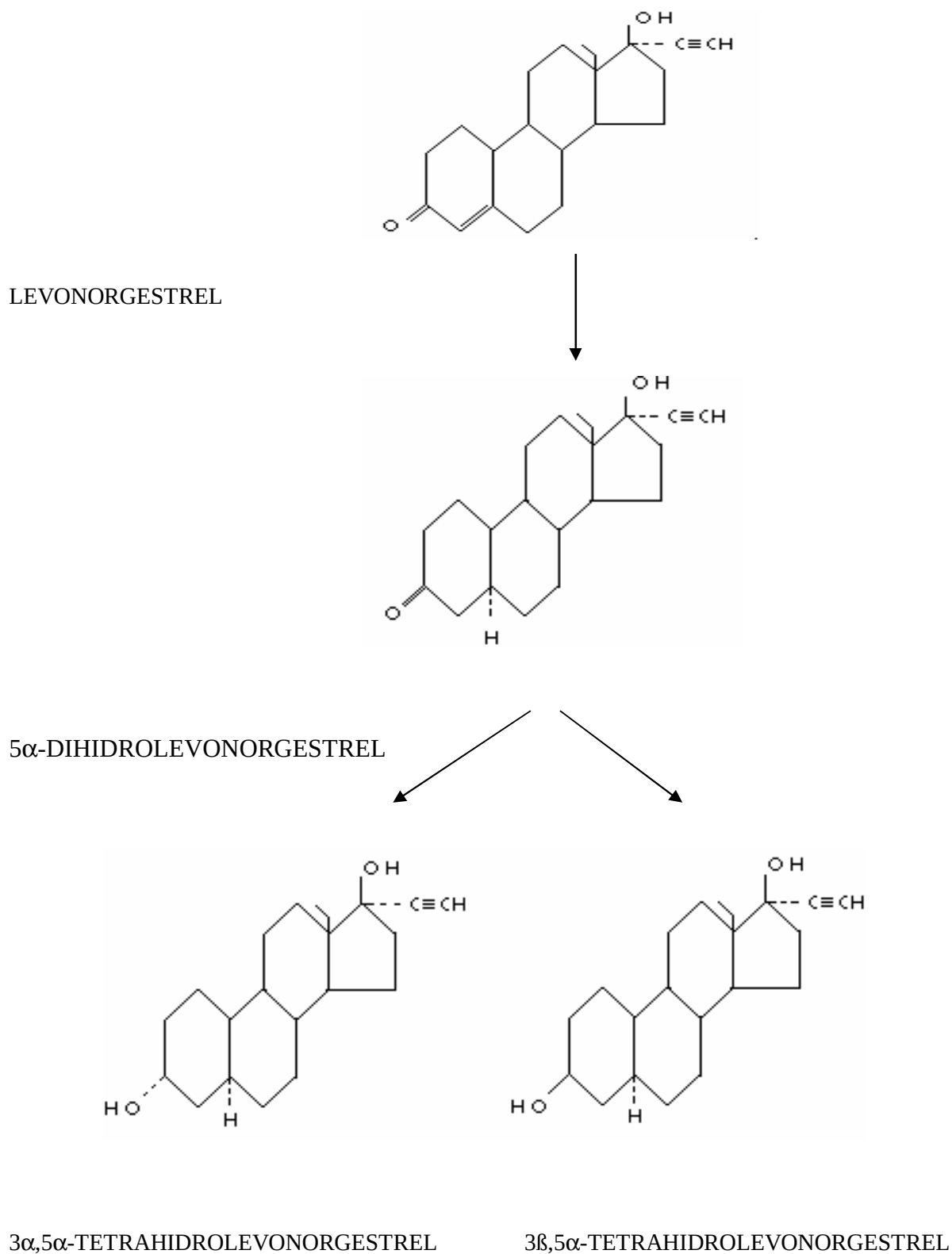
anillo A. Así, se ha demostrado que NET tiene una alta afinidad por el receptor de progesterona y una menor afinidad por el receptor de andrógenos; la 5 α -dihidronoretisterona (5 α NET) interacciona con el receptor de andrógenos, en tanto que el tetrahydro derivado 3 β ,5 α -tetrahydro NET y en menor proporción el 3 α ,5 α -tetrahydro NET (3 β ,5 α NET; 3 α ,5 α NET) muestran alta afinidad por el receptor de estrógenos, siendo capaces de iniciar respuestas celulares estrógeno-dependientes (Chávez y cols, 1985).

En el modelo experimental de la rata macho castrada se ha comprobado que la NET ejerce acciones androgénicas importantes sobre el comportamiento sexual y estas acciones se complementan con acciones estrogénicas resultantes de su biotransformación al derivado 3 β ,5 α -reducido (Moralí y cols, 1990).

Otras progestinas sintéticas, como el LNG, ejercen también diversos efectos hormonales; en algunos sistemas biológicos se demostró que el LNG ejercía efectos androgénicos más potentes que NET (Barranco y Jones, 1974; Batzer, 1986; Dash y cols., 1988; Nikkilä y cols., 1983). Se ha demostrado que estos efectos son ejercidos tanto por el LNG como por su derivado 5 α reducido, 5 α -dihidrolevonorgestrel (5 α LNG), producto de la reducción enzimática, los cuales interaccionan con relativa alta afinidad con el receptor de andrógenos, en forma similar a la descrita para NET.

Por otra parte, otros estudios realizados demostraron que el LNG no ejercía efectos estrogénicos (Bowers y cols, 1958; Schwartz y Hammerstein, 1974) y de hecho no se encontró una interacción significativa del LNG ni de sus metabolitos 5 α -, 3 α 5 α -, o 3 β 5 α -reducidos, con el receptor de estrógenos (RE) aislado del útero de ratas inmaduras (Lemus y cols, 1992). Sin embargo, en un estudio reciente se demostró que los metabolitos tetrahydro reducidos de LNG interaccionan con el RE con una afinidad de unión relativa baja pero son capaces, en dosis altas, de transactivar un sistema de levaduras dependiente de estrógenos cotransfectado con el gene del RE humano y elementos de respuesta a estrógenos unidos a un vector reportero del gen de la β -galactosidasa (Santillán y cols, 2001). Este es un sistema que, comparativamente con los tejidos sensibles a estrógenos, presentes en mamíferos, es capaz de identificar acciones estrogénicas muy bajas, permitiendo evaluar potencias relativas. Para el caso del 3 β LNG, en este sistema la potencia es 750 veces menor que la del estradiol, en tanto que la del 3 α LNG es todavía 2.1 veces menor (Santillán y cols, 2001).

No se ha investigado la magnitud de los posibles efectos androgénicos y/o estrogénicos de estos compuestos sobre el SNC.



III. JUSTIFICACION

El posible efecto que MENT ejerza sobre la restauración del comportamiento sexual de la rata macho castrada, aportará evidencias en cuanto a la efectividad de un andrógeno que no se aromatiza *in vivo*, que presenta una muy baja afinidad de unión relativa por los receptores de estrógenos y que carece de efectos estrogénicos, lo que representa un modelo experimental adecuado para evaluar la posible acción de andrógenos sobre el comportamiento sexual de la rata. Por otra parte, aportará evidencias en cuanto a la efectividad de la estructura Δ^4 -3 cetona vs la 5α reducción en el estudio del mecanismo de acción de los andrógenos sobre la expresión de este comportamiento (Estudio I).

En virtud de que se desconocen los diferentes efectos de tipo hormonal del LNG y de sus metabolitos sobre el SNC, es importante investigar las posibles acciones androgénicas y/o estrogénicas de los derivados reducidos en el anillo A del LNG y su capacidad para sinergizar con estradiol o con DHT, en la restitución de la conducta sexual de la rata macho castrada (Estudio II).

IV. HIPOTESIS DE TRABAJO

HIPOTESIS GENERAL

La administración de esteroides sintéticos con acciones androgénicas potentes y efectos estrogénicos prácticamente nulos (MENT) o muy débiles (LNG y sus derivados) es efectiva para restituir la conducta sexual masculina de la rata macho castrada.

HIPOTESIS PARTICULARES

El andrógeno sintético 7α -metil-19-nortestosterona, compuesto que no interacciona con los receptores de estrógenos y que por su estructura química está impedido para aromatizarse, ejerce acciones en el SNC capaces de restituir la conducta sexual masculina de la rata macho castrada.

El andrógeno sintético 7α -metil-19-nortestosterona ejerce acciones androgénicas periféricas que se manifiestan al estimular el crecimiento de los órganos sexuales accesorios de la rata macho castrada.

El levonorgestrel y sus metabolitos reducidos en los carbonos 3 y 5, *per se*, son capaces de restituir la conducta sexual masculina de la rata macho castrada.

El levonorgestrel y sus metabolitos reducidos en los carbonos 3 y 5 ejercen acciones androgénicas que se manifiestan por su efectividad para la restitución de la conducta sexual masculina de la rata macho castrada al sinergizar con estradiol.

Los metabolitos $3\alpha,5\alpha$ y $3\beta,5\alpha$ -reducidos del LNG ejercen acciones estrogénicas que se manifiestan por su efectividad para la restitución de la conducta sexual masculina de la rata macho castrada al sinergizar con 5α -dihidrotestosterona.

El levonorgestrel y sus metabolitos reducidos en los carbonos 3 y 5 ejercen acciones androgénicas periféricas que se manifiestan al estimular el crecimiento de los órganos sexuales accesorios de la rata macho castrada.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la efectividad de esteroides sintéticos con acciones androgénicas potentes y efectos estrogénicos prácticamente nulos (MENT) o muy débiles (LNG y sus derivados) para restituir la conducta sexual masculina de la rata macho castrada.

OBJETIVOS PARTICULARES

Investigar las acciones de la 7α -metil-19-nortestosterona para restituir la actividad copulatoria masculina de la rata macho castrada.

Investigar los efectos androgénicos periféricos de la 7α -metil-19-nortestosterona sobre el crecimiento de los órganos sexuales accesorios de la rata macho castrada.

Investigar las acciones *per se* del levonorgestrel y sus metabolitos reducidos en los carbonos 3 y 5, para restituir la actividad copulatoria masculina de la rata macho castrada.

Investigar las acciones androgénicas del levonorgestrel y sus metabolitos reducidos en los carbonos 3 y 5, en su capacidad para sinergizar con estradiol para restituir la actividad copulatoria masculina de la rata macho castrada.

Investigar las acciones estrogénicas del levonorgestrel y sus metabolitos reducidos en los carbonos 3 y 5, en su capacidad para sinergizar con 5 α -dihidrotestosterona para restituir la actividad copulatoria masculina de la rata macho castrada.

Investigar los efectos androgénicos periféricos del levonorgestrel y sus metabolitos reducidos en los carbonos 3 y 5, sobre el crecimiento de los órganos sexuales accesorios de la rata macho castrada.

VI. MATERIAL Y METODOS

Se presentan en esta sección los procedimientos que fueron comunes a los dos estudios realizados, en cuanto al manejo de los animales de experimentación, a las evaluaciones de la conducta y al análisis estadístico de los resultados. Los procedimientos particulares de cada uno de los estudios, se presentan en sus secciones correspondientes.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas éticas establecidas para el manejo de animales de experimentación, aprobadas por la Comisión de Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Animales de experimentación.

Los animales utilizados fueron ratas macho adultas de 80 a 90 días de edad (260-290 g de peso corporal) de la cepa Wistar, provenientes del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Las ratas se mantuvieron en jaulas colectivas de acrílico en grupos de 6 animales por jaula, con libre acceso a agua y alimento y con ciclos de iluminación invertidos de 14 h luz: 10 h de obscuridad, quedando comprendido el período de luz de las 18:30 h a las 8:30 h.

Los animales tuvieron por lo menos dos semanas de adaptación al ciclo de iluminación y a las condiciones del bioterio. Después de este período se evaluó su conducta sexual en tres pruebas con intervalos de 3 días entre cada una de ellas, seleccionándose para incluirse en los grupos experimentales aquellos animales que presentaron eyaculaciones en por lo menos 2 de estas pruebas.

Los animales seleccionados se castraron bajo anestesia con éter, a través de una incisión en el escroto, por lo menos 90 días antes de iniciar los tratamientos.

Transcurrido este tiempo, los animales se colocaron en jaulas individuales y se verificó que ya no mostraran actividad sexual en 2 pruebas de 15 min. cada una, con tres días de intervalo entre una y otra. Una vez comprobada la ausencia de actividad copulatoria, los animales se asignaron al azar a los diferentes grupos experimentales para el inicio de los tratamientos.

Evaluación de la conducta sexual.

Las pruebas se realizaron durante la fase oscura del ciclo, iluminando el área con luz roja de baja intensidad. Cada rata se colocó en una jaula de observación de Plexiglas (60x60x40 cm) y con el piso cubierto por aserrín. Después de un período de adaptación de 5 min, se introdujo en el área una hembra receptiva. Las hembras utilizadas como estímulo, recibieron 5 µg de BE tres veces por semana y 500 µg de progesterona 4 h antes de la prueba.

La conducta sexual de los animales se evaluó siguiendo los procedimientos establecidos (Beyer y cols, 1973), Larsson, 1979; Morali y cols, 1977; 1990; 1994; Meisel y Sachs, 1994), a través del análisis de los siguientes parámetros:

- 1) latencia de monta
- 2) número de montas
- 3) latencia de intromisión
- 4) número de intromisiones
- 5) latencia de eyaculación
- 6) intervalo posteyaculatorio
- 7) intervalo interintromisión
- 8) proporción de aciertos.

Cada prueba se terminó al cumplirse una de las siguientes condiciones: a) 15 minutos después de la entrada de la hembra al área de observación si el macho no realizó ninguna respuesta de intromisión en este tiempo; b) 30 minutos después de la primera respuesta de intromisión si el macho no presentó la respuesta de eyaculación en ese período; c) al presentarse la primera respuesta de intromisión después de la respuesta de eyaculación; d) 30 min después de la respuesta de eyaculación si no se presentó una nueva respuesta de intromisión. Estas condiciones de prueba se han establecido con base en observaciones

previas de la incidencia de respuestas en la rata macho y corresponden a las utilizadas en la generalidad de los estudios (Beach y Holtz, 1946; Beach y Holtz, 1949; Beyer y cols, 1973; Davidson, 1969; Dewsbury, 1979; Larsson, 1979; Meisel y Sachs, 1994; Sachs y Barfield, 1976; Whalen y cols, 1985).

Durante los tratamientos experimentales se evaluó la conducta de los animales dos veces por semana. Después de completar la última prueba, los animales fueron sacrificados por una sobreexposición a éter y se disecaron las vesículas seminales y la próstata ventral, pesándose hasta una aproximación de décimas de miligramo.

Análisis Estadístico.

Las proporciones de animales con actividad y de pruebas en las que los animales fueron activos, se compararon entre los grupos con la prueba exacta de Fisher y la de chi-cuadrada (χ^2) respectivamente.

El número de respuestas, sus latencias y la proporción de aciertos se compararon entre los grupos utilizando la prueba “t” de Student o la prueba “U” de Mann-Whitney, de acuerdo a la distribución de los datos.

El peso de los órganos sexuales accesorios se evaluó con la prueba “t” de Student.

Una $p < 0.05$ se consideró significativa (Siegel, 1972; Montgomery, 1991).

Estudio I.- Efecto del acetato de 7 α -metil-19-nortestosterona sobre la restitución de la conducta sexual de la rata macho castrada.

Animales de experimentación.

Los sujetos utilizados fueron 45 ratas macho castradas que fueron sometidas a los procedimientos mencionados previamente en la sección de Material y Métodos y un grupo adicional de seis ratas intactas de la misma edad que los animales castrados, el cual sirvió como grupo control positivo.

Esteroides

Se utilizaron acetato de 7 α -metil-19-nortestosterona proporcionada por el Dr. Wayne C. Bardin (Population Council, N.Y, EEUU) y acetato de testosterona, comprado en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU).

Diseño experimental

Los esteroides se disolvieron en moleculol (2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina), (Pharmatec, Inc., Alachua, FL, EEUU), disuelto al 30% en agua esteril bidestilada y se administraron en forma continua durante 28 días, utilizando bombas miniosmóticas Alzet, Modelo 2002 (Alzo Corp., Palo Alto, CA, EEUU). Las bombas se llenaron, bajo condiciones estériles, con las soluciones de los esteroides preparados en las concentraciones requeridas de acuerdo a las dosis que se fueran a administrar y se implantaron subcutáneamente en la región interescapular de los animales. El volumen contenido en cada bomba es liberado en forma continua y constante por 14 días. Al inicio del estudio se implantó a cada animal una bomba y al cabo de 14 días fue retirada y reemplazada por una nueva, completando así el periodo de estudio de 28 días.

Los animales se asignaron al azar a uno de los siguientes grupos experimentales:

Grupo 1: MENT, 100 μ g al día (n=11)

Grupo 2: MENT, 10 μ g al día (n=10)

Grupo 3: MENT, 5 μ g al día (n=6)

Grupo 4: T, 200 μ g al día (n=10)

Grupo 5: vehículo (control negativo) (n=8)

Grupo 6: animales intactos no tratados (control positivo) (n=6)

Estudio II. Efecto del levonorgestrel y de sus metabolitos reducidos en el anillo A, sobre la restitución de la conducta sexual de la rata macho castrada.

Animales de experimentación.

Los animales utilizados fueron 154 ratas macho castradas que fueron sometidas a los procedimientos mencionados previamente en la sección de Material y Métodos.

Esteroides.

Se utilizaron T, DHT y E₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, EEUU). El LNG fue proporcionado amablemente por Schering Mexicana, S.A. de C.V. (México) y los derivados 5 α LNG, 3 α LNG y 3 β LNG fueron sintetizados en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM, México. El 5 α LNG se sintetizó a partir de LNG mediante reducción con litio-amoniaco, se cristalizó de acetato de etilo-hexano y se purificó por cromatografía FLASH (Still y cols., 1978); el 3 α LNG fue preparado mediante la reducción del 5 α LNG con L-selectride bajo condiciones anhidras (Brown y Krifhnamurthy, 1972); se obtuvo una mezcla de los derivados reducidos 3 α y 3 β LNG (98 y 2% respectivamente). La síntesis del 3 β LNG se realizó a partir del 5 α LNG mediante su reducción por borohidruro de sodio (Bowers y cols., 1958). Los alcoholes epiméricos resultantes fueron separados por cromatografía FLASH utilizando el sistema acetato de etilo-hexano (3:7). La pureza química del LNG y sus derivados se determinaron por su punto de fusión, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectro de absorción en infrarrojo y resonancia magnética nuclear-H. Las constantes físicas y espectroscópicas de los derivados del LNG reducidos en el anillo A han sido previamente descritas (Lemus et al, 1992).

Diseño Experimental

La T y la DHT se disolvieron en un pequeño volumen de diclorometano y una vez disueltos se agregó el volumen requerido de vehículo (aceite de maíz), evaporando después completamente el diclorometano en un baño de agua a 60°C, bajo corriente de nitrógeno. El LNG y sus derivados se disolvieron en un pequeño volumen de alcohol etílico absoluto correspondiente al 10% del volumen final requerido para su administración y una vez disueltos se agregó el volumen requerido de vehículo (aceite de maíz). Las dosis diarias se inyectaron subcutáneamente en un volumen de 0.2 a 0.4 ml por 21 días que duró el estudio.

Para evaluar la capacidad de los compuestos per se para restituir la conducta sexual de la rata macho castrada se administraron diariamente los siguientes compuestos:

T, 500 μ g (n=9)

LNG, 500 μ g (n= 8)

5 α LNG, 500 μ g (n=8)

3 α LNG, 500 μ g (n=8)

3 β LNG, 500 μ g (n=8)
T, 1000 μ g (n=10)
LNG, 1000 μ g (n=7)
5 α LNG, 1000 μ g (n=8)
3 α LNG, 1000 μ g (n=10)
3 β LNG, 1000 μ g (n=7)
Vehículo, (n=10)

Se evaluó la actividad androgénica del LNG y de sus derivados mediante su capacidad para sinergizar con E₂, administrando diariamente los siguientes compuestos:

DHT, 300 μ g + E₂, 5 μ g (n=8)
LNG, 300 μ g + E₂, 5 μ g (n=7)
5 α LNG, 300 μ g + E₂, 5 μ g (n=8)
3 α LNG, 300 μ g + E₂, 5 μ g (n=7)
3 β LNG, 300 μ g + E₂, 5 μ g (n=7)
Vehículo + E₂, 5 μ g (n=10)

Se evaluó la posible actividad estrogénica del LNG y de sus derivados mediante su capacidad para sinergizar con DHT administrando diariamente los siguientes compuestos:

E₂, 5 μ g + DHT, 300 μ g (n=8)
LNG, 300 μ g + DHT, 300 μ g (n=8)
5 α LNG, 300 μ g + DHT, 300 μ g (n=8)
3 α LNG, 300 μ g + DHT, 300 μ g (n=8)
3 β LNG, 300 μ g + DHT, 300 μ g (n=8)
Vehículo + DHT, 300 μ g (n=12)

El grupo que recibió tratamiento con 300 μ g diarios de DHT + 5 μ g diarios de E₂ en estos dos esquemas experimentales, sirvió como control positivo para la evaluación de las acciones androgénicas y estrogénicas respectivamente, de los compuestos.

Las dosis utilizadas en este estudio se seleccionaron con base en estudios previos en los que se utilizaron andrógenos naturales (Moralí y cols., 1994) o progestinas sintéticas (Moralí y cols., 1990) que exhibieron efectos androgénicos o estrogénicos al ser administrados en esquemas de dosis similares.

VII. RESULTADOS

Estudio I.

La administración de MENT a las ratas castradas que ya no mostraban actividad sexual espontánea, luego de 90 días de la cirugía, restituyó la conducta sexual en forma dependiente de la dosis. MENT a las dosis diarias de 100 µg, 10 µg y aún a 5 µg fue efectiva para restituir la conducta de monta, de intromisión y de eyaculación, en la mayor parte de los sujetos (84 a 100%). Los animales castrados que recibieron 200 µg de T como controles, mostraron un nivel de conducta sexual idéntico al presentado por el grupo de ratas intactas de la misma edad no tratadas (Tabla, 1 Fig. 1), indicando que 200 µg al día del andrógeno natural, fue una dosis de reemplazo adecuada.

La incidencia de conducta de monta, de intromisión y de eyaculación en los animales tratados con 100 µg diarios de MENT, fue idéntica a la presentada tanto por los animales tratados con 200 µg de T, como por los animales intactos no tratados, como lo indican las proporciones de pruebas con actividad (Tabla 1).

TABLA 1. PARAMETROS DE LA ACTIVIDAD SEXUAL MOSTRADA POR RATAS MACHO INTACTAS Y POR RATAS CASTRADAS SOMETIDAS A LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

	Intactos no tratados (n=6)	Testosterona 200 µg/día (n=10)	MENT 100 µg/día (n=11)	MENT 10 µg/día (n=10)	MENT 5 µg/día (n=6)	Vehículo (n=8)
% Ss con Monta	100	100	100	100	100	38***°
% Ss con Intromisión	100	100	100	100	100	25***°°
% Ss con Eyaculación	100	100	100	90	84	0***°°°
% Pruebas con Monta	93	100	97	100	79**	20***°°°°
% Pruebas con Intromisión	90	98	95	91	63***°	5***°°°°
% Pruebas con Eyaculación	87	94	92	75**	40***°°°°	0***°°°°
Interv Inter Introm (min) ^a	1.41±0.11	0.90±0.05	0.53±0.03***°	1.31±0.07*	2.18±0.25*	6.22±3.78***°°
Proporción de Aciertos ^a	0.54±0.02	0.57±0.02	0.68±0.01***°	0.52±0.01	0.37±0.02***°	0.25±0.13***°
Latencia de Monta (min) ^a	1.02±0.30	0.76±0.34	0.53±0.28	0.55±0.21	3.43±0.47**	7.78±2.12*
Latencia de Introm (min) ^a	3.94±1.23*	1.11±0.42°	0.87±0.32°	1.04±0.30°°	4.44±0.73**	6.93±1.33***°°
Latencia de Eyac (min) ^a	9.00±1.94	8.92±1.44	4.66±0.75***°	8.77±1.40	17.95±3.94***°	-
Intervalo Post Eyac (min) ^a	6.20±0.95	7.05±0.38	5.57±0.37*	7.35±0.33	10.34±0.67***°°°	-

* p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001 comparadas con el grupo tratado con T, 200 µg

° p<0.05 °° p<0,01 °°° p<0.001 comparadas con el grupo de machos intactos no tratados

^a promedio ± EE

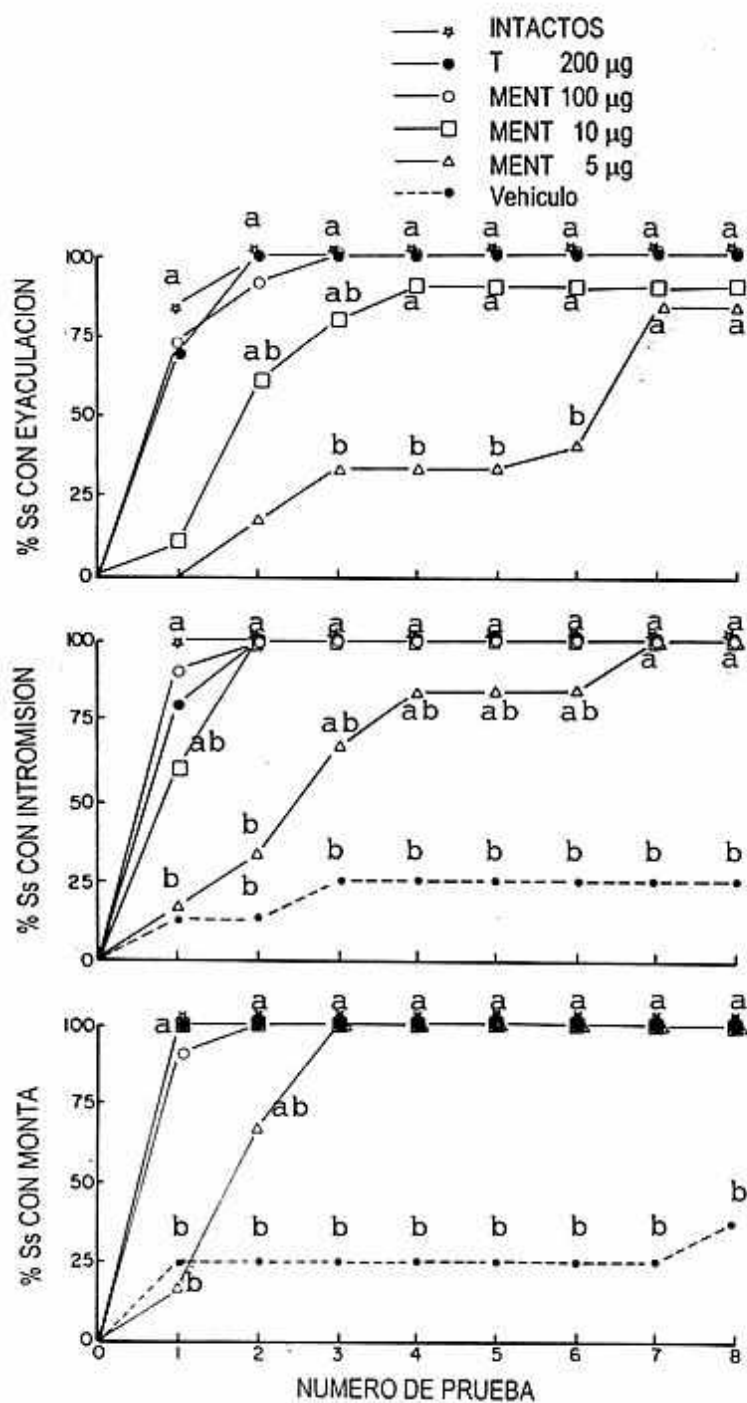


Fig. 1. Porcentajes acumulativos de ratas castradas que mostraron conducta de monta, de intromisión y de eyaculación durante cuatro semanas de tratamiento con acetato de testosterona (T) 200 µg/día, acetato de 7α-metil-19-nortestosterona (MENT) 100, 10 o 5 µg/día o con vehículo. Un grupo de ratas intactas, no tratadas sirvió como control. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

Resultados similares se observan en los Ss tratados con 10 µg diarios de MENT, aún cuando la presentación de conducta de eyaculación fue tardía en relación a la del grupo tratado con T y a la del grupo control intacto (Fig. 1). Una dosis menor de MENT (5 µg al día) fue menos efectiva.

El análisis detallado de los parámetros de la actividad sexual mostró nuevamente que los efectos de MENT sobre la conducta sexual fueron dependientes de la dosis. Se obtuvo una restitución completa de la conducta sexual de los animales castrados, a niveles de actividad similares a los de las ratas intactas, con 10 µg diarios de MENT, como lo muestran los intervalos interintromisión, las proporciones de aciertos y las latencias de monta y de eyaculación (Tabla 1). Aún más, las latencias de intromisión en estos Ss bajo tratamiento con MENT (10 µg al día) fueron menores que las de los animales intactos de la misma edad, indicando una mejor ejecución copulatoria. Los animales tratados con 10 µg diarios de MENT mostraron parámetros de actividad sexual también comparables a los del grupo tratado con T (200 µg al día). La administración de MENT a la dosis de 100 µg diarios resultó ser un estímulo más efectivo que el de 200 µg diarios de T; de este modo, los animales que recibieron esta dosis de MENT mostraron intervalos interintromisión y latencias de eyaculación significativamente más cortos y proporciones de aciertos significativamente mayores que los presentados por los Ss tratados con T e incluso por los animales intactos no tratados. La administración de MENT a la dosis de 5 µg diarios restituyó en forma completa la conducta sexual de los animales castrados; sin embargo, la ejecución de su actividad copulatoria fue significativamente más lenta que la de los Ss intactos y que la de los animales castrados tratados ya sea con T o con mayores dosis de MENT como lo indican las latencias de respuesta y los intervalos interintromisión (Tabla 1).

El efecto de la administración de MENT sobre los pesos de la próstata ventral y de las vesículas seminales en los grupos experimentales fue también dependiente de las dosis como se muestra en la Fig. 2. Los pesos de estos tejidos en los sujetos tratados con 100 y con 10 µg de MENT fueron mayores ($p < 0.001$) que los de los animales castrados que fueron tratados con el vehículo. El tratamiento con 100 µg diarios de MENT indujo un mayor aumento en el peso de la próstata ventral y en el de las vesículas seminales que el inducido por 200 µg diarios de T, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. De

hecho, el peso de la próstata ventral de los sujetos tratados diariamente con 100 μg de MENT fue similar al de los sujetos intactos no tratados pero el peso de las vesículas seminales fue menor ($p < 0.001$). A la dosis de 10 μg diarios, MENT indujo un menor aumento en el peso de la próstata ventral ($p < 0.001$) y de las vesículas seminales ($p < 0.01$) que el inducido por 200 μg de T y que el inducido por 100 μg diarios de MENT ($p < 0.001$) y esos pesos fueron también menores ($p < 0.001$) que los de los tejidos de los animales intactos.

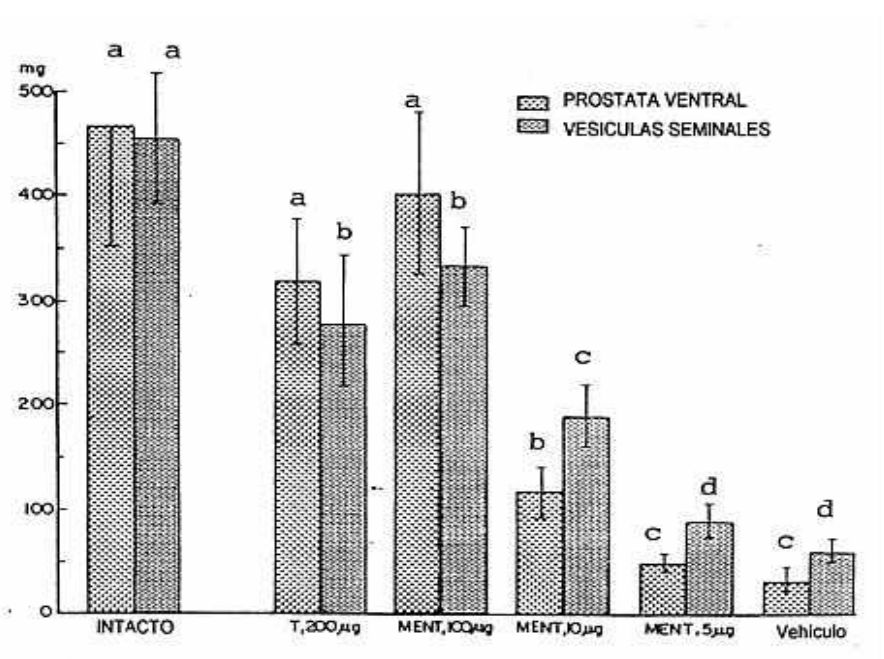


Fig. 2. Efecto de cuatro semanas de tratamiento con acetato de testosterona (T) (200 $\mu\text{g}/\text{día}$), acetato de 19-nor-7- α -metil-19-nortestosterona (MENT) (100, 10 o 5 $\mu\text{g}/\text{día}$) o vehículo sobre el peso de los órganos sexuales accesorios, comparado con el peso de los órganos sexuales accesorios de un grupo de ratas intactas (Promedio $\pm$ DE). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

El análisis de los efectos dosis-respuesta de MENT en comparación con los efectos de T, mediante el programa Allfit (De Lean y cols., 1977) indicó que MENT fue tres o cuatro veces más potente que T para restituir los pesos de los órganos sexuales accesorios, mientras que fue 20 veces más potente que T en cuanto a la restitución de la conducta sexual.

Estudio II.

Efecto de la administración de LNG o de sus metabolitos reducidos.

La mayor parte de los sujetos tratados diariamente con 500 µg de LNG o de sus metabolitos 5α reducidos presentaron la actividad de monta (63 a 88% de los sujetos). Sin embargo, sólo 38 a 63% de los sujetos mostraron conducta de intromisión y estos tratamientos prácticamente no estimularon la conducta de eyaculación, que solamente se presentó en uno de los animales tratados con 5αLNG (Fig. 3; Tabla 2).

TABLA 2. PARAMETROS DE LA ACTIVIDAD SEXUAL MOSTRADA POR LAS RATAS MACHO CASTRADAS, TRATADAS CON LNG O SUS METABOLITOS (500 µg/día).

	Testosterona 500µg/día (n=9)	LNG 500µg/día (n=8)	5αLNG 500µg/día (n=8)	3αLNG 500µg/día (n=8)	3βLNG 500µg/día (n=8)	Vehículo 0.2 ml (n=10)
% Ss con Monta	100	63	88	88	88	80
% Ss con Intromisión	89*	38°	63	0°°°	38°	30°
% Ss con Eyaculación	89***	0°°°	13°°	0°°°	0°°°	0°°°
% Pruebas con Monta	82***	19°°°	48*°°°°	44*°°°°	56*°°°°°	23°°°
% Pruebas con Intromisión	70***	6°°°	15°°°	0°°°	8°°°	4°°°
% Pruebas con Eyaculación	61***	0°°°	2°°°	0°°°	0°°°	0°°°
Interv. Inter Introm.(min) ^a	.18 ± 0.2***	7.3 ± 3.3°°°	5.2 ± 0.6*°°°	-	16.6 ± 6.3°°	12.5±2.5°°°
Proporción de aciertos ^a	0.60 ± 0.05***	0.28 ± 0.07°	0.20 ± 0.03°°°	-	0.11 ± 0.06°°°	0.12±0.03°°°
Latencia de Monta (min) ^a	.2 ± 0.5*	6.9 ± 0.4°°	7.3 ± 0.1°°	7.4 ± 0.1°°	6.4 ± 0.8°°	7.9 ± 1.7°
Latencia de Introm. (min) ^a	2.9 ± 0.7*	8.3 ± 2.1°	7.4 ± 1.9°	-	9.2 ± 4.2°	8.2±3.1°
Latencia de Eyac. (min) ^a	14.1 ± 1.7	-	22.9°	-	-	-
Intervalo Posteyac. (min) ^a	7.7 ± 0.2	-	18.2°	-	-	-

^a Promedio ± EE de las últimas dos pruebas conductuales.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, comparados con el grupo tratado con vehículo.

° p<0.05, °° p<0.01, °°° p<0.001, comparados con el grupo tratado con Testosterona.

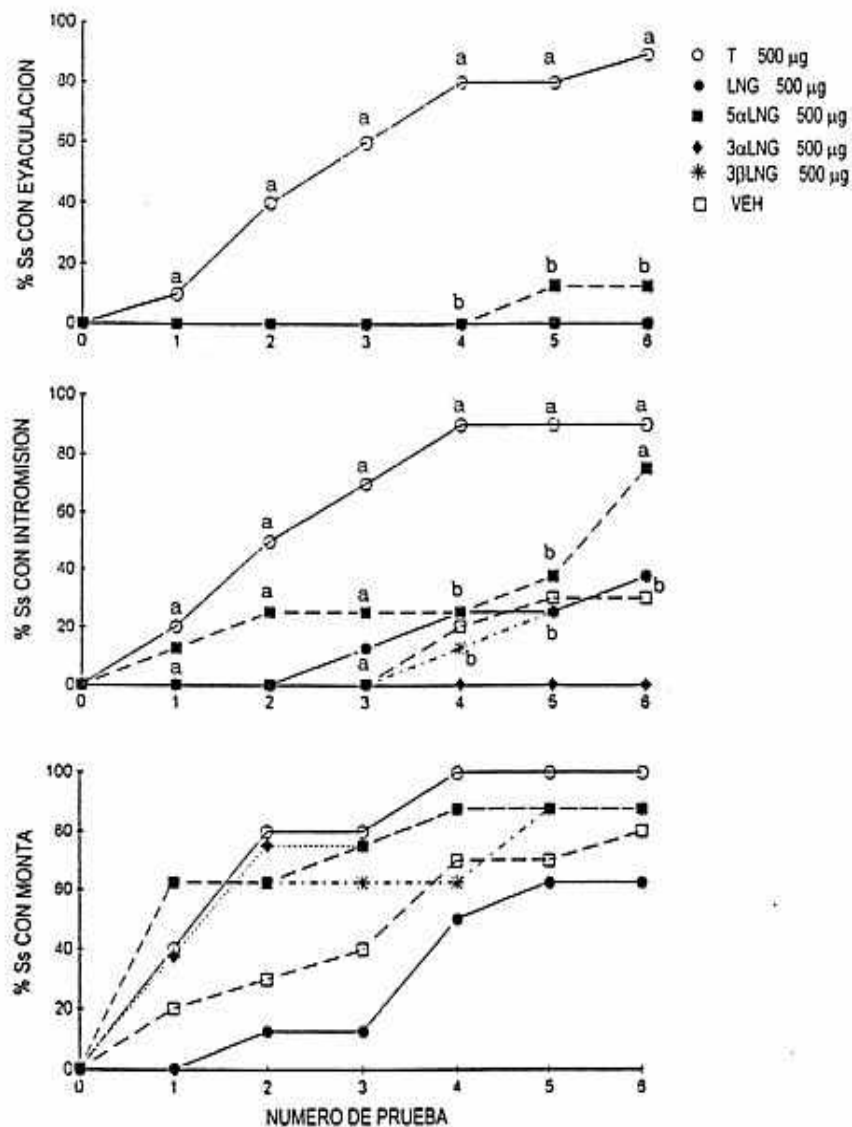


Fig. 3. Efectos conductuales intrínsecos del levonorgestrel (LNG) y de sus metabolitos 5α-reducidos. Los resultados se presentan como porcentajes acumulativos de ratas macho castradas que mostraron conducta de monta, de intromisión y de eyaculación durante los 21 días de tratamiento con estos compuestos (500 µg/día). Ratas macho castradas, tratadas con testosterona (T, 500 µg/día) o con vehículo (VEH), sirvieron como controles positivo y negativo respectivamente. A la dosis empleada, ni el LNG ni sus metabolitos restituyeron la conducta de eyaculación. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

En forma similar, la actividad de monta se presentó en aproximadamente la mitad de las pruebas realizadas, a excepción del grupo tratado con LNG, que sólo mostró esta conducta en 9 de 48 pruebas (19%). La conducta de intromisión se presentó en un número muy escaso de las pruebas realizadas y sólo en una prueba bajo tratamiento con 5 α LNG hubo conducta de eyaculación.

Los parámetros conductuales revelaron en general un efecto muy escaso de todos los tratamientos en comparación con el grupo tratado con T (Tabla 2).

Al administrar una dosis mayor de LNG o de sus metabolitos (1000 μ g/día), se encontraron diferencias altamente significativas entre los grupos ($p < 0.01$) en cuanto a la incidencia y al número de respuestas así como a su curso temporal (Fig. 4, Tabla 3).

El tratamiento con LNG restituyó la conducta copulatoria en todas las ratas castradas. Todos los sujetos presentaron conducta de monta y 6 de los 7 (86%) presentaron intromisiones y conducta de eyaculación, aunque con un retardo a través del periodo de tratamiento (Fig. 4). El retardo en el inicio de las conductas de intromisión y de eyaculación determinó un bajo porcentaje de pruebas con intromisión (29%) y con eyaculación (24%) en este grupo (Tabla 3); sin embargo, una vez que los animales comenzaron a mostrar la respuesta de eyaculación, la incidencia de esta respuesta aumentó notoriamente (45%), al solo considerar las tres últimas pruebas. Los animales tratados con LNG presentaron similares latencias de intromisión y de eyaculación y similares proporciones de aciertos que las de los animales tratados con T (Tabla 3).

El 5 α LNG restituyó parcialmente la conducta copulatoria de los animales castrados (Figura 4), pero solo algunos de ellos (38%) mostraron la respuesta de eyaculación en un menor porcentaje de las pruebas que las ratas tratadas con LNG o con T (Tabla 3). Los animales tratados con 5 α LNG mostraron intervalos interintromisión más largos ($p < 0.01$) y menores valores de su proporción de aciertos ($p < 0.01$), pero latencias de respuesta similares a las de los animales tratados con LNG o con T ((Tabla 3).

El tratamiento con los derivados 3 α LNG o 3 β LNG estimuló la conducta de intromisión en una baja proporción de pruebas (3%; 17%) y fue totalmente inefectivo para restablecer la conducta de eyaculación en las ratas castradas (Fig. 4). Las latencias de monta de los animales tratados con 3 β LNG fueron similares a las de los animales tratados con LNG o con T (Tabla 3).

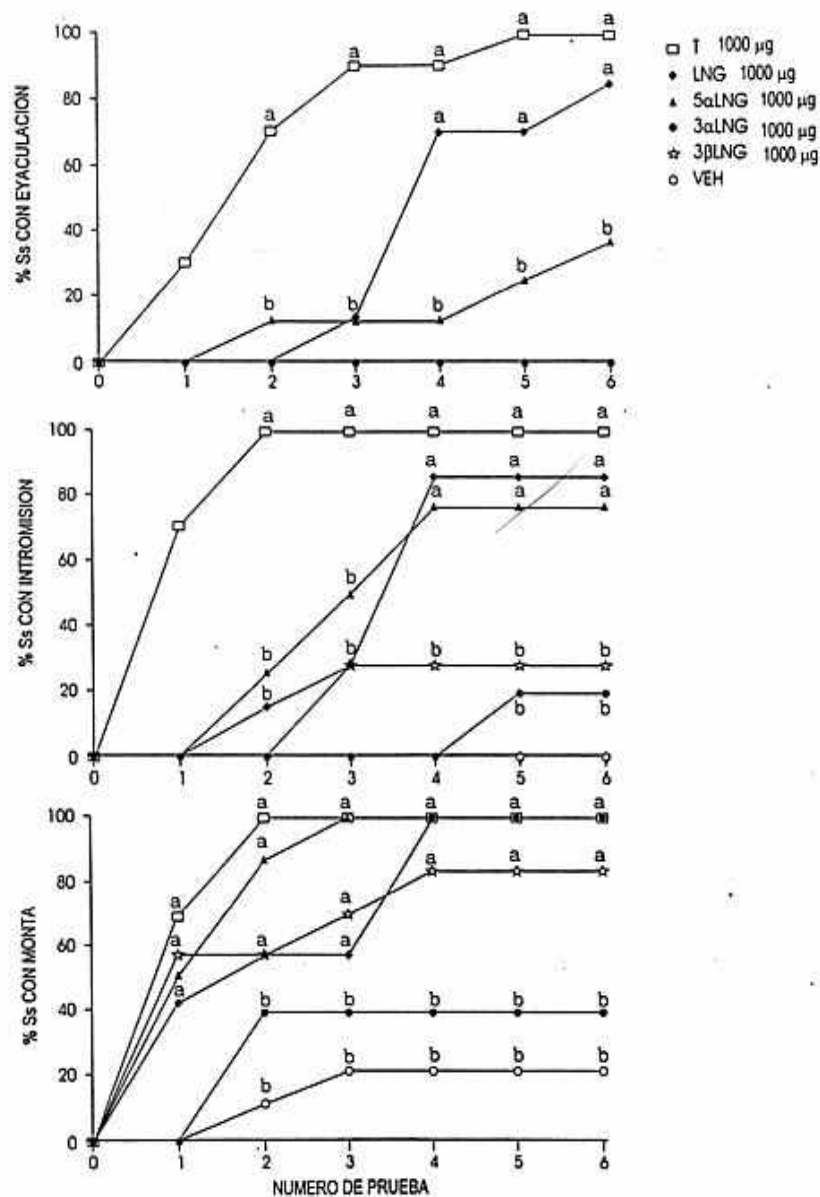


Fig. 4. Efectos conductuales intrínsecos del levonorgestrel (LNG) y de sus metabolitos 5α-reducidos. Los resultados se presentan como porcentajes acumulativos de ratas macho castradas que mostraron conducta de monta, de intromisión y de eyaculación durante los 21 días de tratamiento con estos compuestos (1000 µg/día). Ratas macho castradas, tratadas con testosterona (T, 1000 µg/día) o con vehículo (VEH), sirvieron como controles positivo y negativo respectivamente. El LNG restituyó la conducta sexual incluyendo eyaculación en los animales tratados ($p < 0.001$ en comparación con VEH, prueba de X^2), mientras que la 5α-reducción del LNG resultó en una disminución de sus efectos conductuales. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

TABLA 3. PARAMETROS DE LA ACTIVIDAD SEXUAL MOSTRADA POR LAS RATAS MACHO CASTRADAS, TRATADAS CON LNG O SUS METABOLITOS (1000 µg/día).

	Testosterona 1000µg/día (n=10)	LNG 1000µg/día (n=7)	5αLNG 1000µg/día (n=8)	3αLNG 1000µg/día (n=10)	3βLNG 1000µg/día (n=7)	Vehículo 0.2 ml (n=10)
% Ss con Monta	100***	100***	100***	40 ^{°°}	85**	20 ^{°°°}
% Ss con Intromisión	100***	86***	75***	20 ^{°°°}	28 ^{°°}	0 ^{°°°}
% Ss con Eyaculación	100***	86***	38*** ^{°°}	0 ^{°°°}	0 ^{°°°}	0 ^{°°°}
% Pruebas con Monta	83***	62*** [°]	69***	27 ^{°°°}	48*** ^{°°°}	10 ^{°°°}
% Pruebas con Intromisión	83***	29*** ^{°°°°}	33*** ^{°°°°}	3 ^{°°°}	17*** ^{°°°}	0 ^{°°°}
% Pruebas con Eyaculación	75***	24*** ^{°°°°}	13*** ^{°°°}	0 ^{°°°}	0 ^{°°°}	0 ^{°°°}
Interv. Inter Introm.(min) ^a	0.9 ± 0.1	1.8 ± 0.4 [°]	2.4 ± 0.4 ^{°°}	2.7 ± 0.5 ^{°°°}	4.1 ± 1.0 ^{°°°}	-
Proporción de aciertos ^a	0.68 ± 0.04	0.53 ± 0.07	0.39 ± 0.07 ^{°°}	0.32 ± 0.04 ^{°°}	0.24 ± 0.01 ^{°°°}	-
Latencia de Monta (min) ^a	1.7 ± 1.1**	2.6 ± 0.7*** [°]	5.0 ± 1.6* [°]	10.8 ± 0.7 ^{°°°}	3.6 ± 0.8***	13.4 ± 0.5 ^{°°}
Latencia de Introm. (min) ^a	2.0 ± 1.1	2.8 ± 0.8	3.7 ± 1.0	11.9 ± 0.6 ^{°°}	1.2 ± 0.1	-
Latencia de Eyac. (min) ^a	9.3 ± 1.4	11.3 ± 3.0	10.7 ± 3.5	-	-	-
Intervalo Posteyac. (min) ^a	7.4 ± 0.8	16.7 ± 2.6 ^{°°°}	12.0 ± 1.8 [°]	-	-	-

^a Promedio ± EE de las últimas dos pruebas conductuales.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, comparados con el grupo tratado con vehículo.

[°] p<0.05, ^{°°} p<0.01, ^{°°°} p<0.001, comparados con el grupo tratado con Testosterona.

Efectos del LNG y de sus derivados administrados en combinación con E₂

La administración de LNG en combinación con E₂ restituyó la conducta de monta y de intromisión en la mayor parte de los sujetos (100 y 86% respectivamente) con un curso temporal similar a través del período de tratamiento y en un porcentaje similar de pruebas, que los animales del grupo control tratado con DHT y E₂ (Fig. 5). Sin embargo, en los animales tratados con LNG + E₂ sólo se presentó la conducta de eyaculación en 43% de los sujetos en 23% de las pruebas, valores significativamente menores ($p < 0.05$; $p < 0.001$) que los del grupo control tratado con DHT + E₂ (Fig. 5; Tabla 4). No obstante, la incidencia de respuestas eyaculatorias mostradas por los animales tratados con LNG + E₂ fue significativamente mayor ($p < 0.001$) que la observada en el grupo de animales que sólo recibieron vehículo + E₂ (Tabla 4).

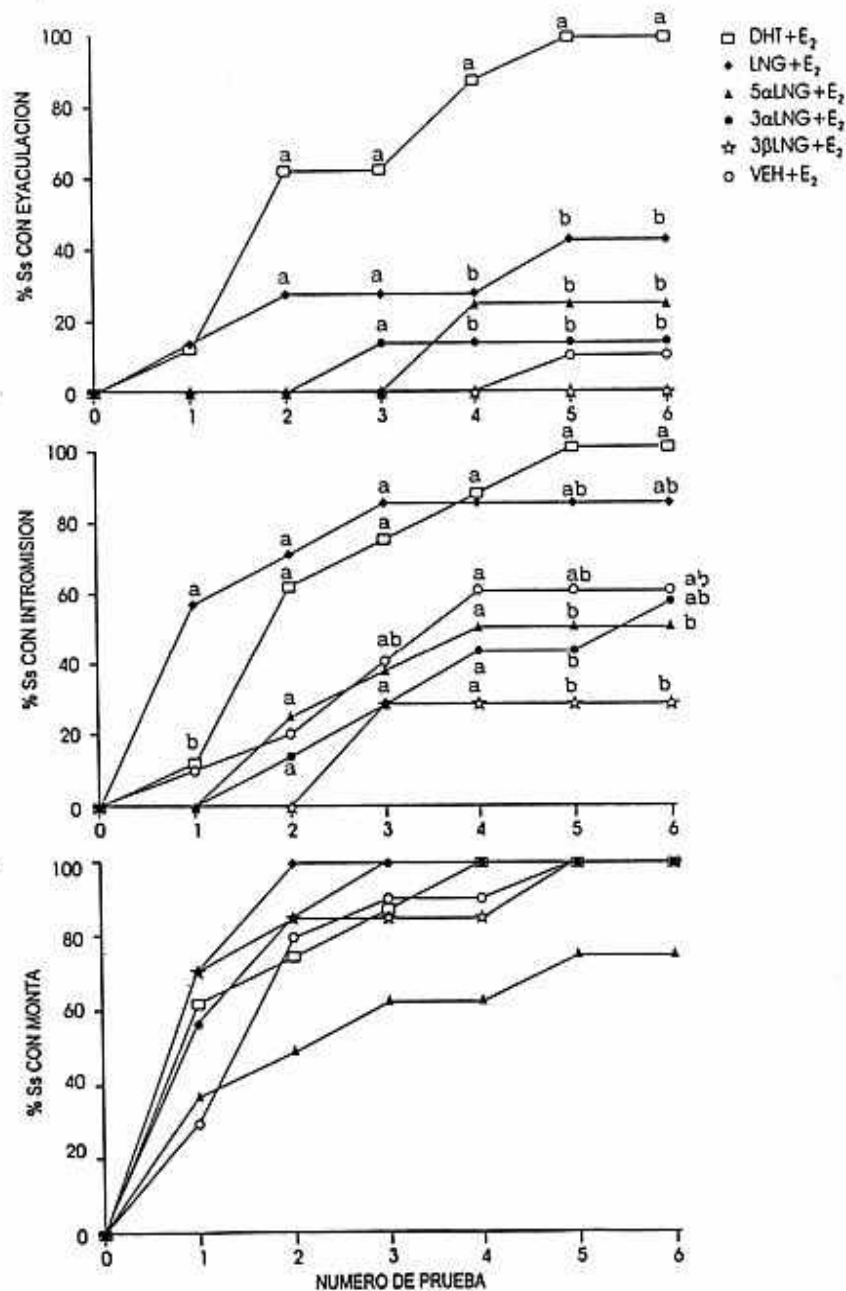


Fig. 5. Efectos conductuales androgénicos del levonorgestrel (LNG) y de sus metabolitos 5 α -reducidos evaluados por su capacidad de sinergizar con estradiol (E₂). Los resultados se presentan como porcentajes acumulativos de ratas macho castradas que mostraron conducta de monta, de intromisión y de eyaculación durante 21 días de tratamiento con LNG, 5 α LNG, 3 α LNG o 3 β LNG (300 μ g/día) en combinación con E₂ (5 μ g/día). Ratas macho castradas tratadas con DHT (300 μ g/día) o con vehículo, en combinación con E₂ (5 μ g/día) sirvieron como controles. LNG restituyó la conducta de intromisión en la mayor parte de los sujetos (86%), y la de eyaculación en 43% de ellos ($p < 0.05$ en comparación con VEH + E₂, prueba de X²), mientras que sus metabolitos 5 α -reducidos fueron menos efectivos ($p < 0.01$ en comparación con DHT + E₂, prueba de X²). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

La combinación de 5 α LNG + E₂ fue menos efectiva para restablecer la conducta copulatoria de las ratas castradas en comparación con el tratamiento de LNG + E₂ (Fig 5; Tabla 4). De este modo, el número de animales tratados con 5 α LNG + E₂ que presentaron intromisión y eyaculación (50% y 25% respectivamente) y el número de pruebas con actividad (29% y 8% respectivamente) fueron significativamente menores (p<0.05) que los de los animales tratados con LNG + E₂ y que los del grupo control tratado con DHT + E₂ (p < 0.001). La incidencia y número de respuestas conductuales mostrados por los animales tratados con 5 α LNG + E₂ no fueron significativamente diferentes que los del grupo control tratado con vehículo + E₂ (Fig. 5; Tabla 4).

La administración de 3 α LNG + E₂ o 3 β LNG + E₂ activó la conducta de monta en todos los Ss pero no restableció la actividad de eyaculación. De hecho, el número de sujetos en estos grupos que mostraron intromisiones y eyaculación, así como el número de pruebas en el que las realizaron, fueron significativamente menores que las de los sujetos tratados con LNG + E₂ (p < 0.05) o DHT + E₂ (p < 0.001) y similares a los del grupo control tratado con vehículo + E₂ (Fig. 5; Tabla 4).

TABLA 4. PARAMETROS DE LA ACTIVIDAD SEXUAL MOSTRADA POR LAS RATAS MACHO CASTRADAS, TRATADAS CON LNG O SUS METABOLITOS EN COMBINACION CON E₂.

	DHT + E ₂ (300 μ g, 5 μ g) (n=8)	LNG + E ₂ (300 μ g, 5 μ g) (n=7)	5 α LNG + E ₂ (300 μ g, 5 μ g) (n=8)	3 α LNG + E ₂ (300 μ g, 5 μ g) (n=7)	3 β LNG + E ₂ (300 μ g, 5 μ g) (n=7)	Vehículo + E ₂ (0.2 ml, 5 μ g) (n=10)
% Ss con Monta	100	100	75	100	100	100
% Ss con Intromisión	100	86	50°	57	28°	60
% Ss con Eyaculación	100*	43°	25°	14°	0°	10°
% Pruebas con Monta	90*	90*	54°	74°	86	77°
% Pruebas con Intromisión	77***	67***	29°	21°	10°	23°
% Pruebas con Eyaculación	63***	24°	8°	5°	0°	1°
Interv. Inter Introm. (min) ^a	1.0 $\pm$ 0.1*	2.5 $\pm$ 0.4°	5.4 $\pm$ 2.1°	7.2 $\pm$ 0.8°	8.0 $\pm$ 2.0°	5.1 $\pm$ 2.6°
Proporción de Aciertos ^a	0.68 $\pm$ 0.03***	0.38 $\pm$ 0.04°	0.24 $\pm$ 0.06°	0.23 $\pm$ 0.04°	0.15 $\pm$ 0.01°	0.32 $\pm$ 0.05°
Latencia de Monta (min) ^a	0.6 $\pm$ 0.3*	2.2 $\pm$ 0.9°	4.2 $\pm$ 2.0°	2.4 $\pm$ 0.7°	3.1 $\pm$ 0.8°	3.9 $\pm$ 1.0°
Latencia de Introm. (min) ^a	2.0 $\pm$ 1.1	2.7 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 1.3	7.6 $\pm$ 2.2°	8.4 $\pm$ 6.2°	3.0 $\pm$ 1.1
Latencia de Eyac. (min) ^a	11.3 $\pm$ 2.2	19.2 $\pm$ 2.4°	19.1 $\pm$ 3.8	16.2	-	29.0
Interv. Post Eyac. (min) ^a	9.5 $\pm$ 1.2	12.2 $\pm$ 1.3°	8.6 $\pm$ 0.7*	8.8*	-	8.7

^a Promedio $\pm$ EE de las últimas dos pruebas conductuales.

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, comparados con el grupo tratado con vehículo + E₂.

° p<0.05, °° p<0.01, °°° p<0.001, comparados con el grupo tratado con DHT + E₂.

Efectos del LNG y de sus derivados administrados en combinación con DHT

El tratamiento con LNG + DHT solo restableció en forma parcial la conducta copulatoria de las ratas castradas, la cual fue similar a la observada en los animales control que recibieron vehículo + DHT (Fig. 6; Tabla 5). La incidencia de respuestas de monta, de intromisión y de eyaculación fue significativamente menor ($p < 0.001$) que la de los animales control, tratados con E_2 + DHT.

Por el contrario, los tratamientos con $5\alpha\text{LNG}$ + DHT o con $3\alpha\text{LNG}$ + DHT estimularon un mayor nivel de actividad copulatoria que el mostrado por los animales control tratados con vehículo + DHT (Fig. 6; Tabla 5). De hecho, 63 % de los Ss tratados con estas combinaciones mostraron conducta de eyaculación, aunque en una menor proporción de pruebas (23 %) que las observadas en las ratas control tratadas con E_2 + DHT.

El tratamiento combinado de $3\beta\text{LNG}$ + DHT fue capaz de activar la conducta de monta en 75 % de los Ss, pero tuvo efectos muy limitados sobre las respuestas de intromisión y de eyaculación, cuya incidencia no fue significativamente diferente a la observada en los animales control tratados con vehículo + DHT (Fig. 6; Tabla 5).

TABLA 5. PARAMETROS DE LA ACTIVIDAD SEXUAL MOSTRADA POR LAS RATAS MACHO CASTRADAS, TRATADAS CON LNG O SUS METABOLITOS EN COMBINACION CON DHT.

	E_2 +DHT (5 μ g,300 μ g) (n=8)	LNG+DHT (300 μ g,300 μ g) (n=8)	$5\alpha\text{LNG}$ +DHT (300 μ g,300 μ g) (n=8)	$3\alpha\text{LNG}$ +DHT (300 μ g,300 μ g) (n=8)	$3\beta\text{LNG}$ +DHT (300 μ g,300 μ g) (n=8)	Vehículo+DHT (0.2 ml,300 μ g) (n=12)
% Ss con Monta	100*	88	88	88	75	50°
% Ss con Intromisión	100*	63	63	88	50°	50°
% Ss con Eyaculación	100**	50°	63	63	25°°	33°°
% Pruebas con Monta	96***	50°°°	58°°°	58°°°	46°°°	19°°
% Pruebas con Intromisión	77***	35°°°	31°°°	42°°°	21°°	19°°
% Pruebas con Eyaculación	63***	17°°	23°°°	23°°°	6°°	14°°
Interv. Inter Introm. (min) ^a	1.0 $\pm$ 0.1*	3.6 $\pm$ 1.4°	3.1 $\pm$ 0.6°°	2.6 $\pm$ 0.7°	3.0 $\pm$ 0.7°°	1.8 $\pm$ 0.4°
Proporción de Aciertos ^a	0.68 $\pm$ 0.03*	0.41 $\pm$ 0.04°°	0.52 $\pm$ 0.06°	0.66 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.10°°	0.58 $\pm$ 0.09°
Latencia de Monta (min) ^a	0.6 $\pm$ 0.3*	4.5 $\pm$ 1.2°	6.6 $\pm$ 1.2°°	4.5 $\pm$ 0.9°	8.0 $\pm$ 1.0°°°	3.5 $\pm$ 1.5°
Latencia de Introm. (min) ^a	2.0 $\pm$ 1.1*	4.6 $\pm$ 0.5°	7.0 $\pm$ 2.0°°	5.3 $\pm$ 1.1°	6.8 $\pm$ 0.5°	6.7 $\pm$ 1.6°
Latencia de Eyac (min) ^a	11.3 $\pm$ 2.2	23.1 $\pm$ 3.3°	21.7 $\pm$ 2.5°	12.9 $\pm$ 1.4	19.2 $\pm$ 4.3°	14.5 $\pm$ 1.3
Interv Post Eyac. (min) ^a	9.5 $\pm$ 1.2*	13.2 $\pm$ 2.5°	13.7 $\pm$ 1.5°	14.4 $\pm$ 1.1°	23.9 $\pm$ 9.7°°	14.6 $\pm$ 1.6°

^a Promedio $\pm$ EE de las últimas dos pruebas conductuales.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparados con el grupo tratado con vehículo + DHT.

° $p < 0.05$, °° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$, comparados con el grupo tratado con E_2 + DHT.

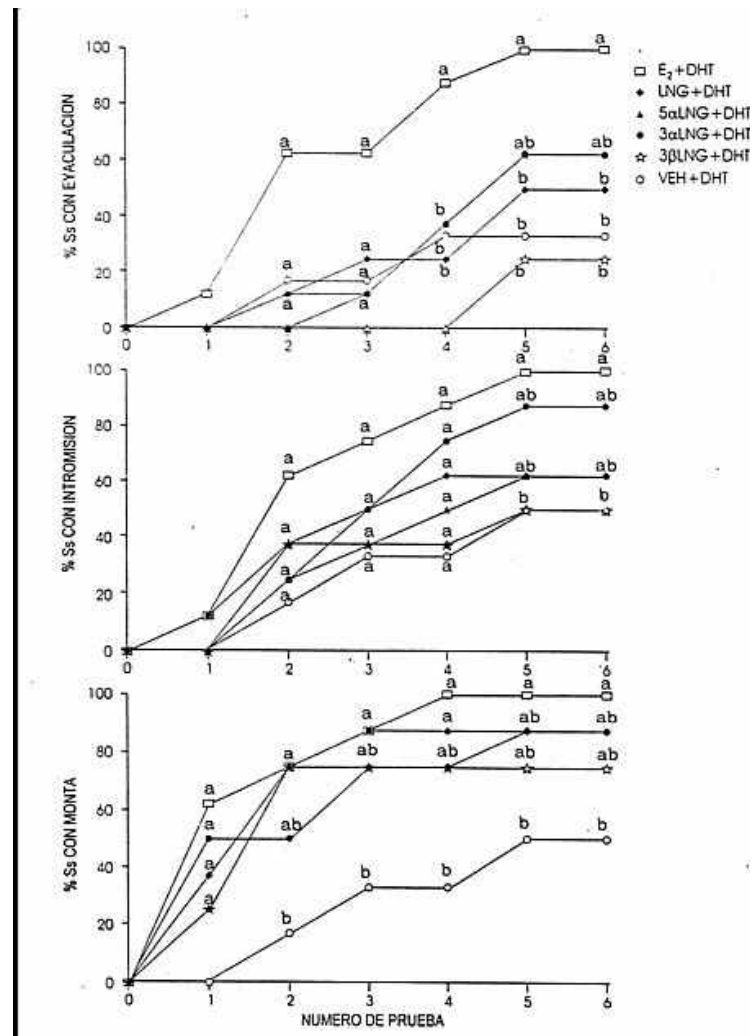


Fig. 6. Efectos conductuales estrogénicos del levonorgestrel (LNG) y de sus metabolitos 5 α -reducidos, evaluados por su capacidad de sinergizar con DHT. Los resultados se presentan como porcentajes acumulativos de ratas macho castradas que mostraron conducta de monta, de intromisión y de eyaculación durante 21 días de tratamiento con LNG, 5 α LNG, 3 α LNG o 3 β LNG (300 μ g/día) en combinación con DHT (300 μ g/día). Ratas macho castradas y tratadas con E₂ (5 μ g/día) o con vehículo, en combinación con DHT (300 μ g/día) sirvieron como controles. Los metabolitos 5 α -reducidos del LNG (5 α - y 3 α LNG) ejercieron ligeros efectos estrogénicos (porcentajes de Ss con eyaculación, NS en comparación con los del grupo tratado con E₂ + DHT, prueba de X²). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos.

Efectos periféricos del LNG y de sus derivados

La administración de 500 µg/día de LNG o de sus metabolitos 5αLNG y 3αLNG, pero no la de 3βLNG, estimuló parcialmente el crecimiento de la próstata ventral (Fig. 7) aunque este efecto fue menor al provocado por T ($p < 0.01$), mientras que en el crecimiento de las vesículas seminales solamente el LNG tuvo efecto, pero menor ($p < 0.01$) que el de T.

El tratamiento con 1000 µg/día de LNG incrementó significativamente ($p < 0.001$) los pesos de la próstata ventral y de las vesículas seminales de las ratas castradas, en comparación con los pesos de estos tejidos en los animales control que recibieron sólo el vehículo. Los efectos del LNG sobre los órganos sexuales accesorios fueron similares a los observados en los animales tratados con T (Fig. 7). El tratamiento con 5αLNG indujo un efecto significativamente menor en los pesos de la próstata ventral y de las vesículas seminales en comparación con los tratamientos de LNG o T. Los derivados 3αLNG o 3βLNG indujeron muy poco efecto, sí acaso, sobre los pesos de la próstata ventral y de las vesículas seminales de las ratas castradas (Fig. 7).

La administración combinada de LNG o de sus metabolitos reducidos en el anillo A con E₂ no indujo una modificación significativa de los pesos de los órganos sexuales accesorios en comparación con los de los Ss control tratados con vehículo + E₂ (Fig. 7).

Cuando el LNG o sus derivados reducidos fueron administrados simultáneamente con DHT a los animales castrados, no se incrementaron los pesos de la próstata ventral y de las vesículas seminales, los cuales fueron similares a los de los sujetos tratados sólo con el vehículo + DHT.

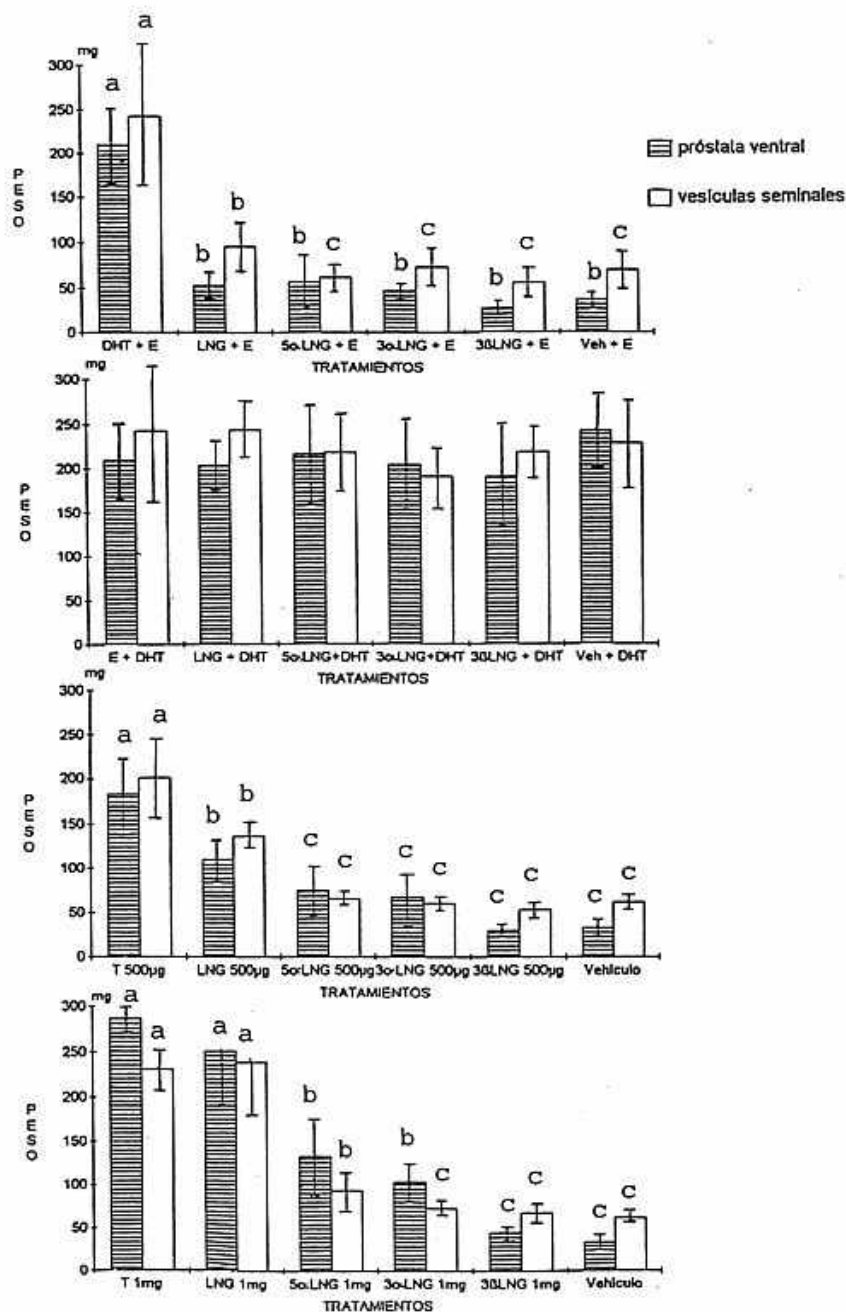


Fig. 7. Efectos androgénicos periféricos del LNG y de sus metabolitos 5 α -reducidos. Se muestran los efectos de 21 días de tratamiento diario con LNG, 5 α LNG, 3 α LNG, 3 β LNG (500 o 1000 μ g) o con su combinación (300 μ g) con E₂ (5 μ g) o con DHT (300 μ g), sobre el peso de los órganos sexuales accesorios. Ratas castradas y tratadas con T (1000 μ g), con DHT (300 μ g) + E₂ (5 μ g), con E₂ (5 μ g) + vehículo (VEH), con DHT (300 μ g) + VEH, o con VEH solo, sirvieron como controles. Los datos se presentan como promedios $\pm$ DS. Las barras con letras diferentes tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$, prueba t de Student), al compararse la próstata ventral o las vesículas seminales.

VIII. DISCUSION

Estudio I

Los resultados obtenidos proporcionan evidencia de que el andrógeno sintético MENT es un agente efectivo para restituir la actividad copulatoria masculina completa en ratas macho castradas, con una potencia considerablemente mayor, en términos de dosis, a la de T. Se ha mostrado que MENT restituye la respuesta de eyaculación a la estimulación eléctrica en monos rhesus en los que se suprimió la espermatogénesis y la respuesta de eyaculación por la administración continua de un agente agonista potente de la LHRH (Sundaram y cols., 1987). MENT es efectiva para mantener la conducta sexual masculina en ratones (Ogawa y cols., 1996) y en hamsters (Wood y cols., 1996). También se ha demostrado que el 17-(1-adamantoato) de 17α -metil-19-nortestosterona, otro éster de MENT, restituyó la actividad sexual en conejos castrados (Hunt y Cheng, 1973). El presente estudio comparó la potencia de MENT administrado en forma continua en cuatro niveles de dosis, con una dosis de T efectiva (200 $\mu\text{g}/\text{día}$) para la restitución de la conducta en ratas macho castradas.

Cuando se administró MENT a la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{día}$, se estimuló la conducta copulatoria masculina de los animales con una eficiencia comparable a la ejercida por T en la dosis de reemplazo utilizada. Los grupos tratados con MENT (10 $\mu\text{g}/\text{día}$) y con T (200 $\mu\text{g}/\text{día}$) mostraron parámetros de actividad sexual idénticos a los que se observaron en animales intactos no tratados. La administración de MENT a una dosis mayor (100 $\mu\text{g}/\text{día}$) dió por resultado una sobreestimulación de la conducta sexual de las ratas castradas. Los animales que recibieron MENT a este nivel de dosis, presentaron intervalos interintromisión y latencias de eyaculación significativamente menores y proporciones de aciertos significativamente mayores en comparación con los animales tratados con T y con las ratas intactas no tratadas. Los experimentos en los que se utilizaron menores dosis de MENT revelaron que este andrógeno sintético es todavía efectivo para estimular la conducta sexual a la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{día}$, aunque con menor potencia, en tanto que la administración de 1 $\mu\text{g}/\text{día}$ no ejerció ningún efecto (datos no presentados). De estos datos se concluye que la potencia de MENT para estimular la conducta sexual fue dosis-dependiente y que su efecto

para la restitución completa de esta actividad en las ratas macho castradas fue aproximadamente 20 veces mayor que la de T.

Se ha sugerido que los parámetros de motivación (latencias de monta, intervalos interintromisión, intervalos posteyaculatorios) son principalmente facilitados por la administración de estrógenos (Davidson, 1969). Es interesante hacer notar que la administración de MENT a las dosis de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{día}$, restituyó la conducta sexual de los sujetos, no sólo con parámetros de ejecución muy efectivos (proporciones de aciertos), sino también con parámetros indicativos de motivación similares a los de los animales intactos o a los de los animales tratados con testosterona. Esto parecería indicar que MENT ejerce efectos estrogénicos. Sin embargo, los efectos estrogénicos que pudiera ejercer MENT, si los hay, no deben contribuir importantemente para sus acciones sobre la conducta sexual, dado que solo se ha demostrado su aromatización *in vitro* en fracciones microsomales de placenta enriquecidas de aromatasas, condiciones que no corresponden a las del substrato neural (LaMorte y cols., 1994). Adicionalmente, al analizar la posible actividad estrogénica de MENT en ratas hembra, se ha encontrado que este andrógeno no induce cornificación vaginal ni la síntesis de receptores de progesterona estrógeno-dependientes en el útero de la rata y que las acciones uterotróficas que ejerce dependen de su interacción con los receptores de andrógenos (Beri y cols., 1998). Queda como una posibilidad el explorar los posibles efectos estrogénicos de MENT en ensayos más sensibles a este tipo de actividad.

La observación de que MENT, un andrógeno que no se 5α -reduce, activa el substrato neural para la conducta sexual masculina con una potencia mayor que la de T, sugiere fuertemente que la 5α -reducción enzimática de los andrógenos puede no requerirse para ejercer este efecto. El metabolismo de MENT difiere del de T en que MENT no es bioconvertida a metabolitos 5α -reducidos (Agarwal y Monder, 1988; Kumar y cols., 1992). Esta observación farmacológica concuerda con los datos de McGinnis y Dreifuss (1989) quienes han propuesto que en condiciones fisiológicas la T más que la DHT juega un papel principal en la regulación de la conducta sexual masculina de la rata. Apoyo adicional para este concepto deriva de hallazgos acerca de que la administración de inhibidores de la 5α -reductasa no suprime la conducta sexual masculina en diferentes especies (Alexandre y Balthazart, 1986; McGinnis y cols., 1987; Sodersten y cols. 1986).

La potencia mayor de MENT para estimular la conducta sexual en comparación a la de T, se correlaciona bien con sus actividades biológicas antigonadotróficas y anabólicas potentes en la rata castrada. Así, MENT es 25 veces más efectiva que T para suprimir los niveles de gonadotrofinas en el suero y 11 veces más potente para incrementar los pesos de los músculos bulbocavernoso y elevador del ano (Kumar y cols., 1992).

En el presente estudio MENT indujo un aumento dependiente de la dosis, en el peso de la próstata ventral y de las vesículas seminales, como había sido previamente demostrado (Kumar y cols., 1992). Sin embargo, la respuesta de los órganos sexuales accesorios a las hormonas esteroides en el presente estudio, fue menor que la encontrada por estos autores (Kumar y cols., 1992), posiblemente porque en el presente estudio el intervalo postcastración después del cual se inició el tratamiento con andrógenos fue más largo, pese a que siendo mayor el peso corporal de nuestros animales se esperaría que sus tejidos tuvieran un peso mayor. En forma interesante, el efecto androgénico inducido por MENT, sobre el crecimiento de los órganos sexuales accesorios, fue significativamente menos potente que el efecto sobre la conducta. Así, una dosis de MENT (10µg/día) que fue suficiente para restituir la conducta sexual completa de las ratas castradas, tuvo efecto androgénico muy pequeño sobre los órganos sexuales accesorios. Aún más, MENT a una dosis mayor (100 µg/día), no restituyó en forma completa el peso de estos tejidos. La observación de que MENT fue solamente 3 a 4 veces más efectiva que la T para restituir el peso de la próstata ventral y de las vesículas seminales, confirma el concepto de que la actividad biológica de este andrógeno sintético sobre estos órganos no se amplifica debido a sus características metabólicas que hacen que no se 5α-reduzca, a diferencia de los efectos androgénicos de T.

En resumen, los resultados de este estudio demuestran que MENT tiene una potencia muy alta para estimular la conducta sexual masculina, ejerciendo en efecto relativamente escaso sobre la próstata ventral y las vesículas seminales. Estos datos proporcionan un apoyo adicional para el uso clínico potencial de este andrógeno sintético como agente terapéutico, de sustitución o como anticonceptivo en el varón.

Estudio II

La restitución de la conducta sexual de las ratas castradas que se observó luego de la administración de dosis altas de LNG (1000 µg/día) se puede interpretar como una

demostración de un efecto androgénico agonista de esta progestina sintética, particularmente por el hecho de que los valores de los parámetros conductuales regulados por andrógenos e indicativos de la ejecución, como la proporción de aciertos y las latencias de intromisión y de eyaculación en los animales tratados con LNG, fueron muy similares a los de los animales del grupo control tratado con T. Dosis menores de LNG (500 y 300 $\mu\text{g}/\text{día}$) aunque fueron efectivas, tuvieron menor potencia para activar la conducta copulatoria. El efecto androgénico de LNG a nivel del SNC se correlacionó con su capacidad para incrementar los pesos de la próstata ventral y de las vesículas seminales. Estas observaciones están de acuerdo con la alta afinidad de unión relativa del LNG al receptor de andrógenos (RA), tanto en tejidos neurales como periféricos sensibles a hormonas (Lemus y cols., 1992).

El hallazgo de que el $5\alpha\text{LNG}$ fue significativamente menos efectivo que el LNG para restituir la conducta copulatoria de las ratas castradas indica que la reducción del anillo A disminuye su actividad androgénica en el SNC en forma similar a lo que se observa luego de la 5α -reducción de andrógenos naturales (Meisel y Sachs, 1994; Morali y cols., 1994; Whalen y cols., 1985). Más aún, el $5\alpha\text{LNG}$ fue también significativamente menos potente que el LNG para incrementar los pesos de los órganos sexuales accesorios en las ratas castradas. El hecho de que la 5α -reducción del LNG disminuyó su potencia androgénica en los órganos periféricos no concuerda con el hecho de que el $5\alpha\text{LNG}$ se una al receptor de andrógenos con una afinidad relativa mayor que el LNG, compuesto del que deriva (Lemus y cols., 1992). Este hecho contrasta marcadamente con el concepto clásico de que la 5α -reducción de la testosterona no solo incrementa su afinidad de unión al RA (Liao y cols., 1973; Martini, 1982), sino que también amplifica sus efectos androgénicos en los órganos periféricos andrógeno-dependientes (Dorfman y Shipley, 1956; Liao y cols., 1973). El efecto paradójico de que la 5α -reducción del LNG disminuya su actividad es similar al descrito previamente para la molécula de NET (Lemus y cols., 1997; Morali y cols., 1990). Dado que la naturaleza de este fenómeno ha sido atribuida, en el caso de NET, a la presencia de un etinilo en el C-17 (Lemus et al., 1997), parece lógico extrapolar esta explicación al LNG y a otras moléculas de progestinas 19-nor que portan un grupo etinilo en posición 17α .

La subsecuente reducción de la molécula del LNG en 3α o en 3β resultó en la completa eliminación de sus efectos androgénicos tanto a nivel central como periférico. De hecho, el $3\alpha\text{LNG}$ o el $3\beta\text{LNG}$ no indujeron activación de la conducta copulatoria ni

aumento de los pesos de los órganos sexuales accesorios en las ratas castradas, lo cual correlaciona con la falta de interacción de ambos derivados tetrahydro reducidos del LNG, con el RA (Lemus y cols., 1992).

LNG o sus derivados se administraron a una dosis menor (300 µg/día), en combinación con E₂ para evaluar su capacidad de sinergizar como andrógenos, con los efectos conductuales del E₂. El hallazgo de que sólo la administración de LNG + E₂ fue capaz de activar en forma completa la conducta copulatoria de los animales castrados, aunque con menor efectividad que la administración de DHT + E₂, demostró que la molécula original del LNG posee actividad androgénica intrínseca. Las observaciones de que la administración de 5αLNG + E₂ no fue efectiva para restituir la conducta copulatoria completa y de que el 3αLNG o 3βLNG + E₂ fueron totalmente inefectivos, sugiere que la reducción de la molécula de LNG en el anillo A resulta en la disminución de su potencia androgénica intrínseca, confirmando los resultados obtenidos luego de la administración del LNG o de sus metabolitos, solos.

Para evaluar si el LNG o sus metabolitos pueden inducir efectos conductuales de tipo estrogénico, se administraron en combinación con DHT. Los tratamientos con 5αLNG + DHT o 3αLNG + DHT fueron los únicos capaces de activar la conducta sexual de los sujetos a un nivel mayor que el de los animales control que recibieron el vehículo + DHT. Estos resultados sugieren que los metabolitos del LNG reducidos en el anillo A ejercen efectos conductuales de tipo estrogénico aunque con una potencia significativamente menor que la del E₂, hallazgo que coincide con un informe reciente en donde se demuestra que los metabolitos tetrahydro-reducidos del LNG interaccionan con el receptor de estrógenos (RE) con una afinidad de unión relativa significativamente menor que la del E₂ y que son capaces, a muy altas dosis, de transactivar un sistema de levaduras estrógeno-dependiente cotransfectado con el gen del RE humano y con elementos de respuesta a estrógenos unidos a un vector reportero de la β-galactosidasa (Santillán y cols., 2001). El efecto estrogénico débil del 5αLNG y del 3αLNG pudo ser el factor que determinó que no se observaran efectos facilitadores significativos sobre los parámetros de motivación sexual (latencias de monta y de intromisión, intervalos inter-intromisión y posteyaculatorios) en respuesta a estos tratamientos.

La potencia de los efectos conductuales estrogénicos ejercidos por dosis altas de los derivados del LNG reducidos en el anillo A fue significativamente menor que la de los metabolitos correspondientes de NET, previamente descritos (Moralí y cols., 1990), observación que se correlaciona con sus diferentes afinidades de unión al RE (Chávez y cols., 1985; Santillán y cols., 2001) y también con los efectos estrogénicos observados en humanos y en ratas luego de la administración de NET (Etchegoyen y cols., 1983; Larrea y cols., 1984; Pérez-Palacios y cols., 1981; Vilchis y cols., 1986).

En forma interesante, la observación de que el 33 % de las ratas castradas tratadas con el vehículo + DHT, utilizadas como grupo control, exhibieron conducta copulatoria completa, confirma resultados previos indicando que la DHT a dosis altas es capaz de restituir la conducta sexual de animales castrados, sexualmente expertos, de diversas especies de mamíferos (Meisel and Sachs, 1994; Whalen y cols, 1985). Nosotros hemos sugerido que los efectos conductuales de la DHT son ejercidos por su propia potencia androgénica y por los efectos estrogénicos de sus metabolitos no-fenólicos, los $3\beta,5\alpha$ - y $3\alpha,5\alpha$ -androstandioles (Moralí y cols., 1994).

Los resultados de este estudio en su conjunto, demuestran que el LNG a altas dosis induce efectos androgénicos tanto a nivel central como periférico y una actividad estrogénica débil mediada por sus productos de conversión metabólica. Los datos señalan el papel del metabolismo del LNG para explicar algunos efectos inducidos por dosis muy altas, suprafarmacológicas, de esta progestina sintética.

IX. CONCLUSIONES

Los resultados de estos dos estudios aportan información acerca de la capacidad de MENT y del LNG y sus metabolitos, esteroides sintéticos con acciones androgénicas potentes y efectos estrogénicos prácticamente nulos (MENT) o muy débiles (LNG y sus derivados), para restituir la conducta sexual de la rata macho castrada.

1) MENT es un andrógeno muy potente para restituir la conducta sexual de la rata macho castrada.

2) Este efecto parece no requerir de su 5α -reducción ni de acciones estrogénicas adicionales.

3) El hecho de que MENT no se 5α -reduzca no le impide ejercer una alta potencia androgénica sobre la expresión de la conducta sexual, pero puede ser la razón de que su potencia androgénica periférica sea comparativamente menor.

4) LNG es una progestina con acciones androgénicas casi tan potentes como las de T para restituir la conducta sexual de la rata macho castrada y para inducir el crecimiento de los órganos sexuales accesorios, al menos a la dosis de 1000 μg diarios.

5) La 5α -reducción del LNG reduce sus efectos androgénicos sobre la conducta sexual y permite una débil expresión de efectos estrogénicos (5α -LNG y 3α -LNG).

6) Los efectos androgénicos del LNG sobre la conducta sexual se pueden considerar potentes dado que se ejercen sin la participación o sólo muy débil, de una acción estrogénica de sus metabolitos.

7) LNG *per se* ejerce efectos androgénicos periféricos.

8) La 5α -reducción del LNG reduce sus efectos androgénicos periféricos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agarwal AK, Monder C. 1988. In vitro metabolism of 7 α -methyl-19-nortestosterone by rat liver, prostate and epididymis. *Endocrinology*; 123: 2187-2193.

Alexandre C, Balthazart J. 1986. Effects of metabolism inhibitors, antiestrogens and antiandrogens on the androgen and estrogen induced sexual behavior in Japanese quail. *Physiol Behav*; 38: 581-591.

Ball MJ, Ashwell E, Gillmer MDG. 1991. Progestagen-only oral contraceptives: Comparison of the metabolic effects of levonorgestrel and norethisterone. *Contraception*; 44: 223-233.

Barranco VP, Jones DD. 1974. Effect of oral contraceptive on acne. *Sout Med J*; 67 : 703-706.

Batzer FR. 1986. Measurements of androgenicity, the spectrum of progestogen activity. *J Reprod Med (Suppl)*; 31: 848-864.

Baum MJ. 1979. A comparison of the effects of methyltrienolone (R 1881) and 5 α -dihydrotestosterone on sexual behavior of castrated male rats. *Horm Behav*; 13: 165-174.

Baum MJ, Tobet SA, Starr MS, Bradshaw WG. 1982. Implantation of dihydrotestosterone propionate into lateral septum or medial amygdala facilitates copulation in castrated male rats given estradiol systemically. *Horm Behav*; 16: 208-223.

Baum MJ, Vreeburg JTM. 1973. Copulation in castrated male rats following combined treatment with estradiol and dihydrotestosterone. *Science*; 182: 283-285.

Beach FA. 1967. Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior. *Physiol Rev*; 47: 289-316.

Beach FA, Holz AM. 1946. Mating behavior in male rats castrated at various ages and injected with androgen. *J Exp Zool*; 101: 91-142.

Beach FA, Holz AM. 1949. Effect of different concentrations of androgen upon sexual behavior in castrated male rats. *J Comp Physiol*; 42: 433-453.

Beach FA, Pauker RS. 1949. Effects of castration and subsequent androgen administration upon mating behavior in the male hamster. *Endocrinology*; 45: 211-221.

Beri R, Kumar N, Savage T, Benalcazar L, Sundaram K. 1998. Estrogenic and progestational activity of 7 α -methyl-19-nortestosterone, a synthetic androgen. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 67: 275-283.

Beyer C, Larsson K, Pérez-Palacios G, Morali G. 1973. Androgen structure and male sexual behavior in the castrated rat. *Horm Behav*; 4: 99-108.

Beyer C, Morali G, Naftolin F, Larsson K, Pérez-Palacios G. 1976. Effect of some antiestrogens and aromatase inhibitors on androgen induced sexual behavior in castrated male rats. *Horm Behav*; 7: 353-363.

Bitran D, Hull EM. 1987. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. *Neurosci Biobehav Rev*; 11: 365-389.

Bloch GJ, Davidson JM. 1968. Effects of adrenalectomy and experience on postcastration sex behavior in the male rat. *Physiol Behav*; 3: 461-465.

Bowers A, Ringold HJ, Derot E. 1958. Steroids CL. 19-nordihydrotestosterone derivatives. *J Am Chem Soc*; 80: 6115-6121.

Brenner PF. 1982. The pharmacology of progestogens. *J Reprod Med (Suppl)*; 27: 490-497.

Brown HC, Krishnamurthy S. 1972. Lithium-tri-sec-butyl borohydride. A new reagent for the reduction of cyclic and bicyclic ketones with superstereo selectivity. *J Am Chem Soc*; 94: 7159-7161.

Bruchovsky N, Wilson JD. 1968. The conversion of testosterone to 5 α -androstane-17 β -ol-3-one by rat prostate in vivo and in vitro. *J Biol Chem*; 243: 2012-2021.

Cabeza M, Vilchis F, Lemus AE, Díaz de León L, Pérez-Palacios G. 1995. Molecular interactions of levonorgestrel and its 5 α -reduced derivative with androgen receptors in hamster flanking organs. *Steroids*; 60: 630-635.

Catherino WH, Jeng MH, Jordan VC. 1993. Norgestrel and gestodene stimulate breast cancer cell growth through and oestrogen receptor mediated mechanism *Br J Cancer*; 67: 945-952.

Coffey DS. 1988. Androgen action and sex accessory tissues, En: *The Physiology of Reproduction*. E Knobil y J Neill (Eds). Raven Press, Nueva York; pp. 1081-1119.

Cravioto MC, Alvarado G, Canto-de-Cetina T, Bassol S, Oropeza G, Santos-Yung R, Valencia J, Palma Y, Fuziwara JL, Navarrete T, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G. 1997. A multicenter comparative study on the efficacy, safety, and acceptability of the contraceptive subdermal implants Norplant[®] and Norplant[®]-II. *Contraception*; 55: 359-367.

Chávez BA, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 1985. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem*; 22: 121-126.

Dahlöf LG, Larsson K. 1978. Copulatory performances of penile desensitized male rats as a function of prior social and sexual experience. *Behav Biol*; 24: 492-497.

Dash DS, Das S, Nanda V, Tripathy BB, Samal KC. 1988. Serum lipid profile in woman using levonorgestrel contraceptive implant, norplant-2. *Contraception*; 37: 371-382.

Davidson JM. 1969. Effects of estrogen on the sexual behavior of male rats. *Endocrinology*; 84: 1365-1372.

Davidson JM, Johnston P, Bloch GJ, Smith ER, Weick RF. 1971. Comparative responses to androgen at androgenic behavioral and other parameters. En: *Proceedings of the III International Congress of Hormonal Steroids*. James and L Martini (Eds.), Excerpta Medica, Amsterdam; pp. 727-730.

De Lean A, Munson PJ, Rodbard D. 1977. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: Application to bioassay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol*; 235: E97-E102.

Dewsbury DH. 1979. Description of sexual behavior in research on hormone-behavior interactions. En: *Endocrine Control of Sexual Behavior*. C Beyer (Ed.), Raven Press, Nueva York; pp. 1-32.

Dorfman RI, Shipley RA, 1956. *Androgens, Biochemistry, Physiology, and Clinical Significance*. New York: John Wiley and Sons (Eds); p. 590.

Dorrington JK, Amstrong DT. 1975. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17 β synthesis in cultured Sertolli cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*; 72: 2677-2681.

Eik-Nes KB. 1965. Biosynthesis and secretion of testicular steroids. En: *Handbook of Physiology*, sect. 7, vol 5, DW Hamilton, RO Greep (Eds.), Williams & Wilkins, Baltimore; pp. 95-115.

Etchegoyen G, Wolpert E, Galván E, Landeros J, Pérez-Palacios G. 1983. Effects of synthetic steroid contraceptives on biliary lipid composition of normal Mexican women. *Contraception*; 27: 591-603.

Feder HH. 1971. The comparative action of testosterone propionate and 5 α -androstane-17 β -ol-3-one propionate on the reproductive behavior, physiology and morphology of male rats. *J Endocrinol*; 51: 242-252.

Feder HH, Naftolin F, Ryan KJ. 1974. Male and female sexual responses in male rats given estradiol benzoate and 5 α -androstane-17 β -ol-3-one propionate. *Endocrinology*; 94: 136-141.

Fishman LM, Safarty GA, Wilson H, Lipsett MB. 1967. The role of the testis in oestrogen production. *Ciba Found Colloq Endocrinol*; 16: 156-165.

Garza-Flores J, Hall PE, Pérez-Palacios G. 1991. Long-acting hormonal contraceptives for women *J Steroid Biochem Mol Biol*; 40: 697-704.

Garza-Flores J, Vilchis F, García GA, Menjívar M, Pérez-Palacios G. 1986. A-ring reduction enhances the antagonistic potency of norethisterone. *Acta Endocrinol*; 112(2): 278-283.

Goldfien A. 1991. Hormonas gonadales e inhibidores. En: Farmacología Básica y Clínica. Katzung BG (Ed), El Manual Moderno, México; pp. 500-522.

Grumbach MM, Ducharme JR, Motoshok RE. 1959. On the fetal masculinizing action of certain oral progestins. J Clin Endocr Metab; 19(11): 1369-1380.

Grunt JA, Young WC. 1953. Consistency of sexual behavior patterns in individual male guinea pigs following castration and androgen therapy. J Comp Physiol; 46: 138-144.

Hall PF. 1988. Testicular steroid synthesis: Organization and regulation En: The Physiology of Reproduction. E Knobil and J Neill (Eds.), Raven Press, Nueva York; pp. 975-998.

Hart BL. 1978. Hormones, spinal reflexes and sexual behavior. En: Biological Determinants of Sexual Behavior. BJ Hutchison (Ed.), John Wiley and Sons, Chichester; pp. 319-347.

Heimer LK, Larsson K. 1964. Drastic changes in the mating behavior of male rat following lesions in the junction of diencephalon and mesencephalon. Experientia; 20: 460.

Hunt WL, Cheng WD. 1973. Sexual activity in castrated male rabbits after oral administration of 7 α -methyl-19-nortestosterone 17-(1-adamantoate). Physiol Behav; 893-896.

Kuhl H. 1996. Comparative pharmacology of newer progestogens. Drugs; 51:188-215.

Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson J-Å. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . Endocrinology; 138: 863-870.

Kumar N, Didolkar AK, Monder C, Bardin CW, Sundaram K. 1992. The biological activity of 7 α -methyl-19-nortestosterone is not amplified in male reproductive tract as is that of testosterone. Endocrinology; 130: 3677-3683.

Kurtz RG, Adler NT. 1973. Electrophysiological correlates of copulatory behavior in the male rat. Evidence for a sexual inhibitory process. J Comp Physiol; 84: 225-239.

LaMorte A, Kumar N, Bardin CW, Sundaram K. 1994. Aromatization of 7 α -metil-19-nortestosterone by human placental microsomes *in vitro*. J Steroid Biochem Mol Biol; 48: 297-303.

Larrea F, Moctezuma O, Pérez-Palacios G. 1984. Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. J Steroid Biochem; 20: 841-847.

Larrea F, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G. 1987. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. J Steroid Biochem; 27: 657-663.

Larsson K. 1956. Conditioning and sexual behavior in the male albino rat. Acta Psychol Gothoburg; 1: 1-269.

Larsson K. 1973. Sexual behavior: The results of an interaction. En: Contemporary Sexual Behavior: Critical Issues in the 1970's. J Money, J Zubin (Eds). John Hopkins University Press; pp. 33-51.

Larsson K. 1978. Experimental factors in the development of sexual behavior. En: Biological Determinants of Sexual Behavior. J Hutchinson (Ed.), John Wiley & Sons, Chichester; pp. 55-86.

Larsson K. 1979. Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. En: Endocrine Control of Sexual Behavior. C Beyer (Ed.), Raven Press, Nueva York; pp. 77-163.

Larsson K, Södersten P, Beyer C. 1973a. Induction of male sexual behavior by oestradiol benzoate in combination with dihydrotestosterone. J Endocrinol; 57: 563-564.

Larsson K, Södersten P, Beyer C. 1973b. Sexual behavior in male rats treated with estrogen in combination with dihydrotestosterone. Horm Behav; 4: 289-299.

Lemus AE, Enríquez J, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 1997. 5 α -reduction of norethisterone enhances its binding affinity for androgen receptors but diminishes its androgenic potency. J Steroid Biochem Mol Biol; 60: 121-129.

Lemus AE, Santillán R, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 2001. In vitro metabolism of gestodene in target organs: formation of A-ring reduced derivatives with oestrogenic activity. Europ J Pharmacol; 417: 249-256.

Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chávez BA, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 1992. Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. J Steroid Biochem Mol Biol; 41: 881-890.

Lemus AE, Zaga V, Santillán R, García GA, Grillasca I, Damián-Matsumura P, Jackson KJ, Cooney AJ, Larrea F, Pérez-Palacios G. 2000. The oestrogenic effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites. J Endocrinol; 165: 693-702.

Liao S, Liang T, Fang S, Castañeda E, Shao T-C. 1973. Steroid structure and androgenic activity. J Biol Chem; 248: 6154-6162.

Loza-Arredondo MC, Lemus AE, Pérez-Palacios G. 1988. Metabolismo de hormonas esteroides. En: Bioquímica e Inmunología, Vol. 2, JJ Hicks y JC Díaz-Zagoya (Eds.), Interamericana, México; pp. 53-92.

Luttge WG. 1979. Endocrine control of mammalian male sexual behavior: an analysis of the potential role of testosterone metabolites. En: Endocrine Control of Sexual Behavior. C Beyer (Ed), Raven Press, Nueva York; pp. 341-363.

Madlafousek J, Hlinak Z, Beran J. 1976. Decline of sexual behavior in castrated male rats: effects of female precopulatory behavior. Horm Behav; 7: 245-252.

Martini L. 1982. The 5α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocr Rev*; 3: 1-25.

McDonald PG, Beyer C, Newton F, Brien B, Baker R, Tan HS, Sampson C, Kitching P, Greenhill R, Pritschard D. 1970. Failure of 5α -dihydrotestosterone to initiate sexual behavior in castrated male rat. *Nature (Lond)*; 227: 964-965.

McEwen BS. 1976. Steroids receptors in neuroendocrine tissues: topography, subcellular distribution and functional implication. En: *Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology*. Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ (Eds.), Elsevier, Amsterdam; pp. 277-308.

McEwen BS, Davies PG, Parsons B, Pfaff DW. 1979. The brain as a target tissue for steroid hormone action. *Ann Rev Neurosci*; 2: 65-112.

McGinnis MY, Dreifuss RM. 1989. Evidence for a role of testosterone-androgen receptor in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology*; 124: 618-626.

McGinnis MY, Kaplan M, Lumia AR. 1987. Effects of an aromatase inhibitor and 5α -reductase inhibitor on male rat sexual behavior. En: 19th Conference on Reproductive Behavior, Tlaxcala, México; Abstract 31.

Meisel RL, Sachs BD. 1994. The physiology of male sexual behavior. En: *The Physiology of Reproduction*, Vol. 2. Knobil E, Neill JD, (Eds.). Nueva York, Raven Press; pp. 3-106.

Michael RP, Wilson M. 1974. Effects of castration and hormone replacement in fully adult male rhesus monkeys. *Endocrinology*; 95: 150-159.

Montgomery DC. 1991. Design and analysis of experiments. Belmont: John Wiley and Sons; p. 537.

Moralí G, Larsson K, Beyer C. 1977. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in castrated male rat by aromatase blockers. *Horm Behav*; 9: 203-213.

Moralí G, Lemus AE, Oropeza MV, García GA, Pérez-Palacios G. 1990. Induction of male sexual behavior by norethisterone: role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacol Biochem Behav*; 37: 477-484.

Moralí G, Oropeza MV, Lemus AE, Pérez-Palacios G. 1994. Mechanisms regulating male sexual behavior in the rat: role of 3α - and 3β -androstane diols. *Biol Reprod*; 51: 562-571.

Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Reddy VV, Flores F, Petro Z, Kuhn M, White R, Takaoka Y, Wolin L. 1975. The formation of estrogen by central neuroendocrine tissues. *Rec Prog Horm Res*; 31: 295-319.

Nikkilä EA, Tikkanen MJ, Kuusi T. 1983. Effects of progestins on plasma lipoproteins and heparine-releasable lipases. En: *Progesterone and Progestins*. CW Bardin, E Milgrom, P Mauvais-Jarvis (Eds.) Raven Press, Nueva York; p. 441.

Ogawa S, Robbins A, Kumar N, Pfaff DW, 1996. Sundaram K, Bardin CW. Effects of testosterone and 7 α -methyl-19-nortestosterone (MENT) on sexual and aggressive behaviors in two inbred strains of male mice. *Horm Behav*; 30: 74-84.

Pérez AE, Ortiz A, Cabeza M, Beyer C, Pérez-Palacios G. 1975. In vitro metabolism of ³H-androstenedione by the male rat pituitary, hypothalamus, and hippocampus. *Steroids*; 25: 53-62.

Pérez-Palacios G, Castañeda E, Gómez-Pérez F, Pérez AE, Gual C. 1970. In vitro metabolism of androgens in dog hypothalamus, pituitary, and limbic system. *Biol Reprod*; 3: 205-213.

Pérez-Palacios G, Chávez B, Escobar N, Vilchis F, Larrea F, Lince M, Pérez AE. 1981. Mechanism of action of contraceptive synthetic progestins. *J Steroid Biochem*; 15: 125-130.

Pérez-Palacios G, Fernández-Aparicio MA, Medina M, Zacarías-Villareal J, Ulloa-Aguirre A. 1981. On the mechanism of action of progestins. *Acta Endocrinol (Copenh)*; 97: 320-328.

Pérez-Palacios G, Larrea F, Cerbón M, Vilchis F. 1988. Mecanismos de acción de hormonas esteroides. En: *Bioquímica e Inmunología*, Vol. 2, JJ Hicks y JC Díaz-Zagoya (Eds.), Interamericana, México; pp. 93-125.

Pérez-Palacios G, Morali G, García GA, Cruz ML, Lemus AE. 1993. Behavioral effects of synthetic progestins. En: *Progress in Endocrinology*. Mornex R, Jaffiol C, Leclère J, (Eds.), Parthenon Publishing. Lancs; pp. 155-159.

Phillips A, Demarest K, Hahn DW, Wong F, McGuire JL. 1990. Progestational and androgenic receptor binding affinities and in vivo activities of norgestimate and other progestins. *Contraception*; 41: 399-410.

Piaggio G, von Hertzen H, Grimes DA, Van Look PFA. 1999. Timing of emergency contraception with levonorgestrel or the Yuzpe regimen. *Lancet*; 353: 729.

Rebar RW, Zeserson K. 1991. Characteristics of the new progestogens in combination oral contraceptives. *Contraception*; 44: 1-10.

Rosenblatt JS, Aronson LR. 1958. The decline of sexual behavior in male cats after castration with special reference to the role of prior sexual experience. *Behavior*; 12: 285-338.

Sachs BD, Barfield RJ. 1972. Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat. En: *Advances in the Study of Behavior*, Vol. 7. Rosenblatt JS, Hinde RA, Shaw E, Beer C, (Eds.). Nueva York: Academic Press; pp. 91-154.

Saltiel A. 1988. Reproducción equina. En: *Reproducción de Animales Domésticos*. Galina C, Saltiel A, Valencia J (Eds.), Noriega Editores, Limusa, México; pp. 311-326.

Santti R, Makela S, Strauss L, Korkman J, Kopstian NL. 1998. Phytoestrogens: Potential endocrine disruptors in males. *Toxicol Ind Health*; 14: 223-237.

Santillán R, Pérez-Palacios G, Reyes M, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I, Lemus AE. 2001. Assessment of the oestrogenic activity of the contraceptive progestin levonorgestrel and its non-phenolic metabolites. *Europ J Pharmacol*; 427: 167-174.

Schwartz U, Hammerstein J. 1974. The oestrogenic potency of various contraceptive steroids as determined by their effects on transcortin-binding capacity. *Acta Endocr Copenh*; 76: 159-171.

Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ. 1995a. Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: I. MCF-7 cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 55: 423-437.

Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ. 1995b. Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast cells: II. T47D cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 55: 439-444.

Siegel S. 1972. *Estadística no Paramétrica Aplicada a las Ciencias de la Conducta*. Trillas, México.

Sivin I, Stern J. 1994. Health during prolonged use of levonorgestrel 20 µg/d and the Copper TCu 380Ag intrauterine contraceptive devices: a multicenter study. *Fertil Steril*; 61: 70-77.

Smith H, Hughes GA, Douglas GH, Hartley D, McLoughlin BJ, Siddall JB, Wendt GR, Buzby Jr. GC, Herbst DR, Ledig KW, McMenamin JR, Pattison TW, Suida J, Tokolics J, Edgren RA, Jansen ABA, Gadsby B. 1963. Watson DHR, Phillips PC. Totally synthetic ($\pm$)-13-alkyl-3-hydroxy and methoxy-gona-1,3,5(10)-trien-17-ones and related compounds. *Experientia*; 19: 394-396.

Södersten P. 1973. Estrogen-activated sexual behavior in male rats. *Horm Behav*; 4: 247-256.

Södersten P, Damassa DA, Smith ER. 1977. Sexual behavior in developing male rats. *Horm Behav*; 8: 320-341.

Södersten P, Eneroth P, Hansson T, Mode A, Johansson D, Näslund B, Liang T, Gustafsson JA. 1986. Activation of sexual behavior in castrated rats: the role of oestradiol. *J Endocrinol*; 111: 455-462.

Södersten P, Gustafsson JA. 1980. Activation of sexual behavior in castrated rats with the synthetic androgen 17 β -hydroxy-17 α -methyl-estra-4,9,11-triene-3-one (R 1881). *J Endocrinol*; 87: 279-283.

Stanczyk FZ, Roy S. 1990. Metabolism of levonorgestrel, norethindrone, and structurally related contraceptive steroids. *Contraception*; 42: 67-95.

Still WC, Kahan M, Mitra A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution *J Org Chem*; 43: 2923-2925.

Stone CP. 1939. Copulatory activity in adult male rats following castration and injections of testosterone propionate. *Endocrinology*; 24: 165-174.

Suchowsky GK, Junkmann K. 1961. A study of the virilizing effect of progesterone in the female rat fetus. *Endocrinology*; 68: 341-349.

Sundaram K, Keizer-Zucker A, Thau RB, Bardin CW. 1987. Reversal of testicular function after prolonged suppression with LHRH agonist in rhesus monkeys. *J Androl*; 8: 103-107.

Thau R, Jackanicz T. 1994. Contraceptive rings: a user-controlled long-acting method for family planning. In: *Contraceptive research and development 1984 to 1994. The road from Mexico City to Cairo and beyond*. Van Look PFA, Pérez-Palacios G (Eds.). Oxford University Press. Oxford; pp. 107-120.

Thompson ML, McGill TE, McIntosh SM, Manning A. 1976. The effects of adrenalectomy on the sexual behavior of castrated and intact BDF1 mice. *Physiol Behav*; 24: 519-522.

Valencia J, Bustamante G. 1988. Ovinos y caprinos. En: *Reproducción de Animales Domésticos*. Galina C, Saltiel A, Valencia J (Eds.), Noriega Editores, Limusa, México; pp. 347-360.

Van der Burg B. 1991. Sex steroids and growth factors in mammary cancer. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*; 125: 38-41.

Van der Burg B, Kalkhoven E, Isbrücker L, de Laat SW. 1992. Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells under growth factor-defined conditions. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 42: 457-465.

Vida JA. 1960. *Androgens and Anabolic Agents, Chemistry and Pharmacology*. Academic Press, Nueva York.

Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, García GA, Angeles A, Pérez-Palacios G. 1986. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J Steroid Biochem*; 24: 525-531.

Whalen RE, Luttge WG. 1971. Testosterone, androstendione and dihydrotestosterone: effects on mating behavior of male rats. *Horm Behav*; 2: 117-125.

Whalen RE, Yahr P, Luttge WG. 1985. The role of metabolism in hormonal control of sexual behavior. En: *Handbook of Behavioral Neurobiology*, Adler N, Pfaff D, Goy RW, (Eds.). Nueva York: Plenum Press; pp. 609-663.

Wilson JD, Glyona RE. 1970. The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction. *Rec Prog Horm Res*; 26: 309-336.

Wood RI, Bean AR, Sundaram K, Kumar N, Bardin CW. 1996. Testosterone and 7 α -methyl-19-nortestosterone (MENT) facilitates sexual behavior in the male syrian hamster: 5 α -reduced androgens are not essential for mating. *Horm Behav*; 30: 131-137.

World Health Organization. 1998. Task force on post-ovulatory methods of fertility regulation. Randomized controlled trial of levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. *Lancet*; 352: 428-433.

XI. PUBLICACIONES RESULTANTES DE ESTA TESIS

Induction of Male Sexual Behavior in the Rat by 7 α -Methyl-19-Nortestosterone, an Androgen That Does Not Undergo 5 α -Reduction¹

GABRIELA MORALÍ,³ ANA ELENA LEMUS,⁴ RAUL MUNGUÍA,³ MARCELA ARTEAGA,³ GREGORIO PÉREZ-PALACIOS,^{2,5} KALYAN SUNDARAM,⁶ NARENDER KUMAR,⁶ and C. WAYNE BARDIN⁶

*Division of Pharmacology,³ Biomedical Research Unit IMSS, Department of Reproductive Biology,⁴ UAM-Iztapalapa, and National Institute of Nutrition S. Zubirán,⁵ Mexico City, Mexico 14000
The Population Council,⁶ New York, New York 10021*

ABSTRACT

The synthetic steroid 7 α -methyl-19-nortestosterone (MENT) binds with high affinity to the androgen receptor and exerts biological effects at some peripheral target tissues with a potency greater than that of naturally occurring androgens. In vivo, MENT does not undergo enzymatic 5 α -reduction and as a consequence, its biologic action on prostate and other organs of the male reproductive tract is not amplified as is that of testosterone (T). Thus, in castrated rats, a dose of MENT that will maintain normal muscle mass and gonadotropin levels will not maintain normal prostate and seminal vesicle weights. To investigate the ability of MENT to restore male sexual behavior in castrated rats, varying doses of MENT acetate were administered for 4 wk by use of s.c. mini-osmotic pumps. Animals treated with T acetate (200 μ g/day) and nontreated intact animals served as positive controls, while a group of animals receiving vehicle alone were the negative controls. Steroid acetates are rapidly converted to T and MENT in blood. Appropriate steroid delivery was assessed by measurement of serum androgen concentrations. Male behavioral parameters were recorded twice per week. At the end of treatment, the weights of sex accessory organs were also recorded. The administration of MENT acetate at daily doses of 100 μ g and 10 μ g induced full copulatory behavior in a manner similar to that observed with doses of 200 μ g T acetate. Analysis of detailed parameters of sexual activity revealed that the higher dose of MENT (100 μ g/day) restored full ejaculatory behavior comparable with that observed in nontreated intact animals, whereas animals receiving 10 μ g/day MENT exhibited longer ejaculation latencies and postejaculatory intervals that were similar to those of T acetate (200 μ g/day)-treated animals. It is significant that the lower dose of MENT acetate (5 μ g/day) was also able to stimulate ejaculatory behavior in most animals, although in a smaller proportion of tests and with longer latencies. The results demonstrate that MENT acetate was highly potent in promoting sexual behavioral activity as determined in castrated rats. We conclude that activation of male sexual behavior in rats does not require A-ring reduction of the androgen molecule.

INTRODUCTION

Even though the mechanisms involved in the hormonal regulation of male sexual behavior in rodents have been extensively investigated, the precise role of androgens vs. estrogens in this phenomenon has remained a controversial issue [1-7]. Furthermore, studies on activation of male sexual behavior with dihydrotestosterone (DHT), the 5 α -reduced metabolite of testosterone (T), have yielded conflicting results [1, 7-9]. Reports from several laboratories [10-13] have demonstrated that DHT displays a synergistic effect when administered simultaneously with estradiol-17 β ; however, recent evidence seems to indicate that under physiological circumstances, testosterone, acting via the androgen receptor, is indeed the key agent responsible for activating the neurons responsible for male behavior [14].

Studies using synthetic steroids have been instrumental in identifying alternative modes of action, even though these modes of action may differ from those exhibited by naturally occurring hormones [15-17]. Recently, we have documented that norethisterone (NET), a nonphenolic, nonaromatizable synthetic progestin, activates rat male sexual behavior through its intrinsic androgenic potency coupled with the estrogen-like potency of its 3 β ,5 α - and 3 α ,5 α -tetrahydro metabolites; these findings provide evidence that NET does not require enzyme-mediated aromatization for stimulating male copulatory activity [18].

The present study was aimed at investigating the activity of the potent synthetic androgen 7 α -methyl-19-nortestosterone (MENT) [19, 20] in restoring male sexual behavior in long-term castrated adult rats. Such a study was of interest since this synthetic steroid does not undergo 5 α -reduction in vitro or in vivo [21, 22].

Further interest in evaluation of the behavioral potency of MENT stemmed from the fact that this synthetic androgen is highly effective in suppressing pituitary gonadotropins [22], is higher in myotropic activity than in prostatic growth-promoting activity [22, 23], and may be suitable for male fertility regulation as well as for androgen replacement therapy.

Accepted May 3, 1993.

Received February 9, 1993.

¹This work was supported in part by The Rockefeller Foundation Grant RF 90016 to the National Institute of Nutrition S. Zubirán and by The National Institute of Child Health and Human Development Grant U54 HD29990 to the Population Council.

²Correspondence: Gregorio Pérez-Palacios, M.D., Professor and Chairman, Department of Reproductive Biology, National Institute of Nutrition S. Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, México, D.F., 14000, México. FAX: (525) 655-1076 and (525) 655-9859.

MATERIALS AND METHODS

Steroids

MENT acetate (7 α -methyl-3-oxo-4-estrene-17 β -yl acetate) was custom synthesized by Steraloids, Inc., Wilton, NH. T acetate was purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. These steroids were dissolved in 30% Molecusol (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin; Pharmatec, Inc., Alachua, FL) in bacteriostatic water and continuously administered for 28 days via Alzet mini-osmotic pumps, model 2002 (ALZA Corp., Palo Alto, CA) under sterile conditions. Pumps were filled with steroid solutions at appropriate concentrations and implanted s.c. in the interscapular region of animals. To maintain 28-day treatment, the pumps were replaced at the end of 14 days.

Animals

Adult male Wistar rats (425–475 g), bred in our laboratory, were selected for the study on the basis of their displaying complete sexual behavior including ejaculation in at least three screening tests. Animals were housed in individual cages with food and water available ad libitum and were maintained under a reversed light-dark cycle (14L:10D; lights-on at 1830 h). Rats were castrated under ether anesthesia at least 60 days prior to experiments. Evidence that no sexual activity was retained was obtained in at least two behavioral tests before steroid treatment. An additional group of age-matched intact rats served as positive controls.

Experimental Design

At initiation of the 4-wk study, each animal received a pump for steroid delivery for 14 days. The pumps were replaced at the end of 2 wk. Animals were assigned to one of the following experimental groups: group 1 ($n = 11$), which received 100 μ g/day MENT; group 2 ($n = 10$), which received 10 μ g/day MENT; and group 3 ($n = 6$), which received 5 μ g/day MENT. Group 4 ($n = 10$), receiving T acetate (200 μ g/day), and group 5 ($n = 6$), consisting of intact, nontreated animals, served as positive controls. Group 6 ($n = 8$) animals, treated with vehicle only, acted as negative controls.

Behavioral Assessment

Male sexual behavior was evaluated by standardized techniques [1, 4, 24, 25]. Tests began on the day of implantation of the mini-osmotic pumps (test 0) and continued thereafter twice per week for 4 wk. Tests were performed during the dark phase of the cycle under dim red light. Rats were placed in plexiglas observation cages (60 $\times$ 60 $\times$ 42 cm), and after a 5-min adaptation period, each was presented with a receptive female. Stimulus females received 5 μ g estradiol benzoate three times per wk and 0.5 mg progesterone 4 h before testing. The number of mounts

and intromissions as well as the mount, intromission, and ejaculation latencies and the postejaculatory interval were recorded. The test was ended in one of the following circumstances: 1) at 15 min after the presentation of the female to the male if no intromission had occurred by that time; 2) at 30 min after the first intromission if no ejaculation had occurred; or 3) after the first intromission following ejaculation.

The rate of copulation and its efficiency were evaluated as the interintromission interval and the hit rate, respectively. The interintromission interval is the result of dividing the ejaculation latency by the number of intromissions or of dividing 30 min by the number of intromissions when no ejaculation occurs. The hit rate is the result of dividing the number of intromissions by the total number of mounts plus intromissions displayed by the animal in a given test; it renders an estimation of the efficiency of the consummatory mechanism [24, 25]. After completion of the last behavioral test, blood samples were withdrawn by cardiac puncture and centrifuged, and serum was stored at -20°C until assayed. Serum levels of T and MENT were determined by specific radioimmunoassays described earlier [15, 26]. Animals were killed by overexposure to ether, and ventral prostate and seminal vesicles were removed and weighed to the nearest 0.1 mg.

Statistical Tests

Proportions of sexually active animals and proportions of tests in which animals were active were analyzed by Fisher's test and χ^2 test; the number and latencies of behavioral responses and the organ weights were analyzed by the Mann-Whitney U -test and Student's t -test, respectively. Group differences were considered significant when $p < 0.05$ was reached (two-tailed test) [27].

RESULTS

Administration of MENT to long-term castrated rats induced male sexual behavior in a dose-dependent manner. Indeed, MENT at daily doses of 100 μ g, 10 μ g, and even 5 μ g was effective in restoring mounting, intromission, and ejaculation activities in most rats (84–100%), while at a dose level of 1 μ g/day it was completely ineffective. Castrated animals receiving T (200 μ g/day), used as the positive control group, displayed a full copulatory behavioral pattern identical to that observed in the age-matched intact, untreated rats (Fig. 1, Table 1).

The occurrence of mounting, intromission, and ejaculation in animals treated with 100 μ g/day MENT was identical to that seen both in animals treated with 200 μ g/day T and in intact, nontreated animals, as assessed by the proportion of positive tests (Table 1). Similar results were observed in animals treated with 10 μ g/day MENT, although a slight delay in the appearance of ejaculatory responses over the course of treatment was observed (Fig. 1). A lower

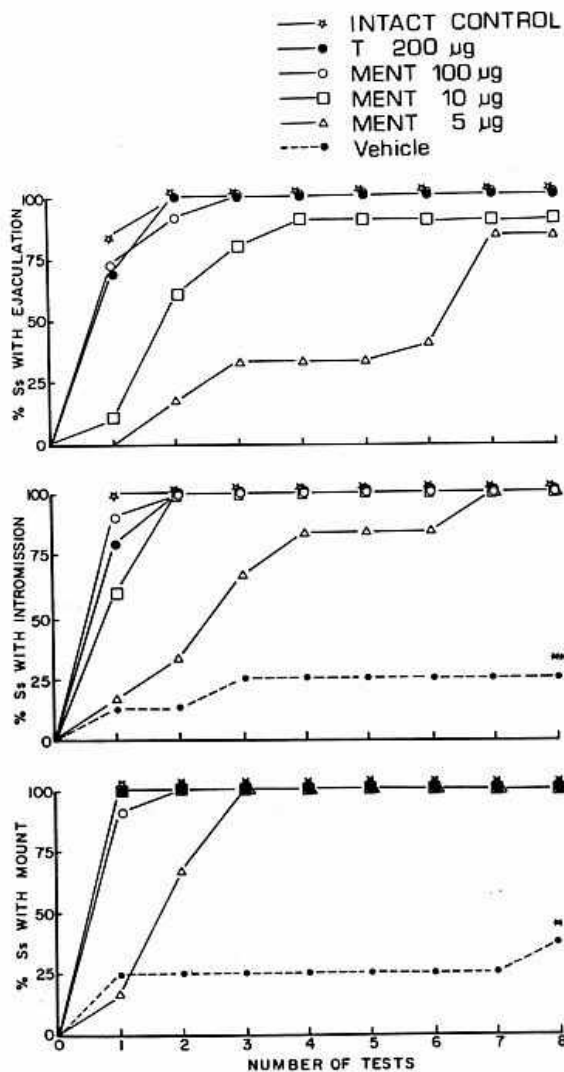


FIG. 1. Cumulative percentage of castrated rats that showed mounting, intromission, and ejaculation during 4 wk of treatment with testosterone acetate (T) (200 μ g/day), with MENT acetate (MENT) (100, 10, or 5 μ g/day), or with vehicle. Intact, untreated rats served as a control group. Vehicle-treated animals did not exhibit ejaculation. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ as compared to the T-treated group.

dose of MENT (5 μ g/day) was less effective (Fig. 1). When MENT was administered at a daily dose of 1 μ g/day to a group of four rats, no effects upon copulatory behavior were seen, although sporadic mounting activity was elicited (data not shown).

Detailed analysis of copulatory parameters further demonstrated that the potent behavioral activity of MENT was

dose-dependent. Full restoration of copulatory behavior in long-term castrated animals to levels similar to those exhibited by intact males was attained with 10 μ g/day MENT as revealed by the interintromission interval, the hit rate, and the mount and ejaculation latencies (Table 1). Moreover, the intromission latencies in these treated rats were shorter than those of age-matched intact animals, indicating a better copulatory performance. Animals treated with 10 μ g/day MENT exhibited copulatory parameters comparable to those of the T (200 μ g/day)-treated group. Administration of MENT at 100 μ g/day resulted in an overreplacement; thus, animals receiving this dose exhibited significantly shorter interintromission intervals and ejaculation latencies, and significantly higher hit rates, than those observed in both untreated intact rats and testosterone-treated castrates. Administration of MENT at 5 μ g/day elicited full sexual behavior in castrated animals; however, the copulatory performance was significantly slower than that exhibited by intact, untreated rats and castrates treated either with T or with MENT at higher doses, as indicated in Table 1.

The effect of MENT administration upon weights of ventral prostate and seminal vesicles in the study groups was also dose-dependent, as shown in Figure 2. Treatment with MENT at 100 μ g/day was more effective than 200 μ g/day T in inducing a significant increase in ventral prostate ($p < 0.01$) and seminal vesicle ($p < 0.05$) weights. However, the weights of sex accessories in these animals were lower than those of intact nontreated control animals. At 10 μ g/day, MENT also induced a significant increase in ventral prostate and seminal vesicles weights, although with less potency, whereas at 5 μ g/day MENT was ineffective.

Measurement of serum MENT (ng/ml) at the end of the treatment period revealed that concentrations were dose related in all experimental groups (mean $\pm$ SD): group 1, 0.75 ± 0.5 ; group 2, 0.17 ± 0.07 ; and group 3, 0.08 ± 0.02 . Serum MENT concentration in individual animals within each treated group did not correlate with their behavioral performance. Serum T level in the T-treated group was 2.31 ± 0.25 ng/ml.

Statistical analysis via the Allfit computer program [28], used to compare the dose-response effects of MENT with data from intact untreated rats and T-treated castrates from this and previous studies, indicated that MENT was three to four times more potent than T in restoring sex accessory organ weight. To assess sexual behavior restoration, the data from MENT- and T-treated animals were compared with those from the intact rats used as controls. The results indicated that the potency of MENT was approximately 20 times higher than that of T.

DISCUSSION

The results presented herein provide evidence that the synthetic androgen MENT is an effective agent for restoring full male copulatory behavior in long-term castrated rats,

TABLE 1. Parameters of sexual activity displayed by castrated male rats at the end of various treatments.

Parameters of sexual activity	Intact untreated (n = 6)	Testosterone 200 µg/day (n = 10)	MENT 100 µg/day (n = 11)	MENT 10 µg/day (n = 10)	MENT 5 µg/day (n = 6)	Vehicle (n = 8)
% Rats with mount	100	100	100	100	100	38 ^{ba}
% Rats with intromission	100	100	100	100	100	25 ^{cy}
% Rats with ejaculation	100	100	100	90	84	0 ^{ca}
% Tests with mount	93	100	97	100	79 ^b	20 ^{ca}
% Tests with intromission	90	98	95	91	63 ^{ca}	5 ^{ca}
% Tests with ejaculation	87	94	92	75 ^b	40 ^{cy}	0 ^{ca}
Interintromission interval (sec)*	84.60 ± 6.40	54.20 ± 3.39	31.50 ± 1.45 ^{ba}	78.80 ± 3.97*	130.60 ± 14.80*	373.27 ± 28.34 ^{ba}
Hit rate*	0.54 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.68 ± 0.01 ^{ba}	0.52 ± 0.01	0.37 ± 0.02 ^{ba}	0.25 ± 0.02 ^{ba}
Mount latency (min)†	1.02	0.63	0.27	0.89	3.22 ^b	8.82*
Intromission latency (min)†	3.47*	0.84	0.70*	1.68 ^y	4.82 ^{ba}	6.91 ^{cy}
Ejaculation latency (min)†	6.81	10.29	5.87 ^{ba}	9.31	20.23 ^{ba}	—
Post-ejaculatory interval (min)†	5.30	7.06	5.76*	7.08	10.60 ^b	—

**p* < 0.05, ^b*p* < 0.01, ^c*p* < 0.001, as compared to the 200-µg T-treated group.^y*p* < 0.05, ^{ca}*p* < 0.01, ^{ba}*p* < 0.001, as compared to the intact, untreated group.

*Mean ± SEM.

†Median.

with a potency remarkably higher than that of testosterone. MENT has been shown to restore ejaculatory response to electrical stimulation in rhesus monkeys in which spermatogenesis and ejaculatory response has been abolished by continuous administration of a potent LHRH agonist via osmotic pumps [29]. It has also been reported that 7 α -methyl-19-nortestosterone 17-(1-adamantoate), another MENT ester, was able to restore sexual activity in castrated male rabbits [30]. The present study compared the behavioral potency of MENT, continuously administered at four dose levels, with an effective behavioral replacement dose of T (200 µg/

day) in long-term castrated rats. Steroids were acetylated at position 17 to enhance their release from implant delivery systems.

When MENT was given at 10 µg/day, it elicited complete male copulatory behavior with an efficiency comparable to that observed in animals treated with the replacement dose of testosterone. Both MENT (10 µg/day)- and T (200 µg/day)-treated groups exhibited sexual activity parameters identical to those observed in intact, nontreated animals. Administration of MENT at a higher dose (100 µg/day) resulted in a behavioral overreplacement in long-term castrated rats. In fact, animals receiving MENT at this dose level presented significantly shorter interintromission intervals and ejaculation latencies and higher hit rates, as compared to both T-treated and intact untreated rats. Experiments using lower doses of MENT revealed that this synthetic androgen was still effective at the dose of 5 µg/day in eliciting sexual behavior, although with lower potency, whereas the dose of 1 µg/day was not effective at all. From these data it was concluded that the behavioral potency of MENT was dose-dependent and that its effect for full restoration of copulatory behavior in the castrated rat was approximately 20 times greater relative to T.

The striking observation that MENT—an androgen that does not undergo 5 α -reduction—activates the neural substrate for expression of male sexual behavior with a potency greater than that of testosterone, suggests strongly that enzyme-mediated 5 α -reduction of androgens may not be required to exert this effect. Indeed, the metabolism of MENT differs from that of T in that MENT is not bioconverted to 5 α -reduced metabolites [21, 22]. This pharmacological observation is in line with the data of McGinnis and Dreifuss [14], who have proposed that under physiological circumstances, testosterone rather than dihydrotestosterone plays

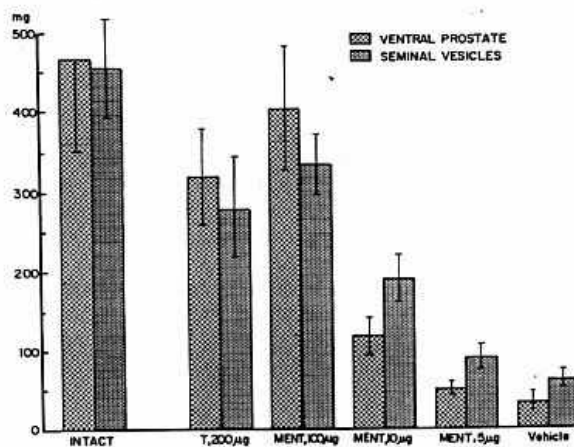


FIG. 2. Effect of 4 wk of treatment with testosterone acetate (T) (200 µg/day), MENT acetate (MENT) (100, 10, or 5 µg/day), or vehicle on accessory sex organ growth as compared to the organ weights of a group of intact rats (mean ± SD).

a major role in the regulation of masculine sexual behavior in the rat. Further support for this concept derives from findings that administration of 5 α -reductase inhibitors does not suppress male sexual behavior in several species [31–33].

The higher behavioral potency of MENT as compared with T correlates well with its potent antigonadotropic and anabolic bioactivities in the castrated rat. Thus, MENT is 25 times more effective than T for suppressing serum gonadotropin levels and 11 times more potent for increasing the weights of bulbocavernosus plus levator ani muscles [22].

Examination of sex accessories in the present study revealed that MENT induced a dose-dependent increase in prostate and seminal vesicle weights, as has been previously reported [22]. The steroid responsiveness of sex accessories in the present study differed from that reported previously [22] because in the present study, the animals' body weight was higher and the postcastration interval before initiation of androgen treatment was longer. Interestingly, the MENT-induced androgenic effect was significantly less potent than the behavioral effect. Thus, a dose of MENT (10 μ g/day) that was sufficient to restore full behavioral function in castrates elicited a rather minor androgenic effect in the reproductive tract. Furthermore, MENT at a higher dose (100 μ g/day) did not completely restore sex accessory weight. The observation that MENT was only 3–4 times more effective than T in restoring prostate and seminal vesicle weights confirms the concept that the biological activity of this synthetic androgen in these organs is not amplified due to its metabolic features.

In summary, the results of this study demonstrate that MENT displays a remarkably high potency in inducing male sexual behavior with relatively low effect on the prostate. These data provide additional support for the potential clinical use of this synthetic androgen as a therapeutic agent.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge Ms. B. Alarcón for manuscript typing.

REFERENCES

- Beyer C, Larsson K, Pérez-Palacios G, Morali G. Androgen structure and male sexual behavior in the castrated rat. *Horm Behav* 1973; 4:99–108.
- Beyer C, Morali G, Naftolin F, Larsson K, Pérez-Palacios G. Effect of some antiestrogens and aromatase inhibitors on androgen induced sexual behavior in castrated male rats. *Horm Behav* 1976; 7:353–363.
- Morali G, Larsson K, Beyer C. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. *Horm Behav* 1977; 9:203–213.
- Morali G, Larsson K, Pérez-Palacios G, Beyer C. Testosterone, androstenedione and androstenediol: effects on the initiation of mating behavior of inexperienced castrated male rats. *Horm Behav* 1974; 5:103–110.
- Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol & Metab* 1971; 33:368–370.
- Pérez-Palacios G, Larsson K, Beyer C. Biological significance of the metabolism of androgens in the central nervous system. *J Steroid Biochem* 1975; 6:999–1006.
- Whalen RE, Yahr P, Luitge WG. The role of metabolism in hormonal control of sexual behavior. In: Adler N, Pfaff D, Goy RW (eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology*. New York: Plenum Press; 1985: 609–663.
- McDonald P, Beyer C, Newton F, Brien B, Baker R, Tan HS, Sampson C, Kitching P, Greenhill R, Prischard D. Failure of 5 α -dihydrotestosterone to initiate sexual behavior in the castrated male rat. *Nature (Lond)* 1970; 227:964–965.
- Sachs BD, Meisel RL. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd., 1988: 1393–1485.
- Baum MJ, Vreeburg JTM. Copulation in castrated male rats following combined treatment with estradiol and dihydrotestosterone. *Science* 1973; 182:283–285.
- Larsson K, Södersten P, Beyer C. Induction of male sexual behaviour by oestradiol benzoate in combination with dihydrotestosterone. *J Endocrinol* 1973; 57:563–564.
- Larsson K, Södersten P, Beyer C. Sexual behavior in male rats treated with estrogen in combination with dihydrotestosterone. *Horm Behav* 1973; 4:289–299.
- Feder HH, Naftolin F, Ryan KJ. Male and female sexual responses in male rats given estradiol benzoate and 5 α -androstano-17 β -ol-3-one propionate. *Endocrinology* 1974; 94:136–141.
- McGinnis MY, Dreifuss RM. Evidence for a role of testosterone-androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology* 1989; 124:618–626.
- Kumar N, Didolkar AK, Ladd A, Thau R, Monder C, Bardin CW, Sundaram K. Radioimmunoassay of 7 α -methyl-19-nortestosterone and investigation of its pharmacokinetics in animals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37:587–591.
- Parrott RF. Effects of 17 β -hydroxy-4-androsten-19-ol-3-one (19-hydroxytestosterone) and 5 α -androstano-17 β -ol-3-one (dihydrotestosterone) on aspects of sexual behaviour in castrated male rats. *J Endocrinol* 1974; 61:105–115.
- Johnson WA, Tiefer L. Mating in castrated male rats during combined treatment with estradiol benzoate and fluoxymesterone. *Endocrinology* 1974; 95:912–915.
- Morali G, Lemus AE, Oropeza MV, García GA, Pérez-Palacios G. Induction of male sexual behavior by norethisterone: role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 37:477–484.
- Campbell JA, Babcock JC. The synthesis of some 7 α - and 7 β -methyl steroid hormones. *J Am Chem Soc* 1959; 81:4069–4074.
- Liao S, Liang T, Fang S, Castañeda E, Shao T-C. Steroid structure and androgenic activity. *J Biol Chem* 1973; 248:6154–6162.
- Agarwal AK, Monder C. In vitro metabolism of 7 α -methyl-19-nortestosterone by rat liver, prostate, and epididymis. *Endocrinology* 1988; 123:2187–2193.
- Kumar N, Didolkar AK, Monder C, Bardin CW, Sundaram K. The biological activity of 7 α -methyl-19-nortestosterone is not amplified in male reproductive tract as is that of testosterone. *Endocrinology* 1992; 130:3677–3683.
- Segaloff A. The enhanced local androgenic activity of 19-nor steroids and stabilization of their structure by 7 α - and 17 α -methyl substituents to highly potent androgens by any route of administration. *Steroids* 1963; 1:299–315.
- Sachs BD, Barfield RJ. Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat. In: Rosenblatt JS, Hinde RA, Shaw E, Beer C (eds.), *Advances in the Study of Behavior*, vol 7. New York: Academic Press; 1976: 91–154.
- Larsson K. Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In: Beyer C (ed.), *Endocrine Control of Sexual Behavior*. New York: Raven Press Ltd., 1979: 77–163.
- Wang NG, Sundaram K, Pavlon SN, Rivier J, Vale W, Bardin CW. Mice are insensitive to the antiestrogenic effects of LHRH agonists. *Endocrinology* 1983; 112:331–335.
- Siegel S. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York: McGraw-Hill; 1956.
- De Lean A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol* 1977; 235:E97–E102.
- Sundaram K, Keizer-Zucker A, Thau RB, Bardin CW. Reversal of testicular function after prolonged suppression with an LHRH agonist in rhesus monkeys. *J Androl* 1987; 8:103–107.
- Hunt WL, Cheng WD. Sexual activity in castrated male rabbits after oral administration of 7 α -methyl-19-nortestosterone 17-(1-adamantate). *Physiol Behav* 1973; 11:893–896.
- Södersten P, Eneroth P, Hansson T, Mode A, Johansson D, Nilsson B, Liang T, Gustafsson J-A. Activation of sexual behaviour in castrated rats: the role of oestradiol. *J Endocrinol* 1986; 111:455–462.
- Alexandre C, Balthazart J. Effects of metabolism inhibitors, antiestrogens and antiandrogens on the androgen and estrogen induced sexual behavior in Japanese quail. *Physiol Behav* 1986; 38:581–591.
- McGinnis MY, Kaplan M, Lumia AR. Effect of an aromatase inhibitor and a 5 α -reductase inhibitor on male rat sexual behavior. In: 19th Conference on Reproductive Behavior; 1987; Tlaxcala, México. Abstract 31.

Hormone-like behavioral effects of levonorgestrel and its metabolites in the male rat

G. Morali^a, A.E. Lemus^{b,c}, R. Munguía^a, G.A. García^d, I. Grillasca^d, G. Pérez-Palacios^{e,*}

^aPharmacology Medical Research Unit, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, DF 06725, Mexico

^bDepartment of Reproductive Biology, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City, DF 14000, Mexico

^cInstituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, DF 09340, Mexico

^dFaculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, DF 04510, Mexico

^eReproductive Health Research, Training and Communication Unit, Faculty of Medicine, National University of Mexico and Mexico City General Hospital, Dr. Balmis No. 148, Mexico City, DF 06726, Mexico

Received 20 February 2002; received in revised form 24 June 2002; accepted 10 July 2002

Abstract

Levonorgestrel (LNG), a contraceptive progestin, exhibits, besides its progestational activity, other hormone-like effects at the peripheral level. To assess whether LNG and its metabolites exert androgenic and/or estrogenic actions at the central nervous system (CNS), their effects on male sexual behavior in castrated rats were examined. LNG, 5 α -dihydro LNG (5 α LNG), and the 3 α ,5 α - and 3 β ,5 α -tetrahydro derivatives of LNG (3 α LNG and 3 β LNG, respectively) were administered for 3 weeks either alone (1000 μ g/day) or in combination (300 μ g/day) with 5 α -dihydrotestosterone (DHT, 300 μ g/day) or with estradiol-17 β (E₂, 5 μ g/day). Copulatory behavior was assessed twice per week and sex accessory organs weights recorded at the end of treatments. LNG restored full copulatory behavior comparable to that of testosterone treated animals, although with a slight delay, whereas 5 α LNG induced male sexual behavior in a significantly lower number of subjects. 3 β LNG and 3 α LNG induced mounting but failed to restore intromission and ejaculation. Combined LNG + E₂ treatment fully activated mounting and intromission, but ejaculation was only partially restored. Combined 5 α LNG + E₂ treatment and the combinations of 3 α LNG or 3 β LNG with E₂ were significantly less effective, activating fewer intromissions and ejaculations. 3 α LNG and 5 α LNG, in combination with DHT, restored male sexual behavior. LNG, but not its metabolites, induced a significant increase on the weight of sex accessory organs. The overall results demonstrated that high doses of LNG induce a potent androgen agonistic behavioral effect and that its A-ring reduction diminishes this potency and enables a shift towards a weak estrogen-like effect.

© 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Male sexual behavior; Levonorgestrel; Contraceptive progestins; Levonorgestrel metabolites; Androgenic effects of levonorgestrel

1. Introduction

Levonorgestrel (n-(1-norgestrel), LNG) is a totally synthetic 13 β -ethyl-substituted 19-nor progestin (Smith et al., 1963) widely used either alone or combined with ethinyl-estradiol in a variety of contraceptive formulations including pills, injectables, medicated intrauterine devices, subdermal implants, vaginal rings, and more recently, emergency contraceptive pills (Ball et al., 1991; Cravioto et al., 1997; Garza-Flores et al., 1991; Piaggio et al., 1999; Sivin and Stern, 1994; Thau and Jackanicz, 1994; WHO, 1998). LNG

induces hormone agonistic effects other than that of its progestational activity. Indeed, LNG specifically binds with high affinity to the mineralocorticoid (Kuhl, 1996; Rebar and Zeserson, 1991) and androgen intracellular receptors (Cabeza et al., 1995; Lemus et al., 1992; Phillips et al., 1990) and exerts the corresponding effects with a relatively high potency. On the contrary, the estrogen-like actions of LNG have remained as a controversial issue. It has been well documented that LNG, at high concentrations, induces cell growth and proliferation of breast cancer cells (Catherino et al., 1993; Schoonen et al., 1995a,b; Van der Burg, 1991; Van der Burg et al., 1992)—an effect that is precluded by steroidal anti-estrogens but not by anti-progestins (Catherino et al., 1993)—suggesting that the estrogen-like effects of LNG are mediated by the estrogen receptor (ER).

* Corresponding author. Tel./fax: +52-55-5588-0100x1441.

E-mail address: gperezpal@aol.com (G. Pérez-Palacios).

However, a number of experimental evidences have demonstrated that the LNG molecule does not interact at all with ERs (Kuhl, 1996; Rebar and Zeserson, 1991) indicating that this synthetic progestin does not induce estrogen agonistic effects.

A number of studies have shown that LNG undergoes extensive peripheral metabolism (Stanczyk and Roy, 1990) and biotransformation to A-ring-reduced derivatives at hor-

mone-sensitive organs (Cabeza et al., 1995; Lemus et al., 1992), in a similar manner to that reported for naturally occurring androgens (Martini, 1982; Pérez et al., 1975; Pérez-Palacios et al., 1970) and for other synthetic 19-nor progestins (Larrea et al., 1987; Lemus et al., 2001). The observation that A-ring reduction of progestins of the 19-nor series may modulate the expression of their hormone-like effects (Lemus et al., 2000; Pérez-Palacios et al., 1993) at

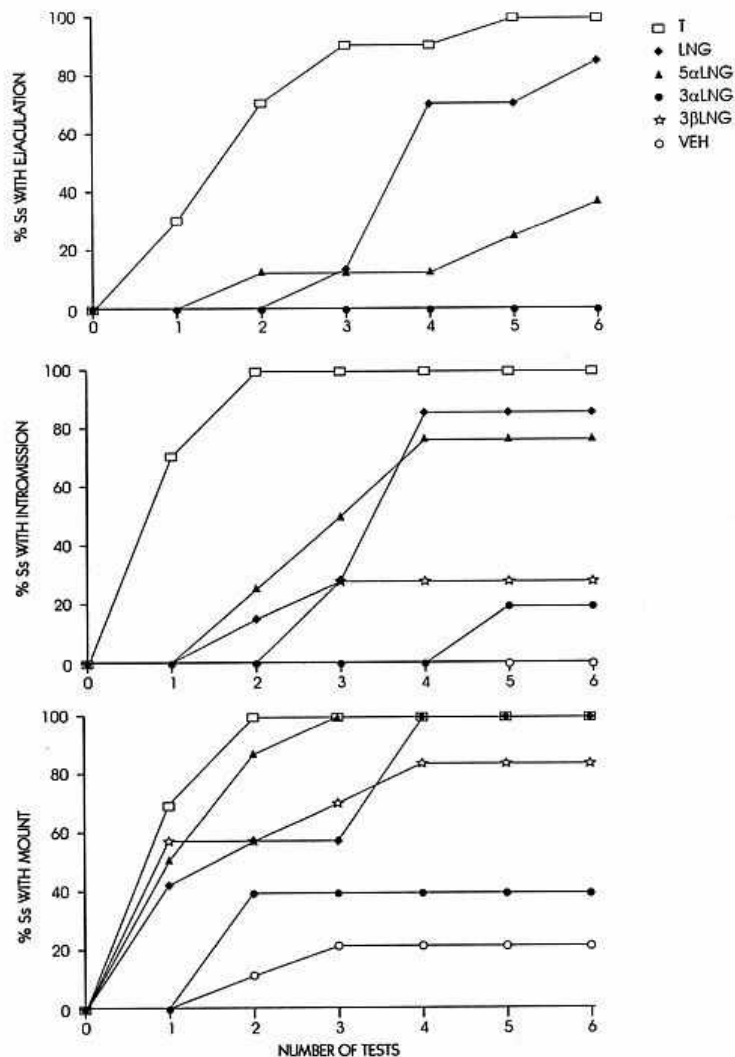


Fig. 1. Intrinsic behavioral effects of LNG and its A-ring-reduced metabolites. Results are presented as cumulative percentages of castrated male rats showing mount, intromission, and ejaculation during 21 days of treatment (1000 µg/day) with LNG, 5αLNG, 3αLNG, or 3βLNG. Castrated rats treated with T (1000 µg/day) or vehicle (VEH) served as controls. LNG restored full copulatory behavior in the treated Ss ($P < .001$, as compared to VEH), while 5α-reduction of LNG resulted in a decrease of its behavioral effect (LNG metabolites, percentage of Ss with ejaculation: $P < .01$, as compared to LNG or T, Fisher Exact Probability Test).

both peripheral and central nervous system (CNS) levels prompted us to investigate the androgen and/or estrogen agonistic behavioral effects and potency of LNG and three of its A-ring-reduced metabolic conversion products in the long-term castrated male rat. Activation of masculine sexual behavior was used in this study as a screening experimental model, taking advantage of its well-documented hormone-regulated expression in rodents. The behavioral effects of LNG and its metabolites were assessed by giving them alone, as well as by their capability to synergize with either estradiol-17 β (E₂) or 5 α -dihydrotestosterone (DHT). The peripheral hormone-like activity of the synthetic steroids was assessed by their effects on the ventral prostate and seminal vesicles of the castrated animals.

Further interest in the conduction of this study stemmed from the observation that enzyme-mediated 5 α -reduction of the molecule of norethisterone (NET), another 19-nor contraceptive progestin, enhances its binding affinity for the androgen receptor (AR) (Chávez et al., 1985), but unexpectedly diminishes and almost abolishes its androgen agonistic effects (Lemus et al., 1997).

2. Materials and methods

2.1. Steroids

Testosterone (T), DHT, and E₂ were supplied by Sigma (St. Louis, MO). LNG was kindly provided by Schering

Mexicana, S.A. de C.V. (Mexico City). The 5 α -reduced derivative of LNG, 5 α -dihydro LNG (5 α LNG), was synthesized by lithium-ammonia reduction of LNG, crystallized from ethyl acetate-hexane, and purified by flash chromatography (Still et al., 1978). The 3 α ,5 α -tetrahydro derivative of LNG (3 α LNG) was prepared from reduction of 5 α LNG with L-selectride under anhydrous conditions (Brown and Krishnamurthy, 1972). A mixture of 3 α LNG (98%) and 3 β ,5 α -tetrahydro LNG (3 β LNG) (2%) reduced derivatives was obtained. Synthesis of 3 β LNG was carried out by sodium borohydride reduction of 5 α LNG (Bowers et al., 1958). The resulting epimeric alcohols were separated by flash chromatography using the system ethyl acetate-hexane (3:7). The chemical purity of LNG and its derivatives was assessed by their melting points, HPLC behavior, infrared absorption, and H-nuclear magnetic resonance. The physical and spectroscopic constants of the A-ring-reduced LNG derivatives have been previously described (Lemus et al., 1992).

2.2. Animals

Subjects (Ss) were 80- to 90-day-old (260–290 g body weight) male Wistar rats bred in our laboratory and selected on the basis of their display of the whole pattern of sexual behavior including ejaculation, in at least three screening tests. Animals were housed in individual cages with food and water available ad libitum, and were maintained under a reversed light-dark cycle (0830 h off, 1830 h on). All rats

Table 1
Parameters of sexual activity displayed by castrated male rats under the various steroid daily treatments for 21 days

	T, 1000 μ g (<i>n</i> = 10)	LNG, 1000 μ g (<i>n</i> = 7)	5 α LNG, 1000 μ g (<i>n</i> = 8)	3 α LNG, 1000 μ g (<i>n</i> = 10)	3 β LNG, 1000 μ g (<i>n</i> = 7)	Vehicle (<i>n</i> = 10)
% Ss with mounting, intromission, and ejaculation	100***, 100***, 100***	100***, 86***, 86***	100***, 75***, 38*** ^{††}	40 ^{††} , 20 ^{†††} , 0 ^{†††}	85***, 28 ^{††} , 0 ^{†††}	20 ^{†††} , 0 ^{†††} , 0 ^{†††}
% Tests with mounting, intromission, and ejaculation	83***, 83***, 75***	62*** [†] , 29*** ^{†††} , 24*** ^{†††}	69***, 33*** ^{†††} , 13*** ^{†††}	27 ^{†††} , 3 ^{†††} , 0 ^{†††}	48*** ^{†††} , 17*** ^{†††} , 0 ^{†††}	10 ^{†††} , 0 ^{†††} , 0 ^{†††}
Mount latency (min) ^a	1.7 $\pm$ 1.1**	2.6 $\pm$ 0.7*** [†]	5.0 $\pm$ 1.6*** [†]	10.8 $\pm$ 0.7 ^{†††}	3.6 $\pm$ 0.8***	13.4 $\pm$ 0.5 ^{††}
Intromission latency (min) ^a	2.0 $\pm$ 1.1	2.8 $\pm$ 0.8	3.7 $\pm$ 1.0	11.9 $\pm$ 0.6 ^{††}	1.2 $\pm$ 0.1	—
Ejaculation latency (min) ^a	9.3 $\pm$ 1.4	11.3 $\pm$ 3.0	10.7 $\pm$ 3.5	—	—	—
Postejaculatory interval (min) ^a	7.4 $\pm$ 0.8	16.7 $\pm$ 2.6 ^{†††}	12.0 $\pm$ 1.8 [†]	—	—	—
Interintromission interval (min) ^a	0.9 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.4 [†]	2.4 $\pm$ 0.4 ^{††}	2.7 $\pm$ 0.5 ^{†††}	4.1 $\pm$ 1.0 ^{†††}	—
Hit rate ^a	0.68 $\pm$ 0.04	0.53 $\pm$ 0.07	0.39 $\pm$ 0.07 ^{††}	0.32 $\pm$ 0.04 ^{††}	0.24 $\pm$ 0.01 ^{†††}	—

^a Mean $\pm$ S.E.M. of the last two behavioral tests.

* *P* < .05, as compared to the vehicle-treated group.

** *P* < .01, as compared to the vehicle-treated group.

*** *P* < .001, as compared to the vehicle-treated group.

[†] *P* < .05, as compared to the T-treated group.

^{††} *P* < .01, as compared to the T-treated group.

^{†††} *P* < .001, as compared to the T-treated group.

were castrated under ether anesthesia at least 90 days before experiments. Evidence that no intromission and ejaculation were retained before the onset of steroid treatments was obtained in at least two behavioral tests. All experiments were performed in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Research Ethics Committee of the Instituto Mexicano del Seguro Social.

2.3. Experimental design

All steroids were subcutaneously administered dissolved in 10% ethanol–corn oil. Injection volumes were 0.1–0.2 ml. Groups of rats were subjected to one of the following treatments: Group 1: One of the following steroids alone (1000 $\mu\text{g/day}$): T ($n=10$), LNG ($n=7$), 5 α LNG ($n=8$), 3 α LNG ($n=10$), and 3 β LNG ($n=7$); Group 2: E₂ (5 $\mu\text{g/}$

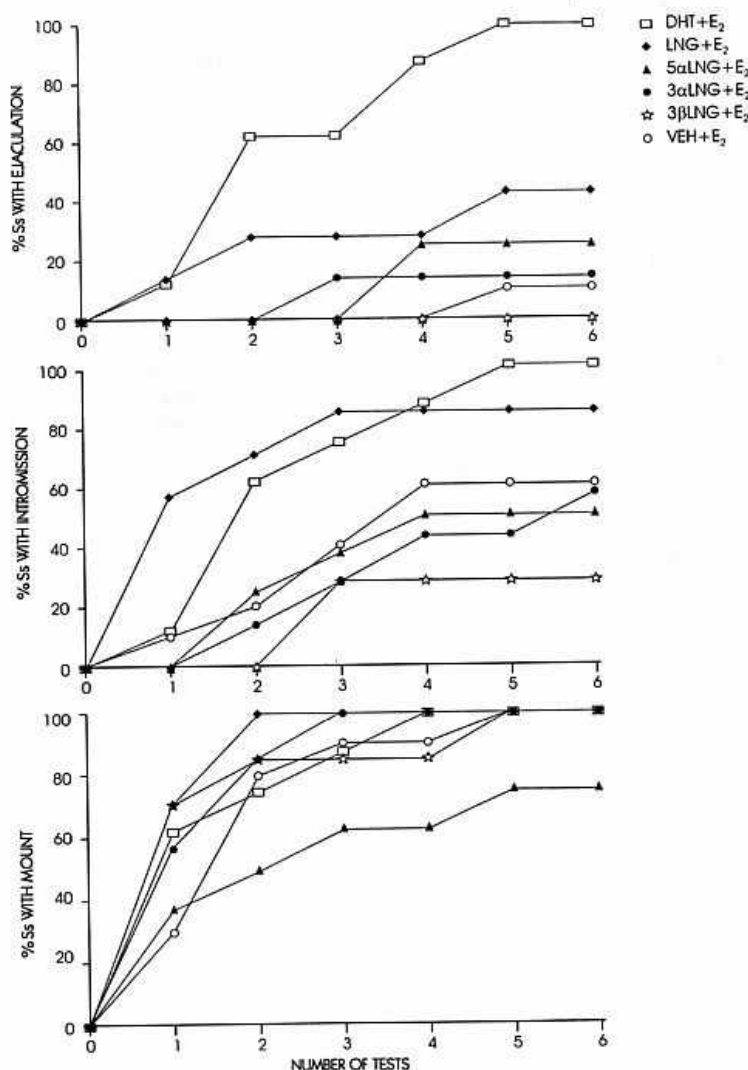


Fig. 2. Androgen-like behavioral effects of LNG and its A-ring-reduced metabolites, as assessed by their ability to synergize with E₂. Results are presented as cumulative percentages of castrated male rats showing mount, intromission, and ejaculation during 21 days of treatment with LNG, 5 α LNG, 3 α LNG, or 3 β LNG (300 $\mu\text{g/day}$) in combination with E₂ (5 $\mu\text{g/day}$). Castrated rats treated with either DHT (300 $\mu\text{g/day}$) or vehicle, in combination with E₂ (5 $\mu\text{g/day}$) served as controls. LNG restored intromission behavior in most Ss (86%) and ejaculation in 43% ($P < .05$, as compared to VEH + E₂, Fisher Exact Probability Test), while its 5 α -reduced metabolites were less effective ($P < .01$, as compared to DHT + E₂, Fisher Exact Probability Test).

day) plus one of the following steroids (300 µg/day): LNG ($n=7$), 5αLNG ($n=8$), 3αLNG ($n=7$), 3βLNG ($n=7$); Group 3: combination of DHT (300 µg/day) with one of the following steroids (300 µg/day): LNG ($n=8$), 5αLNG ($n=8$), 3αLNG ($n=8$), or 3βLNG ($n=8$). Additional groups of animals that received E₂ (5 µg/day) ($n=10$), DHT (300 µg/day) ($n=12$), or vehicle alone ($n=10$) for 21 consecutive days, were used as negative controls; animals ($n=8$) receiving DHT (300 µg/day) plus E₂ (5 µg/day) served as positive controls. The doses of steroids used in this study were chosen on the basis of previous studies using naturally occurring androgens (Morali et al., 1994) or synthetic progestins (Morali et al., 1990), which exhibited androgenic and/or estrogenic behavioral effects when administered in similar dose schemes.

2.4. Behavioral assessment

Male sexual behavior was evaluated by standard techniques (Beyer et al., 1973; Larsson, 1979; Morali et al., 1990, 1993, 1994; Meisel and Sachs, 1994). Tests began on the day of the onset of treatment (Day 0) and continued thereafter twice a week until Day 21. Tests were done during the dark phase of the cycle under dim red light. Rats were placed in Plexiglas observation cages (60 × 60 × 42 cm), and after a 5-min adaptation period, each subject was presented with a receptive female. Stimulus females received 5 µg E₂ benzoate three times per week and 0.5 mg progesterone, 4 h before

testing. The results are presented as cumulative percentage of responsive animals to facilitate comparison with previous studies in which the androgenic and/or estrogenic behavioral activities of naturally occurring androgens (Beyer et al., 1974; Morali et al., 1993) and synthetic progestins (Morali et al., 1990) were assessed in castrated male rats.

The number of mounts and intromissions as well as the mount, intromission, and ejaculation latencies, and the postejaculatory interval, were recorded and measured. The test was ended in one of the following circumstances: (1) 15 min after the presentation of the female to the male if no intromission occurred, (2) 30 min after the first intromission if no ejaculation had occurred, or (3) after the first intromission following ejaculation. The rates of copulation and its efficiency were evaluated as the interintromission intervals and the hit rates, respectively. The interintromission interval results from dividing the ejaculation latency by the number of intromissions, or by dividing 30 min by the number of intromissions when no ejaculation occurs; the hit rate results from dividing the number of intromissions by the total number of mounts plus intromissions displayed by the subject in each test; it renders an estimation of the efficiency of the consummatory mechanism (Larsson, 1979; Sachs and Barfield, 1972). The results of the behavioral parameters analyzed were expressed as the average values obtained in the last two tests (Days 18 and 21 of the experiments) to avoid changes frequently observed in the course of steroid treatments. After completion of the last

Table 2

Parameters of sexual activity displayed by castrated male rats under the various steroid daily treatments for 21 days

	DHT + E ₂ , 300 and 5 µg ($n=8$)	LNG + E ₂ , 300 and 5 µg ($n=7$)	5αLNG + E ₂ , 300 and 5 µg ($n=8$)	3αLNG + E ₂ , 300 and 5 µg ($n=7$)	3βLNG + E ₂ , 300 and 5 µg ($n=7$)	Vehicle + E ₂ , 0.2 ml and 5 µg ($n=10$)
% Ss with mounting, intromission, and ejaculation	100, 100, 100*	100, 86, 43 [†]	75, 50 [†] , 25 ^{††}	100, 57, 14 ^{†††}	100, 28 ^{††} , 0 ^{†††}	100, 60, 10 ^{†††}
% Tests with mounting, intromission, and ejaculation	96*, 77***, 63***	90, 67***, 24*** ^{†††}	54* ^{†††} , 29 ^{†††} , 8 ^{†††}	74 ^{††} , 21 ^{†††} , 5 ^{†††}	86, 10 ^{†††} , 0 ^{†††}	77 [†] , 23 ^{†††} , 1 ^{†††}
Mount latency (min) ^a	0.6 ± 0.3*	2.2 ± 0.9 [†]	4.2 ± 2.0 [†]	2.4 ± 0.7 [†]	3.1 ± 0.8 [†]	3.9 ± 1.0 [†]
Intromission latency (min) ^a	2.0 ± 1.1	2.7 ± 0.4	3.0 ± 1.3	7.6 ± 2.2 [†]	8.4 ± 6.2 [†]	3.0 ± 1.1
Ejaculation latency (min) ^a	11.3 ± 2.2	19.2 ± 2.4 [†]	19.1 ± 3.8	16.2	—	29.0
Postejaculatory interval (min) ^a	9.5 ± 1.2	12.2 ± 1.3* [†]	8.6 ± 0.7*	8.8*	—	8.7
Interintromission interval (min) ^a	1.0 ± 0.1*	2.5 ± 0.4 ^{††}	5.4 ± 2.1 ^{††}	7.2 ± 0.8 ^{†††}	8.0 ± 2.0 ^{†††}	5.1 ± 2.6 [†]
Hit rate ^a	0.68 ± 0.03***	0.38 ± 0.04 ^{†††}	0.24 ± 0.06 ^{†††}	0.23 ± 0.04 ^{†††}	0.15 ± 0.01 ^{†††}	0.32 ± 0.05 ^{†††}

^a Mean ± S.E.M. of the last two behavioral tests.

* $P < .05$, as compared to the vehicle + E₂-treated group.

*** $P < .001$, as compared to the vehicle + E₂-treated group.

[†] $P < .05$, as compared to the DHT + E₂-treated group.

^{††} $P < .01$, as compared to the DHT + E₂-treated group.

^{†††} $P < .001$, as compared to the DHT + E₂-treated group.

behavioral test, Ss were killed by overexposure to ether, and ventral prostate and seminal vesicles were removed and weighed to the nearest 0.1 mg.

2.5. Statistics

The proportions of sexually active animals were analyzed by the Fisher's Exact Probability Test, while analysis

of the proportions of tests in which Ss were active was done by χ^2 tests. Numbers and latencies of behavioral responses were compared between groups by repeated measures analysis of variance followed by Tukey tests or Mann–Whitney *U* tests when appropriate. Organ weights were analyzed by the Student's *t* test. Group differences were considered significant when $P < .05$ was reached (two-tailed test) (Montgomery, 1991).

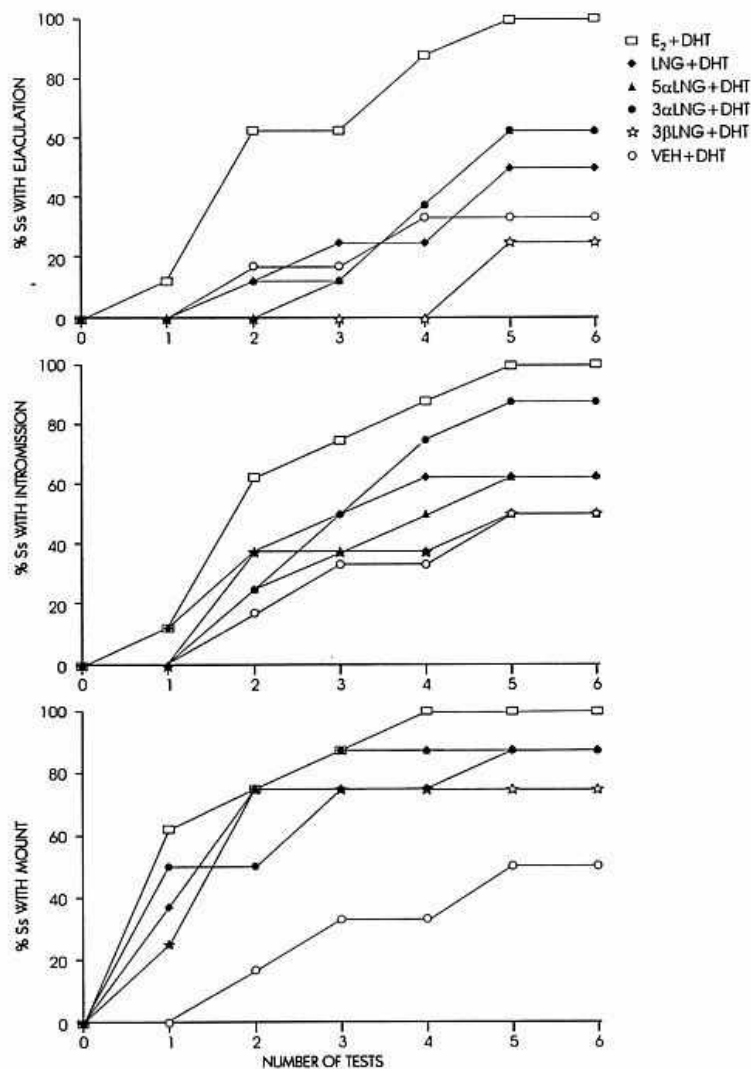


Fig. 3. Estrogen-like behavioral effects of LNG and its A-ring-reduced metabolites, as assessed by their ability to synergize with DHT. Results are presented as cumulative percentages of castrated male rats showing mount, intromission, and ejaculation during 21 days of treatment with LNG, 5αLNG, 3αLNG, or 3βLNG (300 µg/day) in combination with DHT (300 µg/day). Castrated rats treated with either E₂ (5 µg/day) or vehicle, in combination with DHT (300 µg/day) served as controls. Slight estrogenic effects were exerted by 5α-reduced metabolites of LNG (5α- and 3αLNG), since non-significant differences were found in the percentages of Ss with ejaculation as compared to E₂ + DHT (Fisher Exact Probability Test).

3. Results

3.1. Effects of LNG and its derivatives given alone

Highly significant differences ($P < .01$) between groups were noticed in terms of the incidence, the number, and temporal characteristics of behavioral responses (Fig. 1; Table 1).

LNG treatment fully restored copulatory behavior in long-term castrated rats. All Ss treated with LNG presented mounting behavior and most of them (86%) displayed intromission and ejaculatory behavior, although with a slight delay over the course of treatment (Fig. 1). The delayed onset of intromission and ejaculatory behaviors conditioned a low percentage of tests with intromission (29%) and with ejaculation (24%) in this group (Table 1); however, once the Ss started to ejaculate, the incidence of ejaculatory responses increased significantly (45%), as it was recorded in the last three tests. LNG-treated animals presented hit rates and intromission and ejaculation latencies similar to those of control animals treated with T (Table 1).

5 α LNG partially restored the copulatory behavior of castrated animals (Fig. 1), but only a proportion of them (38%) displayed ejaculatory responses in a lower percent of tests than LNG or T-treated rats (Table 1). Animals treated with 5 α LNG exhibited significantly longer interintromission intervals ($P < .01$) and lower hit rate values ($P < .01$)

but similar response latencies than those of animals receiving LNG or T (Table 1).

Treatment with the 3 α LNG or 3 β LNG derivatives stimulated mounting and intromission responses in a low proportion of tests (27% and 3%; 48% and 17%) and it was totally ineffective to restore ejaculatory behavior in castrated rats (Fig. 1, Table 1). Mounting latencies of animals treated with 3 β LNG were similar to those of LNG- or T-treated rats (Table 1).

3.2. Effects of LNG and its derivatives given in combination with E_2

LNG in combination with E_2 restored mounting and intromission behaviors in most Ss (100% and 86%, respectively) with a similar timing over the course of treatment and in a similar percent of tests as those of the DHT + E_2 control group (Fig. 2). However, ejaculation behavior in LNG + E_2 -treated animals was activated in only 43% of Ss in 23% of tests, values significantly lower ($P < .05$; $P < .001$) than those of the DHT + E_2 control group (Fig. 2; Table 2). Nevertheless, the incidence of ejaculatory responses exhibited by LNG + E_2 -treated rats was significantly higher ($P < .001$) than that observed in control animals receiving vehicle + E_2 (Table 2).

The combination 5 α LNG + E_2 was less effective to restore copulatory behavior in castrated rats, as compared

Table 3
Parameters of sexual activity displayed by castrated male rats under the various steroid daily treatments for 21 days

	E_2 + DHT, 5 and 300 μ g ($n = 8$)	LNG + DHT, 300 and 300 μ g ($n = 8$)	5 α LNG + DHT, 300 and 300 μ g ($n = 8$)	3 α LNG + DHT, 300 and 300 μ g ($n = 8$)	3 β LNG + DHT, 300 and 300 μ g ($n = 8$)	Vehicle + DHT, 0.1 ml and 300 μ g ($n = 12$)
% Ss with mounting, intromission, and ejaculation	100*, 100*, 100**	88, 63, 50 [†]	88, 63, 63	88, 88, 63	75, 50 [†] , 25 ^{††}	50 [†] , 50 [†] , 33 ^{††}
% Tests with mounting, intromission, and ejaculation	96***, 77***, 63***	50*.†††, 35*.†††, 17 ^{†††}	58*.†††, 31*.†††, 23*.†††	58*.†††, 42*.†††, 23*.†††	46*.†††, 21 ^{†††} , 6 ^{†††}	19 ^{†††} , 19 ^{†††} , 14 ^{†††}
Mount latency (min) ^a	0.6 ± 0.3*	4.5 ± 1.2 [†]	6.6 ± 1.2 ^{††}	4.5 ± 0.9 [†]	8.0 ± 1.0 ^{†††}	3.5 ± 1.5 [†]
Intromission latency (min) ^a	2.0 ± 1.1*	4.6 ± 0.5 [†]	7.0 ± 2.0 [†]	5.3 ± 1.1 [†]	6.8 ± 0.5 [†]	6.7 ± 1.6 [†]
Ejaculation latency (min) ^a	11.3 ± 2.2	23.1 ± 3.3 [†]	21.7 ± 2.5 [†]	12.9 ± 1.4	19.2 ± 4.3 [†]	14.5 ± 1.3
Postejaculatory interval (min) ^a	9.5 ± 1.2*	13.2 ± 2.5 [†]	13.7 ± 1.5 [†]	14.4 ± 1.1 [†]	23.9 ± 9.7 ^{††}	14.6 ± 1.6 [†]
Interintromission interval (min) ^a	1.0 ± 0.1*	3.6 ± 1.4 [†]	3.1 ± 0.6 ^{††}	2.6 ± 0.7 [†]	3.0 ± 0.7 ^{††}	1.8 ± 0.4 [†]
Hit rate ^a	0.68 ± 0.03*	0.41 ± 0.04 ^{††}	0.52 ± 0.06 [†]	0.66 ± 0.05	0.40 ± 0.10 ^{††}	0.58 ± 0.09 [†]

^a Mean ± S.E.M. of the last two behavioral tests.

* $P < .05$, as compared to the vehicle + DHT-treated group.

** $P < .01$, as compared to the vehicle + DHT-treated group.

*** $P < .001$, as compared to the vehicle + DHT-treated group.

[†] $P < .05$, as compared to the E_2 + DHT-treated group.

^{††} $P < .01$, as compared to the E_2 + DHT-treated group.

^{†††} $P < .001$, as compared to the E_2 + DHT-treated group.

with the combined treatment of LNG + E₂ (Fig. 2; Table 2). Thus, the number of 5 α LNG + E₂-treated Ss achieving intromission and ejaculation (50% and 25%, respectively) and the number of successful tests (29% and 8%, respectively) were significantly lower ($P < .05$) than those of animals treated with LNG + E₂, as well as of the control group receiving DHT + E₂ ($P < .001$). The incidence and

number of behavioral responses shown by animals treated with 5 α LNG + E₂ were not significantly different to those of the control group receiving vehicle + E₂ (Fig. 2; Table 2).

Administration of 3 α LNG + E₂ or 3 β LNG + E₂ activated mounting behavior in all Ss, but failed to restore ejaculatory activity. Indeed, the number of Ss in these groups displaying intromission and ejaculation and the number of successful

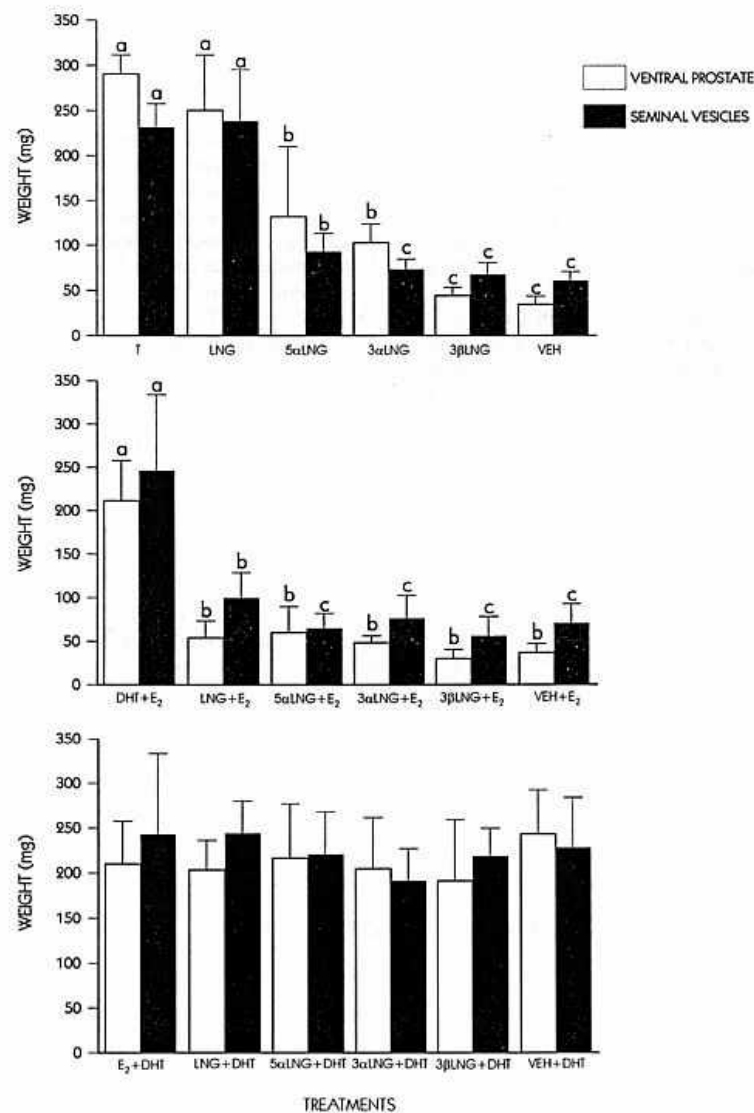


Fig. 4. Peripheral androgenic effects of LNG and its A-ring-reduced metabolites. Effects of 21 days of daily treatment with LNG, 5 α LNG, 3 α LNG, 3 β LNG (1000 μ g), or with their combination (300 μ g) with either E₂ (5 μ g) or DHT (300 μ g), on accessory sex organ weight. Castrated rats treated with T (1000 μ g), DHT (300 μ g) + E₂ (5 μ g), E₂ (5 μ g) + vehicle (VEH), DHT (300 μ g) + VEH, or VEH alone, served as controls. Data are presented as means $\pm$ S.D. Bars with different letters are significantly different from one another ($P < .05$, Student's *t* test) when comparing either ventral prostate or seminal vesicles weights.

tests were significantly lower than those of animals treated with LNG + E₂ ($P < .05$) or DHT + E₂ ($P < .001$) and similar to those of the vehicle + E₂ control group (Fig. 2; Table 2).

3.3. Effects of LNG and its derivatives given in combination with DHT

LNG + DHT treatment only partially restored copulatory behavior in castrated rats, in a similar manner to that observed in control animals receiving vehicle + DHT (Fig. 3; Table 3). The incidence of mounting, intromission, and ejaculatory responses was significantly lower ($P < .001$) than that of control, E₂ + DHT-treated animals.

On the contrary, treatments with 5 α LNG + DHT or 3 α LNG + DHT activated a higher level of copulatory behavior than that exhibited by control animals treated with vehicle + DHT (Fig. 3; Table 3). Indeed, 63% of Ss treated with these combinations displayed ejaculatory behavior, although in a lower proportion of tests (23%) than that observed in control E₂ + DHT-treated rats.

The 3 β LNG + DHT combined treatment was able to activate mounting behavior in 75% of Ss, but it had very limited effects on intromission and ejaculatory responses, which were not significantly different to those observed in control animals receiving vehicle + DHT (Fig. 3; Table 3).

3.4. Peripheral effects of LNG and its derivatives

LNG treatment significantly increased ($P < .001$) the ventral prostate and seminal vesicles weights in castrated rats, as compared with those of control Ss receiving vehicle alone. The effects of LNG on rat sex accessories were similar to those observed in T-treated animals (Fig. 4). Treatment with 5 α LNG induced a significantly lower effect in ventral prostate and seminal vesicles weights, as compared with LNG or T treatments. 3 α LNG or 3 β LNG induced very little, if any, effect upon the weights of ventral prostate and seminal vesicles of castrated rats (Fig. 4).

Combined administration of LNG or its A-ring-reduced derivatives with E₂ did not induce a significant modification on sex accessory organs weights, as compared with control Ss treated with vehicle + E₂ (Fig. 4). When LNG and its A-ring-reduced metabolites were simultaneously given with DHT to castrated animals, the ventral prostate and seminal vesicles weights were similar to those found in Ss treated with vehicle + DHT.

4. Discussion

The results presented herein indicate that the integrated analysis of male copulatory behavior in rodents is a suitable screening model to assess the hormone-like effects and potency of synthetic contraceptive progestins and their metabolic conversion products. The results also provide

information on the mode of behavioral action of LNG and its metabolites at the CNS.

The restoration of sexual behavior in castrated male rats observed after the administration of large doses of LNG (1000 μ g/day) was interpreted as demonstrating an androgen-like agonistic effect of this synthetic progestin (Fig. 1), particularly since the values of androgen-regulated behavioral parameters as the hit rate and the intromission and ejaculation latencies in LNG-treated animals were identical to those of T-treated animals used as a control group (Table 1). Lower doses of LNG (300 and 500 μ g/day), although still effective, were less potent to activate copulatory behavior (data not shown). The androgenic effect of LNG at the CNS correlated well with its capability to restore the weight of the ventral prostate and seminal vesicles as noticed in the castrated LNG-treated rats (Fig. 4). These observations are in line with the relatively high binding affinity of LNG to the AR, at both central and peripheral hormone-sensitive tissues (Lemus et al., 1992).

The finding that 5 α LNG was significantly less effective than LNG to restore copulatory behavior in castrated rats indicates that enzyme-mediated A-ring reduction of LNG diminishes its androgenic activity at the CNS in a similar manner to that observed following 5 α -reduction of naturally occurring androgens (Meisel and Sachs, 1994; Morali et al., 1994; Whalen et al., 1985). Even more, 5 α LNG was also significantly less potent than LNG to increase the weights of sex accessory organs in the castrated rats. The fact that 5 α -reduction of LNG diminished its androgen-like potency at peripheral organs was unexpected, since 5 α LNG binds with a relative higher affinity to the AR than LNG, its parent compound (Lemus et al., 1992). This striking finding is in a sharp contrast with the classic concept that 5 α -reduction of naturally occurring androgens not only enhances their binding affinity to the AR (Liao et al., 1973; Martini, 1982) but also amplifies their androgenic effects at peripheral androgen-dependent organs (Dorfman and Shipley, 1956; Liao et al., 1973). The paradoxical effect of 5 α -reduction upon the LNG molecule is rather similar to that reported for the NET molecule (Lemus et al., 1997; Morali et al., 1990). Since the nature of this unexpected phenomenon has been attributed, in the case of NET, to the presence of the ethynyl moiety at C-17 (Lemus et al., 1997) it seems plausible to extrapolate this explanation to LNG and other 19-nor progestin molecules bearing a 17 α -ethynyl group.

Further 3 α or 3 β reduction of the 5 α LNG molecule resulted in a complete abolishment of its androgen like effects at both central and peripheral levels. Indeed, 3 α LNG or 3 β LNG induced neither activation of copulatory behavior nor increase of sex accessory organs weights in the castrated rats, an observation that correlates with the lack of interaction of both LNG tetrahydro reduced derivatives with the AR (Lemus et al., 1992).

Treatments of LNG and its derivatives at a lower dose (300 μ g/day) combined with E₂ were used to assess their capability to synergize as androgens with the behavioral

effects of E₂. The finding that only the LNG + E₂ combination was able to fully activate the copulatory behavior pattern in castrated animals, although with lower effectiveness than the control DHT + E₂ combination, demonstrated that the unchanged LNG molecule possesses intrinsic androgen-like activity. The observations that 5 α LNG + E₂ failed to restore full copulatory behavior and that 3 α LNG or 3 β LNG + E₂ were completely ineffective suggest that A-ring reduction of the LNG molecule results in a diminution of its intrinsic androgenic potency, confirming the results obtained following the administration of LNG and its metabolites alone.

To assess whether LNG and its metabolites may induce estrogen-like behavioral effects, they were administered in combination with DHT to castrated rats. 5 α LNG + DHT and 3 α LNG + DHT were the only effective combinations capable to activate sexual behavior at a level higher than that of control animals receiving vehicle + DHT. These results suggest that A-ring-reduced LNG metabolites exert estrogen-like behavioral effects with a significantly lower potency than E₂, a finding that is in line with a recent report (Santillán et al., 2001) demonstrating that tetrahydro reduced LNG metabolites interact with the ER with a significantly low relative binding affinity and are able, at very high doses, to transactivate an estrogen-dependent yeast system co-transfected with the human ER gene and estrogen-responsive elements fused to a β -galactosidase reporter vector.

The potency of estrogen-like behavioral effects exerted by high doses of A-ring-reduced LNG derivatives was significantly lower than those previously reported for the corresponding NET metabolites (Morali et al., 1990), an observation that correlates with their different binding affinities to the ER (Chávez et al., 1985; Santillán et al., 2001) and also with the well-known estrogenic effects observed after NET administration (Etchegoyen et al., 1983; Larrea et al., 1984; Pérez-Palacios et al., 1981; Vilchis et al., 1986).

Interestingly, the observation that 33% of castrated animals treated with vehicle + DHT used as a control group, exhibited full copulatory behavior, confirms previous reports indicating that DHT alone may induce sexual behavior in sexually experienced, castrated individuals of several mammalian species (Meisel and Sachs, 1994; Whalen et al., 1985). We have suggested that the behavioral effects of DHT are exerted by its own androgenic potency and the estrogen-like effects of its nonphenolic metabolites, the 3 β ,5 α - and 3 α ,5 α -androstane diols (Morali et al., 1994).

The overall results demonstrate that LNG at high doses induces androgenic effects at both central and peripheral levels and a weak estrogenic activity mediated by its metabolic conversion products. All in all, the data underline the role of metabolism of LNG to explain some effects induced by nonpharmacological doses of this synthetic progestin.

Acknowledgements

This work was partially supported by Grants from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) and the World Health Organization (WHO), Geneva. The assistance of Dr. Ma. Luisa Cuevas in statistical analysis and of Arturo Luna, B.A., and Beatriz Alarcón in the manuscript preparation is acknowledged.

References

- Ball MJ, Ashwell E, Gillmer MDG. Progestagen-only oral contraceptives: comparison of the metabolic effects of levonorgestrel and norethisterone. *Contraception* 1991;44:223–33.
- Beyer C, Larsson K, Pérez-Palacios G, Morali G. Androgen structure and male sexual behavior in the castrated rat. *Horm Behav* 1973;4:99–108.
- Bowers A, Ringold HJ, Derot E. Steroids CL. 19-nordihydrotestosterone derivatives. *J Am Chem Soc* 1958;80:6115–21.
- Brown HC, Krishnamurthy S. Lithium-tri-sec-butyl borohydride. A new reagent for the reduction of cyclic and bicyclic ketones with superstereoselectivity. *J Am Chem Soc* 1972;94:7159–61.
- Cabeza M, Vilchis F, Lemus AE, Díaz de León L, Pérez-Palacios G. Molecular interactions of levonorgestrel and its 5 α -reduced derivative with androgen receptors in hamster flanking organs. *Steroids* 1995;60:630–5.
- Catherino WH, Jeng MH, Jordan VC. Norgestrel and gestodene stimulate breast cancer cell growth through and oestrogen receptor mediated mechanism. *Br J Cancer* 1993;67:945–52.
- Chávez BA, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 1985;22:121–6.
- Cravioto MC, Alvarado G, Canto-de-Cetina T, Bassol S, Oropeza G, Santos-Yung R, Valencia J, Palma Y, Fuziwara JL, Navarrete T, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G. A multicenter comparative study on the efficacy, safety, and acceptability of the contraceptive subdermal implants Norplant[®] and Norplant[®]-II. *Contraception* 1997;55:359–67.
- Dorfman RI, Shipley RA, editors. *Androgens, biochemistry, physiology, and clinical significance*. New York: Wiley, 1956 (590 pp.).
- Etchegoyen G, Wolpert E, Galvan E, Landeros J, Pérez-Palacios G. Effects of synthetic steroid contraceptives on biliary lipid composition of normal Mexican women. *Contraception* 1983;27:591–603.
- Garza-Flores J, Hall PE, Pérez-Palacios G. Long-acting hormonal contraceptives for women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40:697–704.
- Kuhl H. Comparative pharmacology of newer progestogens. *Drugs* 1996; 51:188–215.
- Larrea F, Moctezuma O, Pérez-Palacios G. Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic pituitary unit of ovariectomized rats. *J Steroid Biochem* 1984;20:841–7.
- Larrea F, Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garza-Flores J, Pérez-Palacios G. The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level. *J Steroid Biochem* 1987; 27:657–63.
- Larsson K. Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. In: Beyer C, editor. *Endocrine control of sexual behavior*. New York: Raven Press, 1979. p. 77–163.
- Lemus AE, Vilchis F, Damsky R, Chávez BA, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. Mechanism of action of levonorgestrel: in vitro metabolism and specific interactions with steroid receptors in target organs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:881–90.
- Lemus AE, Enriquez J, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. 5 α -reduction of norethisterone enhances its binding affinity for androgen receptors but diminishes its androgenic potency. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;60:121–9.
- Lemus AE, Zaga V, Santillán R, García GA, Grillasca I, Damián-Matsumura P, Jackson KJ, Cooney AJ, Larrea F, Pérez-Palacios G. The oestrogenic

- effects of gestodene, a potent contraceptive progestin, are mediated by its A-ring reduced metabolites. *J Endocrinol* 2000;165:693–702.
- Lemus AE, Santillán R, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. In vitro metabolism of gestodene in target organs: formation of A-ring reduced derivatives with oestrogenic activity. *Eur J Pharmacol* 2001;417:249–56.
- Liao S, Liang T, Fang S, Castañeda E, Shao T.-C. Steroid structure and androgenic activity. *J Biol Chem* 1973;248:6154–62.
- Martini L. The 5 α -reduction of testosterone in the neuroendocrine structures. Biochemical and physiological implications. *Endocr Rev* 1982;3:1–25.
- Meisel RL, Sachs BD. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*, vol. 2. New York: Raven Press, 1994. p. 3–106.
- Montgomery DC. *Design and analysis of experiments*. Belmont: Wiley, 1991 (537 pp.).
- Morali G, Lemus AE, Oropeza MV, García GA, Pérez-Palacios G. Induction of male sexual behavior by norethisterone: role of its A-ring reduced metabolites. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;37:477–84.
- Morali G, Lemus AE, Munguía R, Arteaga M, Pérez-Palacios G, Sundaram K, Kumar N, Bardin CW. Induction of male sexual behavior in the rat by 7 α -methyl-19-nortestosterone, an androgen that does not undergo 5 α -reduction. *Biol Reprod* 1993;49:577–81.
- Morali G, Oropeza MV, Lemus AE, Pérez-Palacios G. Mechanisms regulating male sexual behavior in the rat: role of 3 α - and 3 β -androstenediols. *Biol Reprod* 1994;51:562–71.
- Pérez AE, Ortiz A, Cabeza M, Beyer C, Pérez-Palacios G. In vitro metabolism of ³H-androstenedione by the male rat pituitary, hypothalamus, and hippocampus. *Steroids* 1975;25:53–62.
- Pérez-Palacios G, Castañeda E, Gómez-Pérez F, Pérez AE, Gual C. In vitro metabolism of androgens in dog hypothalamus, pituitary, and limbic system. *Biol Reprod* 1970;3:205–13.
- Pérez-Palacios G, Fernández-Aparicio MA, Medina M, Zacarias-Villareal J, Ulloa-Aguirre A. On the mechanism of action of progestins. *Acta Endocrinol (Copenhagen)* 1981;97:320–8.
- Pérez-Palacios G, Morali G, García GA, Cruz ML, Lemus AE. Behavioral effects of synthetic progestins. In: Mornex R, Jaffiol C, Leclère J, editors. *Progress in endocrinology*. Lancs: Parthenon, 1993. p. 155–9.
- Phillips A, Demarest K, Hahn DW, Wong F, McGuire JL. Progestational and androgenic receptor binding affinities and in vivo activities of norgestimate and other progestins. *Contraception* 1990;41:399–410.
- Piaggio G, von Hertzen H, Grimes DA, Van Look PFA. Timing of emergency contraception with levonorgestrel or the Yuzpe regimen. *Lancet* 1999;353:729.
- Rebar RW, Zeserson K. Characteristics of the new progestogens in combination oral contraceptives. *Contraception* 1991;44:1–10.
- Sachs BD, Barfield RJ. Functional analysis of masculine copulatory behavior in the rat. In: Rosenblatt JS, Hinde RA, Shaw E, Beer C, editors. *Advances in the study of behavior*, vol. 7. New York: Academic Press, 1972. p. 91–154.
- Santillán R, Pérez-Palacios G, Reyes M, Damián-Matsumura P, García GA, Grillasca I, Lemus AE. Assessment of the oestrogenic activity of the contraceptive progestin levonorgestrel and its non-phenolic metabolites. *Eur J Pharmacol* 2001;427:167–74.
- Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ. Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast tumor cells: I. MCF-7 cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995a;55:423–37.
- Schoonen WGEJ, Joosten JWH, Kloosterboer HJ. Effects of two classes of progestagens, pregnane and 19-nortestosterone derivatives, on cell growth of human breast cells: II. T47D cell lines. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995b;55:439–44.
- Sivin I, Stern J. Health during prolonged use of levonorgestrel 20 μ g/d and the copper TCU 380Ag intrauterine contraceptive devices: a multicenter study. *Fertil Steril* 1994;61:70–7.
- Smith H, Hughes GA, Douglas GH, Hartley D, McLoughlin BJ, Siddall JB, Wendt GR, Buzby GC, Herbst DR, Ledig KW, McMenamin JR, Pattison TW, Suida J, Tokolics J, Edgren RA, Jansen ABA, Gadsby B, Watson DHR, Phillips PC. Totally synthetic ($\pm$)-13-alkyl-3-hydroxy and methoxy-gona-1,3,5(10)-trien-17-ones and related compounds. *Experientia* 1963;19:394–6.
- Stanczyk FZ, Roy S. Metabolism of levonorgestrel, norethindrone, and structurally related contraceptive steroids. *Contraception* 1990;42:67–95.
- Still WC, Kahan M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separation with moderate resolution. *J Org Chem* 1978;43:2923–5.
- Thau R, Jackanecz T. Contraceptive rings—a user-controlled long-acting method for family planning. In: Van Look PFA, Pérez-Palacios G, editors. *Contraceptive research and development 1984 to 1994. The road from Mexico City to Cairo and beyond*. Oxford: Oxford Univ. Press, 1994. p. 107–20.
- Van der Burg B. Sex steroids and growth factors in mammary cancer. *Acta Endocrinol (Copenhagen)* 1991;125:38–41.
- Van der Burg B, Kalkhoven E, Isbrücker L, de Laat SW. Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells under growth factor-defined conditions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;42:457–65.
- Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, García GA, Angeles A, Pérez-Palacios G. Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progestin receptors. *J Steroid Biochem* 1986;24:525–31.
- Whalen RE, Yahr P, Lutge WG. The role of metabolism in hormonal control of sexual behavior. In: Adler N, Pfaff D, Goy RW, editors. *Handbook of behavioral neurobiology*. New York: Plenum, 1985. p. 609–63.
- World Health Organization. Task force on post-ovulatory methods of fertility regulation. Randomized controlled trial of levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. *Lancet* 1998;352:428–33.