

03068

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**  
*Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado*  
**Instituto de Investigaciones Biomédicas**



---

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS QUE  
PARTICIPAN EN LA INHIBICION DE LA  
CONTRACTILIDAD DEL MUSCULO  
LISO DEL SISTEMA REPRODUCTOR  
POR ANDROGENOS Y PROGESTINAS  
5 - REDUCIDOS**

**TESIS**

Que para optar por el Título de  
**MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

Presenta

**CARLOS HOYO VADILLO**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

México, D.F. 1987



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

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

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

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

## PREFACIO.

Los trabajos que se presentan en esta tesis se realizaron en la Unidad de Investigación Biomédica del IMSS, en el laboratorio del Dr. Carlos Kubli. En ese laboratorio realicé el servicio social para mi licenciatura en Biología. Luego en el año de 1982 ingresé a la maestría en Ciencias Fisiológicas. Desde entonces la estructura de la tesis sufrió numerosas modificaciones; producto de las indicaciones de mi tutor, el Dr. Kubli, de las sugerencias de los investigadores invitados a los talleres de tesis, así como de los comentarios de mis maestros y compañeros en dichos talleres. Todo ello enriqueció mi experiencia y me permitió continuar con la etapa final que fue presentar la tesis a los árbitros y a los sinodales. Durante algún tiempo me involucré en otros proyectos que aunque estaban relacionados con el tema, me alejaron un tanto de las labores propias de la tesis, por lo que me retrasé en su terminación. Entre esos trabajos estuvo el registro de la contractilidad uterina *in vivo*, el análisis de frecuencias del EEG y un estudio preliminar de la contractilidad del cisticerco.

Parte del contenido de la tesis fue presentado durante la reunión conjunta de la Western Pharmacology Society, la Texas Pharmacologists y la Asociación Mexicana de Farmacología que se llevó a cabo Enero de 1983. Y apareció publicado en los Proceedings of the Western Pharmacology Society de ese año. Otra parte de la tesis se publicó en la revista Drug and Development Research (6:103-107).

Quiero agradecer por este medio al Dr. Carlos Kubli sus valiosas enseñanzas, sus exigentes indicaciones y sus agudos comentarios, todo lo cual constituyó parte de mi formación. También agradezco al M. en C. Héctor Ponce, de quien aprendí varias de las técnicas utilizadas aquí, su importante participación en el proyecto de tesis. Agradezco la preciosa colaboración de la Biol. Evangelina López y de Eduardo López. Por otra parte, quiero agradecer al Dr. Gijón su hospitalidad cuando estuvimos en su laboratorio, después del sismo de 1985 y al Dr. Hong y al Dr. Villarreal la acogida que me dieron en la Sección de Terapéutica Experimental poco después. Mi sincero agradecimiento a los maestros de la maestría, especialmente al Dr. Alonso de Florida, coordinador del proyecto. Y mi reconocimiento a la Sra. Zárate y al personal del CCH. Finalmente, agradezco los valiosos comentarios y sugerencias de los sinodales que revisaron la tesis: Dr. Gijón, Dr. Hong, Dr. Kubli, Dr. Ninomiya y M. en C. Ponce.

Tlalpan, D.F., Carlos Hoyo Vadillo.

INDICE.

RESUMEN.....	2
INTRODUCCION.....	3
Músculo liso del sistema reproductor.....	3
Epidídimo y vesícula seminal.....	3
Miometrio.....	6
Acople excitación-contracción.....	10
Efectos de andrógenos y progestinas sobre la excitabilidad.....	11
Intercambiador $Na^+-Ca^{2+}$ .....	14
MATERIAL Y METODOS.....	16
Tracto reproductor masculino.....	16
Útero no gestante despolarizado.....	17
Útero gestante.....	19
RESULTADOS.....	21
Efecto de los andrógenos sobre el tracto reproductor masculino.....	21
Efecto de las progestinas sobre el útero no gestante despolarizado.....	23
Efecto de las progestinas sobre el útero gestante.....	27
DISCUSION.....	32
Tracto reproductor masculino.....	32
Útero no gestante despolarizado.....	34
Útero gestante.....	41
APENDICE. SISTEMA DE ANALISIS.....	44
REFERENCIAS.....	47

## RESUMEN.

Se estudió el efecto, *in vitro*, de los metabolitos 5-reducidos de la testosterona y la progesterona sobre el músculo liso del sistema reproductor de la rata. Se observó que los andrógenos antagonizan la respuesta contráctil inducida por  $Ba^{2+}$  (1 mM) en el epidídimo y la vesícula seminal; lo cual sugiere que los andrógenos 5-reducidos podrían participar en el control de la contractilidad del tracto reproductor masculino. Los datos obtenidos en los experimentos con el útero despolarizado (por  $K^+$  y en presencia y en ausencia de  $Na^+$ ) apoyan la hipótesis de que el efecto de los metabolitos 5-reducidos de la progesterona se debe a un bloqueo de la entrada de  $Ca^{2+}$ ; ya que en esas condiciones la contracción sostenida se debe a la entrada de  $Ca^{2+}$  externo. Estos datos también apoyan la propuesta de la presencia del intercambiador  $Na^+-Ca^{2+}$  en el miometrio. Finalmente, se vió que las progestinas reducen la contractilidad espontánea del útero con 5, 10 o 15 días de gestación. Su potencia depende del grado de avance de la gestación. Se propone que el metabolismo de la progesterona desempeña un papel activo en el control de la contractilidad uterina durante la gestación.

## INTRODUCCION

### Músculo liso del sistema reproductor.

El músculo liso del sistema reproductor posee una característica que lo distingue de otros músculos lisos, su fuerte dependencia de las hormonas sexuales. Ello es especialmente notorio en el caso del útero, en el que se observa que sus propiedades fisiológicas cambian según el estado hormonal del animal. En esta tesis se estudia el mecanismo por el que los andrógenos y las progestinas regulan, de modo inhibitorio, la contractilidad del músculo liso del sistema reproductor. Para ello me enfocaré en tres órganos de la rata: el epidídimo, la vesícula seminal y el útero.

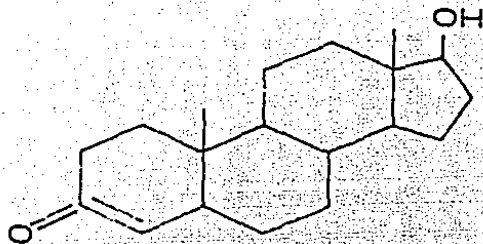
### Epidídimo y vesícula seminal.

Una vez que se ha terminado la espermatogénesis, los espermatozoides son recogidos en la rete testis y conducidos hacia el epidídimo por los conductillos eferentes, lo que se logra gracias a su epitelio ciliado. En el epidídimo se completa la maduración de los espermatozoides, y se almacenan. Debido a que los espermatozoides son inmóviles en este estadio su paso a lo largo este conducto se controla por los movimientos musculares del epidídimo (Goodman, 1980). Por

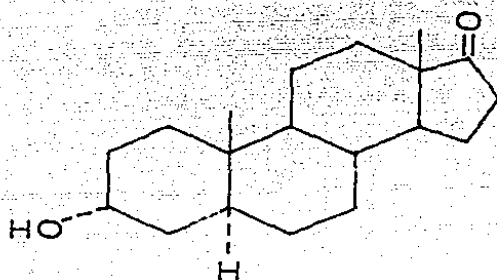
su parte, las vesículas seminales tienen una importante función secretora. Producen la fructosa y otros nutrientes que los espermatozoides requerirán para su motilidad una vez que estén en la vagina (Goodman, 1980).

Actualmente se sabe poco acerca de los mecanismos de regulación de la contractilidad del epidídimo. Ponce-Monter y Kubli-Garfias (1982) reportaron que la actividad contráctil del epidídimo se regula principalmente por receptores alfa-adrenérgicos. Más tarde se vió que la respuesta adrenérgica podría ser modulada por los andrógenos (Caracheo, Hoyo-Vadillo, Ponce-Monter y Kubli-Garfias, 1983), ya que la respuesta del epidídimo de la rata hipofisectomizada es mayor que en la rata intacta y que en la rata hipofisectomizada tratada con testosterona. Los andrógenos, además de su posible regulación de los receptores alfa-adrenérgicos podrían disminuir la contractilidad del epidídimo mediante una acción directa; de una manera similar a las acciones de la progesterona sobre el miometrio. Pues se sabe que los andrógenos son capaces de inhibir las contracciones del útero (Robson, 1938; Kubli-Garfias, Pacheco-Cano, Ponce-Monter y Bondani, 1980).

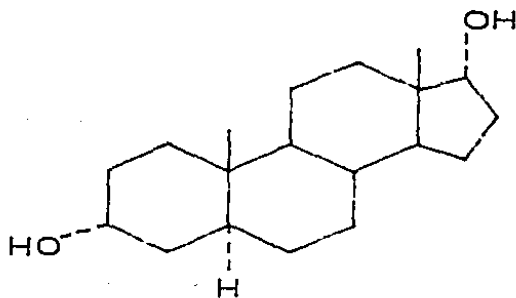
Van Doorn y colaboradores (1975) evaluaron el metabolismo de los andrógenos en la rata. Luego de administrar dihidrotestosterona (DHT) y androstandiol marcados con  $^3\text{H}$ , constataron la presencia de androstandiol y androsterona en



*TESTOSTERONA*



*ANDROSTERONA*



*ANDROSTANDIOL*

Figura 1. Estructuras de la testosterona y dos de sus principales metabolitos. Las líneas punteadas indican que los hidroxilos o los hidrógenos están en posición alfa (ver figura 11).



los principales tejidos del tracto reproductor masculino. Observaron que las concentraciones de androstandiol y androsterona en el epidídimo son mucho mayores que en el plasma; así por ejemplo, el androstandiol, cuya concentración plásmatica es de 0.5 ng/ml, está unas tres veces más concentrado en el epidídimo. En la vesícula seminal los niveles de androsterona y androstandiol son bastante más bajos, pero los de DHT son comparables a los niveles de androstandiol en el epidídimo. Por otra parte, se sabe que la enzima responsable de la reducción de la testosterona y de la DHT se regula por parte de los andrógenos mismos (De Larminat, Monsalve, Charreau, Calandra, y Blaquier, 1978).

#### Miometrio.

El miometrio es el músculo liso con la mayor capacidad contráctil del sistema reproductor; sin embargo, solo durante el trabajo de parto la manifiesta en su máxima magnitud. Varios factores regulan su actividad contráctil, a continuación se revisan algunos de ellos.

El útero de la rata, embarazada o no embarazada, en condiciones *in vitro* manifiesta contracciones espontáneas. En la rata embarazada la contractilidad espontánea se debe, según Vane y Williams (1973), a la liberación de prostaglandinas en el baño; las cuales se identifican en parte con las prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  y  $E_2$ . Estos autores vieron

que hacia el final del embarazo (el día 22) la liberación de prostaglandinas aumenta unas 4 veces; por lo que apoyan la hipótesis de que las prostaglandinas juegan un papel preponderante en la determinación del momento del parto (Thorburn y Challis, 1979).

Allen y Reynolds (1935) demostraron la acción inhibitoria de la progesterona sobre las contracciones uterinas. En 1963 Csapo y Takeda idearon un método para registrar *in vivo* simultáneamente las actividades eléctrica y mecánica del útero de la coneja sin anestesiar. Por medio de tres electrodos y un balón de látex observaron la asociación de los trenes de actividad eléctrica con las contracciones, analogamente a las observaciones *in vitro*. En ese estudio, a lo largo del embarazo, verificaron que con el establecimiento del bloqueo de progesterona ambas manifestaciones desaparecen casi por completo. Csapo llamó bloqueo de progesterona a la imposibilidad de la propagación del potencial de acción que provoca la progesterona, pero que no afecta la capacidad intrínseca del miometrio para contraerse (Csapo, 1963). Uno de los argumentos que más apoyan su teoría es la demostración, de que en la rata, se requiere de un mínimo de 2 ug de progesterona por 100 g de miometrio para evitar el trabajo de parto (Csapo y Wiest, 1969). Sin embargo, algunos autores han dudado que la progesterona sea la responsable de la inhibición de la contractilidad durante el embarazo (Kao,

1977). Las razones para ello son varias. Primero, en algunas especies no se ha podido demostrar *in vivo* el efecto inhibitorio de la progesterona y tampoco se ha podido encontrar una relación clara entre la disminución de los niveles plasmáticos de progesterona antes del parto (Kao, 1977). Sin embargo, los metabolitos de la progesterona no han sido suficientemente estudiados para descartar su papel en el control de la contractilidad uterina durante el embarazo.

Con el objeto de demostrar que no solo la progesterona sino también otros factores presentes en los extractos de cuerpos lúteos podrían tener un efecto inhibitorio sobre las contracciones del útero, Robson (1938) observó el efecto inhibitorio de la testosterona sobre las contracciones del útero. Propuso que los extractos lúteos podrían contener sustancias con efectos similares al de la testosterona lo cual explicaría los resultados obtenidos con varias fracciones de los extractos. Los metabolitos de la progesterona podrían ser esas sustancias que menciona Robson.

El metabolismo de la progesterona aumenta considerablemente durante la gestación (Sanyal y Villee, 1976; Marrone y Karavolas, 1981) por lo que es importante considerar el papel fisiológico de estos metabolitos. Se sabe que algunos de estos metabolitos son más potentes que la progesterona para inhibir la contractilidad espontánea del miometrio de la rata no embarazada (Kubli-Garfias, Medrano-Conde, Beyer y Bondani,

1979), pero no se conoce su efecto en el miometrio embarazado. El metabolismo de la progesterona puede ser un factor regulador de la actividad contráctil del miometrio.

Junto con la progesterona, las contracciones uterinas se rigen por los estrógenos; los cuales promueven el desarrollo del músculo, y por lo tanto aumentan su contractilidad. Esta acción se realiza por procesos que involucran la síntesis de proteínas y tiene una latencia de horas (Finn y Porter, 1975; Reynolds, 1949). Aunque debe mencionarse que los estrógenos (en dosis de 6 ug/ml) presentan una acción directa similar a la de la progesterona (Batra y Bengtsson, 1978).

Además de las hormonas ováricas y las prostaglandinas (Reynolds, 1949; Finn y Porter, 1975; Thornburn y Challis, 1979) el control de la contractilidad uterina durante la gestación involucra la interacción de otros factores. Los niveles plásmaticos de oxitocina (Fuchs, 1983), el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Kishikawa, 1981) y el número de uniones estrechas (gap junctions) del miometrio (Garfield, Puri y Csapo, 1982) son algunos de ellos. Pero su importancia relativa depende de la especie.

Otro factor regulador de la contractilidad uterina, es su inervación autonómica. Así por ejemplo, durante el embarazo se ha observado que el miometrio sufre una denervación de sus terminales adrenérgicas; la cual se efectúa solo en el cuerno

que lleva a los fetos y produce un aumento en la sensibilidad a la noradrenalina (Elmér, Alm y Thorbert, 1980). Sin embargo, su significado fisiológico no se ha aclarado (Marshall, 1981).

#### Acople excitación-contracción.

Se llama acople excitación-contracción a la conversión de los estímulos eléctricos en el estímulo que inicia el ciclo contracción relajación. En el músculo esquelético este proceso se puede dividir en cuatro pasos: 1) el potencial de acción entra al interior de la fibra por el sistema tubular (sistema T), 2) la despolarización de la membrana del sistema T induce la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico, 3) el  $\text{Ca}^{2+}$  así liberado alcanza a la troponina de los filamentos delgados y produce la contracción, 4) cuando termina la influencia de la despolarización, el  $\text{Ca}^{2+}$  es reacumulado en la superficie del retículo sarcoplásmico por un proceso dependiente de ATP (Kuriyama, 1981). El músculo liso no tiene sistema T, pero sus células son mucho más pequeñas que las del músculo esquelético; en cambio, la célula del músculo liso cuenta con numerosas vesículas pinocíticas (*caveola*) las cuales desempeñan la función del sistema T. Esto hace que la célula del músculo liso dependa en gran medida del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular

para contraerse (Kuriyama, 1981). Los efectos inhibitorios de la contractilidad de los andrógenos y progestinas pensamos que se deben a un antagonismo al  $Ca^{2+}$  que entra a la célula cuando se inicia el acople excitación-contracción.

### Efectos de andrógenos y progestinas

#### sobre la excitabilidad.

El efecto inhibitorio de la contractilidad de los andrógenos y las progestinas parece deberse a una acción directa sobre la permeabilidad de la membrana plasmática a los iones, especialmente al  $Ca^{2+}$ . Esta hipótesis se basa en varios hechos, como se muestra a continuación.

En 1961 Kuriyama y Csapo analizaron las modificaciones que provoca la progesterona sobre el potencial de acción del miometrio. Para ello utilizaron microelectrodos intracelulares, por medio de los cuales median el potencial de membrana, al mismo tiempo que registraban con un transductor de tensión la respuesta mecánica del músculo. De ese modo correlacionaron las espigas de los potenciales de acción con la tensión de la tira muscular. Observaron que la progesterona disminuía la actividad eléctrica y por consiguiente las contracciones del miometrio. Es importante tener en cuenta que además de disminuir el número de

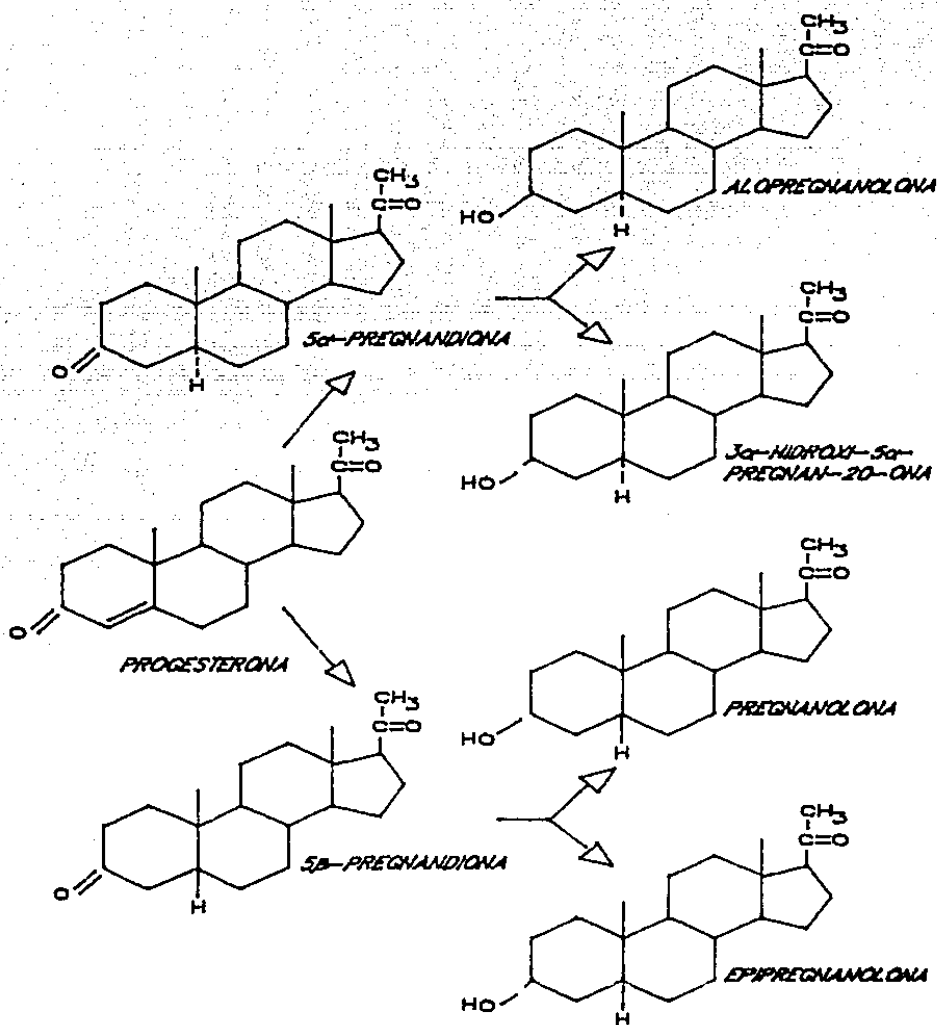


Figura 2. Estructuras de la progesterona y algunos de sus metabolitos 5-reducidos. Las líneas punteadas indican la posición alfa y las continuas la posición beta (ver la figura 11).

potenciales de acción, estos autores observaron que la progesterona disminuía la amplitud del potencial de acción. Debido a que el potencial de acción del miometrio depende de la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Anderson, Ramón y Snyder, 1971), esta observación sugiere que la progesterona bloquea la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  o de alguno de los dos. Aunque la permeabilidad al  $\text{Na}^+$  puede ser alterada por los esteroides, el efecto sobre la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido más estudiado. Así, Batra y Bengtsson (1978) demostraron que la progesterona disminuye la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  del miometrio. Por su parte, Kubli-Garfias y colaboradores (1982) mostraron que un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  estimula la contractilidad del útero, mientras que las progestinas 5-reducidas lo antagonizan. El mecanismo de acción de este antagonismo al  $\text{Ca}^{2+}$  no ha sido suficientemente estudiado. En esta tesis se propone que el mecanismo de acción de los andrógenos y las progestinas, en cuanto a su efecto inhibitorio, sea el de antagonizar o bloquear la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al músculo liso.

En 1942 Seylo observó el efecto anestésico de varios esteroides, entre ellos algunos andrógenos y progestinas. Más tarde Gyernek (1967) demostró que el efecto anestésico de un metabolito de la progesterona, la pregnanolona, era mucho más importante que el de la hormona precursora. Kubli-Garfias y colaboradores (Kubli-Garfias, Canchola,



Arauz-Contreras y Feria-Velasco, 1982; Kubli-Garfias, Cervantes, y Beyer, 1976) estudiaron el efecto depresor de los andrógenos y las progestinas sobre la actividad eléctrica cerebral del gato. Observaron que los metabolitos de la testostosterona y la progesterona, especialmente los 5 beta-reducidos deprimen la actividad eléctrica a dosis mucho menores que sus precursores. Este efecto de los esteroides, no genómico, es muy similar al efecto que se observa en el músculo liso. Por lo que sus mecanismos de acción pensamos que son similares.

#### Intercambiador $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ .

Varios autores (Osa, 1971; Ma y Bose, 1977; Grover, Kwan y Daniel, 1981) han propuesto que un intercambiador  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  esté presente en el miometrio. Su función sería disminuir la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  durante la relajación del miometrio. La existencia del intercambiador explica la contracción que produce la ausencia o la disminución del  $\text{Na}^+$  externo; ya que según Reuter (1974) esta proteína intercambiadora es reversible, es decir, que aunque su función normal es la de eliminar el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  interno, también es capaz de introducir  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular intercambiándolo por  $\text{Na}^+$  interno. En condiciones fisiológicas, el intercambiador utiliza la energía de la

bomba  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  en la forma del gradiente de  $\text{Na}^+$ . Es importante señalar que cuando el intercambiador funciona en sentido inverso, o sea en presencia de  $\text{Na}^+$  bajo, se puede observar en el miometrio, que el desarrollo de tensión se anula en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo (Osa, 1971; Masahashi y Tomita, 1983).

## MATERIAL Y METODOS.

### Tracto reproductor masculino.

Se utilizaron el epidídimo y la vesícula seminal de ratas Sprague-Dawley de 250 a 350 g de peso. Luego de sacrificar a los animales por decapitación, y extraer sus epidídimos y vesículas seminales, estas se disecaron en una solución Krebs-Henseleit, cuya composición (mM) fue la siguiente:  $\text{Na}^+$  144,  $\text{Cl}^-$  129,  $\text{K}^+$  5.8,  $\text{Mg}^{2+}$  1.2,  $\text{HCO}_3^-$  25,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  1.2,  $\text{Ca}^{2+}$  1.5 y glucosa 11.1. El pH se ajustó a 7.4. Los segmentos del epidídimo, de 1 cm de largo, se tomaron a 10 cm del vaso deferente, y los segmentos de la vesícula seminal, también de 1 cm, se disecaron de la porción terminal de la glándula. Ambos tejidos se vaciaron de su contenido, y se sujetaron en cámaras para tejido aislado donde se tensaron a 2 mN para registrar la respuesta contráctil de sus fibras longitudinales. La temperatura se mantuvo en 35 °C y se burbujearon constantemente con carbógeno ( $\text{O}_2$  al 95% y  $\text{CO}_2$  al 5%). Luego de un período de estabilización (30 min) se indujeron contracciones rítmicas con  $\text{BaCl}_2$  (1 mM) las cuales se registraron por medio de transductores Grass (FT.03) y en un polígrafo Grass (7D), en línea con una microcomputadora Sol (ver apéndice). Después de 20 min de registro, que se tomaron como el control, se inyectó al baño (en las dosis indicadas) alguno de los siguientes andrógenos (Sigma

Chemical): 17 beta-hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona; 2, 4, 8 y 16 ug/ml), 3 alfa-hidroxi-5 alfa-androstan-17-ona (androsterona; 0.5, 1, 2 y 4 ug/ml) y 5 alfa-androstan-3 alfa, 17 beta-diol (androstandiol; 0.5, 1, 2 y 4 ug/ml). Los andrógenos se disolvieron en propilen glicol cuya concentración final fue de 1% v/v.

#### Utero no gestante despolarizado.

Se utilizaron segmentos uterinos de un 1 cm de largo que se obtenían de ratas Sprague-Dawley (180-220 g) en fase de diestro. Los tejidos se colocaron en cámaras de órgano aislado (10 ml) donde se registró la actividad contráctil de las fibras longitudinales. Se utilizaron transductores y amplificadores Grass y una computadora Sol para digitalizar la señal (ver apéndice). La solución fisiológica tenía la siguiente composición (mM):  $\text{Na}^+$  135,  $\text{Cl}^-$  146.4,  $\text{K}^+$  4.6,  $\text{Mg}^{2+}$  1.2,  $\text{Ca}^{2+}$  2.2, hepes (ácido N-2-hidroxi etilpiperazina-N'-2-etanesulfónico) 10 y glucosa 11; pH=7.4. El amortiguador hepes se usó porque, como se ve más adelante, cuando se elimina el  $\text{Na}^+$  de la solución no se puede usar amortiguador de  $\text{NaHCO}_3$ . La temperatura se mantuvo en 37 °C y la solución fisiológica se burbujeó con  $\text{O}_2$  al 100%, ya que el hepes no necesita de  $\text{CO}_2$  para amortiguar el pH. Una vez que la actividad contráctil del tejido se estabilizó, esto es

después de 30 min, se cambió la solución hepes por una solución despolarizante; la cual produce una contracción sostenida. Se utilizaron dos soluciones despolarizantes; ambas con  $K^+$  alto (40 mM) pero una de ellas libre de  $Na^+$ :

1) Solución hepes despolarizante con  $Na^+$  normal (DSN) con la siguiente composición (mM):  $Na^+$  99.6,  $Cl^-$  146.4,  $K^+$  40,  $Mg^{2+}$  1.2,  $Ca^{2+}$  2.2, hepes 10 y glucosa 11.

2) Solución hepes despolarizante libre de  $Na^+$  (DLS, composición mM):  $Cl^-$  146.4,  $K^+$  40,  $Mg^{2+}$  1.2,  $Ca^{2+}$  2.2, hepes 10, glucosa 11 y sacarosa 199.2.

El  $Na^+$  de la solución DLS se sustituyó isosmolarmente con sacarosa, la cual por no disociarse se agrega en una concentración que es el doble de la concentración de NaCl en la solución DSN. Este hecho modifica la fuerza iónica (de 0.1598 a 0.0648), pero ello no altera la tensión muscular (Ma y Bose, 1977).

Se tomó un registro de la contracción sostenida que produce la solución despolarizante ya sea la solución DSN o DLS. Este registro se tomó como el control, y tuvo una duración de 5 min al cabo de los cuales se agregó al baño la progesterona a estudiarse. Se utilizaron las siguientes progestinas (Sigma Chemical) y en las dosis que se indican: 4-pregnen-3, 20-diona (progesterona, 32 ug/ml), 5 beta-pregnan-3, 20-diona (5 beta-pregnandiona, 18 ug/ml), 3 beta-hidroxi-5

beta-pregnan-20-ona (pregnanolona, 8 ug/ml) y 3 alfa-hidroxi-5 beta-pregnan-20-ona (epipregnanolona, 15 ug/ml). Las dosis de las progestinas corresponden a las DE<sub>04</sub> obtenidas por Kubli-Garfias y colaboradores (1979). Se eligió esta dosis para tener un efecto claro. Las progestinas se agregaron al baño disueltas en propilen glicol, cuya concentración final fue de 1% v/v.

#### Utero gestante.

Se utilizaron ratas Sprague-Dawley vírgenes las cuales se mantuvieron con un ciclo de luz oscuridad de 14:10 h respectivamente. Todos los días se les tomó un frotis vaginal para seguir su ciclo estral. Para embarazarlas, se colocaron 5 hembras en fase de proestro con un macho experimentado. Se comenzó a contar el embarazo desde ese día para aquellas hembras en cuyos frotis vaginales se observaron espermatozoides. Se sacrificaron a los animales con 5, 10, 15 y 20 días de gestación. De los cuales se obtuvieron segmentos uterinos de aproximadamente 1 cm de largo y los cuales se mantuvieron en la solución Krebs-Henseleit ya descrita. Los fetos de las ratas con 10, 15 y 20 días de gestación se separaron del útero. Los segmentos uterinos se sujetaron en cámaras de tejido aislado de modo que se registraran las contracciones de las fibras longitudinales.

Se usó una tensión de reposo de 10 mN. La preparación se mantuvo en 37 °C y la solución se burbujó con carbógeno (O<sub>2</sub> al 95% y CO<sub>2</sub> al 5%) para mantener el pH en 7.4. Al igual que en los otros experimentos, se utilizaron equipo Grass y una microcomputadora Sol para la medición de la contractilidad de los músculos. Después de un período de estabilización (30 min) se registró un intervalo control (10 min) de la actividad contráctil espontánea y se inyectó al baño, alguna de las progestinas siguientes (Sigma Chemical): 4-pregnen-3, 20-diona (progesterona, 8 ug/ml); 20 alfa-hidroxi-pregnen-3-ona (20 alfa-hidroxi-pregnenona 16 ug/ml); 3 alfa-hidroxi-5 alfa-pregnan-20-ona (21 ug/ml); 3 alfa-hidroxi-5 beta-pregnan-20-ona (epipregnanolona, 5.2 ug/ml); 5 beta-pregnan-3, 20-diona (5 beta-pregnandiona, 3.8 ug/ml); 3 beta-hidroxi-5 beta-pregnan-20-ona (pregnanolona, 2.3 ug/ml). Las dosis indicadas corresponden a las DE<sub>50</sub> para la inhibición de las contracciones espontáneas de la rata no embarazada (Kubli-Garfias, Medrano-Conde, Beyer y Bondani, 1979). Las progestinas se disolvieron en propilen glicol, cuya concentración fue de 1% v/v.

## RESULTADOS

### Efecto de los andrógenos

#### sobre el tracto reproductor masculino.

El epidídimo y la vesícula seminal no presentaron contracciones espontáneas. Por esta razón se utilizó  $Ba^{2+}$ , a una concentración de 1 mM, para inducir una actividad contráctil rítmica. Como se puede ver en la figura 3, las contracciones tenían forma de espigas con una frecuencia entre 0.05 y 0.1 Hz. La respuesta al estímulo de  $Ba^{2+}$  fue ligeramente mayor en el epidídimo que en la vesícula seminal. El propileno glicol, que se utilizó para disolver las hormonas, no tuvo ningún efecto significativo sobre las contracciones a la concentración de 1 % v/v. La testosterona, la androsterona y el androstandiol redujeron la intensidad de las contracciones inducidas. La tensión basal prácticamente no se modificó. Por su parte, la frecuencia de las contracciones casi no cambió con las dosis bajas mientras que a dosis altas las contracciones fueron más lentas, e incluso desaparecieron, como en el caso de la androsterona. En la figura 4 se muestran las curvas dosis respuesta. De las tres hormonas, la testosterona fue la menos potente y la androsterona la más potente. La sensibilidad del epidídimo



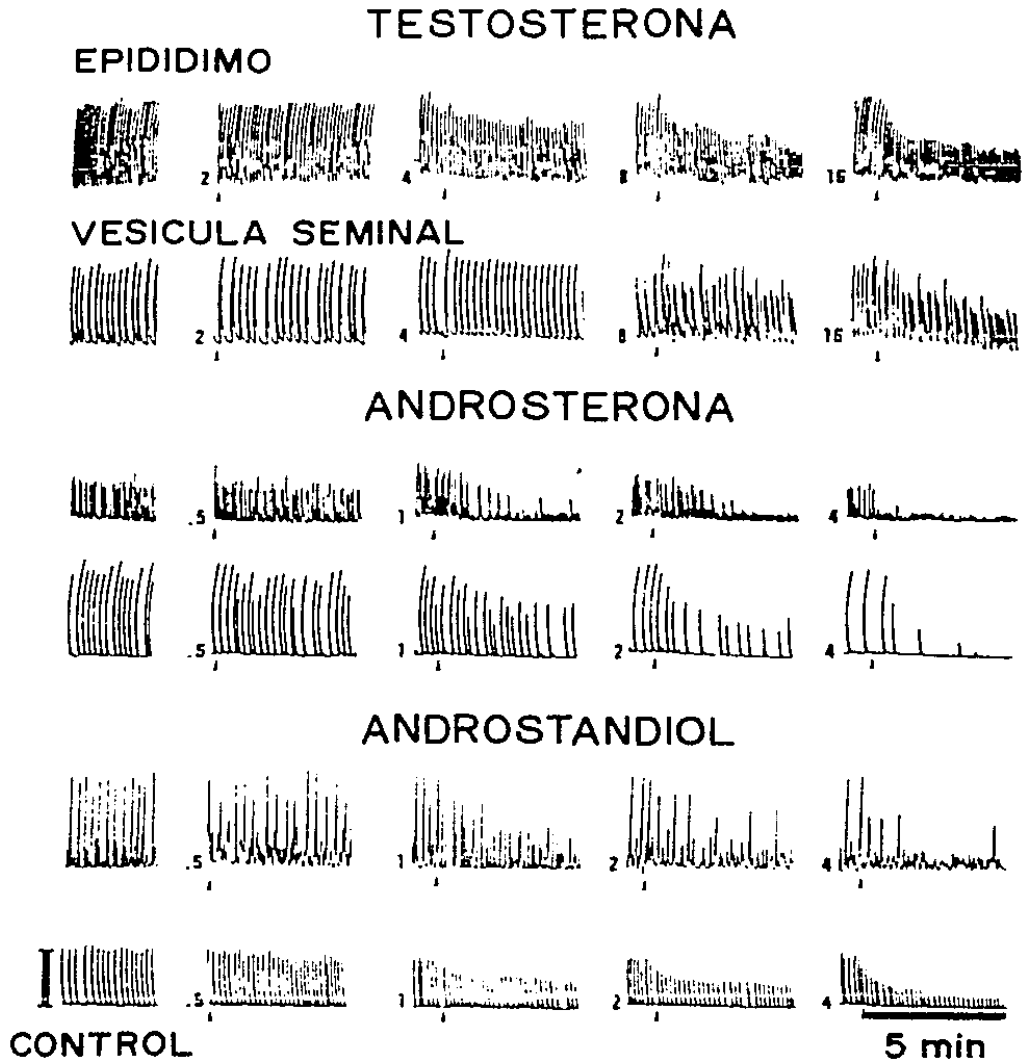


Figura 3. Efecto de los andrógenos sobre la respuesta contráctil del epidídimo y la vesícula seminal inducida por  $Ba^{2+}$  (1 mM). La barra vertical indica una tensión de 2 mN. los números junto a las flechas son las dosis de los andrógenos en  $\mu\text{g/ml}$ .

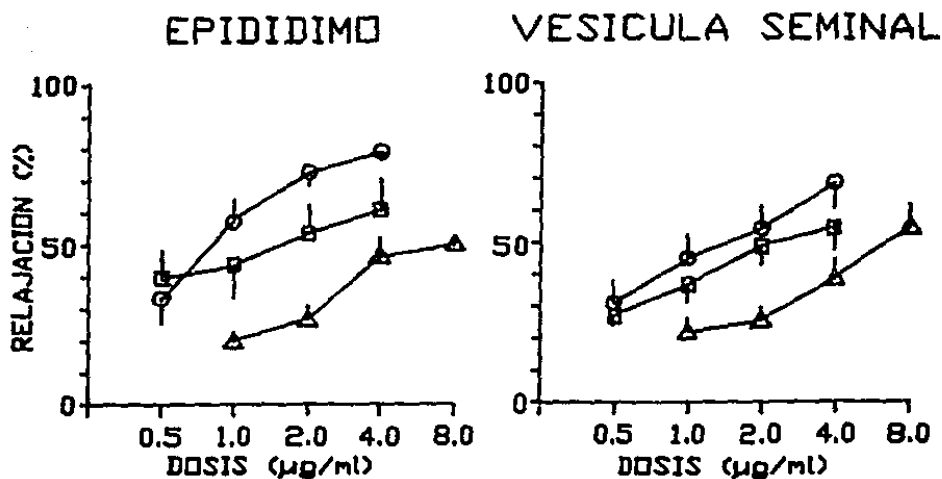


Figura 4. Relajación producida por testosterona (Δ), androsterona (O) y androstandiol (□) sobre las contracciones del epididimo y la vesícula seminal inducidas por Ba<sup>2+</sup> (1mM). Cada punto es el promedio de por lo menos seis experimentos. Las barras indican el error estándar.

fue mayor que la de la vesícula seminal.

Efecto de las progestinas sobre  
el útero no gestante despolarizado.

Después de registrar la actividad espontánea de los úteros

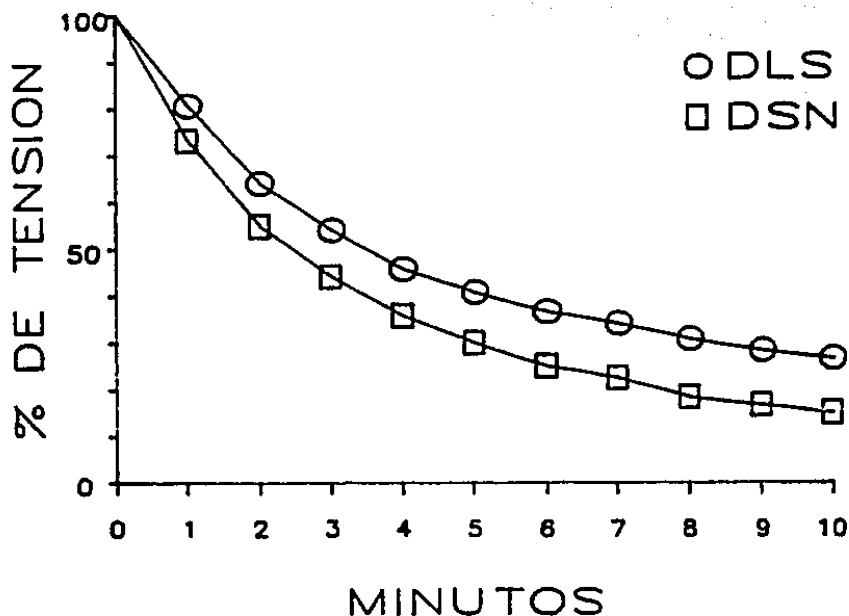


Figura 5. Relajación producida por progesterona al útero despolarizado ( $K^+$  40 mM) en soluciones con  $Na^+$  normal (DSN) y libres de  $Na^+$  (DLS).  $n=8$ , los errores estándares son menores al tamaño de los símbolos.

en fase de diestro, se les indujeron contracciones sostenidas por medio de alguna de las soluciones despolarizantes. El propilen glicol no modificó su tono cuando se inyectó en una concentración de 1 % v/v. Las progestinas disminuyeron el tono de la contracción sostenida (ver figuras 5 a 8), lo cual se manifestó inmediatamente después de que se agregaban al

TABLA I. EFECTO DE LAS PROGESTINAS SOBRE EL MIOMETRIO DESPOLARIZADO EN SOLUCIONES DE POTASIO ALTO CON SODIO NORMAL (DSN) Y EN SOLUCIONES DE POTASIO ALTO LIBRES DE SODIO (DLS).

Progestina	% de Relajación		Tiempo medio de relajación (min)	
	<u>DSN</u>	<u>DLS</u>	<u>DSN</u>	<u>DLS</u>
Progesterona	62.4±1.4	49.4±3.1 <sup>a</sup>	2.8±0.2	4.0±0.6 <sup>c</sup> .
Pregnandiona	63.3±1.7	49.4±2.2 <sup>a</sup>	2.7±0.2	4.6±0.6 <sup>b</sup> .
Pregnanolona	49.0±2.0	41.0±2.9 <sup>b</sup>	4.7±0.4	6.3±0.7 <sup>c</sup> .
Epipregnanolona	51.4±1.0	41.8±1.4 <sup>a</sup>	4.0±0.6	6.5±0.8 <sup>b</sup> .

Los valores representan el promedio ± el error estándar (n=8). <sup>a</sup>P .005, <sup>b</sup>P .05, <sup>c</sup>no significativo.

baño. La relajación fue significativamente mayor en las soluciones con Na<sup>+</sup> normal (DSN) que en las soluciones libres de Na<sup>+</sup> (DLS). La tabla I muestra los porcentajes de relajación que producen las progestinas. La progesterona y la pregnandiona produjeron una relajación mayor que la pregnanolona y la epipregnanolona. La tabla I presenta también los tiempos medios de relajación; los cuales indican el momento en el que se alcanza el 50 % de la tensión inicial. La diferencia entre las dos soluciones despolarizantes es estadísticamente significativa cuando se

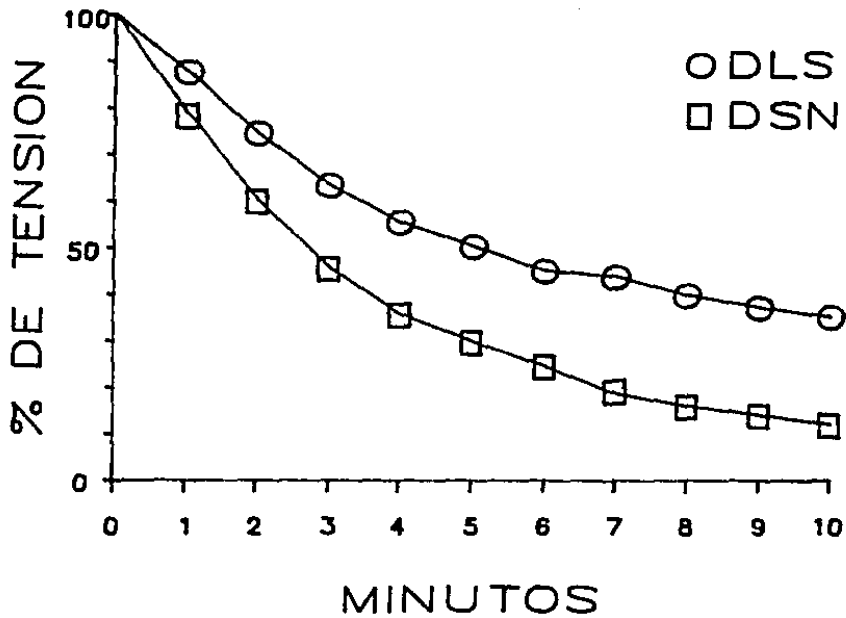


Figura 6. Relajación producida por pregnandiona al útero despolarizado ( $K^+$  40 mM) en soluciones con  $Na^+$  normal (DSN) y libres de  $Na^+$  (DLS).  $n=8$ , los errores estándares son menores al tamaño de los símbolos.

comparan los porcentajes de relajación de las cuatro hormonas estudiadas; sin embargo la misma comparación no es significativa si se hace con los tiempos medios de relajación de la progesterona y de la pregnanolona.

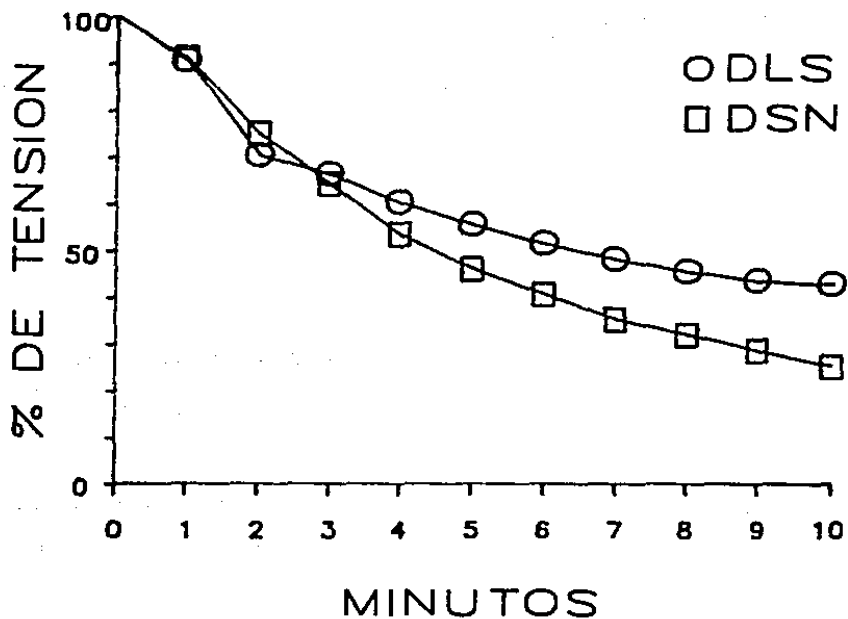


Figura 7. Relajación producida por pregnanolona al útero despolarizado ( $K^+$  40 mM) en soluciones con  $Na^+$  normal (DSN) y libres de  $Na^+$  (DLS).  $n=8$ , los errores estándares son menores al tamaño de los símbolos.

Efecto de las progestinas

sobre el útero gestante.

La actividad contráctil espontánea del útero de la rata gestante decreció con el avance de la gestación (figura 9).

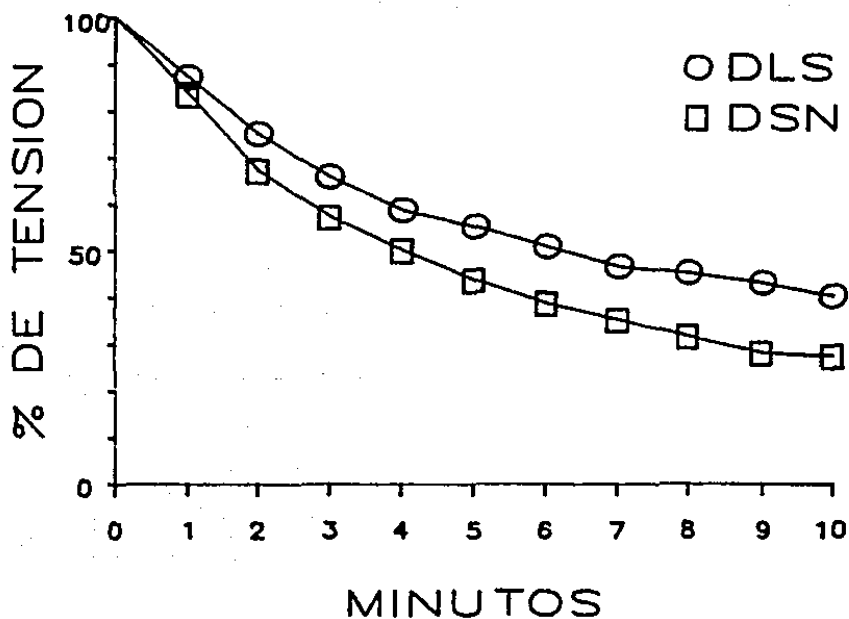
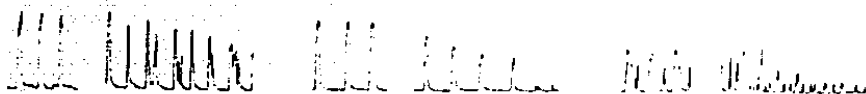


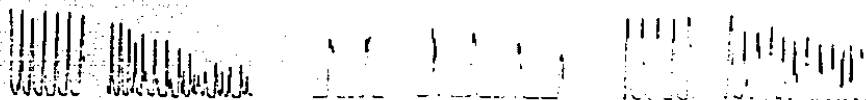
Figura 8. Relajación producida por epipregnanolona al útero despolarizado ( $K^+$  40 mM) en soluciones con  $Na^+$  normal (DSN) y libres de  $Na^+$  (DLS).  $n=8$ , los errores estándares son menores al tamaño de los símbolos.

Sin embargo, a los 5 días de embarazo su actividad era ligeramente mayor que en la rata no gestante. Las contracciones eran mucho más irregulares que las que se observan en la rata no gestante. A los 20 días de gestación el útero no presentó contracciones espontáneas regulares, si bien se registraban algunas al principio del registro pronto

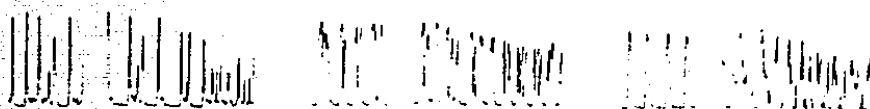
### PROGESTERONA



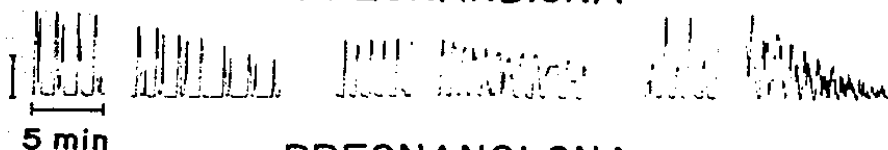
### 20 $\alpha$ - HIDROXI - PREGNENONA



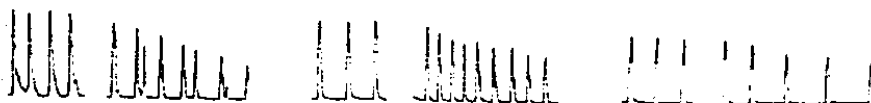
### 3 $\alpha$ - HIDROXI - 5 $\alpha$ - PREGNAN - 20 - ONA



### PREGNANDIONA



### PREGNANOLONA



### EPIPREGNANOLONA



Figura 9. Registros de la actividad contráctil del útero gestante, en condiciones control y bajo el efecto de las progestinas indicadas (DE<sub>50</sub>). La barra vertical corresponde a 10 mN.



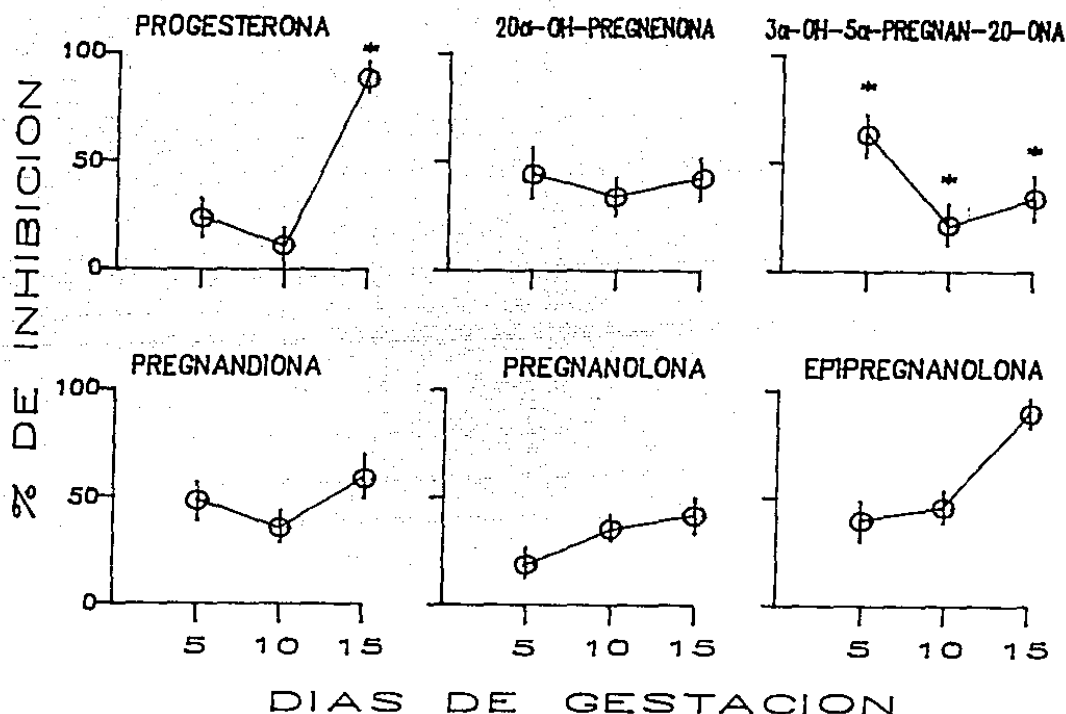


Figura 10. Efecto de las progestinas (DE<sub>50</sub>) sobre la contractilidad espontánea del útero de la rata gestante. Los puntos marcados con \* corresponden al doble de la DE<sub>50</sub>. n=6, las barras son los errores estándares.

desaparecían por completo; por esta razón no se estudió la acción de las progestinas en esta etapa. La figura 9 muestra los registros de la contractilidad espontánea del útero embarazado así como el efecto de las progestinas. En la figura 10 se grafica el efecto de las progestinas sobre las

contracciones espontáneas de la rata con 5, 10 y 15 días de gestación. Como se puede ver, todas las progestinas produjeron una inhibición significativa, que aunque se mantiene cerca del 50 % su potencia depende del grado de avance de la gestación. Las progestinas disminuyeron tanto el área bajo la curva como la amplitud de las contracciones, mientras el tono basal se modificó muy poco; y curiosamente la frecuencia de las contracciones aumentó ligeramente bajo el efecto de las progestinas, especialmente en los componentes de cada contracción o porque una contracción compuesta se subdividía en varias. Bajo el efecto de las progestinas el patrón de las contracciones se volvió más irregular de lo que ya era. La progesterona y la 3 alfa-hidroxi-5 alfa-pregnan-20-ona fueron mucho menos potentes que las otras progestinas, especialmente la última. Por tal motivo se utilizó el doble de la dosis de estas hormonas; es decir el doble de la  $DE_{50}$  que produce inhibición en el útero de la rata no gestante. Las dosis dobles se emplearon para la progesterona a los 15 días de gestación y para la 3 alfa-hidroxi-5 alfa-pregnan-20-ona a los 5, 10 y 15 días de gestación. Por su parte el propileno glicol (1 % v/v) que se utilizó como vehículo no tuvo ningún efecto significativo sobre la contractilidad del útero gestante.

DISCUSION.

Tracto reproductor masculino.

El hecho de que el epidídimo y la vesícula seminal de la rata no presenten contracciones espontáneas se puede explicar por el efecto inhibitor de los andrógenos que se ha mostrado aquí. En este laboratorio hemos observado que el epidídimo de las ratas prepúberes, así como el de las ratas hipofisectomizadas presenta contracciones espontáneas. Posiblemente ello se deba a que los niveles de los andrógenos son bajos en ambas condiciones. Con base en estas observaciones se puede proponer que los andrógenos regulen la actividad contráctil del tracto reproductor masculino por un mecanismo directo, es decir, porque antagonizan la entrada de  $Ca^{2+}$ . Este efecto de los andrógenos es de suma importancia para el proceso de maduración y capacitación del espermatozoide; ya que el tiempo que deben transitar por las regiones rostral y media del epidídimo (cerca de 10 días) debe estar regulado por un mecanismo inhibitorio. Por otra parte, el efecto inhibitor de los andrógenos hace posible que los espermatozoides se puedan almacenar en la porción caudal del epidídimo; y permite que el líquido seminal permanezca en las vesículas seminales.

Los andrógenos son capaces de inhibir las contracciones del epidídimo y la vesícula seminal inducidas con  $Ba^{2+}$  (1 mM). Debido a que el  $Ba^{2+}$ , a esta concentración induce la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula del vaso deferente (Hay y Wadsworth, 1982); los datos aquí presentados, apoyan la hipótesis que postula el antagonismo al  $Ca^{2+}$  como el mecanismo de acción para el efecto relajante de los andrógenos y de las progestinas en el músculo liso. Hansen y colaboradores (1984) descartaron un efecto del  $Ba^{2+}$  sobre la liberación de noradrenalina en la aorta de la rata; pero en su modelo postulan un efecto intracelular del  $Ba^{2+}$  ya que utilizan dosis altas (20 mM) del ión. El antagonismo de los andrógenos al  $Ca^{2+}$  se ha observado también en el miometrio; pues los andrógenos antagonizan el aumento de la contractilidad del útero asociada a una elevación de la concentración del  $Ca^{2+}$  externo (Kubli-Garfias, Ponce-Monter, Medrano-Conde, López-Fiesco y Bondani, 1982).

La androsterona y el androstandiol, como se puede ver en sus curvas dosis-respuesta (fig. 4), son más eficaces que la testosterona para inhibir la contractilidad del epidídimo y la vesícula seminal. Además, la diferencia entre la eficacia de la testosterona y sus metabolitos depende del tejido estudiado. Así por ejemplo, la androsterona es unas 8 veces más potente que la testosterona en el epidídimo.

Utero no gestante despolarizado.

Las progestinas son capaces de abatir la contracción sostenida que inducen las soluciones despolarizantes, con  $K^+$  alto (40 mM, contracción-K). Esto muestra que su efecto sobre la contractilidad del útero depende de una alteración de la permeabilidad al  $Ca^{2+}$ ; pues se sabe que la despolarización del miometrio induce un aumento en la entrada del  $Ca^{2+}$  externo (Marshall y Kroeger, 1973; Batra y Bengtsson, 1978). Si bien durante la despolarización se libera una pequeña cantidad de  $Ca^{2+}$  interno (Masahashi y Tomita, 1983), en este trabajo se estudió la fase tónica de la contracción la cual depende fundamentalmente de la entrada de  $Ca^{2+}$  externo; ya que el  $Ca^{2+}$  interno solo se libera durante el componente fásico de la contracción-K. Por otra parte, estos resultados demuestran que la acción membranal de las progestinas es independiente de una hiperpolarización del músculo.

En este modelo solo se estudió el componente tónico de la contracción-K porque es el más estable y repetitivo, además de la razón expuesta anteriormente. La concentración de  $K^+$  utilizada, 40 mM, se eligió porque a concentraciones mayores la despolarización de las terminales adrenérgicas produce una marcada relajación dependiente de receptores beta (Hogestat, 1978), mientras que a concentraciones menores la contracción

no es lo suficientemente intensa.

Nuestros resultados estan de acuerdo con la hipótesis acerca de la existencia del intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  en el miometrio. Pues la diferencia entre el efecto de las progestinas en las soluciones despolarizantes libres de  $\text{Na}^+$  (DLS) y en las soluciones despolarizantes con  $\text{Na}^+$  normal (DSN), se puede explicar por una entrada adicional de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este flujo adicional de  $\text{Ca}^{2+}$  parece deberse al intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, la tensión que produce el intercambiador no es suficiente para contrarestar del todo la acción de las progestinas, por lo que al parecer las progestinas alteran su funcionamiento.

La sustitución del  $\text{Na}^+$  por sacarosa no afecta la osmolaridad de las soluciones, pero sí afecta la fuerza iónica de la solución; sin embargo, Ma y Bose (1978) han demostrado que ello no es el factor responsable del aumento en el tono, sino específicamente la disminución de la concentración extracelular de  $\text{Na}^+$ .

La diferencia entre los efectos de la progesterona y la pregnandiona, y los efectos de la pregnanolona y la epipregnanolona (ver tabla I), se pueden explicar porque las dosis usadas en este trabajo se obtuvieron a partir de un modelo de contracciones espontáneas: es decir en condiciones donde la contractilidad depende en gran medida del ritmo dado

por las células marcapaso. Como en las condiciones estudiadas aquí la contractilidad es independiente de las células marcapaso, aquellas  $DE_{0.4}$  ya no son equivalentes. Este hecho podría sugerir que la pregnanolona y la epipregnanolona actúan especialmente sobre las células marcapaso.

Las dosis empleadas en estos experimentos, que son las  $DE_{0.4}$  (Kubli-Garfias, Medrano-Conde, Beyer y Bondani, 1979), equivalen entre 50 y 250 veces los niveles fisiológicos observados durante el embarazo de la rata. Así, en el día 14 de la gestación los niveles de progesterona son de 120 ng/ml de plasma y de 160 ng/g de tejido en el útero (Csapo y Wiest, 1969) mientras que la dosis de progesterona ( $DE_{0.4}$ ) fue de 32 ug/ml y la dosis de pregnanolona fue de 8 ug/ml. Debido a las características de las preparaciones *in vitro* y a la naturaleza aguda de estos experimentos se usan dosis mucho más altas que las fisiológicas; ya que de otro modo no se podrían ver los efectos. Otro dato que debe tomarse en cuenta es la producción de progesterona, la cual oscila entre 2 y 24 ug/hr/ovario (Davson y Segal, 1980) durante el embarazo de la rata; lo que ciertamente demuestra que el útero está expuesto a cantidades considerables de progesterona y sus metabolitos. Si bien las progestinas no son las principales reguladoras de la contractilidad uterina, sí se puede pensar que desempeñan un papel importante en la

regulación de su contractilidad. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que estos experimentos tratan principalmente de aclarar el mecanismo de acción de las progestinas, razón por la cual se usan dosis tan altas. Estos resultados hacen notar que no se puede pensar en la progesterona aisladamente, sino que deben considerarse sus metabolitos, los cuales en conjunto podrían ejercer una acción sinérgica.

El efecto inhibitorio de las progestinas no es un efecto totalmente inespecífico, ya que depende de la estereoisomería de la molécula. Como lo muestra la figura 11 los isómeros 5 alfa reducidos son moléculas relativamente planas, mientras que los 5 beta tienen forma de escuadra. Tal vez eso explique que las progestinas 5 beta reducidas sean las más potentes inhibitorias de la contractilidad y que las 5 alfa reducidas casi no tengan efectos.

Las progestinas son capaces de actuar directamente sobre la neurona; pues se ha visto que bloquean la liberación de noradrenalina en rebanadas de corteza cerebral de rata (Kubli-Garfias, Azpeitia, Villanueva, y Ponce-Monter, 1983). Debido a que la liberación de noradrenalina depende críticamente de la concentración de  $Ca^{2+}$  externo, se puede proponer que el mecanismo de acción de las progestinas sea



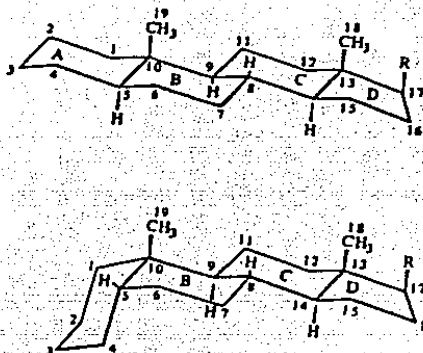


Figura 11. Configuración espacial de los isómeros 5 alfa- (arriba) y 5 beta- (abajo) reducidos de andrógenos y progestinas.

análogo en la membrana neuronal y en la membrana del músculo.

Se ha pensado que el mecanismo de acción del efecto depresor de las progestinas, lo mismo que el de los andrógenos, sea similar al mecanismo de acción de algunos anestésicos generales. En la actualidad, no hay un acuerdo general sobre la manera en que actúan los anestésicos. El problema básico consiste en determinar si los anestésicos, o en este caso los esteroides, actúan directamente sobre las proteínas o sobre los lípidos de la membrana; es decir si alteran directamente la estructura de los canales iónicos o si al modificar la estructura de los lípidos membranales alteran otras estructuras membranales. Según Seeman (1972)

los esteroides actúan indirectamente; ya que al igual que los anestésicos generales, estabilizan la membrana plasmática. Ello significa que debido a su alto coeficiente de partición lípido-agua, los esteroides se introducen entre las cadenas alifáticas de los fosfolípidos con lo que se disminuye la fluidez de la membrana así como otras propiedades estructurales; estos cambios alteran la función de las proteínas membranales y la permeabilidad a los iones. Los datos aquí presentados podrían explicarse con base en ese mecanismo. El cual también explica que las progestinas (y también los andrógenos) antagonizan a otros agentes estimulantes y afectan a otros tejidos; pues la estabilización membranal altera la permeabilidad de todos los canales iónicos. Esta hipótesis se ha visto apoyada por los datos de O'Leary, Ross y Levin (1984) quienes han encontrado una correlación entre el efecto de algunos esteroides anestésicos y la modificación de la movilidad de los fosfolípidos membranales medidos por espectroscopía de Raman. Sin embargo, Richards y colaboradores (1981) han puesto en duda la generalidad de la llamada teoría unitaria de la anestesia pues los esteroides en combinación con anestésicos barbitúricos sinergizan su efecto, por lo que han concluido que existen diferentes mecanismos para cada agente anestésico; es decir que existen receptores o sitios de la membrana donde actúan unos anestésicos y sitios donde actúan otros. Así la posibilidad de que las progestinas actúen

directamente sobre los canales iónicos deberá considerarse pues se ha visto que un pregnano, la alfaxalona, es capaz de interactuar específicamente con los canales iónicos que responden a la acetil colina (Gillo y Lass, 1984). Como puede verse, el estudio del mecanismo de acción de los andrógenos y las progestinas sobre el músculo liso puede ayudar a aclarar no solo la fisiología del sistema reproductor, sino también el mecanismo de acción de los anestésicos generales.

El efecto de las progestinas es comparable también al efecto de los anestésicos locales y al de los antagonistas del  $Ca^{2+}$ . Feinstein (1966) estudió el efecto de la lidocaína y otros anestésicos locales. Observó un importante efecto relajante en el útero de la rata. Además demostró que los anestésicos locales antagonizan de una manera no competitiva al  $Ca^{2+}$ , lo cual indica que el antagonismo al  $Ca^{2+}$  es más importante que el antagonismo al  $Na^+$ . El efecto relajante de los antagonistas del  $Ca^{2+}$  se ha visto con el D-600 (Reiner y Marshall, 1975). El cual tiene un efecto predominantemente sobre los marcapasos del miometrio.

Ultimamente se ha visto (en el laboratorio del Dr. Kubli) que el efecto inhibitor de las progestinas no está mediado por la noradrenalina, ya que el útero despolarizado incubado previamente con propranolol (un antagonista beta adrenérgico) no es capaz de evitar la relajación producida por pregnanolona.

Útero gestante.

Hacia la mitad de la gestación, pero sobre todo hacia el final de la misma, el metabolismo de la progesterona aumenta considerablemente. Entre los metabolitos que más se producen están los derivados 5-reducidos de la progesterona (Sanyal y Villee, 1976; Marrone y Karavolas, 1981). Por ello es importante conocer su papel en el control del tono uterino durante la gestación. Aunque se sabe que estas hormonas son capaces de relajar el útero de la rata no embarazada (Kubli-Garfias, Medrano-Conde, Beyer y Bondani, 1979); no se conocía, hasta ahora, su efecto en el útero gestante.

Con este estudio se muestra por primera vez que los metabolitos 5-reducidos de la progesterona son capaces de disminuir, *in vitro* la contractilidad espontánea del útero gestante. El efecto inhibitor se manifiesta especialmente sobre la fuerza de las contracciones, aunque su frecuencia aumenta ligeramente. Esto se puede explicar por la mayor irregularidad del patrón de las contracciones; pues cada ciclo de contracción-relajación bajo el efecto de los esteroides se desdobra en contracciones más pequeñas, lo cual hace muy ineficiente el trabajo muscular. Como se vió en la sección anterior, la disminución de las contracciones espontáneas del útero se debe a que las progestinas

disminuyen la permeabilidad al  $Ca^{2+}$ .

Es importante señalar que en la rata solo se producen los metabolitos 5 alfa-reducidos de la progesterona, entre los cuales el más abundante es la 3 alfa-OH-5 alfa-pregnan-20-ona (Sanyal y Ville, 1976). Este hecho pareciera sugerir que la función de los metabolitos 5 alfa-reducidos es la de bajar la potencia inhibitoria (Wiest, 1970) de la progesterona; ya que como lo muestran nuestros resultados, los metabolitos 5 alfa-reducidos son significativamente menos potentes que la progesterona para relajar al miometrio.

Nosotros hemos utilizado los metabolitos 5 beta-reducidos porque se les ha encontrado en otras especies; como en la coneja, donde son los isómeros más abundantes, especialmente la 5 beta-pregnandiona (Marchut, 1976). En la mujer embarazada también se han encontrado progestinas 5 beta-reducidas, aunque en proporción menor que las 5 alfa-reducidas (Sjövall, Sjövall y Vinko, 1968). Entre ellas el 5 beta-pregnandirol y la 5 beta-pregnanolona son las más abundantes, especialmente en la fracción glucorónica, donde la concentración del 5 beta-pregnandirol, en la mujer con 34 semanas de gestación, es de 1287 ng/ml de plasma, mayor en este caso que los isómeros alfa (Axelson y Sahlberg, 1983).

Debe notarse que la potencia relajante de las progestinas en la rata gestante con 5, 10 y 15 días de gestación es menor

con respecto a la rata no gestante. Así lo muestra el hecho de que se usó el doble de la DE<sub>50</sub> de la progesterona (con las ratas de 15 días) y la 3 alfa-OH-5 alfa-pregnan-20-ona (ver resultados). Sin embargo, el efecto de las otras hormonas, en general, no cambió tanto.

## APENDICE. SISTEMA DE ANALISIS.

Con el propósito de mejorar y facilitar el análisis de los registros poligráficos, se implementó un sistema para la captura de la señal del poligrafo y su grabación en discos magnéticos. Este sistema consta de un convertidor analógico-digital (A/D), una microcomputadora Sol (Processor Technology) y un paquete de programas en BASIC (ver figura 12).

La digitalización o conversión analógico-digital consiste en la asignación de valores numéricos al nivel del voltaje de una señal eléctrica que representa a una variable física. Se trata, pues de un muestreo en el que una señal continua se representa por una sucesión de valores discretos igualmente espaciados en el tiempo. Generalmente, los convertidores A/D "leen" señales eléctricas de corriente directa que viene de un sistema de transductores y amplificadores.

En este trabajo se utilizó un convertidor A/D cromemco de 8 bits (digitos binarios) con un intervalo de 5 V. De modo que la resolución es de 20 mV porque con 8 bits se pueden representar 256 valores. La resolución es buena ya que corresponde a 0.33 mm en la escala del papel. El muestreo se hizo a 5 Hz, o sea que se capturó un punto cada 200 msec (para cada canal). De acuerdo al teorema del muestreo, que pide que la velocidad de muestreo sea de por lo menos

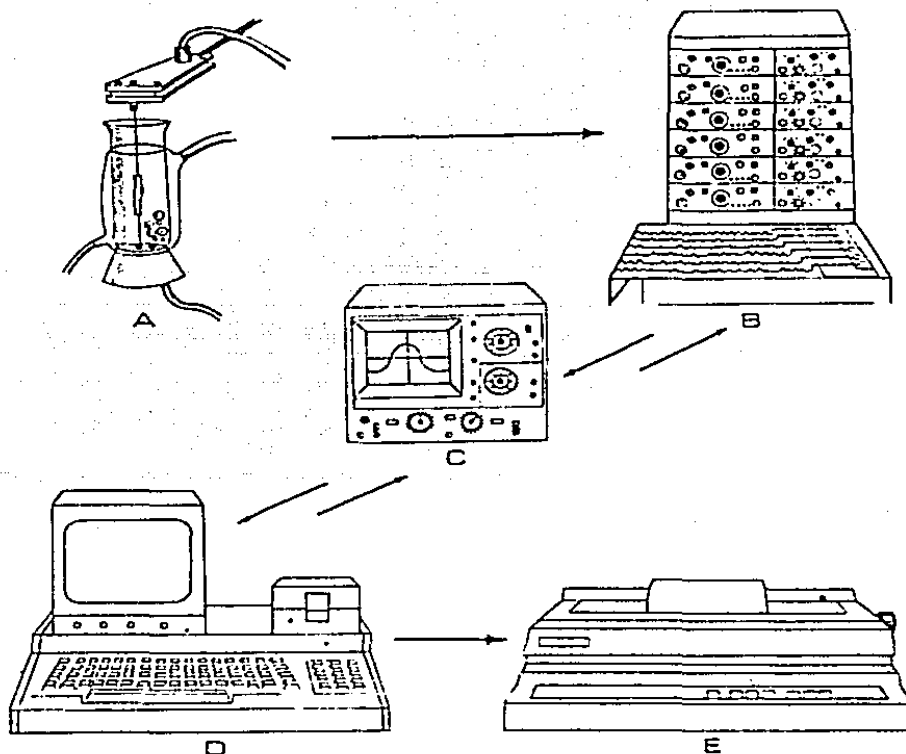


Figura 12. Esquema del sistema de registro y análisis. A) Cámara con el músculo y transductor, B) Polígrafo, C) Osciloscopio, D) Microcomputadora y E) Impresora.

el doble que la frecuencia máxima presente en la señal, esta velocidad de muestreo es adecuada porque la frecuencia máxima presente en las contracciones uterinas es de cerca de .3 Hz. Los valores numéricos se grabaron en diskettes para proceder después a su procesamiento.



El análisis de las señales partió de la recuperación de los valores por medio de la lectura de los diskettes. Se calcularon cinco parámetros básicos. En primer lugar se evaluó el valor de la línea basal es decir el tono de reposo del músculo, al cual se le asignó un cero. Este valor se calcula buscando el valor numérico más bajo del registro. Con base a este punto de referencia se calculó el área bajo la curva. Para ello se utilizó el método de Simpson. En relación a este parámetro se evaluó la contractilidad del músculo liso, ya que el área representa juntas la duración, la fuerza y la frecuencia de las contracciones. Otro parámetro que se calculó fue la tensión máxima y se midió buscando el valor máximo entre el minuto 9 y 10 desde que actúa la hormona. Para las contracciones sostenidas se calculó el tiempo medio de relajación, que se define como el momento en el que la relajación alcanza el 50 % del valor inicial. Finalmente, se midió, para las contracciones sostenidas, el porcentaje de relajación para cada minuto desde el efecto de la hormona.

REFERENCIAS

Anderson, N.C., Ramón F., Snyder, A. (1971). Studies on calcium and sodium in uterine smooth muscle excitation under current clamp and voltage clamp conditions. J Gen Physiol 53:322-339.

Allen, W.M. and Reynolds, S.R.M. (1935). Physiology of the corpus luteum: X. The comparative actions of crystalline progesterin and crude progesterin on uterine motility in unanaesthetized rabbits. Am J Obs Gynec 30:309.

Axelsson, M. and Sahlberg, E.C. (1983). Group separation and gas chromatography-mass spectrometry of conjugated steroids in plasma. J Ster Bioch 18:313-321.

Batra, S. and Bengtsson, B. (1978). Effects of diethylstilboestrol and ovarian steroids on the contractile responses and calcium movements in rat uterine smooth muscle. J Physiol 276:329-342.

Bolton, T.B. (1979). Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol Rev 59:606-718.

Caracheo, F., Hoyo-Vadillo, C., Kubli-Garfias, C. y Fonce-Monter, H. (1983). Efecto de la hipofisectomía sobre la respuesta contráctil del epidídimo inducida por adrenalina. Resúmenes del XXVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Colima, Col.

Csapo, A.I. (1963). Model experiments and clinical trials in the control of pregnancy and parturition. Am J Obs Gynec 85:359-379.

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

Csapo, A.I. and Wiest, W.G. (1969). An examination of the quantitative relationship between progesterone and the maintenance of pregnancy. Endocrinology. 85:735-746.

Elmér, M., Alm, F. and Thorbert, G. (1980). Electrical field stimulation of myometrial strips from non-pregnant and pregnant guinea-pigs. Acta Physiol Scand 108:209-213.

Davson, H. and Segal M.B. (1980). Introduction to Physiology. Vol 5. Academic Press. London.

De Larminat, M.A., Monsalve, A., Charreau, E.H., Calandra,

R.S. and Blaquier, J.A. (1978). Hormonal regulation of 5 alpha-reductase activity in rat epididymis. J. Endocr 79:157-167).

Feinstein, M.B. (1966). Inhibition of contraction and calcium exchangeability in rat uterus by local anaesthetics. J. Pharmac. Exp. Ther 152:516-524.

Finn, C.A. and Porter, D.G. (1975). The Uterus. Publishing sciences group. Acton, Mass.

Fuchs A-R. (1983). The role of oxytocin in Partirution. In: Martini, L., James, V.T.H. Current topics in experimental endocrinology. Academic Press. New York.

Garfield, R.E., Puri, C.P. and Csapo, A.I. (1982). Endrocrine, structural and functional changes in the uterus during premature labor. Am J Obs Gynec 142:21-27.

Gillo, B. and Lass, Y. (1984). The mechanism of steroid anaesthetic (alphaxalone) block of acetylcholine-induced ionic currents. Br J Pharmacol 82:783-789.

Goodman, H.M. (1980). Reproduction. In: Mountcastle, V.B. (Ed.). Medical Physiology. 14th ed. Vol 2, C.V. Mosby. St. Louis.

Grover, A., Kwan, C.Y. and Daniel, E.E. (1981). Na-Ca exchange in rat myometrium membrane vesicles highly enriched in plasma membranes. Am J Physiol 240:C175-C182.

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

Hansen, T.R., Dineen, D.X. and Petrak, R. (1984). Mechanism of action of barium ion on rat aortic smooth muscle. Am J Physiol 246:C235-C241.

Hay, D.W.P. and Wadsworth, R.M.V. (1982). The effects of barium and methoxamine on calcium uptake in the rat bisected vas deferens. Br J Pharmacol 76:197F.

Hogestat E.D. (1984). Characterization of two different calcium entry pathways in small mesenteric arteries from rat. Acta Physiol Scan 122:483-495.

Kao, C.Y. (1977). Electrophysiological properties of the uterine smooth muscle. In: Wynn R.M. Biology of the Uterus. 2nd ed. Plenum. New York.

Kishikawa T. (1981). Alterations in the properties of the

rat myometrium during gestation and post partum. Jap J Physiol 31:515-536.

Kubli-Garfias, C., Azpeitia, E., Villanueva, T. and Ponce-Monter, H. (1983). Inhibition of <sup>3</sup>H-NA release in cerebral cortex slides. Proc West Pharmacol Soc 26:135-138.

Kubli-Garfias, C., Canchola, E., Arauz-Contreras, J. and Feria-Velasco, A. (1982). Depressant effect of androgens on the cat brain electrical activity and its antagonism by Ruthenium red. Neuroscience 7:2777-2782.

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

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

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

Kubli-Garfias, C., Ponce-Monter, H., Medrano-Conde, L., Lopez-Fiesco and Bondani A. (1982). Role of Calcium on the in vitro inhibition of rat uterine contractility produced by androgens and progestins. Arch Invest Med (Mex.) 13:219-224.

Kuriyama, H. (1981). Excitation-contraction coupling in various viseral smooth muscles. In: Bülbbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. and Tomita, T. (Eds). Smooth muscle. Eduard Arnold. London.

Ma T.S. and Bose D. (1977). Sodium in smooth muscle relaxation. Am J Physiol 233:C59-C66.

Marchut, M. (1976). Progesterone formation and metabolism by Rabbit Placenta in vitro. Experientia 32:1211-1213.

Marrone, B.L. and Karavolas, H.J. (1981). Progesterone metabolism by the hypothalamus, pituitary, and uterus of the rat during pregnancy Endocrinology 109:41-45.

Marshall, J.M. (1981). Effects of ovarian steroids and pregnancy on adrenergic nerves of uterus and oviduct. Am J Physiol 240(Cell Physiol 9):C165-C174.

Marshall, J.M. and Kroeger E.A. (1973). Adrenergic

influences on uterine smooth muscle. Phil Trans Roy Soc Series B 265:135-148.

Masahashi, T and Tomita, T. (1983). The contracture produced by sodium removal in the non-pregnant rat myometrium. J Physiol 334:351-363.

O'Leary, T.J., Ross, P.D. and Levin, I.W. (1984). Effects of anaesthetic and nonanaesthetic steroids on dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: a calorimetric and Raman spectroscopic investigation. Biochem 23:4636-4641.

Osa T. (1971). Effect of removing the external sodium on the electrical and mechanical activities of the pregnant mouse myometrium. Jap J Physiol 21:607-625.

Ponce-Monter, H. and Kubli-Garfias C. (1982). Influence of calcium stronium and barium on adrenaline-induced contraction of rat cauda epididymis. IRCS 10:1032-1033.

Reiner, O. and Marshall, J.M. (1975). Action of D-600 on spontaneous and electrical stimulated activity of the parturient rat uterus. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 290:21-28.

Reuter, H. (1974). Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Circulation Res 34:599-605.

Reynolds, S.R.M. (1949). Physiology of the uterus. 2nd ed. Hoeber, New York.

Richards, C.D. and White A.E. (1981). Additive and non-additive effects of mixtures of short-acting intravenous anaesthetic agents and their significance for theories of anaesthesia. Br J Pharmacol 74:161-170.

Robson, J.M. (1938). Reactions of the uterine muscle and endometrium of the rabbit to testosterone. Quarterly J Exp Physiol 26:355-359.

Sanyal, M.K. and Villet, C.A. (1976). Temporal changes in activities of enzymes reducing ring-A of progesterone in fetus and placenta of the rat. Endocrinology 99:249-259.

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

Selye, H. (1942). Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. Endocrinology 30:437-453.

Sjovall, J., Sjovall, K. and Vinko, R. (1968). Steroid

sulfates in human pregnancy plasma. Steroids 11:703-715.

Thornburn, G.D. and Challis, R.G. (1979). Endocrine control of parturition. Physiol Rev 59:863-918.

Van Doorn, E.J., Burns, B., Wood, D., Bird, C.E. and Clark, A.F. (1975). In vivo Metabolism of  $^3\text{H}$ -Dihydrotestosterone and  $^3\text{H}$ -Androstenediol in adult male rats. J Steroid Bioch 6:1549-1554.

Vane, J.R. and Williams, K.I. (1973). The contribution of prostaglandin production to contractions of the isolated uterus of the rat. Br J Pharmacol 48:629-639.

Wiest, W.G. (1970). Progesterone and 20 alpha-hydroxypregn-4-en-20-one in plasma, ovaries, and uteri during pregnancy in the rat. Endocrinology 87:43-48.