



30  
24  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

*EFEECTO INHIBITORIO DE PROGESTINAS  
5-REDUCIDAS SOBRE LA CONTRACCION  
UTERINA INDUCIDA POR PROSTAGLANDI-  
NAS E<sub>2</sub> Y F<sub>2α</sub>*



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
Q U I M I C O  
P R E S E N T A :  
DANIEL LUNA ZARAGOZA

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1991



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

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

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

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

## INDICE

I.	Introducción.	6
1)	Anatomía Uterina.	6
2)	Inervación Uterina.	8
3)	Contracción Uterina.	11
4)	Efectos de Hormonas Esteroides Sobre la Contracción Uterina.	13
5)	Prostaglandinas.	17
5.1)	Estructura.	18
5.2)	Síntesis.	19
5.3)	Acción de las Prostaglandinas en el Utero.	21
5.4)	Mecanismos de Acción de las Prostaglandinas.	22
II.	Planteamiento del Problema.	24
III.	Hipótesis.	26
IV.	Objetivos.	28
V.	Material y Métodos.	30
VI.	Resultados.	37
VII.	Discusión.	46
VIII.	Conclusiones.	53
IX.	Bibliografía.	54

## I. INTRODUCCION

### 1. ANATOMIA UTERINA

El útero es un órgano intrapélvico, su misión más importante es la de albergar al huevo fecundado durante toda la gestación. El útero se compone de dos porciones anatómica y funcionalmente distintas las cuales son, el cuerpo y el cuello.

El cuerpo del útero esta formado por tres capas bien definidas, que de afuera hacia adentro se denominan; peritoneo (o serosa), miometrio y endometrio.

El peritoneo recubre al cuerpo uterino en sus caras anterior y posterior. Por esta capa llegan los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y los nervios. En el peritoneo se encuentran plexos y ganglios simpáticos.

El miometrio esta constituido por fibras de músculo liso y tejido conectivo. Las fibras musculares se disponen formando fundamentalmente tres grupos; 1) el estrato submucoso, es una capa delgada constituida principalmente de fibras longitudinales, pero también forma anillos alrededor de las porciones de los oviductos. 2) El estrato vascular que es la capa más voluminosa y consiste principalmente de haces de fibras musculares circulares

y oblicuas, esta capa recibe su nombre, debido a los grandes vasos sanguíneos contenidos en ella. 3) El estrato supravascular que consiste principalmente de fibras musculares circulares y longitudinales.

El endometrio es la capa mucosa que recubre el cuerpo uterino, esta mucosa responde a cambios morfológicos importantes a los estímulos hormonales de los ovarios y posee la peculiaridad de descamación periódica (Jensen, 1979).

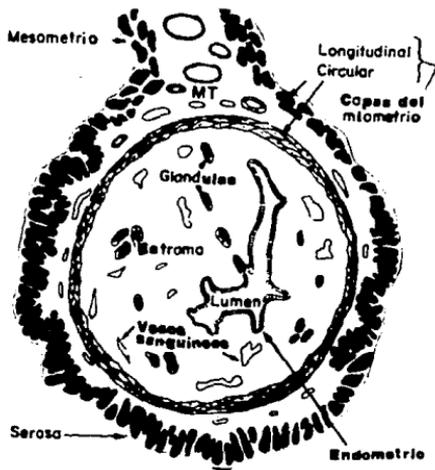


FIGURA 1

Corte longitudinal del útero que muestra las diferentes capas que lo constituyen; serosa, miometrio y endometrio.

El miometrio es una capa constituida por músculo liso, este tipo de músculo es involuntario y distinto al esquelético y cardíaco, ya que sus células son fusiformes, alargadas y estan en íntima relación con el tejido conectivo.

En los vertebrados, los músculos liso, esquelético y cardiaco poseen filamentos delgados (de actina) y filamentos gruesos (de miosina). Los cuales se deslizan unos a lo largo de los otros, cuando se contrae la fibra muscular (Ham, 1975).

## 2. INERVACION UTERINA

Se ha reportado que el útero tiene inervación parasimpática (Colinérgica) e inervación simpática (Adrenérgica) (Adham, 1969; Bülbring, 1987).

La división simpática y parasimpática se originan en núcleos del SNC, del tallo encefálico o de la medula espinal, de donde salen las fibras preganglionares. La división simpática contiene ganglios motores y la división parasimpática consta principalmente de dos grupos de ganglios motores, distribuidos difusamente en la pared del útero (Katzung, 1986).

La inervación adrenérgica en el útero posee tres características únicas: 1) la inervación de neuronas adrenérgicas, en el útero, provienen de las células ganglionares localizadas en el utero. 2) La densidad de la inervación

adrenérgica varía en diferentes partes del útero. 3) La densidad de la inervación así como el contenido de neurotransmisores en nervios individuales, es alterada durante la gestación o con la administración de hormonas sexuales (Sjoberg, 1967, 1968; Falck y cols., 1969).

Los nervios adrenérgicos pélvicos provienen de la región lumbar del cordón espinal y corren desde el ganglio lumbar vertebral hasta el ganglio inferior mesentérico. En el humano, los componentes abdominales de los nervios pélvicos son el superior, el medio y el plexo hipogástrico. Los nervios hipogástricos contienen fibras pre- y postganglionares, las fibras preganglionares se encuentran en el ganglio del plexo pélvico y en la viscera pélvica (Norries y cols., 1973).

Por medio de la técnica de fluorescencia histoquímica se ha podido observar la presencia de varicosidades las cuales contienen neurotransmisores. También hay evidencias de que la concentración de neurotransmisores es mucho más alta en las terminales de los axones, que en otras partes del axón o del cuerpo celular (Falck, 1962). Puesto que las varicosidades están distribuidas a lo largo de los axones, se pueden liberar neurotransmisores de un axón que puede afectar a muchas células miométriales (Norris y cols., 1973).

Es bien sabido que la estimulación eléctrica de los nervios hipogástricos causan contracción o relajación del útero dependiendo de la especie y del estado hormonal (Marshall, 1970).

Se ha descrito que en el útero de rata, la inervación adrenérgica es muy pobre (Norberg, 1966).

Así, los receptores a neurotransmisores de la membrana celular, juegan un papel muy importante en la función motora del miometrio, ya que la membrana de las células miometriales consta de receptores altamente específicos, involucrados en la actividad contráctil (Persianinov, 1974).

Los principales receptores membranales en el útero que intervienen en el proceso muscular de contracción-relajación son: receptores adrenérgicos (Ah!quist, 1948), colinérgicos (Hubard, 1973), serotoninérgicos (Receptor Nomenclature, 1990), histaminérgicos (Black, 1972), dopaminérgicos (Receptor Nomenclature, 1990). El útero consta de receptores a otras sustancias catalogadas como hormonas, presentando así receptores a oxitocina (Nissenson, 1978), angiotensina (Regoli, 1974) y prostaglandinas (PGs) (Hofmann y cols, 1984; Wainman y cols., 1988).

La estimulación de algunos de estos receptores producen contracción, mientras que la estimulación de otros induce relajación en el músculo liso uterino. De tal manera que el acoplamiento de un agonista con su receptor específico da como resultado la modulación de la contractilidad uterina, lo cual es propuesto en la teoría de balance ("See-Saw"). Esta teoría expone el fundamento del mecanismo regulador en el útero, y explica que existe un equilibrio entre compuestos que relajan y compuestos

que excitan, para que se lleve a cabo un buen funcionamiento del ciclo contracción-relajación (Csapo, 1975).

### 3. CONTRACCION UTERINA

Las células del músculo liso dependen en gran medida del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular y en menor grado del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, para que se lleve a cabo el acoplamiento excitación-contracción (Ebashi, 1968; Kuriyama, 1981), activando las proteínas contractiles involucradas en este proceso (Somlyo, 1968; Hurwitz, 1971). Así, si aumenta la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, también aumenta la tensión del músculo liso (Bolton, 1979; Ebashi, 1980).

La disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para inducir relajación del músculo liso puede ser dada por: 1) secuestro de  $\text{Ca}^{2+}$  por el retículo sarcoplásmico y/o mitocondrias (Yamada, 1972; Endo, 1977), 2) expulsión directa por las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular, 3) expulsión al medio extracelular debido al mecanismo intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Kuriyama, 1981).

Como se puede ver, el elemento principal para que se produzca la contracción muscular es el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y para que se produzca la relajación es necesario que la concentración interna de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuya.

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio intracelular se realiza principalmente a través de los canales de calcio, los cuales se encuentran en la membrana celular de los eucariontes y están constituidos esencialmente por glicoproteínas (Lakshminarayanaiah, 1979; Hille, 1984; Towart, 1984). Existen dos tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ; los operados por voltaje y los operados por receptor (Bolton, 1979; Droogmans, 1985; Hurwitz, 1986).

Los canales operados por voltaje son activados por el cambio del potencial eléctrico a través de la membrana celular, este cambio es debido a un desequilibrio entre las cargas eléctricas de ambos lados de la membrana celular (despolarización), provocado por varios iones, como el  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ . Al despolarizarse la membrana celular, la corriente del ion  $\text{Ca}^{2+}$  llega a una diferencia de potencial (de  $-40$  mV y alcanza su máximo en aproximadamente  $0$  mV). Esta despolarización de la membrana, a su vez, promueve la activación de los canales de calcio operados por voltaje (Hurwitz, 1986).

Algunos canales operados por receptor están continuamente abiertos, mientras que otros se abren en respuesta a la unión de un ligando extracelular con un receptor específico que se encuentra en la membrana celular (Bolton, 1979; Bolton, 1986). De este modo se ha considerado que la acción de sustancias que provocan contracción o relajación en el músculo liso están relacionadas con la activación o desactivación de los canales operados por receptores específicos a estas sustancias (Bolton, 1986).

#### 4. EFECIO DE HORMONAS ESTEROIDES SOBRE LA CONTRACCION UTERINA

Las hormonas [palabra griega que significa provocar o excitar (Devore, 1975)] son sustancias producidas por distintas glándulas endocrinas en pequeñas cantidades (Fritz, 1983), actúan como mensajeros químicos al ser transportadas por la sangre hasta determinados órganos, los cuales constituyen sus objetivos y en los que regulan una gran variedad de actividades fisiológicas y metabólicas en los vertebrados.

Existen varios tipos de hormonas, entre estas se encuentran las hormonas polipeptídicas, las hormonas del tipo amina y las hormonas esteroideas. Estas últimas, las hormonas esteroideas se dividen a su vez en cuatro grupos que son; a) corticosteroides, b) estrógenos, c) andrógenos y d) progestinas, en donde las familias b, c y d son las llamadas hormonas sexuales.

Todas las hormonas esteroideas tienen en común la estructura básica de un sistema de cuatro anillos, denominada núcleo ciclopentano perhidrofenantreno.

Es bien sabido que el útero secreta hormonas sexuales. Se ha demostrado que la biosíntesis de las hormonas esteroideas tiene lugar, principalmente, en el ovario (Brodie, 1983). Siendo la progesterona el precursor de los andrógenos y estrógenos.

La progesterona se produce a partir del acetato de colesterol, dando origen al colesterol que es convertido en

pregnenolona, y está a su vez en progesterona. Así, la progesterona puede tener varias rutas distintas, que pueden ser resumidas de la siguiente manera:

1) Puede transformarse a progestinas, como en el caso de los derivados 5a y 5b-reducidos, donde interviene principalmente una 4-5 reductasa.

2) Puede ser transformada a 17-hidroxiprogesterona y a partir de este metabolito, puede dar lugar a estrógenos y andrógenos por varias rutas enzimáticas.

3) Puede dar lugar a corticosteroides, transformandose primero, por acción de una oxidasa, a desoxicorticosterona y este esteroide, a su vez, puede transformarse a otros corticosteroides por acción de ciertas enzimas.

Es bien conocido que las hormonas esteroides intervienen en la actividad de la contractilidad uterina. Los primeros estudios que se realizaron fueron sobre el efecto que producen los esteroides ováricos en la contractilidad muscular uterina (Fraenkel, 1905), este trabajo mostró que el cuerpo lúteo es esencial para mantener el embarazo en la coneja. Más tarde, Athias en 1919 y Blair en 1922 demostraron que el ovario es un importante regulador de la actividad miometrial. Posteriormente, Reynolds (1930) desarrolló la técnica para registrar las contracciones uterinas in vivo, mostrando el efecto relajante de la progesterona sobre las contracciones del útero de coneja.

Después de la caracterización química de las hormonas ováricas, estudios in vivo (Allen y Corner, 1929; Reynolds, 1930) e in vitro (Robson, 1937) mostraron el efecto relajante que produce la progesterona sobre la contracción uterina.

En 1932. Allen y Reynolds describieron que la adición de extractos lúteos que contenían progestinas, inducían una marcada reducción de la contracción del útero de coneja en estro. Por su parte Robson en 1937, mostró que la testosterona también produce un efecto relajante sobre la contracción del útero aislado de la coneja. Estudios posteriores evidenciaron que la contracción inducida eléctricamente en el útero de conejas castradas, pretratadas con estrógenos aumentaba su tensión. Sin embargo, si los animales se pretrataban con progesterona, se provocaba el efecto contrario (Csapo y Corner, 1952). Marshall y Csapo (1962) mostraron que la administración de progesterona tanto in vivo como in vitro, produce inhibición tanto en la actividad espontánea como en la eléctrica del útero de rata.

Por otro lado, se ha reportado un efecto relajante sobre la actividad espontánea del útero aislado de la rata, inducida por progestinas (Kubli-Garfias y cols., 1979), andrógenos (Kubli-Garfias y cols., 1980) y corticosteroides (Perusquia y cols., 1986), mostrando claramente que los esteroides delta-4 y 5-reducidos producen un marcado efecto relajante. Dicha relajación también ha sido observado en otras clases de músculos lisos; como en la contracción inducida por adrenalina o bario en la vesícula seminal y el epidídimo (Kubli-Garfias y cols., 1983), en la

actividad espontánea del ileon de cobayo (Kubli-Garfias y cols., 1987b), arteria coronaria contraída con KCl o ergonovina (Lara-Lemus y cols., 1986) y aorta (Rojas-Mejia y cols., 1986).

El mecanismo de acción que las hormonas esteroideas utilizan para producir relajación muscular no ha sido bien esclarecido. Sin embargo, se ha propuesto que la acción relajante podría ser consecuencia de una disminución en la captación de  $Ca^{2+}$  por el miometrio (Batra y Bengtsson, 1978). Por su parte Kubli-Garfias y cols. (1982, 1984 a y b), mostraron que el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  externo estimula la contractilidad del útero de rata, mientras que las progestinas 5-reducidas lo antagonizan. También se ha observado que andrógenos y progestinas 5-reducidas disminuyen la contracción inducida por  $Ca^{2+}$  en úteros despolarizados de ratas preñadas y no preñadas (Kubli-Garfias y cols., 1983, 1984 a y b), mostrando que los esteroideas producen antagonismo de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de los canales operados por voltaje (Perusquía y cols., 1990). Por otro lado se ha observado que los esteroideas son capaces de disminuir las contracciones uterinas inducidas por oxitocina (Perusquía y cols., 1991a) acetilcolina (Perusquía y cols., 1991b) y serotonina (Perusquía y cols., 1991c), proponiendo que estos compuestos producen disminución de la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de bloquear los canales de calcio operados por los receptores específicos a estas sustancias.

## 5. PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas son un grupo de sustancias que en las últimas décadas han tenido mucho auge y se ha encontrado que intervienen biológicamente en; el flujo sanguíneo, excreción de sodio, eliminación de agua, regulación de la presión sanguínea, el proceso de parto, regulación plaquetaria, respuesta inflamatoria, respuesta inmune, asma bronquial, motilidad intestinal, secreción gástrica, úlcera péptica y citoprotección, flujo salival, metabolismo de carbohidratos, metabolismo graso, metabolismo del calcio, las prostaglandinas también influyen en el SNC y periférico, produciendo efectos oculares y secreción de hormonas hipofisarias (Lee, 1984). Solo por citar unos cuantos de sus efectos biológicos, las PGs resultan tener una relevante importancia en la fisiología.

La atribución de actividades biológicas a estos compuestos fue descubierta por primera vez a principios de la década de los 30's por Kurzrok y Lieb (1930). Goldblatt (1933) y Von Euler (1934) observaron, por separado, que los extractos de vesículas seminales o de semen humano producían contracciones del útero aislado y reducían la presión arterial. Posteriormente en 1934 von Euler caracterizó los compuestos responsables de estos efectos como ácidos grasos y los denominó prostaglandinas ya que asumió que su origen se hallaba en la glándula prostática. En la década de los 60's, Bergström y cols., (1963), mostraron que los efectos de las prostaglandinas derivaba de varios compuestos relacionados entre sí. Los principales compuestos derivados de

Las PGs han sido denominados PGs E y F (PGE y PGF) ya que estas PGs podrían separarse por reparto diferencial entre éter (E) y amortiguador de fosfatos (F) (Bergström, 1960).

### 5.1- ESTRUCTURA

Las PGs son una clase de compuestos orgánicos y son derivados biosintéticos de ácidos grasos, estos compuestos constan de un anillo ciclopentano con dos cadenas laterales alifáticas insaturadas, su estructura básica consta de 20 carbonos y es denominado ácido prostanoico. Los carbonos se numeran del 1-20 a partir del radical carboxilo hasta el grupo metilo terminal. Las PGs se diferencian entre sí por las sustituciones en el anillo y las insaturaciones en las cadenas laterales alifáticas, estas diferencias químicas les confieren distintas actividades biológicas. La PGE únicamente difiere de la PGF en que en la posición 9, existe un grupo cetónico, mientras que en la PGF, existe un grupo hidroxilo. Este grupo hidroxilo puede tener dos posiciones ( $\alpha$  o  $\beta$ ), de las cuales la posición  $\alpha$  (PGF<sub>2</sub>) es la que se produce en la naturaleza. Las denominaciones PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> o PGE<sub>3</sub> se refiere únicamente al número de dobles enlaces en las cadenas laterales alifáticas. De todas las PGs, las PG<sub>2</sub> constituyen la clase más abundante en la naturaleza. El ácido araquidónico (AA) es el ácido graso precursor de las PGs y puede obtenerse directamente en la dieta o por conversión anabólica de los ácidos grasos esenciales en la dieta, como el ácido linoléico (Mathias, 1979).

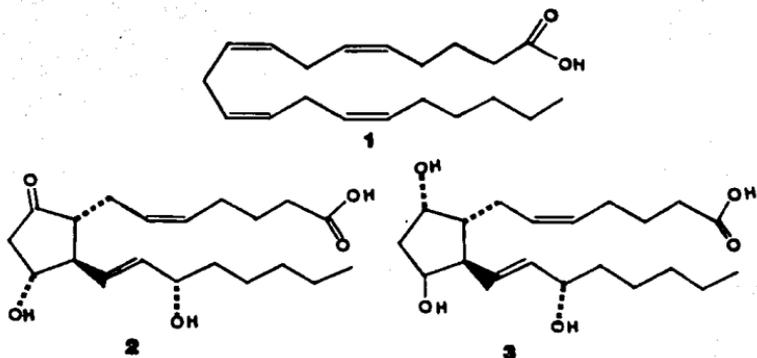


FIGURA 2

Estructura química de 1) ácido araquidónico (precursor) 2) PGE<sub>2</sub>  
3) PGF<sub>2a</sub>

## 5.2- SINTESIS

Los eicosanoides generados en el organismo son sintetizados en la membrana celular. El estímulo adecuado para producirlos, puede variar dependiendo del tipo de célula. En respuesta a este

estímulo, la fosfolipasa A<sub>2</sub> o una combinación de fosfolipasa C y lipasa diglicérido, cataliza la separación de un precursor eicosanoide esterificado (AA). Este AA se produce apartir de los fosfolípidos contenidos en la membrana celular. El AA es generalmente esterificado en la posición dos de los fosfolípidos, estos fosfolípidos pueden ser; fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Posteriormente el AA es convertido, por acción de una ciclooxigenasa, a PGG<sub>2</sub> y este a su vez es convertido a PGH<sub>2</sub>, por acción de una peroxidasa. De la PGH<sub>2</sub> se derivan la PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> entre otras prostaglandinas.

Se ha visto que la enzima ciclooxigenasa, utilizada para producir PGG<sub>2</sub>, puede ser inhibida por ácido acetilsalicílico (aspirina), la indometacina, ibuprofén y otros agentes antiinflamatorios no esteroideos. Esta inhibición es importante para aliviar ciertos malestares (Smith, 1971; Ferreira, 1971).

La síntesis y liberación de PGs se pueden dar por liberación espontánea, estimulación neurogena e hipóxia. Así, los estímulos inducidos por oxitocina (Roberts, 1976), vasopresina, bradiquinina, angiotensina II (Axelrod, 1985) y estrógenos (Neulen y cols., 1988), entre otros, producen su liberación. Estos estímulos, aparentemente conflictivos y en ocasiones inespecíficos sobre la liberación de PGs, son los que han originado tanta confusión, respecto a los posibles papeles fisiológicos de las PGs. Es importante señalar que las acciones de las PGs liberadas son inespecíficas, así, la misma PG estimula algunas acciones en una célula y las inhibe en otra.

### 5.3- ACCION DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL UTERO

El músculo liso uterino se contrae fuertemente por acción de  $PGF_{2a}$ . El efecto de las PGsE depende de la especie, de las concentraciones utilizadas y del estado hormonal (Sullivan, 1966; Hawkins y cols., 1967; Mitolo-Chiepa y cols., 1978). El útero de rata y cobaya se contrae bajo la influencia de las PGF y PGE. Sin embargo, los tres derivados de la PGE disminuye el tono, la frecuencia y la amplitud de las contracciones espontáneas en tiras de útero humano no grávido. Estos efectos inhibitorios fueron más pronunciados alrededor del tiempo de ovulación (Armstrong y Greenwich, 1972).

En animales experimentales y en el humano, las PGs aumentan la motilidad, así como también la sensibilidad del útero grávido a la oxitocina (Liggins, 1973). Estos efectos existen durante todo el embarazo, mientras que la oxitocina tiene poco efecto sobre la motilidad uterina durante la primera mitad del embarazo, causando solo su mayor efecto cuando se aproxima el parto. Las PGs por inyección intravenosa requieren de 15 minutos o más para iniciar sus efectos, mientras que la oxitocina produce efectos inmediatos.

Las PGs  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $F_{1a}$  y  $F_{2a}$  están presentes en el líquido amniótico y en los vasos sanguíneos umbilicales y placentarios, éstas pueden ser la fuente de las PGs, que aparecen en la sangre venosa materna durante el parto. Se ha sugerido que la liberación

de PGs por el feto y la placenta, en un momento adecuado del desarrollo fetal, sería el factor que iniciaría el parto. Hay varios datos que indican que los corticosteroides fetales, que se sintetizan y liberan en cantidades apreciables, durante el parto, inhiben la síntesis de progesterona y aumentan la de PGF<sub>2α</sub> en la placenta. La PGF<sub>2α</sub> inhibe la síntesis de progesterona y estimula la síntesis de estrógenos. Asimismo, los estrógenos, estimulan la síntesis de PGF<sub>2α</sub> (Castracane, 1975). De tal manera se provocan contracciones uterinas por la PGF<sub>2α</sub>, que se refuerzan por la oxitocina, que se libera de la hipófisis posterior, de la madre, dando como resultado la expulsión del feto (Liggins, 1970).

Como una aplicación de lo anterior, la PGF<sub>2α</sub> se ha utilizado con éxito para inducir aborto terapéutico en mujeres embarazadas durante el segundo trimestre, mediante inyección intravenosa (Karim, 1970).

#### 5.4- MECANISMO DE ACCION

Las PGs E<sub>2</sub> y F<sub>2α</sub> son potentes estimuladores de la contracción del músculo liso uterino, por interacción con sus receptores membranales específicos localizados en el miometrio (Hofmann y cols., 1984; Wainman y cols., 1988), e incluso han sido clasificados como EP<sub>2</sub> y EF (Robertson, 1986; Receptor Nomenclature, 1991). Sin embargo, la explicación de los eventos que se suceden después de la unión de las prostaglandinas con sus receptores específicos no es completamente claro. Así, ha sido

propuesto que los efectos producidos por las PGs sobre el músculo liso uterino, podrían variar dependiendo de las diferencias del estado hormonal (Sullivan, 1966; Hawkins y cols., 1967; Mitolo-Chieppa y cols., 1978) y por la variación en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico (Kenakin, 1984). El incremento en la concentración interna de  $Ca^{2+}$  en la célula muscular, dado por PGs, puede ser explicado por una movilización de los iones de  $Ca^{2+}$  a través de tres posibles mecanismos:

a) incremento de las corrientes de  $Ca^{2+}$  vía los canales operados por voltaje (Adelstein y Hathaway, 1979; Bolton, 1979); b) entrada de  $Ca^{2+}$  vía los canales operados por receptor (Bolton, 1979) y/o c) liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular de sus reservorios (Carsten, 1973; Carsten y Miller, 1977; Mironneau y cols., 1984; Molnar y cols., 1987). Sin embargo, aún no se ha determinado el mecanismo preciso que las PGs utilizan para producir contracción uterina.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acción de los esteroides sobre la membrana del útero y otros músculos lisos, es producir un marcado efecto relajante sobre su contracción (Kubli-Garfias, 1987a). Estos compuestos pueden disminuir la contracción inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  en úteros despolarizados con  $\text{K}^+ 40 \text{ mM}$  y libres de  $\text{Ca}^{2+}$  (Perusquia y cols., 1990). También se ha mostrado que en el útero aislado de la rata pretratada con estrógenos los esteroides son capaces de inhibir las contracciones inducidas por oxitocina (Perusquia y cols., 1991a), acetilcolina (Perusquia y cols., 1991b) y serotonina (Perusquia, 1991c). De tal manera, se espera que los esteroides inhiban las contracciones inducidas por PGs.

Se ha propuesto que en el efecto útero-relajante que producen los esteroides, está involucrada la modulación de la permeabilidad del ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Posiblemente, por producir un bloqueo de la entrada de este ion a través de los canales de calcio operados por voltaje (Perusquia y cols., 1990) y los canales de calcio operados por receptor (Perusquia y cols., 1991 a,b y c).

Por otro lado, existen estudios que muestran la interacción entre esteroides (estradiol, estrona y progesterona) y  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_2\alpha$  en la membrana plasmática miometrial de la rata, proponiendo que ambas PGs modulan la permeabilidad iónica de la membrana (Deliconstantinos y Fotious, 1986).

Por lo anterior resulta importante investigar si el mecanismo de acción de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2a</sub> para provocar contracción uterina es dependiente de la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular y simultaneamente observar si la respuesta excitadora de PGs es inhibida por algunos esteroides endógenos (progesterona y progestinas 5-reducidas).

Debido a que los mecanismos de acción de compuestos que intervienen en la modulación de la contractilidad uterina, como son los esteroides y las PGs no han sido determinados, se abre la posibilidad de que ambos compuestos puedan ser reguladores de la permeabilidad iónica de la membrana.

### III. HIPOTESIS

Se ha propuesto que el efecto excitador que producen las PGs sobre la contracción uterina, es debido a un incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, que puede ser proporcionado del medio externo o de los reservorios intracelulares.

Dado que el  $Ca^{2+}$  extracelular es la principal fuente para el aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico para que se produzca la contracción en músculo liso, se espera que la contracción inducida por  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  en el útero, sea debida primero; a la interacción de las PGs con sus receptores específicos identificados en la membrana de la célula uterina, y segundo; que el resultado de la interacción PGs-receptor active los canales de calcio operados por los receptores específicos de PGs para permitir un incremento de la entrada de  $Ca^{2+}$  y de esta manera aumentar la concentración de  $Ca^{2+}$  y de esta manera aumentar la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular necesario para producir contracción.

Por otro lado, a las hormonas esteroides se les ha atribuido un mecanismo de acción como antagonistas de la entrada de  $Ca^{2+}$  por producir relajación de las contracciones uterinas espontáneas e inducidas por  $Ca^{2+}$ , oxitocina, acetilcolina y serotonina, que son dependientes de la entrada de  $Ca^{2+}$  externo. Se espera que la contracción inducida por PGs, que también es dependiente de  $Ca^{2+}$ , sea inhibida por esteroides  $5\alpha$  y  $5\beta$ -reducidos derivados de la progesterona.

En base a lo anterior, se postula que en la fisiología uterina se presenta una interacción de los mecanismos de acción de las hormonas esteroideas y las PGs, produciendo un efecto inhibitorio por parte de las hormonas esteroideas, sobre las contracciones inducidas por prostaglandinas. Posiblemente porque las hormonas esteroideas disminuyan la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de bloquear los canales de calcio operados por los receptores específicos a prostaglandinas.

#### IV. OBJETIVOS

##### **Objetivo principal:**

Contribuir al conocimiento de la fisiología de la contractilidad uterina, estudiando los mecanismos de acción que utilizan tanto las prostaglandinas ( $E_2$  y  $F_{2a}$ ) como las hormonas esteroideas (progesterona y progestinas 5-reducidas) para modificar la contracción uterina.

##### **Objetivos Intermedios:**

1. Demostrar si la contracción uterina inducida por PGs ( $E_2$  y  $F_{2a}$ ) es dependiente de la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular.
2. Determinar si la contracción inducida por prostaglandinas en el útero es antagonizada por un bloqueador de la entrada de  $Ca^{2+}$  (verapamil).
3. Observar si el efecto excitador inducido por  $PG_{E_2}$  y  $PGF_{2a}$  en el útero, es antagonizado en ausencia de  $Ca^{2+}$  externo.
4. Establecer si los esteroideos (4-en y 5-reducidos) inhiben las contracciones uterinas inducidas por  $PG_{E_2}$  y  $PGF_{2a}$ .
5. Correlacionar la estructura química de las progestinas 5a y 5B-reducidas con su efecto observado sobre la contracción inducida por  $PG_{E_2}$  y  $PGF_{2a}$  en el útero aislado de la rata.

6. Estudiar la relación entre los efectos de prostaglandinas y hormonas esteroides en la contractilidad uterina, proponiendo sus posibles mecanismos de acción.

## V. MATERIAL Y METODOS

Para este estudio se utilizaron ratas hembras adultas (180-200g) de la cepa Wistar, alimentadas ad libitum con Purina Chow. Las ratas fueron pretratadas 24 h antes del experimento, con 0.05  $\mu\text{g/g}$ , vía subcutánea, de benzoato de estradiol disuelto en aceite de maíz.

Los animales utilizados fueron sacrificados por dislocación cervical, posteriormente el útero fue disecado y colocado inmediatamente en solución Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): Glucosa, 12.2;  $\text{NaHCO}_3$ , 25;  $\text{NaCl}$ , 119;  $\text{KCl}$ , 4.6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.2;  $\text{MgSO}_4$ , 1.2;  $\text{CaCl}_2$ , 1.5. Los cuernos uterinos fueron separados del tejido graso y vasos sanguíneos. De la porción media de cada cuerno uterino se cortó un anillo de 1 centímetro de longitud aproximadamente. Los anillos fueron colocados en cámaras de incubación para tejidos aislados que contenían 10 mL de solución Krebs-Henseleit burbujeada con una mezcla gaseosa de 5% de  $\text{CO}_2$  en  $\text{O}_2$  a un pH de 7.4, a temperatura constante de 37 °C. Los tejidos fueron sujetados por uno de sus extremos al piso de la cámara y por el otro a un transductor de tensión Grass modelo FT 03C, el cual detectó las señales mecánicas de la contracción y las envió a un polígrafo Grass modelo 7D de 8 canales. La fuerza de tensión empleada en el tejido fue de 10 mN (1 g), lo cual corresponde a 2 centímetros de desplazamiento de la pajilla.

Las contracciones fueron evaluadas porcentualmente, midiendo el área bajo la curva mediante un planímetro digital modelo planix 7. Los datos fueron cuantificados obteniendo las medidas  $\pm$  error estandar de una  $n > 7$  de cada útero de rata.

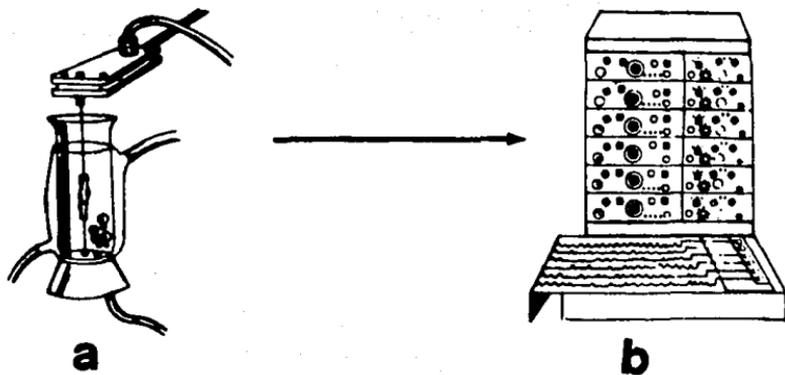


FIGURA 3

Esquema del sistema de registro.

- a) Cámara de incubación para tejido aislado y transductor.
- b) Polígrafo.

#### COMPUESTOS USADOS:

Los esteroides que se probaron fueron: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona); 5 $\beta$ -pregnan-3,20-diona (pregnandiona); 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (pregnanolona); 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (epipregnanolona); 5 $\alpha$ -pregnan-3,20-diona (5 $\alpha$ -pregnandiona, alopregnandiona); 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona (5 $\alpha$ -pregnanolona, alopregnanolona). Todas las progestinas se disolvieron en propilen glicol y se adicionó al baño a una concentración final de 1.43  $\mu$ M del vehículo.

Se probó un bloqueador selectivo de calcio extracelular (verapamil): ( $\alpha$ -(3-((2-(3,4-dimetóxi-fenil)etil)-metilamino)propil)-3,4-dimetóxi- $\alpha$ -(1-metiletil) bencenacetónitrilo, disuelto en agua destilada, adicionándose al baño a una concentración final de 1  $\mu$ M.

Las PGs utilizadas fueron: PGE<sub>2</sub> (ácido (5Z,11 $\alpha$ ,13E,15S)-11,15-dihidróxi-9-oxoprosta-5,13-dien-1-óico) a una concentración final de 1.13  $\mu$ M; PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (ácido((5Z,9 $\alpha$ ,11 $\alpha$ ,13E,15S)-9,11,15-trihidróxi-prosta-5,13-dien-1-óico)), a una concentración final de 0.84  $\mu$ M. Ambas PGs fueron disueltas en etanol y se adicionaron al baño a una concentración final de 17  $\mu$ M del vehículo.

Todos los compuestos fueron provistos por Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.

## MANIOBRAS EXPERIMENTALES

### 1. Experimentos con Verapamil:

Después de un periodo de estabilización de 30 minutos en solución Krebs-Henseleit, el tejido fue despolarizado con una solución de  $K^+$  40 mM y libre de  $Ca^{2+}$  ( $K^+40-Ca^{2+}0$ ). Esta solución fue obtenida por substitución equimolecular de NaCl (84.5 mM) por KCl (40 mM), sin  $CaCl_2$  y EGTA 2mM. Cuando la contracción regresó a la línea basal, se adicionó  $CaCl_2$  a una concentración de 1 mM y se observó la respuesta como una contracción tónica sostenida durante un periodo de 10 minutos, esta respuesta fue tomada como control (100% de respuesta). Posteriormente, el tejido se lavó con la solución  $K^+40-Ca^{2+}0$ , cuando la contracción regresó nuevamente a la línea basal, se adicionó verapamil a una concentración de 1  $\mu$ M, 5 minutos antes de una segunda adición de  $CaCl_2$  (1mM). La respuesta fué mantenida por un periodo de 10 minutos y fué comparada con el control para observar el porcentaje de inhibición.

1.1. Otros experimentos fueron realizados con  $PGE_2$  Y  $PGF_{2\alpha}$ , en presencia de verapamil:

Los tejidos fueron estabilizados durante 30 minutos en solución no modificada de Ringer Krebs-Henseleit. Subsecuentemente, la contracción inducida por cada una de las PGs ( $PGE_2$  1.1  $\mu$ M y  $PGF_{2\alpha}$  0.8  $\mu$ M), fue observada caracterizando la respuesta para obtener una contracción con una fuerza de tensión mayor a 20 mN. La contracción inducida por cada una de las PGs

utilizadas fue registrada durante 10 minutos; y asumida como control (100%). Después de esto, los tejidos fueron lavados con la solución no modificada de Ringer Krebs-Henseleit con el objeto de eliminar el efecto de la PG para que la contracción regresara a la posición original. Posteriormente los tejidos fueron preincubados con verapamil (1  $\mu$ M), 5 minutos antes de una segunda adición de la PG a la misma concentración que se utilizó para obtener la respuesta control y de esta manera observar la diferencias porcentuales entre la contracción de PG en ausencia y presencia de verapamil.

## 2. Experimentos Libres de Calcio:

Por otro lado, cada contracción inducida por PGE<sub>2</sub> (0.8  $\mu$ M) y PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (1.1  $\mu$ M) fue observada en solución no modificada de Ringer Krebs-Henseleit durante 10 minutos, y estas respuestas fueron asumidas como 100% de contracción. Posteriormente, los tejidos fueron lavados con una solución libre de Ca<sup>2+</sup> con 2 mM de EGTA. Bajo estas condiciones, los tejidos fueron mantenidos durante 50 minutos, con la finalidad de depletarlos de Ca<sup>2+</sup>. Subsecuentemente se adicionó la PG (PGE<sub>2</sub> 1.1  $\mu$ M o PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  0.8  $\mu$ M) y su respuesta fue observada también durante 10 minutos, ésta contracción fue comparada con su control. Posteriormente se adicionó al baño CaCl<sub>2</sub> a una concentración 2 mM para observar la viabilidad del tejido y el porcentaje de recuperación.

### 3. Experimentos Concentración-Respuesta:

Los tejidos fueron incubados en solución Krebs-Henseleit durante 30 minutos. Después de este periodo se provocó cada una de las respuestas a PGE<sub>2</sub> (1.1 μM) y PGF<sub>2α</sub> (0.8 μM), la contracción inducida por cada PG fue registrada durante 10 minutos (control), periodo después del cual los tejidos fueron lavados con solución Krebs-Henseleit. Cuando la contracción de PG fue eliminada, los tejidos fueron incubados con progesterona a tres diferentes concentraciones, solamente una concentración fue probada para cada anillo uterino. Después de 5 minutos del tratamiento con progesterona, se hizo una segunda adición de PG a la misma concentración que se utilizó para el control, esta contracción se mantuvo por 10 minutos, en presencia de progesterona.

Las curvas concentración-respuesta para el efecto de progesterona sobre la contracción inducida por PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> fueron graficadas y la concentración inhibitoria (CI): 16, 50 y 84 (i.e.% del efecto de progesterona para inhibir la contracción inducida por PGE<sub>2</sub> o PGF<sub>2α</sub>) fueron obtenidas por interpolación en la curva concentración-respuesta según el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

3.1. De la misma forma se hicieron otros experimentos para observar el efecto de las diferentes progestinas sobre la contracción inducida por PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>. Las progestinas:

pregnanolona, pregnandiona, epipregnanolona, alopregnanolona y alopregnandiona fueron probadas a la CI<sub>50</sub> de su precursor progesterona previamente determinada. La potencia de las diferentes progestinas fue comparada con la CI<sub>50</sub> de progesterona por la siguiente fórmula:

$$\text{Potencia} = \frac{\% \text{ de inhibición de progestina}}{\% \text{ de inhibición de progesterona}}$$

Previamente se hicieron registros para observar que el vehículo en el cual se disolvieron los esteroides (propilenglicol 1.43  $\mu\text{M}$ ) y las PGs (etanol 17  $\mu\text{M}$ ), no presentaron efecto sobre las contracciones uterinas.

## VI. RESULTADOS

### 1. Experimentos con Verapamil:

La contracción tónica sostenida inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  fue prevenida con verapamil en los tejidos despolarizados con solución de  $\text{K}^+40\text{-Ca}^{2+}\phi$  en un  $90.7\% \pm 1.3$  (figura 4A). La contracción provocada por cada PG indujo una respuesta contráctil inmediata de tipo fásico, la cual fue también prevenida en presencia de verapamil en un  $87.4\% \pm 2.6$  para  $\text{PGE}_2$  y  $76.6\% \pm 1.8$  para  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (figura 4B), los valores del porcentaje de inhibición de las contracciones de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en presencia de verapamil fueron comparadas entre sí y se encuentran representados en la tabla I.

TABLA I  
EFECTO CALCIO-ANTAGONICO DE VERAPAMIL SOBRE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR CALCIO,  $\text{PGE}_2$  Y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  EN EL UTERO AISLADO DE LA RATA

COMPUESTO	CONCENTRACION	% DE INHIBICION EN PRESENCIA DE VERAPAMIL
$\text{Ca}^{2+}$	1.0 mM	$90.70 \pm 1.29$
$\text{PGE}_2$	1.1 $\mu\text{M}$	$87.46 \pm 2.60$
$\text{PGF}_{2\alpha}$	0.8 $\mu\text{M}$	$76.67 \pm 1.80$

Los valores son las medidas  $\pm$  error estándar n=8.

## 2. Experimentos Libres de Calcio:

La respuesta contráctil caracterizada para cada PG (PGE<sub>2</sub> 1.1 μM y PGE<sub>2a</sub> 0.8 μM) no fue observada cuando los tejidos fueron mantenidos en una solución libre de Ca<sup>2+</sup> que contenía además 2 mM de EGTA (figura 4C). En estas condiciones se pudo observar que la respuesta a las PGs fue antagonizada 100% cuando no hay Ca<sup>2+</sup> externo. Sin embargo, esta respuesta pudo ser observada cuando se adicionó Ca<sup>2+</sup> externo a una concentración de 2 mM, donde se puede ver que la respuesta se restablece 78.2% ± 1.9 para PGE<sub>2</sub> y 74.2% ± 2.3 para PGF<sub>2a</sub> (tabla II).

TABLA II  
EFECTO DE LA PGE<sub>2</sub> Y PGF<sub>2a</sub> EN UNA SOLUCION LIBRE DE Ca<sup>2+</sup>

PROSTAGLANDINA	% DE RESPUESTA EN SOLUCION Ca <sup>2+</sup> 2mM	% DE RECUPERACION CON Ca <sup>2+</sup> 2mM
E <sub>2</sub>	0	78.21 ± 1.92
F <sub>2a</sub>	0	74.26 ± 2.29

Los valores son las medidas ± error estándar n=8.

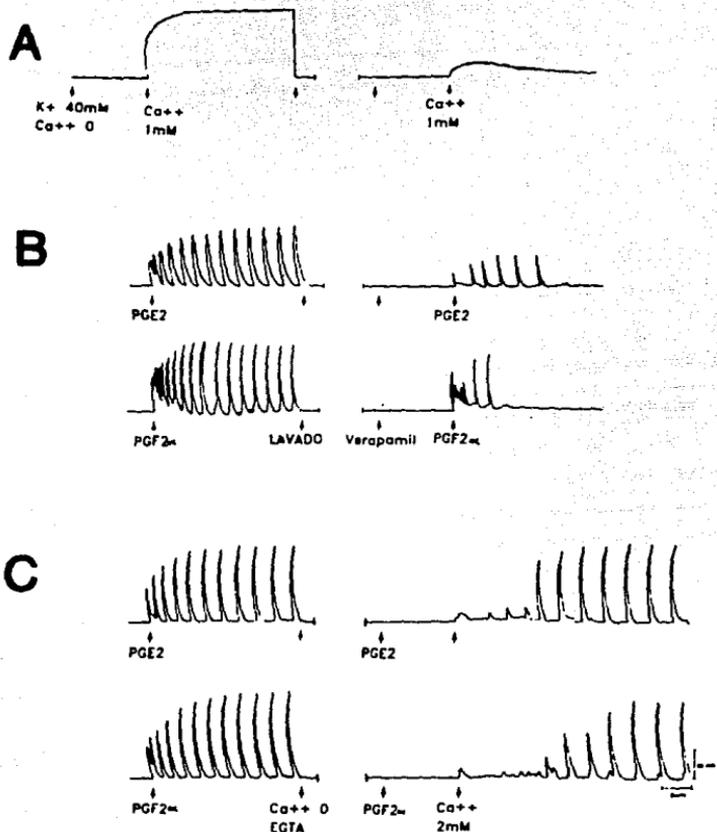


FIGURA 4

A) La contracción tónica producida por calcio en solución de potasio alto y libre de calcio ( $K^+40-Ca^{2+}0$ ) es prevenida por verapamil ( $1 \mu M$ ).

B) Las contracciones inducidas por  $PGE_2$  ( $1.1 \mu M$ ) y  $PGF_{2\alpha}$  ( $0.8 \mu M$ ) son inhibidas por verapamil ( $1 \mu M$ ).

C) Efecto contractil de  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  en un medio con calcio. Nótese que la contracción de ambas PGs es antagonizada en un medio sin calcio, manifestandose con la adición de calcio.

### 3. Experimentos Concentración-Respuesta:

Por otro lado, progesterona a diferentes concentraciones, fue capaz de inducir inhibición de la contracción inducida por PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> (Tabla III), de una manera dependiente de la concentración (figura 5), de donde fueron obtenidos los valores de las CI<sub>10</sub>, CI<sub>50</sub> y CI<sub>80</sub> (Tabla IV).

TABLA III

EFFECTO INHIBITORIO DE LA PROGESTERONA SOBRE LAS CONTRACCIONES INDUCIDAS POR PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> EN EL UTERO AISLADO DE LA RATA.

ESTEROIDES	CONCENTRACION (μM)	PG	% DE RELAJACION
PROGESTERONA	25	E <sub>2</sub>	18.58 ± 3.79
	40	E <sub>2</sub>	39.95 ± 3.39
	50	E <sub>2</sub>	76.81 ± 3.76
	25	F <sub>2α</sub>	18.80 ± 3.28
	50	F <sub>2α</sub>	44.00 ± 3.92
	70	F <sub>2α</sub>	76.90 ± 3.95

Los valores del porciento de relajación son las medidas ± error estándar n = 8.

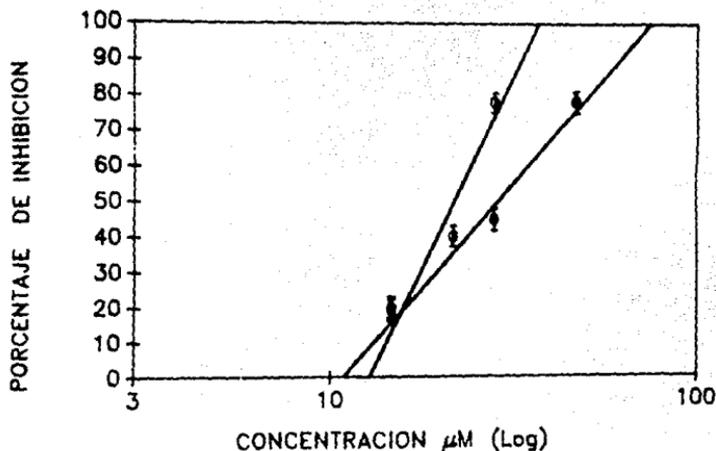


FIGURA 5

Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio de la progesterona sobre la contracción inducida por  $\text{PGE}_2$  ( $1.1 \mu\text{M}$ ) (círculos abiertos) y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $0.8 \mu\text{M}$ ) (círculos cerrados) en el útero aislado de la rata. Cada punto representa la medida  $\pm$  error estándar (barras verticales),  $n \geq 8$ .

TABLA IV

CONCENTRACIONES INHIBITORIAS DE LA PROGESTERONA SOBRE LAS CONTRACCIONES PRODUCIDAS POR LA  $\text{PGE}_2$  Y LA  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

EFFECTO DE PROGESTERONA SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR	$\text{CI}_{10}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CI}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{CI}_{84}$ ( $\mu\text{M}$ )
$\text{PGE}_2$	26.33	40.34	54.35
$\text{PGF}_{2\alpha}$	24.91	50.96	77.01

Los datos fueron obtenidos de la curva concentración-respuesta.

La concentración de progesterona que dió el 50% de inhibición de la contracción prostaglandínica ( $CI_{50}$ ) fue obtenida por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949) con sus respectivos límites de confianza. Así, se pueden observar las diferencias en las pendientes de cada curva concentración-respuesta del efecto de progesterona (Tabla V).

TABLA V  
EFECTO INHIBITORIO MEDIO DE LA PROGESTERONA SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR LA  $PGE_2$  Y LA  $PGF_{2\alpha}$ .

PROGESTERONA	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )	LIMITES	PENDIENTE
SOBRE LA CONTRACCION DE $PGE_2$	40.30	59.70-27.25	1.44
SOBRE LA CONTRACCION DE $PGF_{2\alpha}$	50.96	80.75-32.16	1.77

Los límites y la pendiente se calcularon por el método de Liechfield y Wilcoxon (1949).

Progesterona y progestinas 5-reducidas produjeron un claro efecto inhibitor sobre la contracción inducida por  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  (Figura 6). Todas las progestinas fueron probadas a la misma concentración ( $CI_{50}$  de progesterona) y se observó que las progestinas 5 $\beta$ -reducidas (pregnanolona, pregnandiona y epipregnanolona) presentaron un marcado efecto inhibitorio de las contracciones inducidas por  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  mayor que el de su precursor progesterona. En contraste con las progestinas 5 $\alpha$ -reducidas (alopregnanolona y alopregnandiona) las cuales

produjeron un efecto pobre de inhibición menor a la progesterona (Figura 7). Los valores del porcentaje de inhibición de cada esteroide, así como su potencia se encuentran descritos en las tablas VI y VII.

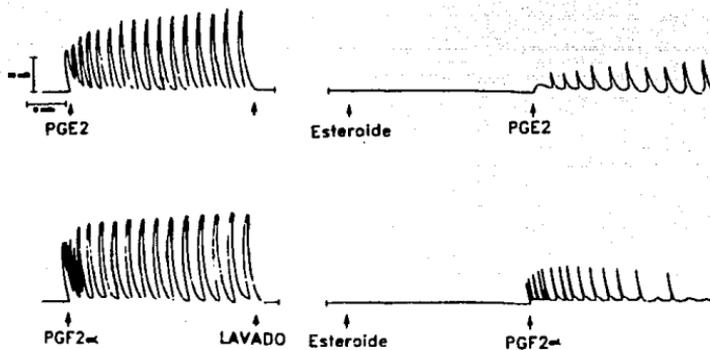


FIGURA 6

Registro típico del efecto inhibitor de un esteroide (5  $\mu$  pregnanolona 25  $\mu$ M) sobre la contracción inducida por PGE<sub>2</sub> 1.1  $\mu$ M (arriba) y PGF<sub>2</sub> $\alpha$  0.8  $\mu$ M (abajo).

EFFECTO INHIBITORIO DE PROGESTINAS  
SOBRE LA CONTRACCION  
UTERINA INDUCIDA POR PGE<sub>2</sub>

EFFECTO INHIBITORIO DE PROGESTINAS  
SOBRE LA CONTRACCION  
UTERINA INDUCIDA POR PGF<sub>2α</sub>

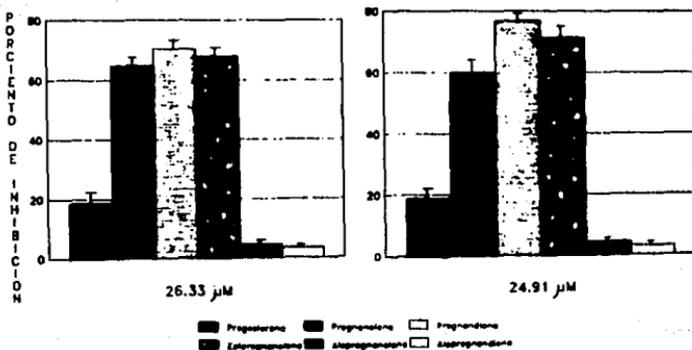


FIGURA 7

Efecto inhibitorio de las diferentes progestinas (CI<sub>50</sub> de progesterona) sobre la contracción inducida por PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>. n = 8 ± error estándar.

TABLA VI

EFFECTO INHIBITORIO DE LOS ESTEROIDES SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR PGE<sub>2</sub>.

ESTEROIDE	% DE INHIBICION	POTENCIA*
PROGESTRONA	18.58 ± 3.74	1.00
PREGNANOLONA	64.93 ± 2.76	3.46
PREGNANDIONA	70.59 ± 3.00	3.80
EPIPREGNANOLONA	67.99 ± 3.02	3.66
ALOPREGNANOLONA	4.62 ± 1.13	0.25
ALOPREGNANDIONA	3.47 ± 0.53	0.18

Las diferentes progestinas fueron probadas a la CI<sub>50</sub> de progesterona = 26.33 µM.

Los valores son las medidas ± error estándar n ≥ 8.

\*La potencia fue comparada con la fórmula: % de inhibición de progestina/% de inhibición de progesterona. Se asumió valor de 1.00 para la progesterona

TABLA VII

EFFECTO INHIBITORIO DE LOS ESTEROIDES SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR PGF<sub>2α</sub>.

ESTEROIDE	% DE INHIBICION	POTENCIA*
PROGESTERONA	18.80 ± 3.28	1.00
PREGNANOLONA	59.72 ± 4.31	3.17
PREGNANDIONA	77.02 ± 2.39	4.09
EPIPREGNANOLONA	71.38 ± 4.05	3.79
ALOPREGNANOLONA	4.10 ± 1.53	0.22
ALOPREGNANDIONA	2.91 ± 1.03	0.15

Las diferentes progestinas fueron probadas a la CI<sub>50</sub> de progesterona = 24.91 µM.

Los valores son las medidas ± error estándar n ≥ 8.

\*La potencia fue comparada por la fórmula: % de inhibición de progestina/% de inhibición de progesterona. Se asumió valor de 1.00 para la progesterona.

## VII. DISCUSION

Los presentes resultados mostraron que las contracciones inducidas por PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> sobre el útero aislado de la rata fue prevenido por verapamil (un antagonista de Ca<sup>2+</sup>) en un rango de 77-87%. Es bien conocido que el verapamil no bloquea la entrada de Ca<sup>2+</sup> en su totalidad y solo lo hace de un 80-90% (Fleckenstein-Grun y cols., 1984), lo cual concuerda con los experimentos realizados en este estudio.

Por otro lado, se observó que las contracciones uterinas que provocan ambas PGs (PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>) fueron totalmente prevenidas cuando los tejidos se encontraban en un medio libre de Ca<sup>2+</sup> extracelular. Sin embargo, estas contracciones se pudieron observar en el momento en que se adicionó Ca<sup>2+</sup> al medio externo.

Por los datos anteriores se puede concluir que las contracciones uterinas que produce PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> son dependientes de Ca<sup>2+</sup> extracelular: 1) Debido a que la disminución de la entrada de calcio que produce el verapamil se lleva a cabo directamente en la membrana plasmática de la célula miometrial y 2) los resultados evidenciaron que en medios libres de Ca<sup>2+</sup>, ambas PGs no ejercen su efecto contráctil y solamente se puede observar cuando se adiciona Ca<sup>2+</sup> extracelular.

La dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  externo para inducir contracción no es privativa de las PGs, ya que se ha propuesto que otras sustancias excitadoras (potasio, acetilcolina serotonina) en las mismas condiciones experimentales (en medios libres de  $\text{Ca}^{2+}$ ), son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Ichida y cols., 1984).

Es ampliamente aceptado que las PGs  $\text{E}_2$  y  $\text{F}_{2\alpha}$  producen contracción del músculo liso por incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  libre citoplasmático. Así, Villar y cols. (1985), reportaron que este cambio puede ser dado por una movilización de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  a través de tres diferentes mecanismos: a) Incremento de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  vía los canales operados por voltaje (Adelstein y Hathaway, 1979; Bolton, 1979), b) entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  externo vía los canales operados por receptor (Bolton, 1979) y/o c) liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Carsten, 1973; Carsten y Miller, 1977; Mironneau y cols., 1984).

El hecho de que los reservorios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  han mostrado ser sensibles a la acción de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , mediante la activación de sus receptores específicos, sugiere que los canales de calcio operados por receptor y la sensibilidad de los reservorios intracelulares a las PGs puedan ser integrados dentro de un solo mecanismo (Villar y cols., 1986). Sin embargo, en éste estudio se ha demostrado que la contracción inducida por PGs depende totalmente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  externo y que la liberación del calcio almacenado en reservorios intracelulares no es suficiente para producir contracción.

En el presente trabajo, se ha intentado dilucidar el mecanismo de acción que las PGs utilizan para producir contracción uterina, mediante experimentos con y sin  $Ca^{2+}$  extracelular para determinar la posible correlación fisiológica de las PGs y los esteroides en la regulación de la contractilidad uterina, asumiendo que los esteroides producen un efecto relajante sobre el músculo liso (Kubli-Garfias, 1987), por un bloqueo de la entrada de  $Ca^{2+}$  (Perusquia, 1990).

Así, progesterona y 5 $\beta$ -progestinas mostraron un marcado efecto inhibitorio de las contracciones inducidas por  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  (de 3 a 4 veces más potente que progesterona), y 5 $\alpha$ -progestinas (alopregnanolona y alopregnandiona) presentaron una potencia de 0.1 a 0.2 en relación a progesterona para inhibir el efecto de estas PGs. Estos datos evidenciaron que las progestinas 5 $\beta$ -reducidas, son mejores que su precursor delta-4 (progesterona). Por lo que se puede observar que la reducción en el anillo A de la progesterona en su posición 5 $\alpha$  o 5 $\beta$  altera de manera importante las propiedades biológicas de la molécula.

Por otra parte, se han reportado efectos similares de una acción inhibitoria a la respuesta de  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  por estradiol, estrona y progesterona en la actividad espontánea miométrial, lo cual se ha explicado como una competencia de los esteroides con las PGs por sus sitios selectivos de unión (receptores) en la membrana plasmática miométrial (Deliconstantinos y Fotious, 1986).

En cuanto al mecanismo de acción que las hormonas esteroides emplean para disminuir la frecuencia y amplitud de las contracciones uterinas, podría ser explicado por el hecho de que estas hormonas muestran un efecto similar al que produce el verapamil, resultando una acción antagonista de la entrada de  $Ca^{2+}$ , probablemente por el bloqueo de los canales de calcio operados por voltaje (Perusquia y cols., 1990). Sin embargo, estos compuestos son capaces de antagonizar la respuesta contráctil provocada por oxitocina, acetilcolina y serotonina, sugiriendo que también pueden estar bloqueando los canales de calcio operados por receptor (Perusquia y cols., 1991 a, b y c).

El punto más importante a discutir en este trabajo es que las PGs actúan directamente sobre la membrana de las células uterinas para producir contracción. Probablemente por interacción con sus receptores específicos (Hofmann y cols., 1984; Wainman y cols., 1988), acoplados con la activación de los canales de calcio operados por receptor para permitir la entrada de este ion (figura 8), de la misma manera que lo hacen otros compuestos excitadores del músculo liso (Bolton, 1979), como se ha explicado el mecanismo del incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular por la interacción de varios neurotransmisores con sus receptores (Ichida y cols., 1984). En particular porque la entrada de  $Ca^{2+}$  es importante para efectuar el incremento de la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular necesario para la excitabilidad tisular.

El efecto inhibitorio de los esteroides en la contracción inducida por PGs, mostrado en el presente estudio, sugiere una interacción entre los esteroides y las PGs en la modulación de la contractilidad uterina, mediante un efecto equilibrado de compuestos excitadores (PGs) e inhibidores (esteroides).

Previamente se ha observado un efecto antagónico de los esteroides sobre la contracción inducida por oxitocina, acetilcolina y serotonina, proponiendo un bloqueo de los canales de calcio operados por receptor para producir relajación muscular (Perusquia y cols., 1991 a, b y c). Por esta evidencia es posible inferir que los esteroides podría estar actuando de la misma forma para producir inhibición de la contracción inducida por PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> (figura 8).

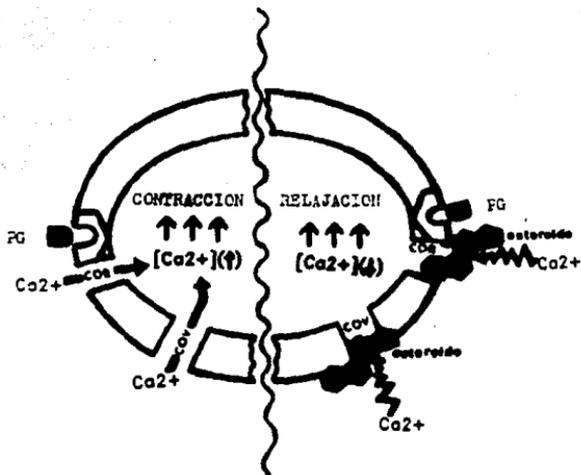


FIGURA 8

Representación esquemática de los mecanismos de acción propuestos.

La actividad contractil de prostaglandinas (PG) es dada por un aumento de la entrada de  $Ca^{2+}$  (CONTRACCION) a través de los canales operados por receptor (COR) y/o canales operados por voltaje (COV) proponiendo que el efecto inhibitorio que producen los esteroides sobre la contracción inducida por PG sea debido a una disminución de la permeabilidad al  $Ca^{2+}$  (RELAJACION) a través de bloquear los COR y los COV.

La posibilidad de que los esteroides estén interactuando directamente con los receptores específicos a  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se encuentra descartada, debido a las enormes diferencias químico-estructurales entre PGs y esteroides, por lo que posiblemente los esteroides no se unan al mismo sitio. Sin embargo, se ha reportado que algunas hormonas esteroides disminuyen la unión de PGs a sus sitios específicos (Deliconstantinos y Foutious, 1986), ésta disminución puede ser dada por cambios conformacionales en la membrana plasmática miometrial inducida por los esteroides. En consecuencia se presenta una alteración de la fluidez de la membrana (estabilización membranal); disminuyendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

El efecto inhibitorio de las hormonas esteroides en la contracción inducida por  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , es probablemente dado por una disminución de la permeabilidad membranal al  $\text{Ca}^{2+}$ , producida por los esteroides, lo que señala un mecanismo de acción no genómico de estos compuestos.

Los trabajos de tipo farmacológico (como el presente) nos ayudan a contribuir al conocimiento de la fisiología uterina. Así como el proponer el posible mecanismo de acción de compuestos tanto endógenos como exógenos que afectan la contractilidad del útero, para que posteriormente puedan ser usados con fines terapéuticos.

### VIII. CONCLUSIONES

- 1.- Las contracciones uterinas inducidas por  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  son dependientes de calcio extracelular. Estos compuestos actúan directamente sobre la membrana plasmática de la célula, aumentando la entrada de calcio.
- 2.- Los esteroides presentan un efecto inhibitorio de las contracciones inducidas por  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$ , por disminución de la entrada de calcio, existiendo una clara relación entre esteroide y PGs para modular la contractilidad uterina.
- 3.- Los esteroides delta-4, como progesterona, tiene una potencia intermedia para inhibir las contracciones uterinas inducidas por  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$ , mientras que los compuestos reducidos en posición 5 $\beta$  presentan una gran potencia con respecto a su precursor, en contraste con los compuestos reducidos en posición 5 $\alpha$  que tienen un efecto tenue. Lo cual indica que la reducción cis/trans del carbono-5 altera las propiedades biológicas de la molécula.
- 4.- El efecto inhibitorio de las hormonas esteroides en las contracciones uterinas inducidas por  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  es probablemente por una disminución de la permeabilidad membranar al  $Ca^{2+}$ , a través de bloquear los canales de calcio operados por los receptores específicos a  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$ .

## IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adham, N. y Schenk, E.A. Autonomic innervation of the rat vagina cervix, and uterus and its cyclic variation. Am. J. Obst. Gynec. 104:508-516 (1969).
- 2.- Ahlquist, R.P. A study of the adrenotropic receptor. Am. J. Physiol. 153:856-861 (1984).
- 3.- Adelstein, R.S. y Hathaway, D.R. Role of calcium and cyclic adenosin 3',5'-monophosphate in regulating smooth muscle contraction. Am. J. Cardiology. 44:783-787 (1979).
- 4.- Allen, W.M. y Corner, G.M. Physiology of corpus luteum: III. Normal growth and implantation of embryos after early ablation of the ovaries under the influence of extracts of the corpus luteum. Amer. J. of Physiol. 98:34-346 (1929).
- 5.- Allen, W.M. y Reynolds, S.R. The effect of progestin-containing extracts of corporal lutea on uterine motility in unanaesthetized rabbit with observations on pseudopregnancy. Amer. J. Physiol. 102: 39-46 (1932).
- 6.- Armstrong, D.T. y Grinwich, D.L. Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rat by indometacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. Prostaglandins. 1:21-28 (1972).
- 7.- Athias, M. Effets de la castration sur les mouvements automatiques de l'utérus chez la cobaye. J. Physiol. Path. Gen. 18:731-737 (1919).
- 8.- Axelrod, L., Minnich, A. K. y Ryan, C. A. Stimulation of prostaglandin production in isolated rat adipocytes by angiotensin II, vasopressin, and bradokinin: evidence for two separate mechanisms of prostaglandin synthesis. Endocrinol. 116:2548-2552 (1985).
- 9.- Batra, S. y Bengtsson, B. Effects of diethylstilboestrol and ovarian steroids on the contractile responses and calcium movements in rat uterine smooth muscle. J. Physiol. 278:329-342 (1978).
- 10.- Bergström, J. y Sjövall, J. The isolation of prostaglandin F from sheep prostate glands. Acta Chem. Scand. 14:1701-1705 (1960).
- 11.- Bergström, J., Ryhage, S. Samuelsson, B. y Sjövall, J. Prostaglandin and related factors. 15. The structures of prostaglandin E<sub>1</sub>, F<sub>1a</sub> y F<sub>2a</sub>. J. Biol. Chem. 238:3555-3568 (1963).
- 12.- Black, J.W. Definition and antagonism of histamine H<sub>2</sub>-receptors. Nature. 236:385-390 (1972).

- 13.- Blair, E.W. Contraction rate of uterine musculature of the rat with reference to the oestrus cycle. *Anat. Rec.* 23:9-10 (1922).
- 14.- Bolton, T.B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59: 606-718 (1979).
- 15.- Bolton, T.B. y Large, W.A. Are junction potentials essential? Dual Mechanism of smooth muscle cell. Activation by transmitter released from autonomic nerves. *Quart. J. Exp. Physiol.* 71:1-28 (1986).
- 16.- Brodie, A.M.H. Biosynthesis, metabolism and secretion of ovarian steroid hormones. En: "the ovary, Comprehensive Endocrinology," ed: Serra, G.B. Reven. Press, New York, 1983. pp. 356-382.
- 17.- Bülbring, E. y Tomita, T. Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacological Reviews.* 39:49-96 (1987).
- 18.- Carsten, M.E. Sarcoplasmic reticulum from pregnant bovine uterus: Prostaglandins and calcium. *Gynec. Invest.* 4:95-105 (1973).
- 19.- Carsten, M.E. Hormonal regulation of myometrial calcium transport. *Gynecol. Invest.* 5:269-275 (1974).
- 20.- Carsten, M.E. y Miller, M.D. Effects of prostaglandins and oxytocin on calcium release from a uterine microsomal fraction. *J. Biol. Chem.* 252:1576-1581 (1977).
- 21.- Castracane, V.D. y Jordan, V.D. The effect of estrogen and progesterone on uterine prostaglandin biosynthesis in the ovariectomized rat. *Biol. Rep.* 13:587-598 (1975).
- 22.- Csapo, A.I. y Corner, G.W. The antagonistic effects of estrogens and progesterone on the staircase phenomenon in uterine muscle. *Endocr.* 51:378-385 (1952).
- 23.- Csapo, A.I. The "seesaw" theory of the regulatory mechanism of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121:578-581 (1975).
- 24.- Deliconstantinos, G. y Fotious, S. Sex steroids and prostaglandins upon the purified rat myometrial plasma membranes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 45:149-156 (1986).
- 25.- Devore, G. "Química Orgánica". Ed: Publicaciones Culturales. S.A. Méx. D.F., 1975. p. 267.
- 26.- Droogmans, G., Himpens, B. y Casteels, R. Ca-exchange, Ca-channels and Ca-antagonist. *Experientia.* 41:895-900 (1985).

- 27.- Ebashi, S. y Endo, M. Calcium ion and muscle contraction. Proc. Biophys. Molec. Biol. 18:123-183 (1968).
- 28.- Ebashi, S. Regulation muscle contraction. Proc. R. Soc. Lond [Biol]. 207 (1168):259-286 (1980).
- 29.- Endo, M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. Physiol. Rev. 57:71-108 (1977)
- 30.- Falck, B. Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method. Acta Physiol. Scand. 197:1-25 (1962).
- 31.- Falck, B., Owman, Ch., Rosengren, E. y Sjöberg, N.O. Reduction by progesterone of the estrogen-induced increase in transmitter level of the short adrenergic neurons innervating the uterus. Endocrinol. 84:958-959 (1969).
- 32.- Fraenkel, L. Die funktion des corpus luteum. Arch. Gynaek. 68:438-535 (1905).
- 33.- Ferreira, S.M. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandins release from the spleen. Nature (New Biol.) 231:231-237 (1971).
- 34.- Fleckenstein-Grun, Fray, M. y Fleckenstein, A. Calcium antagonists: Mechanism and therapeutic uses. Trends in Pharmacol. Sci. 5:283-286 (1984).
- 35.- Fritz, M.A. y Speroff, L. Currents concepts of the endocrine characteristic of normal menstrual function: The key to diagnosis and management of menstrual disorders. Clin. Obstet. Ginecol. 26:647-689(1983).
- 36.- Goldblatt, M.W. A depressor substance in seminal plasma. Chem. Ind. 52:1056-1061 (1933).
- 37.- Ham, A.W. "Tratado de histología". ed: Interamericana. México, 1975. pp. 493-515.
- 38.- Hawkins, R.A., Jessup, R. y Ranwel, P.W. En: "Effect of ovarian hormones on response of the rat uterus to prostaglandins". ed: Ramuelli, P. y J.E. Shaw. Prostaglandins. New York, 1967 p.11.
- 39.- Hille, B. En: "Ionic channels of excitable membranes". Sunderland, Massachussets, 1984. pp.56-75.
- 40.- Hofmann, G.E., Roa, C.V., Barrows, G.H., Rossano, L.T. y San Filippo, J.J. Prostaglandin E y F<sub>2α</sub> receptora in human uterine Leiomyomas. J. Clin. Endoc. Met. 58:454-457 (1984).

- 41.- Hubbard, J.I. y Quastol, D.M.J. Micropharmacology of the vertebrate neuromuscular transmission. *Ann. Rev. Pharmacol* **13**:199-216 (1973).
- 42.- Hurwitz, L. y Joiner, P.D. Mobilization of cellular calcium for contraction in intestinal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **218**:12-18 (1971).
- 43.- Hurwitz, L. Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **28**:225-258 (1986).
- 44.- Ichida, S., Moriyama, M. y Terao, M. Characteristics of the influxes through voltage- and receptor-operated Ca Channels in uterine smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **228**(2):439-445 (1984).
- 45.- Kenakin, T.P. The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacol. Rev.* **36**:165-209 (1984).
- 46.- Karim, S.M.M. y Filshie, G.M. Use of PGF<sub>2a</sub> for therapeutic abortion. *Br. Med. J.* **3**:198-200 (1970).
- 47.- Katzung, G.B. Introducción a la farmacología autonómica. En: "Farmacología Básica". ed: Appleton & Lange Ed: El Manual Moderno. México, 1986. pp. 57-67.
- 48.- Kubli-Garfias, C., Medrano-Conde, C., Beyer, C. y Bondani, A. In vitro inhibition of rat uterine contractility induced by 5a and 5B progestins. *Steroids.* **34**:609-617 (1979).
- 49.- Kubli-Garfias, C., López-Friesco, A., Pacheco-Cano, M.T., Ponce-Monter, H. y Bondani, A. In vitro effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility. *Steroids.* **35**:633-641 (1980).
- 50.- Kubli-Garfias, C., Ponce-Monter, H., Medrano-Conde, L., López-Friesco, A. y Bondani, A. Participación del calcio en la inhibición in vitro de contractilidad del útero de la rata producida por andrógenos y metabolitos de la progesterona. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*. **13**:219-224 (1982).
- 51.- Kubli-Garfias, C., Hoyo-Vadillo, C., López-Nieto, E. y Ponce-Monter, H. Inhibitory of spontaneous contractions of the rat pregnant uterus by progesterone metabolites. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26**:115-118 (1983).
- 52.- Kubli-Garfias, C., Perusquia, M., Hoyo-Vadillo, C. y Ponce-Monter, H. Calcium antagonist as mechanism of action of natural androgens and progestins on uterine smooth muscle. Satellite Symposium of 7th International Congress of Endocrinology. Abstracts P22, Montreal Canada (1984a).

- 53.- Kubli-Garfias, C., Perusquia, M. y Ponce-Monter, H. Antagonism of androgens to the calcium induced contractions of pregnant rat myometrium. 7th International Congress of Endocrinology. Abstracts 1265. Québec, Canada (1984b).
- 54.- Kubli-Garfias, C. Modulatory action of 5-reduced androgens and progestins on the excitability of CNS and smooth muscle. *J. Steroid Biochem.* 26:332 (1987a).
- 55.- Kubli-Garfias, C., Medina-Jimenez, M., García-Yañez, E., Vazques-Alvarez, A.M., Perusquia, M., Gómez-García, N., Almanza, J., Ibañez, R. y Rodríguez, R. Relaxant action of androgens, progestins and corticosteroids on the isolated ileum of the quinea-pig. *Acta Physiol. et Pharmacol. Latinoam.* 37(3):357-364 (1987b).
- 56.- Kuriyama, H. Excitation-contraction coupling in various visceral smooth muscle. En: Smooth Muscle. ed: Bulbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. y Tomita, T. Ed: Arnold, E. London, 1981. pp. 171-197.
- 57.- Kurzrock, D. y Lieb C.H. Biochemical studies of human semen II. The action of semen human uterus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 28:268-272 (1930).
- 58.- Jensen, D. Fisiología endocrina y de la reproducción. En: Fisiología. Ed. Interamericana. México, 1979 pp. 1104-1105.
- 59.- Lakshminarayanaiah, N. y Beirao, P.S. Calcium system of a grant barnacle muscle fiber. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 22:301-307 (1979).
- 60.- Lara-Lemus, A., Perusquia, M., Amezcua, J.L. y Kubli-Garfias, C. Efecto relajante de la pregnanolona sobre la arteria coronaria de perro contraída con ergonovina y cloruro de potasio. XXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Guanajuato, Gto. del 17-20 de agosto .p. 71 (1986).
- 61.- Lee, J.B. Las Prostaglandinas. En: Tratado de Endocrinología. ed: Williams, R.H. Ed: Salvat México, 1984 pp. 1146-1164.
- 62.- Liggins, G.C. Physiological controlling mechanism in mammalian parturition. *Proc. Aust. Physiol. Pharmacol. Soc.* 3:6-16 (1970).
- 63.- Liggins, G.C. Hormonal interaction in the mechanism of parturition. *Mem. Soc. Endocrinol.* 20: 119-124 (1973).
- 64.- Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F.A. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96:99-108 (1949).

- 65.- Marshall, J.J. y Csapo, A.I. Hormonal and ionic influences on the membrane activity of uterine smooth muscle cells. *Endocrinology*. 69:1026-1029 (1961).
- 66.- Marshall, J.M. Adrenergic innervation of the female reproductive tract: Anatomy, physiology and pharmacology. *Ergeb. Physiol.* 62:7-67 (1970).
- 67.- Mathias, M.M. y Dupont, J. The relationship of dietary fats to prostaglandins biosynthesis. *Lipids*. 14:247-252 (1979).
- 68.- Mitolo-Chieppa, D., Alcino, L. y Lograno, M. Influence of hormonal treatments on the sensitivity of the isolated uterus to PGF<sub>2a</sub> in the rat. *Pharmacol. Res. Commun.* 10:205-208 (1978).
- 69.- Mironneau, C., Mironneau, M. y Savineau, J.P. Maintained contractions of rat uterine smooth muscle incubated in a Ca<sup>2+</sup>-free solution. *Br. J. Pharmac.* 82:735-743 (1984).
- 70.- Molnar, M., Asem, E.K. y Hertelendy, F. Differential effects of prostaglandin F<sub>2a</sub> and prostaglandin E<sub>1</sub> and E<sub>2</sub> on cyclic 3',5'-monophosphate production and intracellular calcium mobilization in avian uterine smooth muscle cells. *Biol. Reprod.* 38:384-391 (1987).
- 71.- Nissenson, R. Oprosing effects of estradiol and progesterone on oxytocin receptors in rabbit uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75:2044-2048 (1978).
- 72.- Neulen, J., Zaharadnik, H.P., Fleckn, U. y Breckwoltdt. Effects of estradiol-17β and progesterone on the synthesis of prostaglandin F<sub>2a</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> y prostaglandin I<sub>2</sub> by fibroblasts from human endometrium in vitro. *Prostaglandins*. 36 (1):17-30 (1988).
- 73.- Norberg, K.A. y Fredericsson, B. Cellular distribution of monoamines in the uterine and tubal walls of the rat. *Acta Physiol. Scand.* (Suppl.) 277:68-149 (1966).
- 74.- Norris, J.H., Hertig, A.T. y Abell, R.M. Nervous influences on the myometrium. En: "The Uterus". ed: Norris, J.H. y Abell, R.M. U.S.A., 1973 pp. 101-109.
- 75.- Persianinov, L.S. Physiology and pathology of uterine contractility. En: "Recent Progress in Obstetrics and Gynecology," ed: O'Connor, M. & Knight, J. Ed: Elsevier, Excerpta Medical, Amsterdam, 1974 p. 5-20.
- 76.- Perusqufa, M. Hoyo-Vadillo y Kubli-Garfias, C. Biphasic effect of corticosteroids on the contraction of isolated rat uterus. *Arch. Invest. Med. (Mx.)*. 17:203-209 (1986).

- 77.- Perusquia, M., García-Yañez, E., Ibañez, R. y Kubli-Garfias, C. Non-Genomic mechanism of action of delta-4 and 5-reduced androgens and progestins on the contractility of the isolated rat myometrium. *Life Sciences*. 47(17):1547-1553 (1990).
- 78.- Perusquia, M. y Campos, G. Inhibitory effect of androgen and progestina on the contraction induced by oxytocin in the rat myometrium. *Med. Sci. Res.* 19:177-179 (1991a).
- 79.- Perusquia, M., Corona, J.L. y Kubli-Garfias, C. Inhibitory effect of 5-reduced androgens and progestins on the uterine contraction induced by acetylcholine. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34:324-328 (1991b).
- 80.- Perusquia, M., Campos, G., Corona, J.L. y Kubli-Garfias, C. Antagonism by 5-reduced steroids of the tonic and phasic contractions induced by serotonin in the isolated rat uterus. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34:382-386 (1991c).
- 81.- Receptor Nomenclature Supplement. *Trends in Pharmacol. Sci.* January, 1990.
- 82.- Receptor Nomenclature Supplement. *Trends in Pharmacol. Sci.* January, 1991.
- 83.- Regoli, D., Park, W. K. y Rioux, F. Pharmacology of angiotensin. *Pharmacol. Rev.* 26:69-123 (1974).
- 84.- Reynolds, S.R.M. Studies on the uterus. A method for recording uterine activity in chronic experiments on unanestabilized animal. *Amer. J. Physiol.* 92:420-429 (1930).
- 85.- Roberts, J.S., McCracken, J.A. y Soloff, M.S. Oxytocin-stimulated release of prostaglandin F<sub>2a</sub> from ovine endometrium in vitro. *Prostaglandins*. 36: 17-31 (1988).
- 86.- Robertson, R.P. Characterization and regulation of prostaglandins and leukotriene receptors: an overview. *Prostaglandins*. 31:395-411 (1986).
- 87.- Robson, J.M. Reaction of the uterine muscle and endometrium of the rabbit to testosterone, *Quart. J. Exp. Physiol.* 26:355-363 (1930).
- 88.- Rojas-Mejía, Y., Moreno, J.A., García-Marquez, F., Perusquia, M., Medina-Jimenez, M., García-Yañez, E. y Kubli-Garfias, C. Efectos producidos por la androsterona sobre la contractilidad de las aurículas aisladas de la rata. XXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Guanajuato, Gto., del 17-20 de agosto de 1986 p. 243.

- 89.- Sjöberg, N.O. The adrenergic transmitter of the female reproductive tract: Distribution and functional changes. *Acta Physiol. Scand. (Suppl.)* 305:5-25 (1967).
- 90.- Sjöberg, N.O. Considerations on the causes of disappearance of the adrenergic transmitter in uterine nerves during pregnancy. *Acta Physiol. Scand.* 72:510-517 (1968).
- 91.- Smith, J.B. y Willis, A.L. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *nature (New BIOL.)*. 231:235-238 (1971).
- 92.- Somlyo, A.P. y Somlyo, A.F. Vascular smooth muscle: Normal structure, pathology, biochemistry and biophysics. *Pharmacol. Rev.* 20:197-272 (1968).
- 93.- Sullivan, T.J. Response of the mammalian uterus to prostaglandins under differing hormonal conditions. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 26:678-685 (1966).
- 94.- Towart, R. y Shcram, M. Recent advances in pharmacology of calcium channel. *Trends Pharmacol. Sci.* 5:111-113 (1984).
- 95.- Villar, A., D'Ocon, M.P. y Anselmi, E. Calcium requirements of uterine contraction induced by PGE<sub>1</sub>: importance of intracellular calcium stores. *Prostaglandins.* 30(3):491-496 (1985).
- 96.- Villar, A., D'Ocon, M.P. y Anselmi, E. Role of intracellular calcium stores in the contractile response of uterus to several agonist. *J. Pharmacol. (Paris)* 17:514-518 (1986).
- 97.- Von Euler, U.S. Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkung von Nativsecten und extrakten männlichen a. cessorischen Geschtsdrusen. *Arch. Exp. Phatol. Pharmak.* 175:78-83 (1934).
- 98.- Wainman, B.C., Burcea, I. y Crankshaw, D.J. The effects of prostanoids on estrogen-dominated rat myometrial longitudinal muscle in vitro. *Biol. Reprod.* 39:221-228 (1988).
- 99.- Yamada, S. y Tomomura, y. Phosphorylation of the calcium-magnesium dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum coupled with cation translocation. *J. Biochem.* 71:1101-1104 (1972).