

00361
2 Reg.

RESPUESTA CONTRACTIL A SEROTONINA DEL UTERO AISLADO DE RATA:
REGULACION ESTROGENICA Y DEPENDENCIA DEL CALCIO EXTRACELULAR

Tesis para optar por el grado de
Maestra en Ciencias (Biología)

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México

Bióloga María Guadalupe Campos Lara

Director: M. en C. Héctor Antonio Ponce Monter

Noviembre de 1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Antecedentes	1
Histología del miometrio	1
Inervación del útero	2
Regulación hormonal de la actividad miometrial	4
Mecanismos de acción de los estrógenos en el útero de rata	17
Calcio y músculo liso uterino	23
Planteamiento del problema	28
Material y métodos	31
Resultados	34
Sensibilidad del útero de rata a la serotonina durante el ciclo estral	34
Latencia de efecto del estradiol en la respuesta a serotonina del útero de ratas ovariectomizadas	34
Efecto del estradiol en la respuesta a serotonina del útero de ratas hipofisectomizadas	38
Especificidad de la sensibilidad a serotonina	39
Efecto del calcio extracelular en la respuesta contráctil inducida por serotonina en el útero de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol	40
Efecto del verapamil en la respuesta contráctil inducida por serotonina	41
Discusión	43
Referencias	49

ANTECEDENTES

1. Histología del miometrio

El útero es el segmento de paredes gruesas del aparato reproductor de las hembras de los mamíferos que está entre el oviducto y la vagina. El útero de los roedores tiene dos cuernos uterinos completamente separados y el cérvix, aunque fusionado externamente, tiene dos canales separados o bien, uno en forma de Y. La pared del útero incluye tres capas: perimetrio (externa y serosa), miometrio (media y muscular) y endometrio - - (interna y mucosa) (Eckstein y Zuckerman, 1956; Lesson y Lesson, 1977). El útero puede realizar considerable trabajo mecánico gracias a las capas de músculo liso que se encuentran localizadas en el miometrio.

El miometrio es una capa gruesa de musculatura lisa. Las células del músculo liso están agrupadas en haces separados por tejido conectivo. Además del colágeno, el tejido conectivo comprende fibroblastos, macrófagos, células cebadas y fibras elásticas; sus funciones son sostener las fibras musculares y transmitir la tensión producida por la contracción de una fibra a la siguiente (Finn y Porter, 1975).

Los haces de músculo liso, en úteros bicornios como el de los roedores, están arreglados normalmente en dos capas que forman el miometrio. En la capa externa, los haces están arreglados paralelamente al eje longitudinal del útero, y su contracción tiende a acortar el útero en dirección céfalo-cau

dal. En la capa interna, los haces están arreglados concéntricamente alrededor del eje longitudinal; su contracción constriñe el lumen uterino. Los haces están arreglados complejamente, entrelazados entre sí (Finn y Porter, 1975). Según Ludwig (1952), los haces de las capas longitudinal y circular en la rata son continuos a través de un sistema complejo de giros espirales.

2. Inervación del útero

El desarrollo de la técnica de fluorescencia histoquímica por Falck y col. (1962) para la localización celular de catecolaminas ha dado lugar a numerosos estudios del sistema nervioso autónomo en la regulación del músculo liso uterino.

Desde un punto de vista clásico, el músculo liso - del útero tiene inervación dual: inervación parasimpática, con acetilcolina como transmisor químico, e inervación simpática, con noradrenalina como transmisor. Las neuronas colinérgicas activan receptores muscarínicos excitatorios y las neuronas - noradrenérgicas activan receptores adrenérgicos alfa y beta (Moawad, 1973).

Al analizar los reportes de la inervación del músculo liso del aparato genital femenino de diferentes especies - de mamíferos, es evidente que todos los componentes nerviosos, excepto el colinérgico, muestran una variación considerable (Marshall, 1970).

El útero de la rata tiene una inervación adrenérgica muy rica que está asociada con los vasos sanguíneos y con los haces de músculo liso. Esta inervación está compuesta de las típicas neuronas postganglionares largas, cuyos cuerpos celulares están en los ganglios lumbar y mesentérico, y de las neuronas postganglionares cortas que se originan en los ganglios pélvicos localizados cerca o en los órganos efectores (Sjöberg, 1967; Hervonen y col., 1973). Las neuronas adrenérgicas cortas inervan principalmente el músculo liso de los órganos de la reproducción (Owman y col., 1974). Una característica sobresaliente de las neuronas adrenérgicas cortas es la regulación del metabolismo de su neurotransmisor por los esteroides ováricos (Owman y Sjöberg, 1973; Marshall, 1981).

Adham y Schenk (1969) han caracterizado la inervación autónoma de útero, cérvix y vagina de rata. Señalan que la capa muscular circular del útero está inervada más intensamente que la longitudinal, y que la intensidad de la inervación disminuye gradualmente hacia la parte ovárica del cuerno uterino. Concluyen que la inervación adrenérgica y colinérgica del útero de rata es considerablemente más densa y prominente en estro que en diestro y que el contenido de neurotransmisores de las neuronas puede estar regulado por un factor hormonal.

Además de la inervación directa adrenérgica y colinérgica, el músculo liso uterino tiene la influencia directa de otros neurotransmisores putativos como histamina y seroto-

nina que tienen acceso a él por difusión de terminales nerviosas de los vasos sanguíneos o de otros tejidos. De acuerdo con los estudios de fluorescencia histoquímica realizados por McKercher y col. (1973), los únicos almacenes identificables de histamina y serotonina en el útero de la rata son las células cebadas, aunque los límites de detección de la técnica no son suficientemente sensibles para permitir la exclusión definitiva de almacenes de aminas de otro tipo de células. Las células cebadas se encuentran discontinuamente a lo largo del cuerno uterino (Levier y Spaziani, 1966) y alcanzan su mayor número cerca de las pequeñas arterias y arteriolas del miometrio. Las aminas son liberadas de las células cebadas por desgranulación o exocitosis (Johnson y Moran, 1969; Ellis y col., 1970; Lagunoff, 1972).

Mediante estudios inmunohistoquímicos también se ha podido revelar la presencia de fibras nerviosas que contienen diferentes tipos de péptidos que han sido postulados como neurotransmisores; entre éstos se encuentran el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y el neuropéptido Y (Stjernquist y col., 1983).

3. Regulación hormonal de la actividad miometrial

La mayoría de los músculos lisos tiene una función específica que se lleva a cabo intermitente o continuamente a lo largo de la vida del animal. De acuerdo con su posición y función los músculos lisos varían ampliamente en sus patrones de actividad.

Los patrones temporales y espaciales de dicha actividad dependen de las propiedades membranales de las células musculares lisas y de la innervación. La actividad espontánea puede dar lugar a un tono continuo o a ondas de contracción. Los neurotransmisores, ya sean excitatorios o inhibitorios, modifican esta actividad o la promueven en músculos en reposo. La actividad de cualquier músculo depende de cierto número de factores, entre ellos se cuentan las propiedades de las células musculares lisas individuales, la interacción entre ellas y la influencia de agentes externos como nervios, hormonas y el medio ambiente físico (Creed, 1979).

La función del útero varía de acuerdo con el estado reproductivo del animal. El útero experimenta cambios cíclicos para la implantación de un blastocisto; si el embarazo ocurre, el útero aumenta de tamaño con el desarrollo del embrión y durante el parto cambia de una relativa inmovilidad a una contractilidad extrema. Estos cambios son regulados por estrógenos y progesterona, los cuales inician una serie de cambios funcionales para la implantación, mantenimiento del embrión, alteraciones oportunas del estado contráctil del músculo liso uterino y sensibilidad miométrial a factores que juegan una función importante en la iniciación de la labor (Sakamoto y col., 1987). Entre dichos factores se encuentra la aparición de uniones estrechas en la última etapa del embarazo y aumento de la concentración de receptores a oxitocina; estos eventos traen

como consecuencia una amplificación de la respuesta contráctil inducida por oxitocina, proceso que se considera el inicio del parto (Fuchs y col., 1983).

3.1 Propiedades electrofisiológicas de la membrana

El valor del potencial de membrana en reposo de células miometriales de varias especies de animales no embarazados fluctúa entre -35 y -40 mV (Marshall, 1959; Kuriyama, 1961; Bülbring y col., 1968). Alrededor del momento de la ovulación, los niveles de estrógenos se incrementan y provocan crecimiento del útero para una eventual implantación embrionaria. En el miometrio de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol durante tres o más días, la membrana se hiperpolariza hasta 20 mV (Casteels y Kuriyama, 1965). Krishnamurti y col. (1982) reportaron que justo antes del parto, los estrógenos modifican la actividad eléctrica asincrónica del miometrio transformándola en una actividad eléctrica coordinada.

Esta transición de la actividad eléctrica miometrial puede estar asociada con el desarrollo de un gran número de uniones estrechas entre las células miometriales.

El efecto de la progesterona sobre el miometrio durante el embarazo es promover un estado de quietud muscular y oponerse o neutralizar la excitabilidad causada por los estrógenos. Muchas de las respuestas del miometrio observadas durante el embarazo y la labor se han relacionado con los niveles circulantes de estrógenos y progesterona; la rela-

ción estrógenos/progesterona se incrementa en varias especies justo antes del inicio de la labor (Challis y Mitchell, 1981). El efecto inhibitorio de la progesterona sobre el desarrollo de uniones estrechas uterinas tanto in vivo como in vitro puede ser responsable parcialmente del bloqueo de la contractilidad uterina por progesterona (Garfield y col., 1978).

3.2 Ultraestructura y síntesis proteica

Los constituyentes citoplásmicos y nucleares de las células miometriales están bajo la influencia de los niveles circulantes de estrógenos. En la rata ovariectomizada, dentro de las 24 horas siguientes a la administración subcutánea de 10 ug de benzoato de estradiol, se incrementa el número y el tamaño de los nucleolos y, tras 48 a 72 horas, el número de ribosomas y mitocondrias en el citoplasma también aumenta (Laguens, 1964). Ross y Klebanoff (1967), Bergman (1968) y Bo, Odor y Rothrock (1968) encontraron que 6 horas después del tratamiento con estradiol a ratas ovariectomizadas, aumenta el número de ribosomas en la lámina externa de la membrana nuclear; además, la can ti dad y el tamaño de la granulación del retículo endoplásmico rugoso aumenta entre 6 y 96 horas después del tratamiento. Estos hallazgos proveen apoyo ultraestructural para la obs er va ci ón de que los estrógenos estimulan la síntesis proteica en el miometrio (Jensen y De Sombre, 1972; O'Malley y Means, 1974).

El útero de la rata ha sido utilizado como un modelo adecuado para estudiar con técnicas bioquímicas los cambios -

histológicos inducidos por la estimulación hormonal. El análisis de los productos de traducción del ARNm in vitro en animales tratados con estradiol ha revelado el incremento de algunas proteínas. La progesterona sola no estimula el aumento de la síntesis proteica; sin embargo, el tratamiento con una combinación de estrógenos más progesterona disminuye la síntesis de proteínas estimulada por los estrógenos después de la traducción in vitro (Komm y Lyttle, 1984).

Por otro lado, muchos investigadores han tratado de utilizar proteínas marcadas para estudiar los efectos hormonales; así, se han utilizado los receptores a progesterona (Reiss y Kaye, 1981), la actividad de la peroxidasa (Lyttle y De Sombre, 1979) y la actividad del activador del plasminógeno uterino (Kneifel y col., 1980). Ninguno de estos métodos de análisis ha sido enteramente satisfactorio ya sea por su presencia en varios tejidos o por la incapacidad de incorporar aminoácidos. Komm y col. (1985) utilizaron el sistema de incorporación de metionina marcada con azufre 35 y encontraron que la administración de estrógenos a ratas ovariectomizadas produce un incremento en la síntesis y liberación de dos proteínas con peso molecular de 115 000 y 65 000. Este método ha sido utilizado exitosamente para estudiar los efectos de la progesterona sobre el aumento de la síntesis de proteínas inducido por estrógenos. Wheeler y col. (1987) demostraron que en el útero de rata la progesterona inhibe la síntesis de las proteínas de peso molecular 115 000 y 65 000 inducidas por el tratamiento con estrógenos; la aplicación de la progesterona -

se realizó ocho horas después del tratamiento con estrógenos. Este estudio reporta también que, mientras que parte del ARNm se produce entre las 2 y 6 horas, la mayoría parece producirse entre las 6 y 12 horas después de la administración de estrógenos. La función fisiológica de las proteínas inducidas por estrógenos en el útero de rata se desconoce; sin embargo, su estudio contribuye a entender el mecanismo de la expresión genómica regulada por los estrógenos.

3.3 Sensibilidad uterina a los agentes uterotónicos

La regulación de varios tipos de receptores miometriales que median la contractilidad del músculo liso uterino es una acción relevante de los estrógenos. El efecto de las hormonas sexuales ováricas sobre la concentración de varios tipos de receptores miometriales se ha estudiado principalmente en animales de laboratorio como rata, cobayo y conejo; en humano - existen pocos estudios de este tipo. La concentración de los receptores miometriales se ha estudiado por métodos indirectos y directos; los primeros incluyen la sensibilidad del miometrio a determinado agonista (sustancia excitadora) que generalmente produce un efecto contráctil; los métodos directos emplean la unión de agonistas o antagonistas específicos, marcados con un isótopo radioactivo, en preparaciones de microsomas uterinos. Los modelos experimentales más utilizados comprenden úteros de animales ovariectomizados y ovariectomizados-tratados con estrógenos, úteros de animales en diferentes fa-

ses del ciclo estral y úteros de animales en diferentes etapas del embarazo.

3.3.1 Oxitocina

La oxitocina contrae el útero de varias especies de mamíferos. En algunas especies la respuesta uterotónica es dependiente - del estado endocrino del animal; por ejemplo, el útero de conejo es un caso notable ya que después del tratamiento con estrógenos es muy sensible a la oxitocina, mientras que úteros de conejos tratados con progesterona son insensibles a la - misma. No obstante, el útero de conejo retiene la capacidad de responder a otros agentes contráctiles como la metacolina, que es un agonista colinérgico (Nissenson y col., 1978).

Kuriyama y Susuki (1976) encontraron que en el útero de rata embarazada, inmediatamente antes del parto, la oxitocina es más efectiva en inducir la contracción del miometrio que a la mitad del embarazo. Este súbito cambio de la sensibilidad del útero de rata embarazada a la oxitocina corresponde al aumento de la concentración de receptores miometriales a oxitocina (Fuchs y col., 1983).

En úteros aislados de mujeres no embarazadas en fase proliferativa, la oxitocina aumenta la contractilidad uterina así como también en úteros de mujeres embarazadas (tercer trimestre); este efecto uterotónico es bloqueado por la indometacina (inhibidor de la ciclooxigenasa), por lo que se presume que las prostaglandinas uterinas contribuyen a la ac-

ción uterotónica de la oxitocina (Garrioch, 1978).

3.3.2 Histamina

La histamina produce contracción del músculo liso uterino aislado de cobayo y de humano; sin embargo, relaja el músculo liso del útero de la rata. El útero aislado de rata parece ser el único caso en el que la histamina induce relajación uterina. (Bertaccini y col., 1979).

El estudio comparativo del efecto de la histamina - sobre segmentos uterinos aislados de rata y cobayo, utilizando agonistas y antagonistas histamínicos de los subtipos H_1 y H_2 , muestra que el útero de rata tiene solamente receptores a histamina del subtipo H_2 . La activación de los receptores H_2 produce un aumento de la liberación de noradrenalina de las varicosidades nerviosas adrenérgicas; la noradrenalina activa los receptores postsinápticos adrenérgicos beta-2 y se produce la relajación uterina (Goyal y Verma, 1982). En el útero de cobayo se encontraron los dos subtipos de receptores a histamina, observándose que ambos receptores son de tipo excitatorio y probablemente se encuentran localizados sobre la superficie de las células miometriales (Goyal y Verma, 1982).

El efecto relajante uterino de la histamina sobre el útero de la rata es dependiente del estado hormonal del animal. Viggiano y col. (1984) reportaron que el útero aislado de ratas en fase de estro es más sensible a la histamina que el útero de animales en fase de diestro.

3.3.3 Acetilcolina

La acetilcolina produce aumento de la actividad contráctil del útero de varias especies de mamíferos como rata, cobayo, conejo y humano. En la rata y en el conejo el tratamiento con estrógenos no modifica la sensibilidad del útero a los agonistas colinérgicos (Nissenson y col., 1978). Sin embargo, en úteros aislados de cobayos ovariectomizados y ovariectomizados-tratados con estradiol, se observa que la sensibilidad a la acetilcolina disminuye por el tratamiento con estrógenos (Garris y col., 1984).

3.3.4 Prostaglandinas

Las prostaglandinas se utilizan en la clínica para estimular la actividad uterina en la etapa final del embarazo y en el segundo trimestre del embarazo (Garrioch, 1978). Se ha observado que los segmentos uterinos provenientes de mujeres no embarazadas (etapa proliferativa) y embarazadas (tercer trimestre) son sensibles a la acción uterotónica de la prostaglandina F-2 alfa. Estos resultados indican que en el útero humano probablemente no se presenta un cambio en la concentración de receptores a prostaglandinas (Garrioch, 1978).

El tratamiento con estrógenos a ratas ovariectomizadas disminuye la sensibilidad del útero a la prostaglandina F-2 alfa (Mitolo-Chieppa y col., 1978). Sin embargo se ha observado que los estrógenos influyen más sobre la regulación de la síntesis de prostaglandinas que sobre la concentración

de los receptores a prostaglandinas. En el útero de ratas ovariectomizadas, el tratamiento con estrógenos aumenta significativamente la producción de prostaglandina F-2 alfa y del tromboxano B-2 (Brown y Poyser, 1985).

Una función importante de las prostaglandinas en la contractilidad uterina es actuar como transductores de las señales hormonales. El estudio de Caldwell y Gardner (1987) muestra que en útero de rata las prostaglandinas funcionan como transductores de la señal de la oxitocina y no participan con este papel en la contracción inducida por carbacol (agonista colinérgico), bradiquinina y angiotensina II.

3.3.5 Angiotensina II

En el músculo liso uterino, los sitios receptores para angiotensina II están ampliamente distribuidos. Se han identificado concentraciones altas de receptores a angiotensina II en úteros aislados de rata y perro (Capponi y Catt, 1979).

En el útero de la rata embarazada se ha observado que los receptores a angiotensina II aumentan durante la primera mitad del embarazo, mientras que en la segunda mitad disminuyen y así permanecen hasta un días después del parto. Estos cambios se localizan principalmente en el área de la implantación y parecen estar relacionados con el proceso de decidualización. La baja concentración de receptores a angiotensina II que se observa justo antes del parto indica que esta hormona no tiene una función importante en el proceso de

de parto de la rata (Schirar y col., 1980).

3.3.6 Noradrenalina

La contractilidad uterina es estimulada por agonistas adrenérgicos alfa e inhibida por agonistas adrenérgicos beta. Existen numerosos estudios que concluyen que la sensibilidad del útero a las catecolaminas varía según la especie, así como con el estado hormonal, y que esos cambios en la motilidad uterina probablemente se deben a fluctuaciones en la densidad de los receptores adrenérgicos alfa y beta (Diamond y Brody, 1966; Nesheim, 1974; Williams y Lefkowitz, 1977; Roberts y col., 1977). La noradrenalina es el principal neurotransmisor adrenérgico que se ha encontrado en el útero de rata, cobayo, oveja y humano (Arkininstall y Jones, 1985).

Los estrógenos aumentan la sensibilidad del útero de conejo a la noradrenalina. El tratamiento con estrógenos a conejos ovariectomizados aumenta la sensibilidad del útero a la noradrenalina y también aumenta la concentración de receptores adrenérgicos α_2 ; sin embargo, la respuesta contráctil del músculo liso uterino inducida por noradrenalina está mediada por receptores adrenérgicos α_1 sin ninguna influencia -- aparente de los receptores adrenérgicos α_2 . De estas observaciones, Riemer y col. (1987) concluyeron que los estrógenos incrementan la sensibilidad del útero de conejo a la noradrenalina, sin un cambio aparente en la concentración de receptores adrenérgicos α_1 y proponen que los estrógenos pueden -

actuar sobre eventos que suceden a la activación de los receptores adrenérgicos alfa₁.

Roberts y col. (1981) observaron que el tratamiento con estrógenos no modifica la concentración de receptores adrenérgicos beta en el miometrio de conejo. También mostraron que los estrógenos aumentan la sensibilidad del útero de conejo a la noradrenalina y no modifican la respuesta a acetilcolina.

El útero de rata presenta variaciones en la concentración de los receptores adrenérgicos del subtipo beta durante las diferentes fases del ciclo estral. Krall y col. (1978) encontraron que el contenido miometrial de receptores adrenérgicos beta, pero no alfa, en la rata se eleva significativamente durante las fases de proestro y estro; además reportaron que la castración produce una reducción significativa del contenido de receptores adrenérgicos beta y que esta reducción se revierte al administrar estradiol. Los resultados obtenidos de estos estudios concuerdan con la sensibilidad del útero de rata a noradrenalina durante las diferentes fases del ciclo estral (Sterin-Speziale y col., 1981).

Garris (1984) reportó que los segmentos uterinos - aislados de cobayos ovariectomizados son menos sensibles a la noradrenalina que los segmentos aislados de cobayos ovariectomizados y tratados con estrógenos. Esta diferencia en la sensibilidad del útero a la noradrenalina se debe, según Garris, a que los estrógenos aumentan la concentración de receptores adrenérgicos alfa en el útero de cobayos ovariectomizados.

3.3.7 Serotonina

La información relacionada con la sensibilidad del útero a la serotonina es muy escasa y se refiere principalmente a estudios realizados en útero de rata. Se ha reportado que el útero de la rata en fase de estro es especialmente sensible a la serotonina (Robson y col., 1954). La gran sensibilidad del útero de la rata tratada con estrógenos a la serotonina fue motivo del desarrollo de un bioensayo para este neurotransmisor (Amin y col., 1954). Durante varios años se dejó de estudiar este fenómeno y no fue sino hasta 1983 cuando Ichida y col. reportaron que el aumento de la sensibilidad a la serotonina inducido por tratamientos prolongados con estrógenos se debe al aumento de receptores a serotonina en este tejido. Cohen y col. (1985) completaron la observación anterior proponiendo que los receptores a serotonina presentes en el útero de la rata son del subtipo S_2 . En otras especies como conejo, cobayo y humano se desconoce si los estrógenos influyen sobre la sensibilidad del útero a la serotonina.

3.4 Células cebadas y contenido de aminas biogénicas

La distribución de las células cebadas en secciones cruzadas del útero de rata es regulada significativamente por estradiol como lo muestran los resultados de Gibbons y Chang (1972) y McKercher y col. (1973). El gran número de células cebadas totalmente desgranuladas durante el proestro y 15 horas después de la administración de estrógenos a ratas ovariectomizadas probablemente indica la liberación de las aminas biogénicas de las células cebadas. McKercher y col. (1973) encontraron que después de 4 horas de la administración de estradiol, el contenido de histamina y serotonina de las células cebadas uterinas disminuye hasta 70%. Probablemente la disminución de histamina y serotonina se debe a un aumento en la liberación de las mismas y este fenómeno podría relacionarse con el edema uterino que se observa cuatro horas después de la administración de estrógenos a ratas ovariectomizadas.

4. Mecanismos de acción de los estrógenos en el útero de rata

La mayoría de los estudios bioquímicos ha considerado el útero de rata como un órgano con un solo tipo de célula y con una sola clase de receptor a estrógenos que media todas las respuestas a la estimulación hormonal a través del mismo mecanismo de acción. Según esta hipótesis ampliamente aceptada, la interacción de los estrógenos con el receptor citosólico-nuclear involucra un mecanismo de dos pasos. La hormona prime-

ro se une al receptor citosólico; el complejo hormona-receptor es translocado al núcleo donde interactúa con un sitio -aceptor específico en la cromatina. Esta interacción induce la activación genómica o desrepresión, lo cual resulta en un incremento de la transcripción de ARN mensajero y la subsecuente síntesis de proteínas específicas y cambios bioquímicos, -morfológicos y funcionales de las células blanco (Jensen y De Sombre, 1972;.O'Malley y Means, 1974).

Los siguientes hallazgos no concuerdan con la hipótesis clásica de un único mecanismo de acción de los estrógenos para mediar todos sus efectos, y solamente pueden ser explicados si se considera la existencia de mecanismos múltiples de acción de los estrógenos.

Se ha demostrado la existencia de receptores a estrógenos en la membrana y en el citoplasma de leucocitos eosinófilos sanguíneos y uterinos (Tchernitchin y col., 1975; Tchernitchin y Tchernitchin, 1976; Lee, 1982), en la superficie de los vasos sanguíneos uterinos (Tchernitchin y col., -1976) y en las membranas citoplásmicas de las células uterinas (Pietras y Szego, 1977; Müller y col., 1979); también se ha observado la existencia de sitios de unión tipo II citoplásmicos y nucleares a los estrógenos (Eriksson y col., 1980), además del bien conocido sistema citosólico-nuclear de receptores a estrógenos. Se ha involucrado al AMP cíclico y a las prostaglandinas como mediadores de la estimulación estrógena (Singhal y Lafreniere, 1972; Tchernitchin y col., 1977;

Soto-Feine y col., 1981; Penney y col., 1981); se ha observado migración de lisosomas al núcleo (Szego, 1975) y migración muy rápida de leucocitos eosinófilos hacia el útero tras la administración de estrógenos (Tchernitchin y col., 1974); la eosinofilia uterina y el edema subsecuente no son bloqueados por actinomicina D (Tchernitchin y Galand, 1982) y están determinados por los niveles de estrógenos en la sangre y no en el útero (Tchernitchin, 1979). Estos efectos se observan independientemente de las bien conocidas acciones de los estrógenos inducidas a través de la activación genómica.

Kirkland (1977) y Tchernitchin (1983), en desacuerdo con la hipótesis clásica de un solo mecanismo de acción de los estrógenos, han propuesto dos grupos independientes de fenómenos estimulados por estrógenos en el útero de la rata y que pueden disociarse bajo varias condiciones experimentales; cada grupo puede ser estimulado selectivamente o bloqueado completamente sin interferir con el otro, por lo que se ha concluido que son mediados por mecanismos independientes.

El primer grupo de respuestas (aumento del peso húmedo uterino, eosinofilia uterina, edema, aumento de la permeabilidad vascular y liberación de histamina) constituye la fase temprana no genómica de la estimulación estrogénica y es mediado por los leucocitos eosinófilos uterinos que migran de la sangre al útero al activarse sus receptores membranales a estrógenos (Tchernitchin, 1972, 1974, 1979; Tchernitchin y col.,

1976; Kirkland, 1977; Tchernitchin y Galand, 1982).

El segundo grupo de respuestas (aumento de la síntesis de ARN y proteínas, aumento de enzimas uterinas y la diferenciación bioquímica, morfológica y funcional de las células blanco) da lugar a la fase tardía genómica de la estimulación estrogénica y es mediado por la interacción del complejo hormona-receptor con el genoma (Jensen y De Sombre, 1972; Tchernitchin y Galand, 1981; Lee, 1982; Tchernitchin, 1983).

De acuerdo con Kirkland (1977), los fenómenos de la fase temprana no genómica se manifiestan dentro de las primeras cuatro horas después de administrar los estrógenos, y los fenómenos de la fase tardía genómica tienen una latencia de 24 horas. Además, propone que las respuestas uterinas de la fase tardía de la estimulación estrogénica representan el desarrollo completo del útero, mientras que los fenómenos tempranos representan la preparación de este órgano para su completo desarrollo. Tchernitchin y Galand (1982) establecieron que las respuestas tempranas no genómicas alcanzan su máxima manifestación seis horas después de la administración de los estrógenos, y que las respuestas tardías genómicas se desarrollan completamente 24 horas después (Galand y col., 1984).

Grunert y colaboradores (1986) han podido disociar los efectos del dietilstilbestrol y del 17-beta estradiol sobre las respuestas tempranas no genómicas y tardías genómicas del

útero de la rata. Observaron que el dietilstilbestrol es más débil que el 17-beta estradiol para inducir edema uterino seis horas después de su administración.

También se ha demostrado que la hormona tiroidea participa en ciertas respuestas tardías genómicas inducidas por estrógenos en el útero de la rata, y en cambio no modifica - las respuestas tempranas no genómicas observadas cuatro horas después de la administración de estrógenos (Gardner y col., 1978).

Los términos acción indirecta (genómica) y acción directa (no genómica) han sido acuñados por McEwen (1982) y aplicados principalmente para caracterizar las acciones de las hormonas esteroides en el sistema nervioso central. - McEwen propone que las hormonas esteroides pueden alterar la actividad de la célula nerviosa por una acción directa sobre la membrana o por una acción indirecta a nivel genómico, la cual está mediada por receptores intracelulares. Los efectos directos son de latencia corta y de duración breve. Por ejemplo, el 17-beta estradiol inhibe la descarga neuronal inmediatamente después de que se aplica iontoforéticamente sobre el área hipotalámica; este efecto no es producido por su epímero 17-alfa estradiol (Kelly y col., 1977). En contraste, los efectos indirectos o genómicos son de latencia y duración largas. Por ejemplo, la activación de la receptividad sexual en las - ratas hembras por estradiol, la cual tiene una latencia de

inicio de 18 a 24 horas y perdura sin el estímulo estrogénico durante 24 a 36 horas (Green y col., 1970; Parsons y col., 1981). Hay efectos hormonales que caen entre estos dos extremos en términos de latencia y duración. Tal es el caso de la facilitación de la receptividad sexual y proceptividad por progesterona en ratas tratadas con estrógenos, la cual se presenta 30 a 60 minutos después de la administración y persiste durante unas pocas horas (Meyerson, 1972; Fadem, 1979).

Otros términos relacionados con el mecanismo de acción de las hormonas esteroides son los efectos primarios o secundarios inducidos por ellas. Los efectos primarios son los causados por la interacción de la hormona con la célula correspondiente. Los efectos secundarios son los que están mediados por otra hormona. Por ejemplo, la prolactina, secretada por la estimulación estrogénica, está involucrada como mediador del efecto de estrógenos sobre el recambio de neurotransmisores en el cerebro (Gudelesky y col., 1976). Otro ejemplo semejante es el aumento de la liberación de noradrenalina de terminales nerviosas inducido por un incremento de AMPc en tejido neural tratado con estrógenos (Paul y col., 1979). Asimismo, Kirkland y col. (1977) han señalado que se necesita un factor hipofisiario para que el desarrollo uterino inducido por estrógenos se lleve a cabo completamente.

5. Calcio y músculo liso uterino

El desarrollo de la tensión por las proteínas contráctiles de la célula muscular lisa depende principalmente de la concentración de calcio ionizado dentro del citoplasma (Bolton, 1979). En estudios recientes se indica que el calcio puede actuar en un sitio regulador que está asociado con la molécula de miosina para producir la contracción, y no con la troponina (Bremel y col., 1977; Sobieszek, 1977). Sin embargo, la manera en que la interacción actina-miosina es controlada en el músculo liso - permanece en controversia. Ebashi (1977) ha propuesto que -- otras dos proteínas, leiotonina y una proteína ácida, son esen ciales para la contracción del músculo liso; éstas y la tropomiosina producen la contracción al actuar en la molécula de actina.

Los iones calcio que inducen el aumento citoplásmico de este ion pueden provenir de dos fuentes principalmente: una de ellas está localizada en la parte exterior de la membrana celular y está determinada por cambios en la concentración de calcio extracelular (Van Breemen y col., 1980; Hurwitz, 1986). La otra fuente consta de los almacenes intracelulares de calcio como la cara interna de la membrana plasmática, el retículo sarcoplásmico y la mitocondria (Bolton, 1979; Cavero y Spedding, 1983).

Existen dos vías principales por las que los iones de calcio del medio externo atraviesan la membrana celular y tienen acceso al aparato contráctil: el sistema de canales de

calcio operados por el receptor y el sistema de canales de calcio dependientes del voltaje (Bolton 1979; Meisheri y col., 1981; Hurwitz, 1986). Asimismo, los iones de calcio extracelular pueden entrar al citosol a través de una pequeña fuga membranaral - (Van Breemen y col., 1982) y de un mecanismo de intercambio sodio-calcio (Reuter, 1974; Grover y col., 1981; Masahashi y Tomita, 1983).

Se considera que un canal del calcio en la membrana de una célula eucariótica es una estructura macromolecular que consta de una o más glucoproteínas (Lakshminarayanaiah, 1981; Towart y Schramm, 1984), cuya configuración sería cilíndrica con un poro acuoso en el centro (Towart y Schramm, 1984). Independientemente del mecanismo de activación, los iones de calcio que tienen la capacidad de atravesar el poro del canal pueden pasar solamente si éste presenta una configuración abierta. Los canales de calcio tienen esa conformación cuando las condiciones son adecuadas y se aplica un estímulo apropiado. Sin estos elementos, los mecanismos de entrada de los canales de calcio mantienen una conformación cerrada (Hurwitz, 1986). Aunque es difícil generalizar, los canales de calcio que se han encontrado en diferentes tipos celulares tienen aparentemente mecanismos de entrada similares a los de los canales de sodio, en los que operan para transformar el canal en alguna de tres conformaciones o estados diferentes (Trautwein y col., 1975; Kass y Scheuer, 1982; Tsien, 1983). La conformación abierta se refiere al estado activado; las otras dos son con-

formaciones cerradas y se refieren a un estado desactivado y a un estado inactivado. Los canales de calcio sensibles al voltaje adquieren el estado activado cuando el potencial de membrana se reduce a un nivel adecuado. Los canales de calcio operados por receptor adquieren el estado activado al interactuar los receptores específicos de la membrana plasmática con los neurotransmisores u hormonas (Bolton, 1979; Meisheri y col., 1981; Hurwitz, 1986).

Para estimar la participación de las fuentes extracelular e intracelular de calcio en la contracción del músculo liso inducida por diferentes estímulos se han utilizado preparaciones aisladas y bañadas en medios deficientes de calcio - (Somlyo y Somlyo, 1968; Devine y col., 1972; Bolton, 1979).

En 1964, Fleckenstein reportó que el verapamil y la prenilamina tenían el mismo efecto inhibitorio sobre el músculo cardiaco que la ausencia de calcio en el medio extracelular. Desde entonces, se han descubierto numerosos compuestos orgánicos de diferentes estructuras químicas, que tienen el mismo efecto inhibitorio (Janis y Triggle, 1983; Meyer y col., 1983; Spedding, 1985). Este efecto resulta de la acción directa de estos compuestos en los canales de calcio. Originalmente, se denominó "antagonistas de calcio" a estos compuestos, debido a que sus efectos inhibitorios se revertían al incrementar la concentración iónica de calcio en el medio extracelular. Recientemente se les nombra "agentes bloqueadores de los cana-

les de calcio" o "bloqueadores de los canales de calcio" (Cave-ro y Spedding, 1983; Hurwitz, 1986) y se sabe que actúan a tra-vés de los canales de calcio dependientes del voltaje (Bolton, 1979 ; Nayler y Horowitz, 1983).

Se ha propuesto que mediante el uso de antagonistas de calcio se puede discriminar entre las vías de entrada de calcio operadas por el receptor y las vías de entrada de calcio opera-das por el voltaje, ya que estas sustancias inhiben preferencial-mente la respuesta mecánica y la entrada de calcio inducida por la despolarización de la membrana (Bolton, 1979; Meisheri y -col., 1981).

Las sustancias que producen contracción del músculo liso del útero de rata difieren en la manera de incrementar la concentración de calcio libre citoplásmico que activa a las pro-teínas contráctiles. Por ejemplo, la contracción inducida por una solución despolarizante de potasio o por prostaglandina F 2 alfa es dependiente de calcio extracelular (Batra y Bengtsson, 1978; Kothekar y col., 1985). Sin embargo, la contracción del útero de rata inducida por acetilcolina o angiotensina II no depende del calcio extracelular (Hamon y Worcel, 1979; Sakai y col., 1982; Lalanne y col., 1984; Mironneau y col., 1984). Es-tos resultados indican que las sustancias que contraen el mús-culo liso del útero de rata lo hacen a través de diferentes me-canismos de acción.

Los agentes bloqueadores de la entrada de calcio como el metoxiverapamil inhiben completamente la contracción uterina inducida por potasio alto (Batra y Bengtsson, 1978). Sin embargo, el verapamil sólo inhibe parcialmente la respuesta contráctil del útero de rata inducida por acetilcolina (Kothekar y col., 1985).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los estudios relacionados con la sensibilidad del útero de rata a los agentes uterotónicos regulada por estrógenos no se ha tomado en cuenta la latencia de inicio del fenómeno, ya que la mayoría de las observaciones se han realizado entre las 48 y 72 horas después de administrar los estrógenos; tampoco se ha estudiado la relación de este fenómeno con las respuestas de la fase temprana no genómica o con las de la fase tardía genómica, inducidas por estrógenos en el útero de la rata. El conocimiento de la latencia de inicio de la sensibilidad del útero de la rata a los agentes uterotónicos, regulada por estrógenos y su relación con las respuestas uterinas, también inducidas por estrógenos, permitirá conocer la naturaleza del fenómeno al ubicarlo en alguno de los dos grupos principales de respuestas.

Hasta la fecha se desconoce la función fisiológica de la serotonina en el útero de la rata; sin embargo, se ha relacionado con el edema uterino que se observa cuatro horas después de la administración de estrógenos (McKercher y col., 1973). Se ha propuesto que la serotonina del útero de la rata se localiza en el interior de las células cebadas junto con la histamina (McKercher, 1973). Se sabe que los estrógenos influyen sobre la distribución y el contenido de estas dos aminas en las células cebadas uterinas; así, la administración de es-

trógenos a ratas ovariectomizadas causa una reducción de 70% en el contenido de aminas de las células cebadas uterinas cuatro horas después de la administración de estrógenos. Esta observación se ha interpretado como la liberación de las aminas de las células cebadas (McKercher y col., 1973). Por el corto tiempo (cuatro horas) en que se presentan los fenómenos mencionados y por la inclusión del edema uterino en el grupo de respuestas tempranas inducidas por estrógenos, es interesante explorar si la sensibilidad del útero de la rata a la serotonina es un fenómeno del grupo de respuestas uterinas tempranas inducidas por estrógenos, como la eosinofilia uterina, el edema y la liberación de histamina, o si pertenece al grupo de respuestas uterinas tardías inducidas por estrógenos, como los aumentos de la síntesis de ARN y proteínas.

Los cambios plasmáticos en las concentraciones de estrógenos afectan el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis, al mismo tiempo que producen cambios importantes en otros órganos blanco como útero, vagina, cérvix, glándula mamaria, etcétera (Sonnenschein y Soto, 1978). Mediante el empleo de ratas hipofisectomizadas se ha podido demostrar la contribución de la pituitaria en algunas respuestas uterinas inducidas por estrógenos en la rata (Gardner y col., 1978; Kirkland y col., 1977). Puesto que en este trabajo se explora la naturaleza de la acción de los estrógenos en la sensibilidad del útero de la rata a la serotonina, es importante determinar

si en este fenómeno existe una contribución de la hipófisis al efecto de los estrógenos sobre el útero de la rata.

La relación entre la selectividad de la respuesta uterina a los agentes uterotónicos y el estado endócrino del animal, es un buen índice de la participación de dichos agentes en la fisiología uterina. Por lo tanto, estudiar la selectividad de la respuesta uterina inducida por estrógenos a diversos agentes uterotónicos permitirá conocer el grado de selectividad de la respuesta contráctil del útero de la rata a la serotonina.

Finalmente, puesto que la serotonina produce contracción del músculo liso del útero de rata estrogenizada, es importante conocer si la serotonina induce la entrada de calcio del medio extracelular o si promueve la liberación de calcio de almacenes intracelulares; en caso de que la contracción inducida por serotonina utilice calcio extracelular, se investigará si el uso de un bloqueador de las vías de entrada de calcio sensibles al voltaje es capaz de revelar vías de entrada de calcio operadas por el receptor en este fenómeno.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas hembras vírgenes de la cepa Sprague-Dawley de aproximadamente 200 g de peso, en las fases de estro, meta-estro, diestro y proestro, ovariectomizadas, ovariectomizadas-tratadas con estradiol, hipofisectomizadas e hipofisectomizadas tratadas con estradiol. Solamente se emplearon animales que presentaron dos ciclos estrales continuos. Las fases del ciclo estral se determinaron por frotis vaginales. La ovariectomía y la hipofisectomía se realizaron bajo anestesia con éter 15 días antes del sacrificio o del tratamiento con estradiol; éste consistió en una dosis única de 10 ug/kg de 3-benzoato de 17-beta estradiol en un volumen de 0.1 ml de aceite de maíz, administrada por vía subcutánea. Las ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol se sacrificaron cada hora durante el periodo de 1 a 6 horas, y a las 12, 24, ó 44 horas después de la administración de estradiol, mientras que las hipofisectomizadas tratadas con estradiol se sacrificaron después de 44 horas.

Los animales se sacrificaron por desnucamiento. Se extrajeron los cuernos uterinos y se disecaron en una solución Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) a 30°C con la siguiente composición milimolar: NaCl, 119; KCl, 4.6; KH_2PO_4 , 1.2; MgSO_4 , 1.2; CaCl_2 , 1.5; NaHCO_3 , 20 y glucosa, 11.5. El pH se ajustó a 7.4 con burbujeo constante de 5% de CO_2 en O_2 . Se obtuvieron dos segmentos transversales de la parte media de cada cuerno uterino, de 1 cm de longitud aproximadamente.

Cada segmento uterino se colocó en una cámara de incubación de 5 ml de volumen que contenía solución KRB a 37°C con burbujeo constante de 5% de CO₂ en O₂. Los segmentos uterinos se tensionaron a 1 g y se estabilizaron durante una hora antes de exponerlos a las drogas, renovando la solución KRB cada 10 minutos. Las contracciones del músculo liso uterino se registraron isométricamente por medio de un transductor de tensión modelo FT03 conectado a un polígrafo Grass modelo 7B.

La actividad contráctil espontánea se registró al iniciar cada experimento durante 20 minutos. Las drogas se añadieron directamente al baño de incubación en un volumen de 10 ul de las soluciones apropiadas para obtener las concentraciones finales deseadas. Las soluciones de las drogas se prepararon con solución KRB o agua destilada. En todos los casos las drogas se dejaron actuar durante 5 minutos; después de este tiempo el tejido se lavó dos veces con KRB precalentado a 37°C.

El aumento de la actividad contráctil inducido por los agonistas (serotonina, acetilcolina y oxitocina) se midió como el área bajo la curva del trazo poligráfico obtenido durante los primeros 5 minutos de exposición a la droga, por medio de un planímetro. La respuesta inducida por acetilcolina (10^{-4} M) se consideró la respuesta del 100% en todos los experimentos y con ésta se contrastaron las respuestas obtenidas con serotonina en todas las condiciones experimentales de este estudio.

La dependencia del calcio extracelular se estudió en segmentos uterinos de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol durante 44 horas (10 ug/kg por vía subcutánea). Las soluciones con diferentes concentraciones de calcio (0, 0.5, - 1 y 1.5 mM) se prepararon de la misma forma que la solución - KRB salvo por la variación en la concentración de CaCl_2 . En la solución con 0 mM de calcio, además de omitir el CaCl_2 , se adicionó EGTA (10 uM) para quelar el calcio contaminante (Batra y Bengtsson, 1978; Uski y Andersson, 1984; Maigaard y col., 1985).

El efecto de verapamil (antagonista de calcio) se examinó añadiendo este compuesto a la solución KRB en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 uM.

El 3-benzoato de 17-beta estradiol, la serotonina, la acetilcolina y el verapamil fueron suministrados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). La oxitocina se obtuvo de una solución comercial de los laboratorios Sandoz (México).

El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student y las diferencias con p menor de 0.05 se consideraron significativas (Tallarida y Murray, 1984).

RESULTADOS

Sensibilidad del útero de rata a la serotonina durante el ciclo estral. Los cambios en la sensibilidad a serotonina del útero aislado de ratas en las 4 fases del ciclo estral se muestran en la figura 1. La respuesta contráctil máxima del útero a la serotonina se observó en la fase de estró y fue significativamente mayor que en la fase de diestro ($p < 0.01$) durante la cual se observó la menor sensibilidad a la serotonina. También se observó que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las fases de diestro y metaestro en la sensibilidad uterina a la serotonina; sin embargo, éstas fueron significativamente diferentes cuando se contrastaron con la sensibilidad de úteros de ratas en fase de proestro ($p < 0.01$). En las diversas fases del ciclo estral estudiadas, los tejidos uterinos respondieron a la serotonina dependientemente de la dosis.

Latencia de efecto del estradiol en la respuesta a serotonina del útero de ratas ovariectomizadas. En las condiciones experimentales en que se realizó este trabajo, el útero de ratas ovariectomizadas presentó actividad espontánea constante, con una frecuencia de una contracción por minuto; este patrón de actividad no se modificó en presencia de diferentes concentraciones de serotonina (figura 2A). El estradiol no tuvo efecto en la respuesta uterina a serotonina cuando se experimentaron

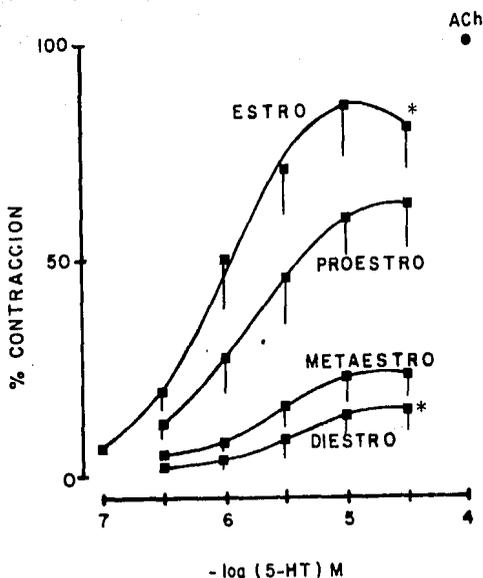


Figura 1. Curvas concentración respuesta a serotonina (5-HT) de segmentos uterinos aislados de ratas en diferentes fases del ciclo estral. Cada punto representa el promedio de 10 a 12 experimentos, y las barras verticales, el error estándar. *p 0.01.

latencias de 1 a 5 horas, es decir, el patrón de actividad contráctil espontánea no se modificó en presencia de serotonina. En la figura 2 se muestra la respuesta a serotonina del útero - de ratas ovariectomizadas y ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol durante 6, 12, 24 y 44 horas. El útero de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol durante seis horas respondió contráctilmente a las concentraciones más altas de serotonina (10^{-6} M y 10^{-5} M) (figura 2B). Después de una latencia de 12 horas, el estradiol produjo mayor sensibilidad del útero de ratas ovariectomizadas a la serotonina, que se - manifestó por la respuesta contráctil a las concentraciones

5×10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} y 10^{-5} M (figura 2C). Tanto a las 6 como a las 12 horas de tratamiento con estradiol, no se observó efecto en la actividad contráctil espontánea del útero de ratas ovariectomizadas, la cual permaneció constante, como se observa al inicio de los registros (2B y 2C).

A las 24 horas de administración de estradiol, la respuesta uterina contráctil a serotonina se presentó desde la concentración más baja, es decir, 10^{-8} M (figura 2D). Sin embargo, la respuesta contráctil máxima inducida por serotonina se observó a las 44 horas de latencia de efecto del estradiol (figura 2E). Desde las 24 horas de tratamiento, la actividad contráctil espontánea fue inhibida completamente por el estradiol, como se observa al inicio de los registros (2D y 2E). La respuesta contráctil inducida por serotonina en el útero de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol durante 6, 12, 24 y 44 horas fue dependiente de la concentración, como se muestra en la gráfica de la figura 3.

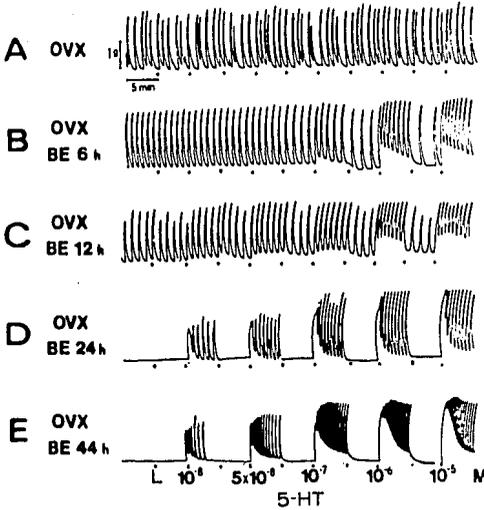
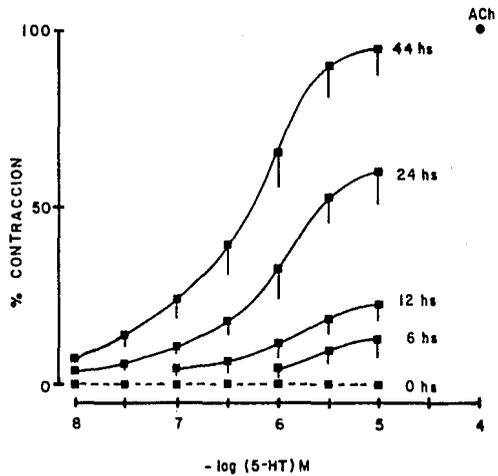


Figura 2. Efecto de diferentes tiempos de exposición al estradiol en la respuesta contráctil inducida por serotonina (5-HT) en segmentos uterinos aislados de ratas ovariectomizadas (OVX) (BE=benzoato de estradiol).

Figura 3. Curvas concentración-respuesta a serotonina (5-HT) de segmentos uterinos aislados de ratas ovariectomizadas y tratadas durante diferentes lapsos con estradiol. Cada punto representa el promedio de 10 a 12 experimentos, y las barras verticales, el error estándar.



Efecto del estradiol en la respuesta a serotonina del útero de ratas hipofisectomizadas. El útero de ratas hipofisectomizadas presentó un patrón de actividad contráctil espontánea semejante al que se observó en el útero de ratas ovariectomizadas (figura 4A), y tampoco se modificó al añadir serotonina al baño de incubación (figura 4B). El tratamiento de estradiol durante 44 horas a ratas hipofisectomizadas inhibió las contracciones uterinas espontáneas, como lo muestra el registro de la figura 4C. La adición de serotonina al útero de ratas hipofisectomizadas y tratadas con estradiol durante 44 horas produjo una respuesta contráctil dependiente de la concentración, que cesa al retirar la droga del medio de incubación (figura 4D).

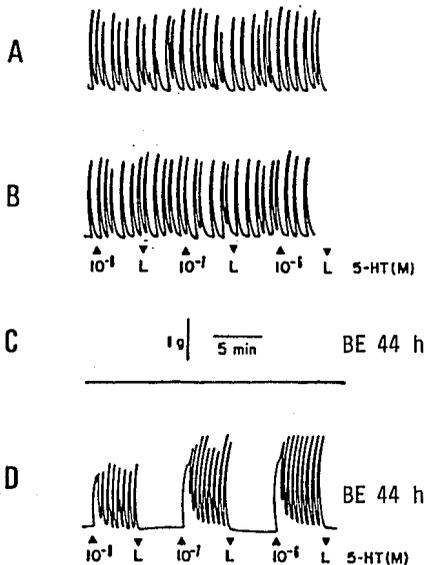


Figura 4. Efecto del estradiol en la actividad espontánea y en la respuesta contráctil inducida por serotonina (5-HT) en segmentos uterinos aislados de ratas hipofisectomizadas.

Especificidad de la sensibilidad a serotonina. Para confirmar que el estradiol induce sensibilidad específicamente a la serotonina, se estudió la respuesta contráctil a la acetilcolina y a la oxitocina en úteros de ratas ovariectomizadas y ovariectomizadas tratadas con 10 ug/kg de benzoato de estradiol durante 44 horas. En las figuras 5 y 6 se observa que la sensibilidad a la acetilcolina y a la oxitocina no se modificó por la administración de estrógenos, sugiriendo que el incremento en la sensibilidad a la serotonina inducido - por estrógenos es específico.

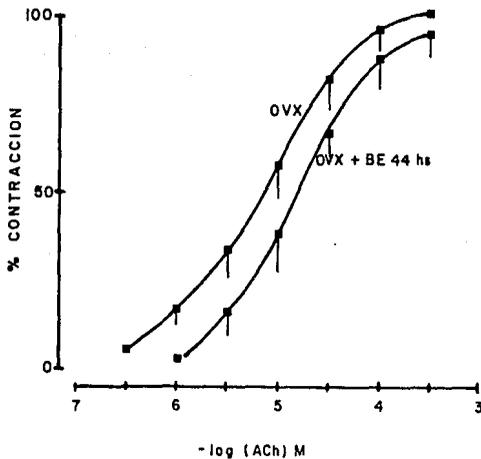


Figura 5. Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) de segmentos uterinos - aislados de ratas ovariectomizadas y ovariectomizadas tratadas con benzoato de estradiol 44 horas. Cada punto representa el promedio de 10 a 12 experimentos, y las líneas verticales, el error estándar.

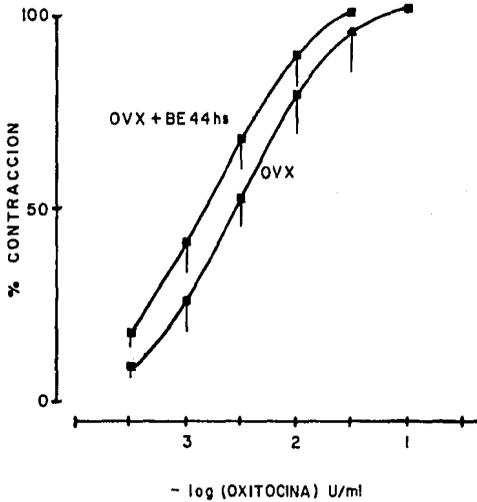


Figura 6. Curvas concentración-respuesta a oxitocina - de segmentos uterinos aislados de ratas ovariectomizadas y ovariectomizadas y -- tratadas con benzoato de estradiol 44 horas. Cada punto representa el promedio de 10 a 12 experimentos, y las líneas verticales, el error - estándar.

Efecto del calcio extracelular en la respuesta contráctil inducida por serotonina en el útero de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol. En la figura 7 se muestra la respuesta contráctil inducida por serotonina (10^{-5} M) en útero de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol durante 44 horas en medios de incubación con diferentes concentraciones de -- calcio extracelular (0, 0.5, 1 y 1.5 mM). La respuesta contráctil a serotonina 10^{-5} M en un medio extracelular con CaCl_2 1.5 mM se consideró el 100 %. En presencia de CaCl_2 1 y 0.5 mM las respuestas contráctiles fueron 65 ± 11 % y 35 ± 8 % respectivamente. Estos valores representan el promedio de 10 a 12 experimentos \pm el error estándar. La ausencia de calcio -

en el medio extracelular (CaCl_2 0 mM, EGTA 10 μM) disminuyó notablemente la respuesta a serotonina.

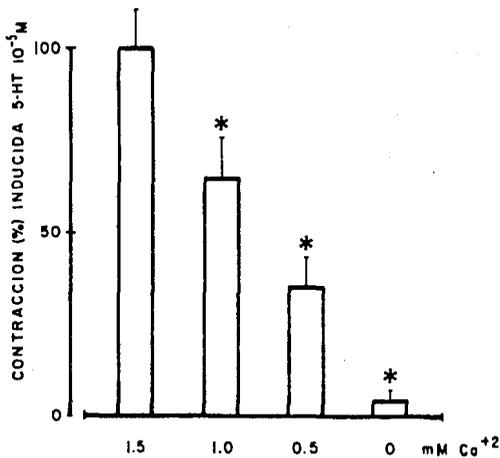


Figura 7. Efecto de diferentes concentraciones de calcio extracelular en la respuesta contráctil a serotonina en el útero de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol 44 horas. Los datos representan la media \pm el error estándar de 10 a 12 experimentos. * $p < 0.01$.

Efecto del verapamil en la respuesta contráctil inducida por serotonina en el útero de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol. El verapamil inhibió la respuesta contráctil máxima a serotonina en el útero de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol durante 44 horas, de manera dependiente de la concentración. En la figura 8 se muestran las curvas concentración de serotonina versus la respuesta contráctil, en presencia de verapamil (0.1, 0.5 y 1 μM). La respuesta máxima inducida por serotonina (10^{-5} M) disminuye en forma significativa con 0.1 μM de verapamil ($p < 0.05$) y con 0.5 y 1 μM de verapamil ($p < 0.01$).

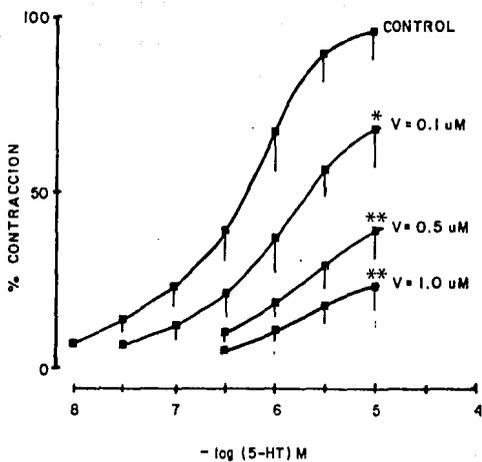


Figura 8. Efecto de diferentes concentraciones de verapamil en la respuesta contráctil a serotonina en el útero de ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol 44 horas. Cada punto representa el promedio de 10 a 12 experimentos, y las líneas verticales, el error estándar de la media. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

DISCUSION

Los resultados obtenidos con úteros de animales en diferentes fases del ciclo estral completan las observaciones iniciales de Robson y col. (1954) y apoyan la idea de que en condiciones normales la serotonina puede tener alguna participación en la fisiología uterina. El patrón de la sensibilidad del útero de la rata a la serotonina en las diferentes fases del ciclo estral muestra que cuando los niveles plasmáticos de estrógenos, según datos reportados por Savoy-Moore y col., 1980 y Bélanger y col., 1981, son bajos, la sensibilidad del útero a la serotonina también es baja, como en la fase de metaestro. Asimismo, cuando los niveles plasmáticos de estrógenos alcanzan su valor máximo (proestro), la sensibilidad uterina a la serotonina es significativamente mayor que en la fase de diestro. Durante la fase de estro, los niveles plasmáticos de estrógenos vuelven a ser bajos y, sin embargo, es cuando se observa la máxima sensibilidad del útero a la serotonina; esto indica que es necesaria cierta latencia para que se manifieste la acción de los estrógenos en la sensibilidad del útero de rata a la serotonina.

Uno de los modelos experimentales más utilizados en el estudio de la acción de los estrógenos sobre el útero es la rata ovariectomizada (Kirkland y col., 1977; Marshall y col., 1986; Gimeno y col., 1987). La vigorosa actividad espontánea que presentan los úteros de ratas ovariectomizadas está rela-

cionada con la liberación de prostaglandinas al medio de incubación, tal como lo han demostrado Sterin-Speziale y col. (1980). Por otro lado, la indometacina (inhibidor de la ciclooxigenasa) inhibe en forma dependiente de la dosis la actividad espontánea de los úteros de ratas ovariectomizadas, lo cual confirma que esta actividad se origina por la liberación de prostaglandinas (Garrioch, 1978; Caldwell y Gardner, 1987). El tratamiento in vivo con estrógenos disminuye la liberación de prostaglandinas uterinas en ratas ovariectomizadas (Sterin-Speziale y col., 1980). Probablemente la inhibición de la actividad espontánea uterina observada en animales tratados con estrógenos se debe al efecto de los estrógenos sobre la síntesis de prostaglandinas.

La completa insensibilidad del útero de rata ovariectomizada a la serotonina es un caso notable. En úteros de otras especies estimulados con varios agentes uterotónicos no se ha observado algo semejante. Por ejemplo, el útero de conejo ovariectomizado manifiesta cierta sensibilidad a la noradrenalina, la cual aumenta cuando se trata al animal con estrógenos (Riemer y col., 1987); en cambio, el útero de rata es completamente insensible a la serotonina al ovariectomizar al animal, lo cual es una muestra indirecta de que no tiene receptores a serotonina.

Los resultados del estudio de la temporalidad del efecto de los estrógenos sobre la sensibilidad del útero de rata ovariectomizada a la serotonina muestran que el desarrollo de la respuesta contráctil se inicia seis horas después de

la administración de los estrógenos y que se necesitan más de 24 horas de acción estrogénica para que se observe la máxima sensibilidad del útero a la serotonina. Estos resultados descartan la posibilidad de que este fenómeno se relacione con las respuestas de la fase temprana no genómica inducidas por estrógenos, como la eosinofilia uterina, la disminución del contenido de histamina y serotonina de las células cebadas uterinas, - el aumento de peso húmedo uterino y el edema uterino, fenómenos que alcanzan su máxima manifestación cuatro horas después de administrar los estrógenos (McKercher y col., 1973; Grunert y Tchernitchin, 1981; Tchernitchin y Galand, 1982; Galand y col., 1984). El hecho de que se observe la máxima sensibilidad del útero a la serotonina 24 horas después de la administración de estrógenos indica que este proceso cae dentro de la temporalidad en que se manifiestan los efectos tardíos genómicos inducidos por los estrógenos en el útero de rata, como aumento de la síntesis de ARN y proteínas uterinas (Tchernitchin y col., 1975; Grunert y Tchernitchin, 1981; Tchernitchin y Galand, 1982; Galand y col., 1984).

Se desconoce si la sensibilidad del útero de la rata ovariectomizada a la serotonina inducida por estrógenos está asociada con algún fenómeno de la fase tardía genómica. Sin embargo, este estudio inicial abre la posibilidad de utilizar el modelo experimental para conocer si existe alguna relación entre el fenómeno estudiado y las respuestas de la fase temprana no genómica y de la fase tardía genómica inducidas por

estrógenos, utilizando sustancias que pueden disociar los dos grupos de respuestas, como el estriol, que induce respuestas uterinas tempranas no génomicas (Tchernitchin y col., 1975), y como la nafoxidina, que induce principalmente respuestas tardías génomicas (Galand y col., 1984). El empleo de estas sustancias y el registro temporal (a las 2, 6, 9, 24 y 48 horas) de las respuestas inducidas por estrógenos en el útero de la rata han servido de base para disociar los efectos tempranos y tardíos de los estrógenos sobre el útero de rata (Galand y col., 1984).

El tiempo que tarda en manifestarse plenamente la sensibilidad del útero de rata a la serotonina sugiere que probablemente sea necesaria la síntesis de macromoléculas. Esta sugerencia es compatible con otros conocidos efectos de los estrógenos sobre la inducción de proteínas (Chan y col., 1976) y sobre el retardo en la respuesta de los estrógenos para inhibir el número de receptores adrenérgicos alfa de las plaquetas de conejo (Roberts, 1979). Sin embargo, la evidencia definitiva de una acción génomica de los estrógenos sobre la sensibilidad del útero de la rata a la serotonina se obtendrá al utilizar inhibidores de la síntesis de ARN ó proteínas.

La hipofisectomía no modificó el efecto de los estrógenos sobre la sensibilidad del útero de rata a la serotonina, por ello es probable que este fenómeno sea producto de una acción primaria de los estrógenos sobre las células miometriales

y no esté mediado por algún factor hipofisario como sucede con algunas respuestas tardías del útero de rata inducidas por estrógenos, que son disminuidas específicamente por la hipofisectomía, como el aumento de peso uterino (Kirkland y col., 1977). Por otro lado, la hipofisectomía no modifica el efecto de los estrógenos sobre la formación de uniones estrechas en el miometrio de rata (Burghardt y col., 1987) ni sobre las respuestas de la fase temprana del útero de rata (Kirkland y col., 1977). Las observaciones anteriores indican que mientras algunas respuestas de la fase tardía del útero de rata inducidas por estrógenos son mediadas por algún factor hipofisario, éste no interviene en otras respuestas como la sensibilidad del útero de rata a la serotonina.

Este estudio muestra que los estrógenos regulan selectivamente la sensibilidad del útero aislado de la rata ovariectomizada a la serotonina, ya que no modifican la sensibilidad del útero a otros agentes uterotónicos como la oxitocina y la acetilcolina. Estos hallazgos indican que el cambio específico en la sensibilidad del útero de la rata a la serotonina puede tener una función fisiológica importante en este tejido.

Los resultados obtenidos en medios con diferentes concentraciones de calcio indican que la contracción uterina inducida por serotonina y regulada por estrógenos es dependiente del calcio extracelular; resultados semejantes han sido reportados en la contracción del músculo liso uterino humano in-

ducida por noradrenalina (Maigaard y col., 1985). Estos resultados sugieren que la fuente de calcio extracelular es fundamental para la contracción inducida por serotonina e indican que ésta no moviliza calcio de almacenes intracelulares como lo hacen otras sustancias uterotónicas como la acetilcolina y la angiotensina II que son capaces de inducir contracción del útero de rata en soluciones sin calcio (Mironneau y col., 1984).

El verapamil inhibió en forma dependiente de la dosis la contracción uterina inducida por serotonina. Una probable explicación de este fenómeno es que la serotonina despolarice la membrana de las células miométriales y active las vías de entrada de calcio sensibles al voltaje, las cuales son bloqueadas por verapamil. Se desconoce si la serotonina efectivamente despolariza las células miométriales de rata; sin embargo, se ha reportado que sí despolariza las células del músculo liso del conducto deferente de la rata (Yoshida y Kuga, 1986). Otra explicación del efecto inhibitorio del verapamil es que éste sea capaz de bloquear las vías de entrada de calcio operadas por el receptor, en este caso activadas por la serotonina, pues se ha reportado que bloqueadores de los canales de calcio operados por voltaje pueden interferir con los operados por el receptor en músculo liso vascular (Towart, 1984).

Los resultados de este estudio indican que la respuesta contráctil inducida por serotonina en el útero aislado de la rata y regulada por estrógenos es un fenómeno perteneciente a la fase tardía de las respuestas del útero de la rata a la acción de los estrógenos, y dependiente del calcio extracelular. Sin embargo, para esclarecer su naturaleza genómica deben realizarse estudios de inhibición de síntesis de ARN o de proteínas. Asimismo es necesario elucidar la participación de las vías de entrada de calcio sensibles al voltaje en la contracción del músculo liso uterino inducida por serotonina. Finalmente, aunque nuestros resultados indican que el cambio específico en la sensibilidad a la serotonina puede desempeñar un papel funcional importante en la fisiología uterina, se desconoce la función de la serotonina en el útero y las consecuencias de su regulación estrogénica, por lo que son necesarios estudios adicionales del mecanismo de acción de este fenómeno y su relación con las respuestas del útero de rata a los estrógenos.

REFERENCIAS

- Adham, N. y Schenk, E. (1969): Autonomic innervation of the rat vagina, cervix and uterus and its cyclic variation. Am. J. Obst. Gynec. 104(4): 508-516.
- Amin, A., Crawford, T. y Gaddum, J. (1954): The distribution of substance P and 5-HT in the central nervous system of the dog. J. Physiol. 126:596-618.
- Arkininstall, S. y Jones, C. (1985): Regional changes in catecholamine content of the pregnant uterus. J. Reprod. Fert. 73:547-557.
- Batra, S. y 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.
- Bélanger, A., Cusan, L., Caron, S., Barden, N. y Dupont, A. (1981): Ovarian progestins, androgens and estrogen throughout the 4-day estrous cycle in the rat. Biol. Reprod. 24:591-596.
- Bergman, R. A. (1968): Uterine smooth muscle fibres in castrate and estrogen treated rats. J. Cell Biol. 36:639-648.
- Bertaccini, B., Molina, E., Vitali, T. y Zappia, L. (1979): Action of histamine receptors agonists and antagonists on rat uterus. Br. J. Pharmac. 66:13.
- Bo, W., Odor, D. y Rothrock, M. (1968): The fine structure of uterine muscle of the rat uterus at various time intervals following a single injection of oestrogen. Am. J. Anat. 123:369-373.
- Bolton, T.B. (1979): Mechanisms of action of transmitters and substances on smooth muscle. Physiol. Rev. 59:606-718.
- Bremel, R., Sobieszek, A. y Small, J. (1977): Regulation of actin-myosin in vertebrate smooth muscle. En: Biochemistry of Smooth Muscle. Stephens, N. (ed.). University Park Press. Baltimore, E.U.A. Pp. 533-549.
- Brown, C.G. y Poyser, N.L. (1985): Further studies on prostaglandin and thromboxane production by the rat uterus during the oestrous cycle. J. Reprod. Fert. 73:391-399.
- Bülbring, E., Casteels, R. y Kuriyama, H. (1968): Membrane potential and ion content in cat and guinea pig myometrium and the response to adrenaline and noradrenaline. Br. J. Pharmacol. 34:388-407.

Burghardt, R., Gaddy-Kurten, D., Lawrence, R., Kurten, R. y Mitchell, P. (1987): Gap junction modulation in rat uterus. Structure-activity relationships of estrogen receptor-binding ligands on myometrial and serosal cell. Biol. Reprod. 36:741-751.

Caldwell, N. y Gardner, R. (1987): The selective inhibition by indomethacin of rat uterine contractile responses. Annals New York Academy of Sciences 494:101-103.

Capponi, A.M. y Catt, K.J. (1979): Angiotensin II receptors in adrenal cortex and uterus: binding and activation properties of angiotensin analogues. J. Biol. Chem. 254:5120.

Casteels, R. y Kuriyama, H. (1965): Membrane potential and ionic content in pregnant and non-pregnant myometrium. J. Physiol. 177:263-287.

Cavero, I. y Spedding, M. (1983): Calcium antagonists: a class of drugs with a bright future. Life Sci. 33:2571-2581.

Cohen, M., Schenck, K., Colbert, W. y Wittenauer, L. (1985): Role of 5HT₂ receptors in serotonin induced contractions of non vascular smooth muscle. J. Pharmac. Exp. Ther. 232(3):770-774.

Creed, K.E. (1979): Functional diversity of smooth muscle. British Medical Bulletin 35(3):243-247.

Challis, J. y Mitchell, B. (1981): Hormonal control of preterm and term parturition. Semin. Perinatol. (N.Y.) 5:192-202.

Chan, L. y O'Malley, B.W. (1976): Mechanism of action of the sex steroid hormones. New Engl. J. Med. 294:1322-1328.

Devine, C., Somlyo, A. y Somlyo, P. (1972): Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. J. Cell Biol. 52:690-718.

Diamond, J. y Brody, T. (1966): Hormonal alteration of the response of the rat uterus to catecholamines. Life Sci. 5(23):2187-2193.

Ebashi, S. (1977): Role of subcellular structures in Ca⁺⁺ homeostasis. En: Excitation-contraction coupling in smooth muscle. Casteels, R., Godfrain, T. y Rüegg, J. (eds.). Elsevier. Amsterdam. Pp. 239-240.

Eckstein, P. y Zuckerman, S. (1956): Morphology of the reproductive tract. En: Marshall's Phys. of Reprod. 1(1). Parks, Logman, Green & co. Nueva York.

Ellis, H., Johnson, A. y Moran, N. (1970): Selective release of histamine from mast cells by several drugs. J. Pharmac. Exp. Ther. 175:627-631.

Eriksson, H., Hardin, J., Markaverich, B., Upchurch, S. y Clark, J. (1980): Estrogen binding in the rat uterus: heterogeneity of sites and relation to uterotrophic response. J. Steroid Biochem. 12:121-130.

Fadem, B., Barfield, F. y Whale, R. (1979): Dose-response and time-response relationships between progesterone and the display of patterns of receptive and proceptive behavior in the female rat. Horm. Behav. 13:40-48.

Falck, B., Hillarp, N., Thiene, B. y Torp, A. (1962): Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde. J. Histochem. Cytochem. 10:348-354.

Finn, C.A. y Porter, D.G. (1975): The uterus. Publishing Sciences Groups, Inc. E.U.A.

Fleckenstein, A. (1964): Die Bedeutung der energiereichen Phosphate für Kontraktilität und tonus des Myokards. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 70: 81-99.

Fuchs, A., Periyasamy, S., Alexandrova, M. y Soloff, M. (1983): Correlation between oxytocin receptor concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: effects of ovarian steroids. Endocrinology 113: 742-748.

Galand, P., Tchernitchin, N. y Tchernitchin, A.N. (1984): Time-course of the effects of nafoxidine and oestradiol on separate groups of responses in the uterus of the immature rat. J. Steroid Biochem. 21(1):43-48.

Gardner, R., Kirkland, J., Ireland, J. y Stancel, G. (1978): Regulation of the uterine response to estrogen by thyroid hormone. Endocrinology 103(4): 1164-1172.

Garfield, R.E., Sims, S., Kannan, M. y Daniel, E. (1978): Possible role of gap junctions in activation of myometrium during parturition. Am. J. Physiol. 235:C168-179.

Garrioch, C.B. (1978): The effect of indomethacin on spontaneous activity in the isolated human myometrium and on the response to oxytocin and prostaglandin. Br. J. Obst. Gynaecol. 85:47-52.

Garris, D., Ingenito, A., McConnaughey, M. y Dar, M. (1984): Regulation of estrogen induced uterine hyperemia and contractility in the guinea pig: cholinergic modulation of an alpha-adrenergic response. Biol. Reprod. 30: 863-868.

Gibbons, A. y Chang, M. (1972): Number of mast cells in the rat uterus with special reference to its relation to hormonal treatment and decidual response. Biol. Reprod. 6:193-203.

Gimeno, M., Franchi, A., González, E. y Gimeno, A. (1987): Uptake and release of ³H prostaglandins E-2 and F-2 alpha in uterine strips isolated from ovariectomized rats. Influence on in vitro progesterone. Prostaglandins 33(1):51-61.

- Goyal, R. y Verma, S. (1982): Mechanism of action of histamine in the estrogen primed rat uterus. Eur. J. Pharmacol. 77:237-242.
- Green, R., Lutge, W. y Whalen, R. (1970): Induction of receptivity in ovariectomized female rats by a single intravenous injection of estradiol 17 beta. Physiol. Behav. 5:137-141.
- Grover, A., Kwan, C. y Daniel, E. (1981): Na-Ca exchange in rat myometrium membrane vesicles highly enriched in plasma membranes. Am. J. Physiol. 240:C175-182.
- Grunert, G., Porcia, M. y Tchernitchin, A. (1985): Differential potency of oestradiol-17 beta and diethylstilboestrol on separate groups of responses in the rat uterus. J. Endocr. 110:103-114.
- Grunert, G. y Tchenirtchin, N. (1981): Morphological quantification of estrogen-induced uterine edema. IRCS Med. Sci. 9:5.
- Gudelesky, G., Simpkins, J., Mueller, B., Meites, J., Moore, K. (1976): Selective actions of prolactin on catecholamine turnover in the hypothalamus and on serum LH and FSH. Neuroendocr. 22:206-215.
- Hamon, G. y Worcel, M. (1979): Electrophysiological study of the action of angiotensin II on the rat myometrium. Circulation Res. 45:234-243.
- Hervonen, A., Kanerva, L. y Lietzén, R. (1973): Histochemically demonstrable catecholamines and cholinesterases of the rat uterus during estrus cycle, pregnancy and after estrogen treatment. Acta Physiol. Scand. 87:283-288.
- Hurwitz, L. (1986): Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 26:225-258.
- Ichida, S., Tokunaga, H., Oda, Y., Fujita, N., Hirata, A. y Hata, T. (1983): Increase of serotonin receptors in rat uterus induced by estradiol. J. Biol. Chem. 258(22):13438-13443.
- Janis, R. y Triggle, D. (1983): New developments in Ca channel antagonists. J. Med. Chem. 26:775-785.
- Jensen, E. y DeSombre, E. (1972): Mechanisms of action of the female sex hormones. Ann. Rev. Biochem. 41:203-230.
- Johnson, R. y Moran, N. (1969): Selective release of histamine from rat mast cells by compound 48/80 and antigen. Amer. J. Physiol. 215(3):453-459.
- Kass, R. y Scheuer, T. (1982): Calcium ions and cardiac electrophysiology. En: Calcium Blockers. Flaim, S y Zelis, R. (3ds.). Urban and Schwarzenberg. Baltimore, E.U.A. Pp. 3-19.
- Kelly, M., Moss, R. y Dudley, C. (1977): The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity through the estrous cycle of the female rat. Exp. Brain Res. 30:54-64.

- Kirkald, J., Gardner, R., Ireland, J. y Stancel, G. (1977): The effect of hypophysectomy on the uterine response to estradiol. Endocrinology 101:403-410.
- Kneifel, M., Leytus, S., Fletcher, E., Weber, T., Mangel, W. y Katenellenbogen, B. (1980): Uterine plasminogen activator activity: modulation by steroid hormones. Endocrinology 111:493.
- Komm, B. y Lyttle, C. (1984): Steroidal regulation of rat uterine in vitro mRNA translation products. J. Steroid Biochem. 21:571.
- Komm, B., Keeping, H., Sabogal, G., Lyttle, C. (1985): Comparison of media proteins from ovariectomized rat uteri following estrogen treatment. Biol. Reprod. 32:443.
- Kothekar, V., Grover, J., Tiku, P. y Reddy, G. (1985): Effect of verapamil and lignocaine on prostaglandin induced contractions in isolated rat uterus. Indian J. Med. Res. 81:79-82.
- Krall, J., Mori, H., Tuck, M., LeShon, L. y Korenman, S. (1978): Demonstration of adrenergic catecholamine receptors in rat myometrium and their regulation by sex steroid hormones. Life Sci. 23:1073-1082.
- Krishnamurti, C., Kitts, D., Kitts, W., Tompkins, J. (1982): Myoelectrical changes in the uterus of sheep around parturition. J. Reprod. Fertil. 64: 59-67.
- Kuriyama, H. (1961): Effect of progesterone and oxytocin upon mouse myometrium. J. Physiol. 159:26-39.
- Kuriyama, H. y Suzuki, H. (1976): Effects of prostaglandin E2 and oxytocin on the electrical activity of hormone-treated pregnant rat myometria. J. Physiol. 260:335-349.
- Laguens, R. (1964): Effect of estrogen upon the fine structure of the uterine smooth muscle. J. Ultrastruc. Res. 10:578-584.
- Lagunoff, D. (1972): The mechanism of histamine release from mast cells. Biochem. Pharmacol. 21:1889-1896.
- Lakshminarayanaiah, M. (1981): Calcium channels in the barnacle muscle membrane. en: New Perspectives on calcium antagonists. Weiss, G. (ed.) Williams & Wilkins, Baltimore. Pp. 19-33.
- Lalanne, C., Mironneau, C., Mironneau, J. y Savinear, J. (1984): Contractions of rat uterine smooth muscle induced by acetylcholine and angiotensin II in calcium free medium. Br. J. Pharmac. 81:317-326.
- Lee, S.H. (1982): Uterine epithelial and eosinophil estrogen receptors in rats during the estrous cycle. Histochemistry 74:443-452.

- Lesson, C.R. y Lesson, T.S. (1977): Histología. Ed. Interamericana. México.
- Levier, R. y Spaziani, E. (1966): The effects of estradiol on the occurrence of mast cells in the rat uterus. Exp. Cell Res. 41:244-252.
- Ludwig, D.S. (1952): The structure of the muscle wall in the uterus of the rat. Acta Anat. 15:23-41.
- Lyttle, C. y DeSombre, E. (1979): Generality of oestrogen stimulation of peroxidase activity in growth responsive tissue. Nature 268:337.
- Maigaard, S., Forma, A. y Andersson, K. (1985): Differences in contractile activation between human myometrium and intramyometrial arteries. Acta Physiol. Scand. 124:371-379.
- Marshall, J.M. (1959): Effects of oestrogen and progesterone on single uterine muscle fibres in the rat. Am. J. Physiol. 197:935-942.
- Marshall, J.M. (1970): Adrenergic innervation of the female reproductive tract: anatomy, physiology and pharmacology. Ergebn. Physiol. 62:6-67.
- Marshall, J.M. (1981): Effects of ovarian steroids and pregnancy on adrenergic nerves of uterus and oviduct. Am. J. Physiol. 240:C165-C174.
- Masahashi, T. y Tomita, T. (1983): The contracture produced by sodium removal in the non-pregnant rat myometrium. J. Physiol. 334:351-363.
- McEwen, B. y Parsons, B. (1982): Gonadal steroid action on the brain: neurochemistry and neuropharmacology. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22:555-598.
- McKercher, T., Van Orden III, L., Bhatnagar, R. y Burke, J. (1973): Estrogen induced biogenic amine reduction in rat uterus. J. Pharmacol. Exp. Ther. 185(3):514-522.
- Meisheri, K., Hwang, O. y Van Breemen, C. (1981): Evidence for two separate calcium pathways in smooth muscle plasmalemma. J. Membr. Biol. 59:19-25.
- Meyer, H., Bossert, F., Wehinger, E., Towart, R. y Bellemann, P. (1983): Chemistry of calcium antagonists. Hypertension 5(suppl. II):II 2- II 7.
- Meyerson, B. (1972): Latency between intravenous injection of progestins and the appearance of estrous behavior in estrogen-treated ovariectomized rats. Horm. Behav. 3:1-10.
- Mironneau, C., Mironneau, J. y Savineau, J. (1984): Maintained contractions of rat uterine smooth muscle incubated in a calcium free solution. Br. J. Pharmac. 82:735-743.

- Mitolo-Chieppa, D., Aliciano, L. y Logran, M. (1978): Influence of hormonal treatment on the sensitivity of the isolated uterus to PGF 2 alpha in the rat. Pharmac. Res. Comm. 10:205-209.
- Moawad, A.H. (1973): The sympathetic nervous system and the uterus. En: Uterine contraction. Jasimovich, J.B. (ed.) John Wiley & Sons. Nueva York. Pp. 65-82.
- Müller, R., Johnston, T. y Wotiz, H. (1979): Binding of estradiol to purified uterine plasma membranes. J. Biol. Chem. 254:7895-7900.
- Nayler, W. y Horowitz, J. (1983): Calcium antagonists: a new class of drugs. Pharmac. Ther. 20:203-262.
- Nesheim, B. (1974): Comparison of alpha and beta receptor stimulation in the circular and longitudinal muscle of the estrogen and progesterone dominated rabbit uterus. Acta Pharmacol. Toxicol. 34:295-304.
- Nissenson, R., Flouret, G. y Hechter, O. (1978): Opposing effects of estradiol and progesterone on oxytocin receptors in rabbit uterus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75(4):2044-2048.
- O'Malley, B.W. y Means, A. (1974): Female steroid hormones and target cell nuclei. Science 183:610-620.
- Owman, C. y Sjöberg, M. (1973): Effect of pregnancy and sex hormones on the transmitter level in uterine short adrenergic neurons. En: Frontiers in Catecholamine research. Usdin, E. y Snyder, S. (eds.) Pergamon. Nueva York. Pp. 795-801.
- Owman, C., Sjöberg, N. y Sjöstrand, N. (1974): Short adrenergic neurons, a peripheral neuroendocrine mechanism. En: Amine fluorescence histochemistry. Fujiwara, M. y Tanka, C. (eds.) Igaku-Shoin. Tokyo. Pp.47-67.
- Parsons, B., Rainbow, T., Pfaff, D. y McEwen, B. (1981): Oestradiol, sexual receptivity and cytosol progesterin receptors in rat hypothalamus. Nature 292: 58-59.
- Paul, S., Axelrod, J. Saavedra, J. y Skolnick, P. (1979): Estrogen induced efflux of endogenous catecholamines from the hypothalamus in vitro. Brain Res. 178:499-505.
- Penney, L., Frederich, R. y Parker, G. (1981): 17 beta oestradiol stimulation of uterine blood flow in oophorectomized rabbits with complete inhibition of uterine ribonucleic acid synthesis. Endocrinology 109:1672-1676.
- Pietras, R. y Szego, C. (1977): Specific binding sites for oestrogen at the outer surface of isolated endometrial cells. Nature 265:69-72.

Reiss, N. y Kaye, A. (1981): Identification of the major component of the estrogen induced protein of rat uterus as the BB isozyme of creatine kinase. J. Biol. Chem. 256:5741.

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

Riemer, K., Goldfien, A. y Roberts, J. (1987): Rabbit myometrial adrenergic sensitivity is increased by estrogen but is independent of changes in alpha adrenoceptor concentration. J. Pharmac. Exp. Ther. 240(1):44-50.

Roberts, J., Insel, P., Goldfien, R y Goldfien, A. (1977): Alpha adrenoreceptors but not beta adrenoreceptors increase in rabbit uterus with estrogen. Nature 270:624-625.

Roberts, J., Goldfien, R., Tsuchiya, A., Goldfien, A. y Insel, P. (1979): Estrogen treatment decreases alpha adrenergic binding sites on rabbit platelets. Endocrinology 104:722-728.

Roberts, J., Insel, P. y Goldfien, A. (1981): Regulation of myometrial adrenoreceptors and adrenergic response by sex steroids. Mol. Pharmac. 20:52-58.

Robson, J., Trounce, J. y Didcock. (1954): Factors affecting the response of the uterus to serotonin. J. Endocrinol. 10:129-132.

Ross, R. y Klebanoff, S. (1967): Fine structural change in uterine smooth muscle and fibroblasts in response to estrogen. J. Cell Biol. 32:155.

Sakai, K., Higuchi, K., Yamaguchi, T. y Uchida, M. (1982): Oxytocin induced calcium free contractions of rat uterine smooth muscle: effects of preincubations with EGTA and drugs. Gen. Pharmac. 13:393-400.

Sakamoto, H., MacLusky, M. y Naftolin, F. (1986): Steroid receptors in the pregnant uterus. En: The physiology and biochemistry of the uterus in pregnancy and labor. Huszar, G. (ed.) CRC Press. Florida, E.U.A. Pp. 35-52.

Savoy-Moore, R., Schwartz, N., Duncan, J. y Marshall, J. (1980): Pituitary gonadotropin hormone receptors during the rat estrous cycle. Science 209: 942-944.

Schirar, A., Capponi, A. y Catt, K. (1980): Regulation of uterine angiotensin II receptors by estrogen and progesterone. Endocrinology 106:5.

Singhal, R. y Lafreniere, R. (1972): Metabolic control mechanisms in mammalian systems. XV. Studies on the role of adenosine 3' 5'-monophosphate in oestrogen action on the uterus. J. Pharmacol. Exp. Ther. 180:86-97.

Sjöberg, N.O. (1967): The adrenergic transmitter of the female reproductive tract: distribution and functional changes. Acta Physiol. Scand. Suppl. 305.

Sobieszek, A. (1977): Vertebrate smooth muscle myosin: enzymatic and structural properties. En: Biochemistry of Smooth Muscle. Stephens, N. (ed.) University Park Press. Baltimore, E.U.A. Pp. 413-443.

Somlyo, A. y Somlyo, A.P. (1968): Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. 159:129-145.

Sonnenschein, C. y Soto, A. (1978): Pituitary uterotrophic effect in the estrogen dependent growth of the rat uterus. J. Steroid Biochem. 9:533-537.

Soto-Feine, N., Petersen, V. y Tchernitchin, A. (1981): Are prostaglandins involved in early estrogen action? Experientia 37:1351-1352.

Spedding, M. (1985): Calcium antagonist subgroups. Trends Pharmacol. Sci. 6:109-114.

Sterin-Speziale, N., Gimeno, M., Bonacossa, A. y Gimeno, A. (1980): The effect of estradiol on isolated rat uterine motility and on prostaglandin generation. Prostaglandins 20 (2):233-243.

Sterin-Speziale, N., Gimeno, M., Borda, E., Chaud, M. y Gimeno, A. (1981): A different contractile response to catecholamine of two regions (mesometrial and antimesometrial) of isolated rat uterine horns. Pharmacol. Res. Comm. 13:401-410.

Stjernquist, M., Emson, P., Owman, C., Sjöberg, N., Sundler, F. y Tatemoto, K. (1983): Neuropeptide Y in the female reproductive tract. Distribution of nerve fibers and motor effects. Neurosci. Lett. 39:279-284.

Szego, C.M. (1975): Lysosomal function in nucleocytoplasmic communication. En: Lysosomes in Biology and Pathology. Dingle, J. y Dean, R. (eds.) North Holland. Amsterdam. Vol. 4, pp. 385-477.

Tallarida, R. J. y Murray, R. (1984): Manual of pharmacologic calculations. Springer-Verlag. Nueva York.

Tchernitchin, A. (1972): Radioautographic study of the effect of estradiol 17 beta, estrone, estriol, progesterone, testosterone and corticosterone on the in vitro uptake of 2,4,6,7-3H estradiol-17 beta by uterine eosinophils of the rat. Steroids 19:575-586.

Tchernitchin, A. (1974): Effect of superfusion with human male serum, bovine serum albumin or non radioactive estrogens on the retention of tritiated estradiol 17 beta and estriol by the rat uterus. J. Steroid Biochem. 5:481-484.

Tchernitchin, A. (1979): The role of eosinophil receptors in the non-genomic response to estrogens in the uterus. J. Steroid Biochem. 11:417-424.

Tchernitchin, A. (1983): Eosinophil mediated non-genomic parameters of estrogen stimulation - a separate group of responses mediated by an independent mechanism. J. Steroid Biochem. 19(1):95-100.

Tchernitchin, A. y Galand, P. (1981): Some uterine estrogenic responses depend on systemic, not local, estrogen levels. Biol. Reprod. 24, suppl.1, 148A.

Tchernitchin, A. y Galand, P. (1982): Dissociation of separate mechanisms of estrogen action by actinomycin D. Experientia 38:511-513.

Tchernitchin, A., Roorijck, J., Tchernitchin, X., Vandenhende, J. y Galand, P. (1974): Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. Nature 248:142-143.

Tchernitchin, A. y Tchernitchin, X. (1976): Characterization of the estrogen receptors in the uterine and blood eosinophil leukocytes. Experientia 32:1240-1242.

Tchernitchin, A., Tchernitchin, X., Rodríguez, A., Mena, M., Unda, C., Mairesse, N. y Galand, P. (1977): Effect of propranolol on various parameters of estrogen stimulation in the rat uterus. Experientia 33:1536-1537.

Tchernitchin, A., Tchernitchin, X., Robel, P. y Baulieu E. (1975): Liaison de l'oestradiol dans les leucocytes polinucléaires éosinophiles humains. C.r. Acad. Sci. Paris 280 D:1477-1480.

Tchernitchin, X., Tchernitchin, A. y Galnad, P. (1976): Dynamics of eosinophils in the uterus after oestrogen administration. Differentiation 5: 151-154.

Towart, R. y Schramm, M. (1984): Recent advances in the pharmacology of the calcium channel. Trends Pharmacol.Sci. 5:111-113.

Trautwein, W., McDonald, T. y Tripathi, O., (1975): Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle. Pfluegers Arch. 354:55-74.

Tsein, R.W. (1983): Calcium channels in excitable cell membranes. Ann. Rev. Physiol. 45:341-358.

Uski, T. y Andersson, K. (1984): Effects of prostanoids on isolated feline cerebral arteries. Acta Physiol. Scand. 120:197-205.

Van Breemen, C., Aaronson, P., Cauvin, C., Loutzenhiser, R. Mangel, A. y Saida, K. (1982): The calcium cycle in arterial smooth muscle. En: Calcium blockers. Flaim, S. y Zelis, R. (eds.) Urban and Schwarzenberg. Baltimore, E.U.S. Pp. 53-63.

Van Breemen, C., Aaronson, P., Loutzenhiser, R. y Meisheri, K. (1980): Calcium movements in smooth muscle. Chest 78:157-165.

Viggiano, M., Dveksler, G., Franchi, A., Gimeno, A. (1984): Prostaglandins and ovarian factors as modulators of the negative inotropic action of histamine in the isolated rat uterus. Prost. Leukotr. Med. 16:267-278.

Wheeler, C., Komm, B. y Lyttle, R. (1987): Estrogen regulation of protein synthesis in the immature rat uterus: the effects of progesterone on proteins released into the medium during in vitro incubations. *Endocrinology* 120(3): 919-923.

Williams, L. y Lefkowitz, R. (1977): Regulation of rabbit myometrial alpha adrenergic receptors by estrogen and progesterone. *J. Clin. Invest.* 60: 815-818.

Yoshida, S. y Kuga, T. (1986): Probable pre- and postsynaptic modifications by 5-HT of contractile responses to electrical stimulation of isolated guinea pig vas deferens. *Japan J. Pharmacol.* 41:315-323.

*