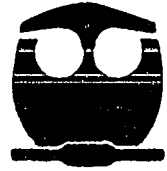


58
203



Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE QUIMICA



**EFFECTO RELAJANTE DE ESTEROIDES 4-EN Y 5-REDUCIDOS SOBRE LA
CONTRACCION INDUCIDA EN LA AORTA TORACICA AISLADA DE RATA.**



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Presenta:

RICARDO HERNANDEZ AVILA

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Marzo 1994



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

FACULTAD DE QUIMICA.

**Efecto relajante de esteroides 4-en y 5-reducidos sobre la
contracción inducida en la aorta torácica aislada de rata.**

TESIS.

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA:**

RICARDO HERNANDEZ AVILA.

MEXICO. D. F.

MARZO 1994.

JURADO ASIGNADO:

Presidente.	Dr. Rafael Rion Ariola.
Vocal.	Dra. Mercedes Perusquía Nava.
Secretario.	Dra. Elia Brosla Naranjo Rodriguez.
1er. suplente.	M. en C. Arturo Víctor Rosales Olivares.
2do. suplente.	Biol. Manuel Miranda Anaya.

LUGAR DONDE SE ESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, perteneciente al Departamento de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas U. N. A M.

Vo. Bo. del ASESOR DE TEMA:


Dra. Mercedes Perusquía Nava.

SUSTENTANTE:


Ricardo Hernández Avila.

A MIS PADRES

Dos personas que estuvieron ahí
en todo momento, por su paciencia y
apoyo durante estos años, por legarme
la mejor de las herencias

A MIS HERMANOS.

Quienes representan mucho para mí,
por su estímulo para seguir adelante
durante este tiempo.

A BARBARA.

Por el estímulo recibido durante la elaboración
de este trabajo, con cariño y agradecimiento.

A LA DRA. MERCEDES PERUSQUIA NAVA.

Por poner a mi alcance los recursos
necesarios para llevar a cabo ésta tesis
por sus enseñanzas, sugerencias
y orientaciones.

Por contar por siempre con la amistad de
quienes recibí incondicional apoyo para
continuar adelante en los momentos difíciles
a mis amigos y compañeros.

A todas aquellas personas por su participación
no menos importante, que contribuyeron a hacer
posible la realización de este trabajo.
A todos ellos un sincero agradecimiento.

**A LA U. N. A. M., FACULTAD DE QUIMICA Y
AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS.**

INDICE.

	pag.
Indice	I
Lista de Tablas	IV
Lista de Figuras	IV
Lista de Abreviaturas	V

CAPITULO I. INTRODUCCION.

1. Generalidades de músculo liso.	1
a) Estructura fina de músculo liso vascular	4
b) Fisiología de músculo liso vascular	6
2. Distribución de músculo liso vascular.	9
a) Arterias de grueso calibre	9
b) Arterias de mediano calibre	10
c) Arterias de pequeño calibre	10
3. Aorta torácica.	10
a) Preparación <i>in vitro</i> .	11
b) Acción de fármacos	12
4. Endotelio vascular.	12
a) Propiedades del endotelio vascular	13
b) Composición del endotelio	14
c) Clasificación	15
d) Factores liberadores del endotelio	16

INDICE.

	pag.
5. Efecto de esteroides en músculo liso vascular.	20
CAPITULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	24
CAPITULO III. HIPOTESIS.	25
CAPITULO IV. OBJETIVOS.	
a) Objetivo general	26
b) Objetivos particulares	26
CAPITULO V. MATERIAL Y METODOS.	
a) Modelo Biológico	27
b) Sistema de Registro	28
c) Desarrollo Experimental	30
1. Preparaciones con endotelio	30
2. Preparaciones sin endotelio	31
3. Observación morfológica del endotelio	34
4. Curvas concentración-respuesta	37
5. Efecto de los metabolitos de progesterona	37
d) Análisis de los datos	38
e) Substancias utilizadas	39

INDICE.

	pag.
CAPITULO VI. RESULTADOS.	
1. Estandarización de la repuesta a Noradrenalina	41
2. Respuesta endotelio-dependiente	43
3. Acción de los esteroides	52
CAPITULO VII. DISCUSION.	53
CAPITULO VIII. CONCLUSIONES.	57
CAPITULO IX. REFERENCIAS.	58

LISTA DE TABLAS.

	pag.
Tabla I. Efecto de progesterona en preparaciones con y sin endotelio	46
Tabla II. Concentraciones inhibitorias del efecto de progesterona	48
Tabla III. Concentración inhibitoria media, limites de confianza y pendiente de la recta	49
Tabla IV. Efecto de andrógenos y progestinas sobre la contracción inducida por noradrenalina	51

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Sistema de registro.	29
Figura 2. Estrategia experimental	33
Figura 3. Contracción inducida por noradrenalina	42
Figura 4. Efecto de progesterona	44
Figura 5. Micrografías de cortes transversales	45
Figura 6. Efecto de 5 α - y 5 β -pregnanolona	50
Grafica I Curvas concentración-respuesta.	47

LISTA DE ABREVIATURAS.

Ach	acetilcolina
ADN	ácido desoxirribonucleico
BKR	buffer Krebs-Ringer
CaCl ₂	cloruro de calcio
CE	células endoteliales
CM	células musculares
CI ₁₆	concentración inhibitoria 16
CI ₅₀	concentración inhibitoria 50
CI ₈₄	concentración inhibitoria 84
cm	centímetros
CO ₂	dióxido de carbono
cols	colaboradores
D.E	desviación estándar
DHT	dihidrotestosterona
ETOH	etanol
ET-1	endotelina 1
ET-2	endotelina 2
ET-3	endotelina 3
ETS	endotelinas
FRDE	factor relajante derivado del endotelio
FRDP	factor relajante derivado de plaquetas
GMPc	guanosin monofosfato cíclico
°C	grados centígrados
i.e.	es decir (<i>id est</i>)
KH ₂ PO ₄	fosfato dibásico de potasio

L	lavado
M	molaridad
MgSO ₄	sulfato de magnesio
ML	músculo liso
MLV	músculo liso vascular
μM	micromolar
mm	milímetros
mM	milimolar
min	minutos
mN	milinewtons
nm	nanómetros
NA	noradrenalina
NaCl	cloruro de sodio
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
ON	óxido nítrico
ONS	óxido nítrico sintetasa
O ₂	oxígeno
P ₄	progesterona
%	por ciento
SNC	sistema nervioso central
RK	Ringer-Krebs
RS	retículo sarcoplásmico
RSL	retículo sarcoplásmico liso
RSR	retículo sarcoplásmico rugoso
T ₄	testosterona

I. INTRODUCCION.

1.- GENERALIDADES DE MUSCULO LISO.

EL tejido muscular se divide en tres grupos: músculo estriado, músculo cardíaco y músculo liso (ML). El músculo estriado se encuentra asociado con el esqueleto donde también recibe el nombre de músculo esquelético, es el responsable del movimiento locomotor y de otros movimientos voluntarios de los vertebrados. El músculo cardíaco, es una forma semejante del músculo estriado; cuya contracción rítmica es involuntaria, y difiere del esquelético en que las fibras ramificadas no son sinciciales, sino que están formadas por unidades individuales unidas entre sus extremos. El ML está compuesto por células fusiformes de un solo núcleo, su contracción es en respuesta a la estimulación del sistema nervioso autónomo, debido a que no está sometido a un control voluntario (Fawcett, 1990).

El ML se denomina también músculo involuntario; la razón consiste en que no se encuentra bajo el control de la mente consiente, que como ya se mencionó, se encuentra bajo el control del sistema nervioso autónomo (involuntario); se localiza principalmente en las paredes de las vísceras huecas y de los vasos sanguíneos (venas y arterias, en los cuales su función principal es controlar el diámetro de la luz de éstos vasos), además de vasos linfáticos (Ham, 1984). Forma la parte contráctil de la pared del sistema digestivo; desde la porción media del esófago hasta el esfínter interno del ano. Proporciona la fuerza motriz para mezclar los alimentos ingeridos con los jugos digestivos y para propulsarlos a lo largo de la porción absorbente y eliminadora del intestino grueso. Se localiza en las vías urinarias y genitales; así como también en la pared de las vías respiratorias desde la

tráquea hasta los conductos alveolares. En la piel forma unos músculos diminutos, llamados erectores del pelo, responsables de la piloerección. En la areola de la glándula mamaria participa en la erección del pezón y en el tejido subcutáneo del escroto, causa el arrugamiento de la piel que acompaña a la elevación de los testículos. En el ojo forma la musculatura del iris y del cuerpo ciliar, que regulan la acomodación, la constricción y dilatación de la pupila (Fawcett, 1990).

La mayor parte de las vísceras huecas están cubiertas por dos capas de ML: una interna compuesta por fibras de distribución circular, y una externa compuesta por otras de distribución longitudinal. En los vasos sanguíneos, la capa de las fibras de ML pueden estar confinadas en la media, sitio en que las fibras están colocadas de manera espiral. La distribución espiral hace que las fibras estén en ángulo obtuso con el eje del vaso (Strong, 1932; Ham, 1984), estas fibras son importantes para la contracción vascular (Sollmann y Gilbert, 1938; Schmitt, 1972; Heäusler, 1978).

Las fibras musculares lisas están compuestas principalmente de células largas y fusiformes, que se agrupan unas junto a otras formando láminas o haces, el núcleo alargado de la célula lisa relajada tiene un perfil liso que se redondea en sus extremos. Las células musculares lisas varían mucho en longitud, de unos órganos a otros, en el útero gestante humano pueden llegar a ser de 0.5 mm de largo, su longitud promedio en la musculatura del intestino humano es de alrededor de 0.2 mm, las células musculares lisas más pequeñas son las de las paredes de los vasos sanguíneos, pueden medir sólo 20 micras de largo.

Aunque ordinariamente es considerado por los morfólogos como un tipo único de músculo, el ML se adapta a una gran variedad de funciones y difiere marcadamente en sus propiedades fisiológicas según el lugar en que se localice. En los vasos

sanguíneos, se comporta más bien como el músculo esquelético; en él, la actividad se inicia ordinariamente por fibras nerviosas (nervios vasomotores) y, hay pocas pruebas que hablen en favor de una conducción entre las unidades celulares. El ML visceral, por otra parte, presenta cierta semejanza funcional con el músculo cardíaco, pues tiene una autorritmicidad miogénica. Existen otras diferencias fisiológicas y farmacológicas del ML en los diferentes órganos. Por ejemplo, la cantidad de actina y miosina del ML uterino, está bajo control endocrino. La musculatura uterina en las fases terminales de la gestación también responde a la hormona oxitocina, elaborada en el lóbulo posterior de la hipófisis. El ML de otras partes del cuerpo es relativamente inerte frente a hormonas que no sean la adrenalina (Fawcett, 1990).

El ML difiere del músculo estriado no sólo por su aspecto histológico y citológico, sino también por sus propiedades fisiológicas y farmacológicas. Sus contracciones son más lentas que las de los otros tipos de músculo, pero es capaz de mantener una contracción intensa por períodos más largos y con un gasto relativamente pequeño de energía. La contracción puede iniciarse, dependiendo de las diferentes localizaciones, por los impulsos nerviosos, por estímulos hormonales o por cambios locales que nacen del propio músculo. Esta propiedad es fundamental del protoplasma que, en grado muy variable, poseen todos los tejidos celulares. En el tejido muscular se ha desarrollado al máximo la capacidad de las células para convertir la energía química en trabajo mecánico por medio de la contracción (Fawcett, 1990).

a) Estructura fina del músculo liso vascular.

La superficie membranal es una estructura trilaminar de aproximadamente 8 nm de diámetro (Garfield y Somlyo, 1977). La variación en diámetro es considerada por presentar proteínas de la membrana. Tales formaciones son consistentes con el modelo del mosaico fluido, propuesto para membranas celulares (Nicolson, 1976), de acuerdo a este modelo las proteínas son de forma globular y están asociadas con una bicapa lipídica.

La superficie del músculo liso vascular (MLV) es una extensa membrana basal con un aspecto amorfo (Somlyo y cols., 1973), la cual se caracteriza por contener una serie de invaginaciones (vesículas superficiales), de 50 a 80 nm (Matthews y Gardrier, 1966; Cliff, 1967; Devine, 1978), las cuales contienen glicosaminoglicanos. Se ha sugerido que tales vesículas presentan diferencias en número y distribución (Parker, 1958; Fawcett, 1959; Keech, 1960; Pease y Molinary, 1960; Karker, 1961; Ham, 1962; Rhodin, 1962; Reale y Ruska, 1965; Spiteri y cols., 1966), así como también en la cantidad de complejos de proteínas y glicoproteínas, que pueden estar involucradas en el transporte de iones, regulación del volumen de líquidos y actividad de receptores a fármacos (Nicolson, 1976; Garfield y Daniel, 1977ab; Garfield y Somlyo, 1977), estando además las que regulan el transporte de otros compuestos tales como ferritina, peroxidasa de rábano, oro coloidal y lipoproteínas de baja densidad (Palade, 1960; Jennings y cols., 1962; Bruns y Palade, 1988; Smith, 1990). Estas vesículas se asocian muchas veces con las mitocondrias y el retículo sarcoplásmico (RS) (Devine y cols., 1973; Wootton y Goodford, 1975).

Las mitocondrias, como en otros tejidos, en el MLV es el sitio de metabolismo oxidativo, muchas veces se localizan en los polos del núcleo en un número significativo, algunas veces están adyacentes a la membrana plasmática y en otras en asociación con vesículas y RS. Varían considerablemente en longitud, con un máximo de 7 micras (Sachs, 1967; Westman 1967; Garfiel y Somlyo 1977), en los gránulos observados en ellas se han encontrado iones divalentes: calcio y estroncio (Somlyo y cols., 1974). Además, parecen jugar un papel menos importante dentro del MLV, como reservorio de calcio para la contracción (Jones, 1981).

El aparato de Golgi ésta compuesto de membranas laminares y vacuolas. Se localiza prevalentemente en la región perinuclear (Rhodin, 1962; Gonzáles-Crussi, 1971; Jones, 1981; Fawcett, 1990), se piensa que está involucrado en la síntesis de glicosaminoglicanos y otros materiales de la matriz extracelular. El aparato de Golgi no juega un papel en la síntesis de glicoproteínas de la membrana plasmática (por ejemplo, receptores), y su sistema no está involucrado en cambios de sensibilidad a fármacos, asociado con la hipertensión (Jones, 1981).

Se han identificado tres tipos de filamentos contráctiles (gruesos, delgados e intermedios) presentes comúnmente en la superficie de los vasos (Choi, 1962; Campbell y Campley, 1975; Jones, 1981). Filamentos gruesos de 13.5-17.5 nm de diámetro observados (prevalentemente) en venas y arterias, los cuales contienen miosina (Choi, 1962), y tienden a acomodarse paralelamente uno con otro en el eje largo de la célula. Filamentos delgados de 5-8 nm de diámetro acomodados en forma de rosetas alrededor de los filamentos gruesos, en un ordenamiento hexagonal con 11-12 nm de espacio entre filamentos (Heumann, 1970; Rice y cols., 1970; Somlyo y cols., 1973) y contienen actina (Murphy y cols., 1974). Son observados entre cuerpos densos localizados entre el citoplasma y la membrana

(Asthon y cols., 1975; Somlyo y cols., 1976). Filamentos de 10-11 nm de diámetro (intermedios) son comúnmente vistos en varios tipos de ML (Fawcett, 1959; Asthon y cols., 1975; Devine, 1978; Jones, 1981), proveen un medio de transducción de fuerza entre citoplasma, cuerpos diversos y membrana de unión; la relación numérica entre filamentos gruesos y delgados es de alrededor de 1:15 en MLV (Somlyo y cols., 1973).

La red de tubulos y sacos formados en el citoplasma constituyen el retículo sarcoplásmico (RS). El retículo sarcoplásmico liso (RSL), es libre de ribosomas y se localiza principalmente en la superficie de la membrana en varias formas y orígenes, pero el significado de estas variaciones es desconocido (Jones, 1981), en contraste con el retículo sarcoplásmico rugoso (RSR), el cual parece ser más prevalente en los polos nucleares, siendo más abundante en todas las células desarrolladas del ML. En animales adultos (conejo y cobayo) la cantidad de RSR varía entre diferentes músculos, presentándose en forma más abundante en el MLV y en el miometrio, que en el músculo intestinal (Jones, 1981). Una importante relación ha sido notada entre el contenido total de RS y la habilidad del MLV para contraerse en solución libre de calcio (Devine y cols., 1972).

b) Fisiología del músculo liso vascular.

El ML de la vena porta del conejo es considerado de tipo fásico (Somlyo y Somlyo, 1968, 1970). Este tipo está caracterizado por actividad espontánea, una habilidad para generar potenciales de acción y menos potenciales de membrana. En contraste, el ML de la arteria pulmonar es de tipo tónico, este muestra poca actividad espontánea; responde a diferentes estímulos con cambios graduados en el potencial de membrana.

El ML fásico no puede contraerse en solución libre de calcio, esto debido a que la cantidad de calcio que puede almacenar internamente es mínima. Se ha sugerido además, que la actividad de este músculo está asociada con respuesta fásica y respuesta tónica, las cuales actúan paralelamente frente a la membrana (Golenhofen, 1975). Experimentos de tipo farmacológicos, han sugerido que el sistema fásico esta asociado con los potenciales de acción, mientras que el sistema tónico involucra despolarización. Esto puede proponer que el RS juegue un papel importante en el almacenamiento y liberación de calcio; el músculo con más RS, puede disponer de más calcio para su contracción. Además, el transporte membranal juega un importante papel en los niveles de calcio citoplásmicos. El hecho de que el MLV pueda contraerse en soluciones libres de calcio, indica la existencia de sitios intracelulares donde se controla el almacenamiento y liberación de calcio (Devine y cols., 1972). Ahí son también importantes las diferencias en la permeabilidad iónica entre estos dos tipos de MLV, ésto puede también contribuir a la diferente sensibilidad a soluciones libres de calcio. Se ha sugerido que la respuesta fásica en MLV tónico representa la liberación de calcio de reservorios con capacidad limitada, como en la membrana o en RS (Casteels y cols., 1977; Endo, 1977).

El transporte de sodio y calcio ha recibido más atención a causa de su papel potencial en el acoplamiento contracción-relajación (Blaustein, 1977). Se ha observado que el MLV puede contraerse en concentraciones altas de calcio, cuando la concentración de sodio es baja o cuando es alta. A la vez, se ha observado que el MLV responde a estímulos vía una graduada despolarización y no a potenciales de acción generados bajo condiciones fisiológicas (Somlyo y Somlyo, 1968; 1970).

En 1969 Somlyo y cols., observaron una buena correlación entre cambios en los potenciales de membrana inducidos por noradrenalina (NA), y el desarrollo de la contracción. También observaron que agonistas de diferente potencia en la respuesta contractil, tienen efectos paralelos en el potencial de membrana (Somlyo y Somlyo, 1968, 1970). Por su parte Heatsler (1978), confirmó la relación cercana entre despolarización y respuesta contráctil a NA en la arteria pulmonar de conejo. Estos estudios sugieren una serie de eventos, en los cuales la acción de NA (y otros agonistas) en la membrana son importantes para iniciar la despolarización.

La liberación de calcio de RS y de estructuras membranales es importante para la contracción inducida por NA, el calcio extracelular (libre y asociado con la matriz celular), es también considerado importante, por ser una fuente de calcio; el cual es utilizado en el proceso contractil (Jones, 1981).

Las fibras nerviosas que inervan el MLV se originan desde el sistema nervioso autónomo (Gabella, 1981), la principal es: la de la cadena simpática (paravertebral) que forma las fibras adrenérgicas del sistema cardiovascular.

El ML puede ser estimulado mediante múltiples tipos de señales: nerviosas, hormonales y de otras clases; esto es debido a que el ML contiene diferentes tipos de proteínas receptoras que pueden dar inicio al proceso contráctil; también tiene otras proteínas que lo inhiben. Estas, a su vez, controlan la apertura de canales iónicos, o bien controlan algunas otras vías posibles de activación o inhibición de la fibra muscular lisa.

Se sabe que la inervación autónoma del ML puede ser principalmente de dos tipos; colinérgica la cual secreta neurotransmisores como la acetilcolina (Ach), y

adrenérgica cuyo principal neurotransmisor es la noradrenalina (NA). La Ach excita las fibras de ML en algunos órganos y la inhibe en otros. Normalmente, cuando la Ach excita una fibra muscular, la NA la inhibe y viceversa (Guyton, 1992).

2.- DISTRIBUCION DE MUSCULO LISO VASCULAR.

Es un interés particular en este trabajo, estudiar la relación que guardan algunos compuestos con la fisiología del MLV. Este tipo de músculo se encuentra en las arterias, las cuales se dividen en tres categorías según su tamaño y ciertas características histológicas y, aunque todas conducen sangre, tales estructuras ejecutan funciones un poco diferentes e importantes, a las cuales está adaptada particularmente su estructura (Somlyo y Somlyo, 1968; Ham, 1984; Fawcett, 1990).

Las células que las constituyen son funcionalmente diversas y dependientes del tamaño y naturaleza del vaso. Esta diferenciación en función es debida a la diferente organización de las células, inervación, propiedades de membrana y receptores (Creed, 1979). Estas células además pueden existir en un amplio espectro de fenotipos (Chamley-Chapbell y cols., 1979).

a) Arterias de grueso calibre o elásticas.

Incluyen la aorta y sus ramas principales: tronco bronquiocefálico, subclavia, comienzo de la carótida primitiva y origen de las arterias pulmonares. Sus células son principalmente de forma circular o helicoidal y la superficie es irregular (Smith, 1990).

b) Arterias de mediano calibre o musculares.

Son también llamadas arterias distribuidoras, formadas por células lisas circulares o espirales, colocadas en capas concéntricas (Ham, 1984; Smith, 1990).

c) Arterias de pequeño calibre.

En las cuales se incluyen capilares y arteriolas; por lo regular con diámetro menor de 2 mm, se encuentran en su mayor parte, dentro de los tejidos y órganos (Ham, 1984, Smith, 1990), se constituyen principalmente por células transversales en dirección del flujo y en forma espiral alrededor del lumen.

Todos estos tejidos se caracterizan por poseer tres capas o tunicas: íntima, media y adventicia, que se distinguen claramente en los vasos de mayor calibre. Conforme disminuye el calibre vascular, las tres capas se tornan cada vez menos precisas y, por último, en las arteriolas, dejan de ser identificables (Smith, 1990).

3.- AORTA TORACICA.

La aorta es la principal arteria de la circulación general del cuerpo. Se divide en aorta ascendente cayado aórtico y aorta descendente, la aorta ascendente es una porción localizada en el pericardio y que da origen a dos ramificaciones: arteria coronaria izquierda y arteria coronaria derecha. El cayado aórtico, es la continuación de la aorta ascendente; se localiza a la izquierda y por delante de la traquea, las ramas del cayado aórtico son: el tronco braquiocefálico, la arteria carótida primitiva izquierda y la arteria subclavia izquierda. La aorta torácica es la continuación del cayado aórtico y se localiza a la izquierda de la columna vertebral;

se ha dividido para propósitos de descripción en la porción torácica y la porción abdominal.

La aorta torácica se extiende desde el arco aórtico de el diafragma, iniciando al principio, un poco a la izquierda de la columna vertebral pero se aproxima a la línea media conforme alcanza el diafragma. En la rata, la persistente vena cava superior izquierda, atraviesa la aorta para alcanzar el corazón y la vena acigos se localiza a la izquierda de la aorta. Las ramificaciones de la aorta torácica son: intercostal, subcostal, y la fénica superior (Greene, 1963).

a) Preparación *in vitro*.

El tamaño de la aorta en conejos, cerdos y ratas, así como la relativa facilidad con la cual el tejido aórtico puede ser disecado, y limpiado de tejido adiposo y adventicio, ha ayudado a el uso común de esta preparación. A pesar de las variaciones en la técnica de disección de la aorta, esta ha sido con pocas excepciones (Scott y cols., 1970), bien utilizada en solución Buffer Krebs-Ringer (BKR) o buffer salino; la aorta aislada (disecada) ha sido perfundida o cortada en segmentos de diferente tamaño e incubada. Estudios realizados con el microscopio electrónico de transmisión, han demostrado que existen alteraciones aparentes del endotelio aórtico, que ocurren durante la preparación del tejido para su incubación. Además, la capa intacta de células endoteliales es rápidamente perdida durante el periodo inicial o subsecuente a su incubación, bajo condiciones establecidas ahora en uso común. Estos estudios han mostrado alteraciones en la estructura de la capa endotelial, las cuales son causadas durante el breve periodo requerido para preparar al tejido para su incubación, en donde las células endoteliales son dañadas y la integridad de algunos organelos internos modificada. Sin embargo, esto no significa

que se observaron cambios en la estructura del MLV (Morrison y cols 1977., Furchgott y Zawadzki, 1980).

b) Acción de fármacos.

La acción de los compuestos puede ser de dos tipos: el primero, el cual puede ser llamado de acción directa, resulta de la reacción del compuesto con determinados componentes de la célula del ML o con las células dependientes de actividad funcional. Estos componentes que son los comúnmente referidos como receptores del compuesto en cuestión.

El segundo tipo, el cual puede ser llamado de acción local indirecta, resulta de la interacción del compuesto con algún otro componente de la célula o del tejido adyacente, conduciendo la acumulación o liberación de una segunda sustancia, la cual ejerce una acción directa en la célula. En el caso de muchos compuestos es posible deducir de evidencias experimentales el tipo de acción ya sea directa o indirecta o ambos tipos combinados; mientras que en el caso de algunos compuestos el tipo de acción ejercida no es aún clara (Furchgott, 1955).

4.- ENDOTELIO VASCULAR.

El endotelio vascular es un amplio y necesario sistema compuesto de una monocapa de células endoteliales (Highsmith y cols., 1992). Así, esta capa endotelial está ubicada para una variedad de papeles clave en la modulación del tono vasomotor (Moncada y cols., 1976). Se sabe actualmente que el endotelio vascular es un sitio de procesos bioquímicos activos, como la conversión e inactivación de polipéptidos, prostaglandinas, nucleótidos y aminas. Además,

convierte precursores inactivos en productos vasoactivos (Smith, 1990; Highsmith y cols., 1992).

a) Propiedades del endotelio vascular.

El endotelio juega un importante papel en la hemostasis fisiológica (Todd, 1959; Wabel y Palade, 1964; Spaet y Erichson, 1966; Tranzer y Baumgarther, 1967; Warren y Bono, 1970; Stemerman y Spaet, 1972; Zeldis y cols., 1972; Becker y Nachman, 1973), mediante el revestimiento de las superficies (Robbins, 1988) y en la respuesta de los vasos sanguíneos a estímulos fisiológicos y patológicos (Ryan y cols., 1970; Didisheim, 1972; Fanburg y Glazier, 1972; Smith y Ryan, 1972; Strum y Junod, 1972). Las anomalías en la estructura y función del endotelio para el transporte, puede contribuir significativamente en desordenes de la pared de los vasos sanguíneos, tal como: trombosis, arteriosclerosis, vasculitis e hipertensión (Spaet y Ts'ao, 1969; Wolinsky, 1970; Stemerman y Spaet, 1972; Didisheim, 1972; Bobik y Campbell, 1993), esta diferenciación en función es debida a la diferente organización de las células; invasión, propiedades de la membrana y receptores (Creed, 1979). Además, el endotelio puede sintetizar y secretar proteínas de material celular y tejido conectivo de la membrana basal: elastina, proteoglicanos y colágeno (Todd y Freedman, 1972; Jurokova y cols., 1976), también posee una función sensitiva desempeñada por los neuropéptidos (Robbins, 1988).

La integridad del endotelio es un requerimiento fundamental para conservar la estructura y función normal de la pared vascular. Cualquier alteración de la función de las células endoteliales, particularmente una disminución en su capacidad para migrar y proliferar, puede inhibir más bien que promover curación de la lesión. Los vasos sanguíneos sufren una marcada constricción cuando la producción de óxido

nítrico (ON) es inhibida por las células endoteliales (Furchgott y Zawadzki, 1980; Moncada y Higgs, 1991). Así, la eliminación de este vasodilatador natural de los vasos, puede ser causa también de la vasoconstricción observada en las regiones carentes de células endoteliales. Recientemente, se ha observado que la actividad de la óxido nítrico sintetasa (ONS), puede ser inducida en MLV de el fenotipo sintético (Beasley y cols., 1991; Schini y cols., 1991) y ahí, en ausencia de endotelio, las células del ML son capaces de formar un posendotelio con la superficie laminar de los vasos en los cuales, largas áreas de endotelio han sido removidas. La capa modificada de posendotelio del ML puede revertir esa constricción por medio de la producción de ON o de la producción de otro relajante vascular e inhibidor del crecimiento (O'Brien y cols., 1987; Beasley y cols., 1991; Schini y cols., 1991; Bobik y Campebl, 1993).

Esta capa de células del ML, es un auténtico endotelio, no trombogénica y con el tiempo produce grandes cantidades de la prostaglandina I₂ (Eldor y cols., 1981). Se ha propuesto que la exposición de células endoteliales a compuestos que inducen la relajación, es seguida de una serie de eventos, que relajan el ML (Rapaport y Murad, 1983). Por lo que, el efecto inductor de estos compuestos relajantes dependen de la presencia de endotelio, ya que, si esta capa de células es eliminada al adicionar estos compuestos relajantes, el efecto no se manifiesta (Furchgott y Zawadzki, 1980).

b) Composición del endotelio.

La membrana basal del endotelio contiene colágena tipo IV y V, laminina, heparan, sulfato de proteoglican y una cantidad variable de fibronectina (Bobik y Campbell, 1993). El cuerpo central de estas células es ensamblado con la neonitina,

ésta contiene grandes cantidades de RSR y ribosomas libres. Como otros endotelios, el arterial normal es una membrana semipermeable, pero sus características precisas de permeabilidad son temas de discusión (Jaffe, 1983).

En la mayor parte de las regiones arteriales las uniones intercelulares normalmente son impermeables a una gran variedad de moléculas, pero son estructuras relativamente lábiles que pueden ensancharse por influencia de factores hemodinámicos (como presión arterial elevada) y posiblemente agentes vasoactivos (Hütter, 1982). Por lo tanto, esta capa celular, apenas visible en los cortes histológicos rutinarios, no es una simple membrana pasiva como se pensaba, sino un participante activo en la interacción de sangre y tejidos (Fishman, 1982; Jaffe, 1983). El importante papel del endotelio en la modulación de la reactividad de ML a varios compuestos ha sido aceptada (Tetsuda y cols., 1993).

Previos estudios indican que como resultado de la anoxia, el ML responde con contracción y este fenómeno es mediado en parte por un decremento en la liberación del factor relajante derivado del endotelio (FRDE). El papel de las plaquetas que relajan vasos sanguíneos por estímulo de FRDE liberado o la contracción producida por anoxia, no es conocido (Yang y cols., 1993).

c) Clasificación.

Es común clasificar al endotelio de acuerdo a su estructura y función en dos grandes grupos: los de revestimiento y los glandulares. Este criterio encierra cierto grado de arbitrariedad, ya que existe endotelio de revestimiento donde todas las células secretan moco (endotelio de revestimiento del estómago), o también donde

sólo algunas células son glandulares (células caliciformes del endotelio de la tráquea y del intestino) (Fishman, 1982; Jaffe, 1983).

d) Factores liberados del endotelio.

Factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP). Este compuesto fue descubierto por Kohler y Lipton en 1974, como el principal mitógeno integro del suero sanguíneo, actuando en cultivo de células del mesénquima. Este no es el único mitógeno liberado por plaquetas activas, pero es ocupado por el 50% de la actividad miogénica (Heldin y cols., 1981). El termino FCDP es conocido a causa de su intervención en los productos de células tales como las endoteliales (Dicorleto y Bowen-Pope, 1983), en el MLV (Seifert y cols., 1984; Nilsson y cols., 1985) y activador de monocitos/macrófagos (Shimokado y cols., 1985; Martinet y cols., 1986).

En el sistema cardiovascular, células endoteliales, capilares y arteriales, células de MLV y fibroblastos son capaces de sintetizar el factor ácido y básico de crecimiento de fibroblastos, además de producir y liberar endotelinas.

Las endotelinas (ETS), son un grupo de pequeños péptidos secretados por células del endotelio vascular y ML (Yanagisawa y cols., 1988; Sokolovsky, 1991). Tres diferentes isoformas han sido identificadas ET-1, ET-2 y ET-3. La secreción de ET-1 (Yanagisawa y cols., 1988) parece estar involucrada en el sistema microtubular (Kitazumi y cols., 1991). Esta secreción de ET-1 de células endoteliales puede ser estimulada por hipoxia (Kourembanas y cols., 1991) y por una variedad de substancias, incluyendo trombina, factor trasformante de crecimiento, vasoprecina-arginina y angiotensina II (Emori y cols., 1991).

Algunas evidencias implican a la ET-1 en la patofisiología o hipertrofia de los vasos y lesiones artereoscleróticas. La ET-1 estimula la proliferación de células de ML (Bobik y cols., 1990) y síntesis de ADN (Hirata y cols., 1989). Los niveles en plasma de ET-1 son incrementados en pacientes hipertensos (Saito y cols., 1990), tanto como en pacientes con lesiones artereoscleróticas (Lerman y cols., 1991). En este último grupo, los niveles de ET-1 en plasma correlacionan directamente con el número de lesiones vasculares; ET-1 fue también detectada dentro de las lesiones, presumiblemente en células de ML. Normalmente, la ET-1 se localiza en la capa de células endoteliales (Hiroe y cols., 1989; Miyauchi y cols., 1990), es un potente vasoconstrictor de la irrigación uterina y es considerablemente más potente que NA y fenilefrina (Yang y Clark, 1992). Estas observaciones se correlacionan con los trabajos de Fried y Samuelson (1991), quienes reportaron este tipo de efectos en arterias uterinas y venas humanas.

El factor relajante derivado de endotelio (FRDE) es un compuesto producido localmente, causa relajación en MLV en preparaciones *in vivo* e *in vitro* (Furchgott y Zawadzki, 1980; Griffith y cols., 1984). Es liberado en respuesta a incrementos de flujo sanguíneo y sustancias vasoactivas como por ejemplo Ach y adenina (Furchgott y Zawadzki, 1980; Griffith y cols., 1984; Cocks y cols., 1985; Buga y cols., 1991). Se sabe que el FRDE y ON tienen propiedades químicas y farmacológicas similares, esto conduce a la sugerencia que FRDE puede ser ON (Palmer y cols., 1987; Moncada y cols., 1988). El ON es producido y liberado de las células endoteliales durante la conversión enzimática de L-arginina a L-citrulina (Palmer y cols., 1988; Schmidt y Klein, 1988), demostrándose que análogos de L-arginina pueden actuar como inhibidores competitivos de la ONS, reduciendo la producción de ON (Rees y cols., 1989; 1990). El efecto vasodilatador de ON y

FRDE se sabe que es finalmente mediado por estimulación de la guanilato ciclasa soluble (Johns y cols., 1990).

La relajación dependiente del endotelio, la cual fue subsecuentemente demostrada en muchas preparaciones, incluyendo algunas venas, arterias y micro vasos, ocurre en respuesta a una variedad de sustancias, tales como; Ach, adenina, nucleótidos, trombina, sustancia P, el ionóforo de calcio A23187 y bradicinina. Otras condiciones como la hipoxia, incrementos en flujo y la estimulación eléctrica, también causan relajación dependiente del endotelio de tejido vascular *in vitro*. No obstante, algunos compuestos, tales como los nitrovasodilatadores, agonistas β -adrenérgicos y prostaciclina, inducen relajación vascular por mecanismos independientes de la presencia del endotelio (Moncada y cols., 1976; Furchgott y Zawadzki, 1980; Griffith y cols., 1984; Busse y cols., 1985).

A pesar de la potente acción vasodilatadora de Ach *in vivo*, este neurotransmisor no siempre produce relajación de preparaciones aisladas de vasos sanguíneos *in vitro*. Por ejemplo, en tiras helicoidales de aorta torácica descendente de conejo, la única respuesta reportada para Ach, ha sido a concentraciones graduadas, ocurriendo a concentraciones mayores de 0.1 μ M y mediada por receptores muscarínicos (Furchgott y Bhadoakom, 1953; Furchgott, 1955). Además, se ha observado que en anillos de aorta torácica de conejo, Ach produce una marcada relajación a concentraciones menores que las requeridas para inducir contracción (Furchgott y Davison, 1979; Furchgott y Zawadzki, 1979).

Esta aparente discrepancia en la pérdida de relajación por Ach en el caso de tiras, fue el resultado de un raspado no intencional de la superficie íntima con la superficie del equipo de cirugía durante la preparación del tejido, en el cual; ya sean

anillos, tiras transversales o helicoidales, siempre mostraron relajación a Ach. La relajación de Ach en preparaciones aisladas de aorta torácica de conejos y otros vasos sanguíneos requieren la presencia del endotelio, de igual manera que la relajación inducida por algunas hormonas en MLV, donde de algún modo se activa una secuencia de reacciones en las cuales el ácido araquidónico (o algunos otros ácidos grasos insaturados) es liberado y luego oxidado por lipoxigenasa, dando un producto que es responsable de la relajación en las células del ML (Van Voorde y Leusen, 1982ab). Este producto oxidado que es liberado es sensible a peróxido o radicales libres como: hidroquinona, el cual es un antioxidante y radical libre que actúa inhibiendo la relajación. El ácido liberado puede provocar elevación o disminución de las contracciones inducidas por agonistas adrenérgicos; estas respuestas son igualmente dependientes de la integridad del endotelio (De Mey y Vanhoutte, 1982; Singer y Peach, 1983; Miller y Vanhoutte, 1985), de no ser este ácido graso oxidado, pudiera ser algún otro ácido graso insaturado, como quinacrina, un inhibidor de la fosfolipasa A₂, inhibidores de agonistas-inductores dependientes del endotelio. El ácido graso puede ser oxidado por anoxia o mediante la inhibición de cicloxigenasa y/o lipoxigenasa, dando como resultado inhibición de la relajación (Furchgott y Zawadski, 1980; Furchgott, 1981).

Los efectos vasodilatadores de nitroprusiato y nitroglicerina, se piensa puedan ser mediante la activación de la guanilato ciclasa y formación de GMPc (Katsuki y cols., 1977; Katsuki y Murad, 1977; Schultz y cols., 1977) como resultado de la activación de fosfolipasa, debido a que cuando se inhibe fosfolipasa, se revierte parcialmente la relajación inducida por Ach.

La eliminación del endotelio previene el efecto relajante de nitroprusiato y nitroglicerina, además de prevenir el incremento de los niveles de GMPc.

(Rapoport y Murad, 1983). Estos compuestos probablemente inducen la formación de ON el cual activa la guanilato ciclasa (Arnold y cols., 1977; Katsuki y cols., 1977). La guanilato ciclasa puede ser activada con radicales hidroxilo libres (Mettal y Murad, 1977), ácidos grasos insaturados (Walch y Pastan, 1976; Glass y cols., 1977) y peróxidos lipídicos (Hidaka y Asano, 1977).

Los compuestos contráctiles así como el ionóforo de calcio A23187, han mostrado incrementar los niveles de GMPc en una variedad de ML (Dunham y cols., 1974; Clyman y cols., 1975; Diamond y Blisard, 1976; Katsuki y Murad, 1977).

En un estudio sistemático en ratas del efecto de histamina en preparaciones aórticas precontractadas con NA, se observó que la histamina produce relajación, mientras preparaciones de aorta de otras especies (conejo, gato, cobayo), muestran una respuesta bifásica o únicamente contracción (Van Voorde y Leusen, 1982a). Todas estas preparaciones reaccionan con una relajación tras la adición de Ach (Furchgott y Zawadzki, 1980; Lee, 1980; Chand y Altura, 1981; Singer y Peach 1983).

5.-EFECTO DE ESTERIOIDES EN MUSCULO LISO VASCULAR.

El efecto depresivo (anestésico) de los esteroides 5-reducidos sobre la actividad cerebral ha sido mostrado desde hace más de 50 años (Selye, 1941; 1942), aunque también ha sido reportado un efecto membranar en eritrocitos (Seeman, 1972). En el sistema nervioso central (SNC), los efectos más evidentes son en registros electroencefalográficos, donde los esteroides producen sincronización y cambios en

la actividad multiunitaria, así como caída del disparo neuronal en estructura límbica y formación reticular mesencéflica (Kubli-Garfias y cols., 1976; 1982),

La regulación de la contracción espontánea uterina por hormonas sexuales, fue observada en estudios realizados con estrógenos y progesterona (P_4) en útero de conejas ovariectomizadas, mostrándose que tiras uterinas pretratadas con estrógenos aumentaban la tensión al ser estimuladas eléctricamente, pero la revertían si los animales eran pretratados con P_4 (Csapo y Corner, 1952).

La modulación de la contractilidad uterina por progestinas y andrógenos ha sido bien establecida como una acción relajante (Kubli-Garfias y cols., 1979; 1980). Demostrando que el útero preñado también es sensible a la acción relajante de estos compuestos (Kubli-Garfias y cols., 1983b). También se ha reportado que los corticosteroides producen un marcado efecto relajante sobre las contracciones espontáneas del útero de ratas (Perusquia y cols., 1986). En uréter, intestino delgado y estómago, Kumar (1962) reportó un efecto relajante de P_4 . Por otro lado, Bruce y Behsudi (1979, 1980), mostraron que P_4 a concentraciones fisiológicas afecta también la contractilidad del esófago y del colon, siendo el íleo de cobayo igualmente sensible a la acción de progestinas, andrógenos y corticosteroides (Kubli-Garfias y cols., 1987b). Este efecto relajante de las hormonas esteroides es también observado en otras clases de ML, como en el epidídimo y la vesícula seminal de rata donde el tejido es estimulado con NA o bario (Kubli-Garfias y cols., 1983c).

El aumento de presión y por consiguiente la estimulación del flujo sanguíneo por estrógenos, ha sido demostrada en numerosas especies, incluyendo ovejas ovariectomizadas (Killam y cols., 1973; Resnik y cols., 1974; 1976, Levine y

cols.,1984). Sin embargo, son pocos los trabajos que existen con respecto al efecto de esteroides en MLV, en donde pregnanolona ha mostrado un efecto relajante en arterias coronarias aisladas de perro contraídas con ergonovina o cloruro de potasio (Lara-Lemus y cols., 1986), de igual manera se ha reportado que la androsterona disminuye la contractilidad de aurículas aisladas de rata (Rojas-Mejía y cols., 1986).

Otros autores han mostrado que los andrógenos; 5 α - y 5 β -dihidrotestosterona (DHT), aumentan la fuerza de contracción a una concentración de 10⁻⁹M y la disminuyen a 10⁻⁸M en aurículas aisladas de rata en las cuales el tejido es estimulado eléctricamente (García-Valencia y cols., 1989).

Por otra parte se ha reportado que el tratamiento crónico con estrógenos, aumenta el efecto contráctil dependiente de endotelio inducido por ácido araquidónico y prostaglandinas, en aorta de conejo (Miller y Vanhoutte, 1990). También se ha descrito que implantes subcutáneos de P₄ (14 a 21 días antes del experimento) afecta mínimamente las respuestas dependientes de endotelio en arteria coronaria de perro (Miller y Vanhoutte, 1991). Posteriormente se ha mostrado que el estradiol disminuye el tono muscular de la arteria uterina de mujeres posmenopáusicas (Hillard y cols., 1992).

Otros estudios han reportado que la L-nitroarginina metil éster antagoniza el efecto vasodilatador de 17 β -estradiol en la vasculatura uterina, sugiriendo que el ON es necesario para mediar la vasodilatación producida por 17 β -estradiol (Van Buren y cols., 1992). Lo cual propone que la respuesta de los estrógenos es endotelio dependiente, pero que los mediadores responsables de la vasodilatación inducida por estrógenos, es aún desconocida (Van Buren y cols 1992).

El tratamiento con estrógenos no afecta uniformemente las relajaciones dependientes de endotelio en los vasos sanguíneos de conejo. Sin embargo, facilita la relajación dependiente de endotelio para Ach en arteria femoral (Gisclard y cols., 1988) y ovárica pero no en arteria mesentérica de conejo (Miller y cols., 1988). En aorta de conejos hembras hipertensas experimentalmente, la terapia de esteroides también eleva la relajación inducida por Ach, que es dependiente del endotelio (Willians y cols., 1988).

Estos resultados confirmaron que el tratamiento crónico con estrógenos incrementa la sensibilidad de los vasos sanguíneos a NA (Gisclard y cols., 1988; Miller y Vanhoutte, 1990). La acción de NA en los receptores adrenérgicos a elevadas concentraciones parece estimular la producción de sustancias contráctiles de células endoteliales de la aorta de conejo (Buonassisi y Verter, 1976).

Sobre la contractura de NA, la contracción endotelio dependiente inducida por ácido araquidónico fue elevada por estrógenos en aorta de conejos pretratados con 17 β -estradiol (Miller y Vanhoutte, 1990). El efecto del tratamiento de estrógenos sobre el endotelio puede involucrar cambios en la producción de algunos factores derivados del endotelio. Por otro lado, se ha reportado que P₄ afecta mínimamente la respuesta endotelio dependiente. El resultado de estos trabajos indica que hormonas esteroides pueden modular selectivamente la expresión de la relajación endotelio dependiente o independiente. (Miller y Vanhoutte, 1991).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha reportado que los esteroides 5-reducidos inducen relajación en diferentes tipos de ML, *i.e.*, uterino e intestinal, así como en el tracto reproductor masculino (epidídimo y vesícula seminal). Sin embargo, son pocas las evidencias que existen acerca de la acción de estos compuestos sobre la musculatura vascular y la participación que pueda tener el endotelio para ejercer su efecto. Los reportes existentes son controversiales en cuanto al efecto de estos compuestos en la musculatura vascular, ya que algunos autores reportan vasodilatación (Lara-Lemus y cols., 1986; Rojas-Mejía y cols., 1986; Burne y cols., 1992; Hillard y cols., 1992) y otros estudios han mostrado un efecto vasoconstrictor (García-Valencia y cols., 1989; Miller y Vanhoutte, 1991). Asimismo, existe información aislada que documenta sobre una acción vasodilatadora de estrógenos, a la que se le ha atribuido que es dependiente del endotelio (Van Buren y cols., 1992; Van Voorde y Leusen, 1982b).

Por lo anterior resulta interesante estudiar de manera sistemática, el efecto de un grupo de metabolitos de progesterona (andrógenos y progestinas 5-reducidos) sobre la aorta torácica aislada de rata y determinar la participación del endotelio en su acción.

III. HIPOTESIS.

Si los esteroides han mostrado ejercer un efecto relajante en diferentes tipos de músculo liso entonces, el músculo liso vascular puede ser blanco de la acción relajante de los esteroides 5-reducidos. Postulando así, que las hormonas esteroides puedan estar modulando la excitabilidad en general, en una forma no específica y que el efecto sea independiente de los factores relajantes derivados del endotelio, como ocurre en otros tipos de músculo liso libre de células endoteliales.

IV. OBJETIVOS.

a) OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de esteroides 4-en y 5-reducidos en músculo liso vascular de rata y relacionar su acción con la presencia de endotelio.

b) OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1) Construir la curva concentración-respuesta de progesterona, sobre la contracción inducida por noradrenalina, en presencia y ausencia de endotelio vascular de aorta torácica aislada de rata.
- 2) Obtener las concentraciones inhibitorias 16, 50 y 84 de progesterona en preparaciones con y sin endotelio.
- 3) Probar diferentes progestinas y andrógenos a una concentración equimolecular en ambos tipos de preparaciones.
- 4) Describir el efecto que ejercen los esteroides en la musculatura vascular.
- 5) Establecer la influencia del endotelio vascular, en la acción producida por los esteroides.
- 6) Hacer una relación de potencia de los diferentes metabolitos de progesterona y correlacionar su estructura química con su actividad biológica.

V. MATERIAL Y METODOS.

a) MODELO BIOLOGICO.

Para este estudio se utilizaron ratas machos adultas de la cepa Wistar de aproximadamente 200-300 g de peso, alimentadas con Purina-Mills (PMI 5001 Feeds, Inc.) y agua *ad libitum*, mantenidas en un bioterio con un ciclo luz/obscuridad de 12hr luz/12hr obscuridad.

Los animales utilizados fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente después, mediante una incisión en el tórax, se disecó la aorta torácica de la porción descendente; situada entre el corazón y el diafragma. Una vez separada del tejido conectivo circundante, utilizando material de microcirugía: tijeras de iris Barquer de 2¼ pulgadas, de iris rectas de 4 pulgadas, de mayo rectas de 5½ pulgadas y pinzas de disección finas rectas de 4 pulgadas. La aorta se colocó en una caja de petri, la cual contenía solución Ringer Krebs-Henseleit (K-H) con la siguiente composición (mM): Glucosa 12.0, NaHCO₃ 24.9, NaCl 118.5, KCl 4.74, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.18 y CaCl₂ 2.5. La solución fue preparada con agua desionizada, mantenida a 37°C y el pH se ajustó a 7.4 mediante burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ en 95% de O₂.

En estas condiciones se evitó al máximo la manipulación del tejido y posible daño. Así, la aorta fue disecada. Posteriormente fue cortada en anillos de aproximadamente 1 cm de longitud.

Para este estudio se obtuvieron preparaciones con y sin endotelio; las primeras fueron disecadas en la forma antes mencionada, con el objeto de obtener el endotelio intacto. Mientras que las preparaciones sin endotelio se obtuvieron raspando gentilmente el lumen, mediante la introducción de hilo de nylon trenzado en la luz de la aorta, con el fin de eliminar la capa de células endoteliales y así, obtener un tejido libre de ellas.

b) SISTEMA DE REGISTRO.

Los anillos de aorta fueron suspendidos horizontalmente por dos ganchos de acero inoxidable en forma de "L" (Fig. 1A), evitando cuidadosamente el daño tisular. Así, uno de los ganchos se sujetó de un extremo a la base de una cámara de incubación para tejido aislado (Fig. 1B), con un volumen de 10 ml de solución K-H y el otro gancho fue amarrado a un hilo de seda de 000 y este a su vez, sujetado a un transductor Grass, modelo FTO3C (Fig. 1C), el cual detectó las señales mecánicas y las envió a un polígrafo Grass, modelo 79 de 4 canales (Fig. 1D).

Los anillos fueron sometidos a una fuerza de 10 mN (1g de tensión), lo cual corresponde a 2 cm de desplazamiento de la pajilla.

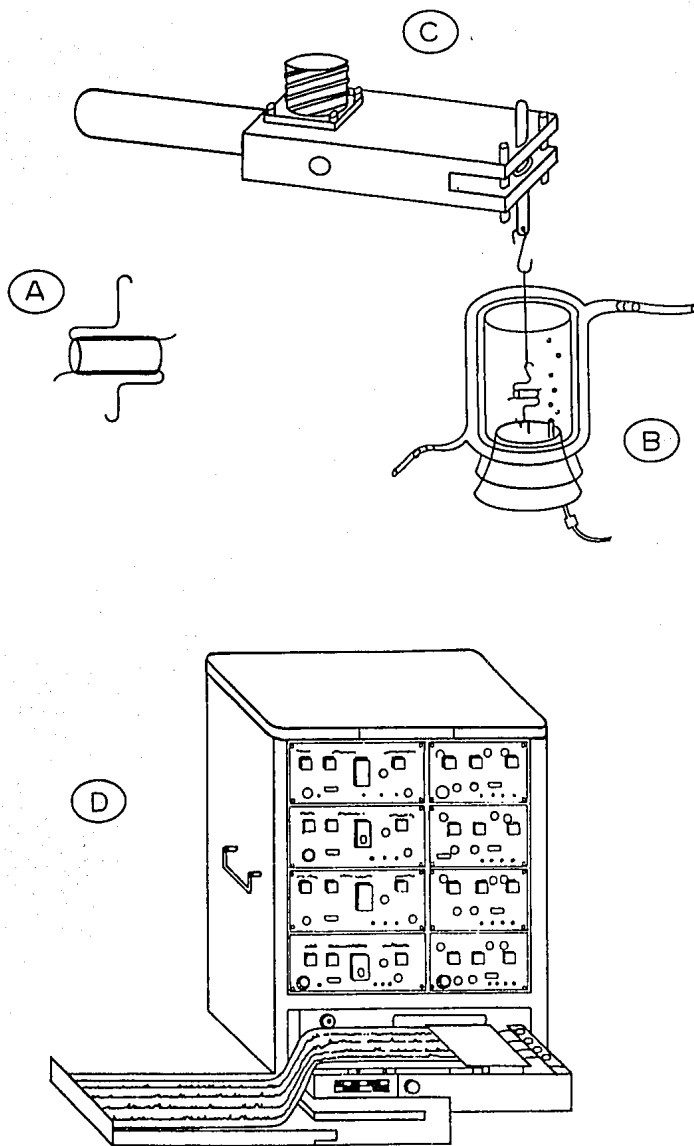


Figura 1. Sistema de registro: A) Anillos sujetos por dos ganchos de acero inoxidable, B) Cámara de incubación, C) Transductor, D) Polígrafo.

c) DESARROLLO EXPERIMENTAL.

1) Preparaciones con endotelio.

Después de un período de estabilización de 1h, con la finalidad de adaptar al tejido a las condiciones *in vitro*, los anillos aórticos fueron incubados en solución K-H, posteriormente se adicionó a la cámara noradrenalina (NA), a una concentración final de 0.3 μM y la contracción fue registrada durante 30 min con la finalidad de estandarizar la respuesta a NA, se provocaron dos contracciones más con NA 0.3 μM con el objeto de observar que la respuesta fuera reproducible. Además, con ello determinar las condiciones de experimentación.

En los siguientes experimentos, la contracción tónica sostenida inducida por dicha concentración de NA, fue registrada durante 5 min y tomada como valor control, inmediatamente después, con el objeto de mostrar farmacológicamente la presencia de endotelio (Furchgott y Zawadzki, 1980; Rapoport y Murad, 1983), se adicionó acetilcolina (ACh) a una concentración de 20 μM y se registró, su efecto durante 20 min. Considerando la presencia de endotelio cuando se observó un efecto relajante inmediato sobre la contracción inducida por NA, únicamente se ensayaron las preparaciones donde la ACh provocó una relajación mayor al 40% (Furchgott y Zawadzki, 1980; Rapoport y Murad, 1983).

Después de 20 min de la adición de ACh, los tejidos fueron lavados con solución K-H hasta que la contracción regresó a su línea basal original y dejando al tejido reposar durante 1h para su adaptación al medio. Posteriormente, se indujo nuevamente la contracción tónica sostenida por NA 0.3 μM y 5 min después, se

adicionó a la cámara de incubación progesterona (P₄) a 3 diferentes concentraciones y su efecto fue registrado durante 20 min (una concentración por cada experimento).

Con estos valores se construyó la curva concentración-respuesta de P₄ sobre la contracción inducida por NA en la aorta torácica con endotelio presente. Una vez hecha la observación, el tejido fue nuevamente lavado con solución K-H y 1h después (tiempo de recuperación del tejido), la contracción fue inducida una vez más con NA 0.3 μ M, observando la respuesta por 20 min con la finalidad de ver la recuperación de la contracción, así como la viabilidad del tejido.

2) Preparaciones sin endotelio.

En estas preparaciones, el lumen de los anillos aórticos fue previamente raspado, antes de ser montado en las cámaras de incubación y de la misma manera que en las preparaciones con endotelio, primero se estandarizaron las condiciones del tejido; después del período de estabilización se provocaron 3 respuestas contráctiles de NA 0.3 μ M, registrando cada estimulación durante 30 min, para de esta manera estandarizar que la respuesta a NA fuera constante y sin variación.

En otros experimentos, la contracción tónica sostenida inducida por NA se registró durante 5 min, después de los cuales se adicionó ACh (20 μ M) y se registró su efecto durante 20 min. Solamente fueron consideradas las preparaciones sin endotelio cuando ACh no modificó la contracción inducida por NA, de acuerdo a lo descrito por Furchgott y Zawadzki (1980), Rapoport y Murad (1983). Posteriormente los tejidos fueron lavados con solución K-H, cuando la pajilla regresó a la línea basal, se dejó reposar a los tejidos durante 1h, antes de inducir la

contracción tónica sostenida por NA 0.3 μ M, 5 min posteriores a la contracción, se adicionó a la cámara de incubación P₄ a 3 diferentes concentraciones (una por cada experimento) y su efecto fue registrado por 20 min.

A continuación el tejido fue nuevamente lavado con solución K-H, dejándolo estabilizar también durante 1h, para inducir nuevamente la contracción tónica sostenida con NA a la misma concentración, registrando la respuesta por 20 min con la finalidad de observar la reproductibilidad de la contracción, así como la viabilidad del tejido.

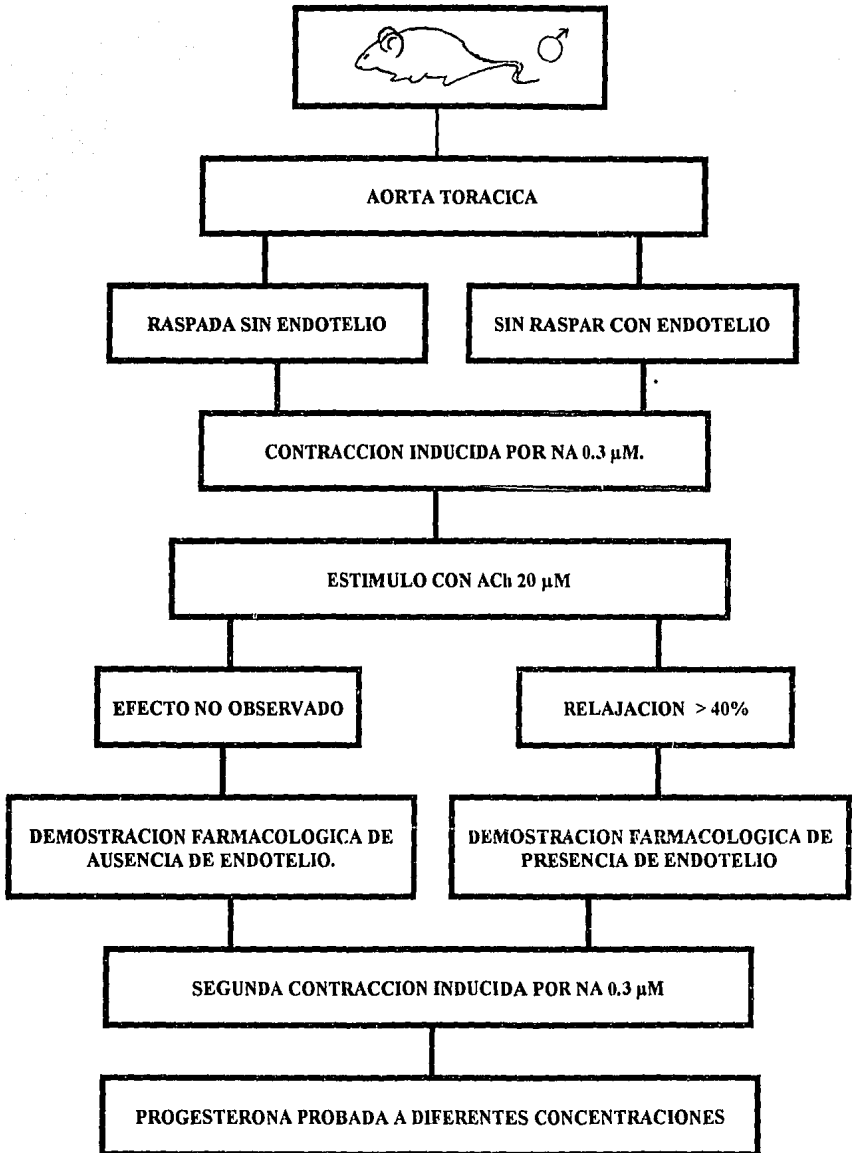


Figura 2: Representación esquemática de la estrategia experimental.

3) Observación morfológica del endotelio.

Con el objeto de comprobar morfológicamente la presencia o ausencia de endotelio en las preparaciones ensayadas, se fijaron los tejidos correspondientes con formaldehído al 3%.

Para observar la integridad del endotelio vascular, en condiciones normales, se realizó una perfusión intracardiaca con paraformaldehído al 4% en Buffer fosfatos 0.1M pH 7.4 a temperatura ambiente durante 45 min. Después se extrajo la aorta y se eliminó de ésta el tejido conectivo y adiposo. Inmediatamente el tejido fue colocado en 10 ml de paraformaldehído al 4% durante 24 hr y se lavó en solución Buffer fosfatos 0.1 M pH 7.4 a 4°C 48 hr.

Todas las preparaciones fueron deshidratadas en alcohol al 80% durante 6 hr a temperatura ambiente. Posteriormente se pasó a alcohol 96% (2 veces), alcohol absoluto (2 veces), alcohol-xilol 1:1 (2 veces), xilol (2 veces). La permanencia del tejido en cada solución fue de una hora, realizándose un cambio más de la misma solución antes de colocarlo en una solución diferente, finalmente el tejido se incluyó en parafina con un punto de fusión de 57°C.

Se obtuvieron cortes histológicos transversales de un espesor de 4 micras con la ayuda de un micrótopo (Modelo 820 Spencer, American Optical). Los cortes fueron colocados en portaobjetos con alcohol al 30% para facilitar su manipulación. Posteriormente las laminillas fueron colocadas en una estufa a 56°C para que los cortes se adhieran a la superficie del portaobjetos y se eliminara la parafina.

Inmediatamente las laminillas fueron teñidas para su observación morfológica con la técnica Hematoxilina-Eosina:

Hematoxilina de Harris.

Hematoxilina	10 g
Alcohol absoluto	100 ml
Alumbre de potasio	100 g
Oxido rojo de mercurio	2.5 g
Agua destilada	<u>900 ml</u>
	1000 ml

Calentar el agua con el alumbre hasta que este se disuelva. Adicionar la hematoxilina disuelta en alcohol absoluto y hervir lo más rápido posible. Dejar enfriar un poco y agregar el óxido de mercurio. Una vez fría colocarla en un frasco color ámbar y almacenarla a temperatura ambiente. La hematoxilina madura en 6 meses; si se desea usar inmediatamente, adicionarle de 2 a 4 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml y filtrarla.

Eosina Acuosa.

Eosina amarillenta	2.5 g
Agua destilada	100 ml
Alcohol absouto	<u>400 ml</u>
	500 ml

Disolver la eosina en agua destilada, y añadirle el alcohol absoluto. Agregar 2 gotas de ácido acético glacial por cada 100 ml de eosina para acelerar y estabilizar el colorante.

Alcohol Acido.

Alcohol absoluto	70 ml
Agua destilada	29 ml
Acido clorhídrico concentrado	<u>1 ml</u>
	100 ml

Agua amoniacal al 2%.

Agua destilada	98 ml
Hidróxido de amonio	<u>2 ml</u>
	100 ml

Desarrollo de la Tinción con "Hematoxilina-Eosina."

Fijar el corte histológico mediante calor. Después desparafinar de la siguiente manera: xilol 5 min (2 veces); Xilol-alcohol 1:1 2 min; alcohol absoluto 30 seg (2 veces); alcohol 95% (3 veces).

Hidratar el tejido con agua 20 seg. Inmediatamente proceder a hacer la tinción con Hematoxilina acuosa de Harris 3 min. Lavar con agua corriente 2 min; pasar a alcohol-ácido un baño rápido y lavar con agua corriente 2 min. Diferenciar los cortes con agua amoniacal, después lavar con agua corriente 2 min. Sumergir en eosina acuosa al 0.5% de 10 a 15 veces; pasar alcohol 96% 20 veces; alcohol absoluto 20 veces; alcohol-xilol 1:1 10 veces. Transferir a xilol 10 min y realizar dos cambios más, dejar en xilol 20 min más. Eliminar el exceso de xilol y montar las preparaciones en resina sintética al 60% en xilol. Las observaciones morfológicas se realizaron en un microscopio triocular (modelo OPTIPHOT-2, NIKON), del cual se tomaron las micrografías (400X) de los anillos aórticos con y sin endotelio así como en preparaciones intactas.

4) Curvas concentración-respuesta.

De las respuestas de progesterona (P_4) en ambas preparaciones (con y sin endotelio), fueron graficadas las curvas concentración-respuesta para obtener la concentración inhibitoria media (CI_{50}); la cual es la mitad de la respuesta máxima producida por la concentración de P_4 sobre la contracción inducida por NA. Los límites de confianza, las CI_{16} , CI_{50} , CI_{84} y el valor de la pendiente de la recta se obtuvieron por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

5) Efecto de los metabolitos de Progesterona.

Con el valor de la CI_{16} de progesterona se probaron los diferentes esteroides (progestinas y andrógenos Δ_4 , 5α y 5β reducidos) a una concentración equimolecular sobre las preparaciones consideradas previamente con presencia o ausencia de endotelio, según la respuesta a ACh.

d) ANALISIS DE LOS DATOS.

El efecto de ACh se cuantificó en porciento de inhibición de la relajación inmediata a su adición, midiendo la amplitud (altura) en cm de la contracción inducida por NA, justo antes de adicionar ACh, considerando esta medición como control (100% de respuesta), y el efecto se valoró en el punto más bajo de la relajación efectuada inmediatamente a la adición de ACh.

En la misma forma la respuesta de cada concentración de los diferentes esteroides probados, se evaluaron 8 veces. Se probó un compuesto por experimento, el efecto fue cuantificado a los 10 min de la adición del esteroide y el valor obtenido fue comparado con el valor control, considerado sobre la misma contracción de NA, justamente antes de añadir al baño el esteroide. Los datos fueron expresados en porcentaje de relajación \pm D.E. Además, se utilizó la prueba estadística de "t" de Student para comparar los valores en ambos grupos.

La valoración de estas mediciones se realizó midiendo la amplitud de la contracción inducida por NA en presencia y ausencia de esteroide, utilizando escuadras con graduación en centímetros.

La potencia del efecto para los diferentes esteroides de prueba se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Potencia} = \frac{\% \text{ de inhibición del metabolito.}}{\% \text{ de inhibición de progesterona.}}$$

Asignando el valor de uno al precursor de progestinas y andrógenos (Progesterona).

e) SUBSTANCIAS UTILIZADAS.

NORADRENALINA.

± Arterenol: Clorhidrato de Noradrenalina, ± Norepinefrina, 1-(3,4-dihidroxifenil)-2-aminoetanol, 4-(2-amino-1-hidroxietil)-1,2-benzonadiol, 2-amino-1-(3,4-dihidroxifenil)-etanol, de Sigma Chemical Co. St Louis MO. Solubilizada en agua desionizada. Utilizada para inducir la contracción tónica sostenida a una concentración final en la cámara de incubación de 0.3 μ M.

ACETILCOLINA.

Clorhidrato de acetilcolina, acecolina, arterocolina, 2-(acetiloxi)-N,N,N-Cloruro de trimetiletanamina, de Sigma Chemical Co. St Louis MO. Solubilizada en agua desionizada. Utilizada para mostrar la presencia de endotelio (respuesta endotelio dependiente) a una concentración final en la cámara de incubación de 20 μ M.

ESTEROIDES.

PROGESTINAS: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona); 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (pregnanolona, 5 β -pregnanolona) y 3 β -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona (5 α -pregnanolona, alopregnanolona).

ANDROGENOS: 17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona); 17 β -hidroxi-5 β -androstan-3-ona (5 β -dihidrotestosterona, 5 β -DHT) y 17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona (5 α -dihidrotestosterona, 5 α -DHT).

Los esteroides probados fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. St Louis MO.

Para disolver los esteroides se utilizó etanol absoluto (Alcohol Etilico, Merck-México, S. A.) a una concentración final en la cámara de incubación de 17.14 mM con un volumen de 0.1%. Previamente se realizaron los registros para observar que el vehículo no ejerciera efecto en la contracción inducida por NA.

VI. RESULTADOS.

1.- ESTANDARIZACION DE LA RESPUESTA A NA.

La estimulación de los receptores α_1 adrenérgicos por NA 0.3 μ M causa una contracción tónica sostenida inmediata (Cauvin y cols., 1982; 1984), la cual se mantiene durante el tiempo de experimentación (30 min). La respuesta en tres estímulos consecutivos de NA fue comparada entre sí, observándose que no se modificó el tono y la amplitud de la contracción durante 30 min, siendo esta reproducible. Además, el vehículo utilizado (etanol) para disolver los esteroides no causó efecto alguno sobre la contracción inducida por NA (fig. 3). Lo que indica que el efecto de los fármacos estudiados (esteroides), observado posteriormente, es debido a la acción del compuesto y no al vehículo.

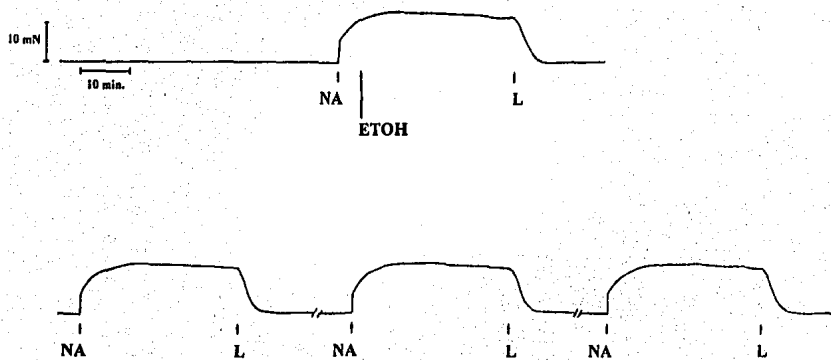


FIGURA 3. Registros que muestran la contracción tónica sostenida inducida por noradrenalina (NA 0.3 μ M) en anillos aórticos de rata. En la parte superior se muestra que el vehículo de los esteroides, etanol (ETOH 0.1%) no modifica el tono de la contracción. En la parte inferior se observa que el tono y amplitud de la contracción, así como la duración se mantiene constante en tres adiciones consecutivas de NA. El lavado (L) del tejido fue realizado por cambio de la solución Ringer.

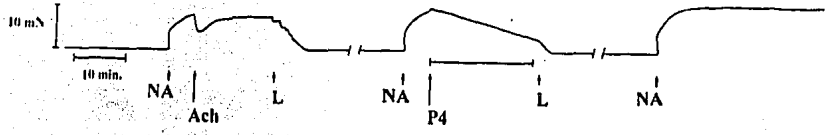
En las preparaciones donde se eliminó la capa endotelial (aorta raspada) se observó que Ach ($20\mu\text{M}$) no modificó el tono de la contracción inducida por NA, en contraste con las preparaciones con endotelio (aorta sin raspar), donde Ach provocó una relajación $> 40\%$ (Fig. 4). lo cual muestra que el efecto de Ach es endotelio-dependiente. Esta estimación, fue verificada al observar en los cortes histológicos que en los anillos raspados no se observa la capa de células endoteliales y en los anillos intactos se visualiza claramente la monocapa de células endoteliales (fig. 5).

2. RESPUESTA ENDOTELIO DEPENDIENTE.

La relajación producida por progesterona (P_4) sobre la contracción inducida por NA fue observada mediante una disminución paulatina de la amplitud de la contracción.

A diferentes concentraciones, la P_4 produjo relajación de la contracción inducida por NA en ambos tipos de preparaciones *i.e.* con y sin endotelio (Fig. 4), donde se observa que el efecto, a diferentes concentraciones ($n=8$), sigue una linealidad dependiente de la concentración (gráfica I). Se observó que el efecto de P_4 en las preparaciones sin endotelio resultaron significativamente diferentes ($P < 0.00005$) con respecto a su efecto en preparaciones con endotelio (tabla I).

AORTA SIN RASPAR



AORTA RASPADA

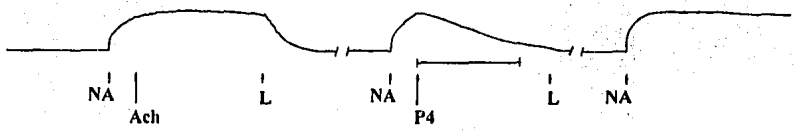


Figura 4. Arriba: registro típico de las preparaciones con endotelio (aorta sin raspar) del efecto relajante inducido por acetilcolina (Ach 20 μ M), sobre la contracción de noradrenalina (NA 0.3 μ M) y el efecto relajante de progesterona (P4 70 μ M) sobre una segunda contracción de NA. Abajo: preparaciones sin endotelio (aorta raspada), que muestra que la contracción inducida por NA (0.3 μ M), no es afectada por Ach (20 μ M), sin embargo, el efecto relajante de P4 (70 μ M), es observado en una posterior contracción de NA. Nótese la recuperación de la contracción en la tercera estimulación por NA después de lavado (L) el tejido en ambos tipos de preparaciones.

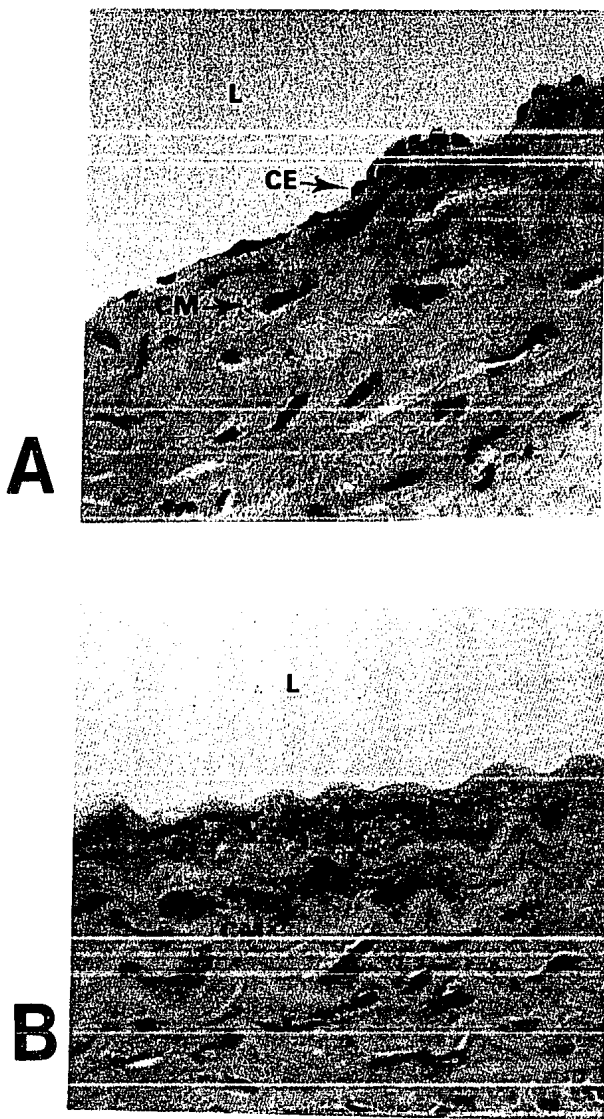


Figura 5. Micrografía, corte transversal de aorta torácica de rata 400X. A) Preparación de aorta con endotelio (sin raspar). B) Preparación de aorta sin endotelio (raspada). Las flechas indican la ubicación de las células endoteliales (CE), células musculares (CM) y el lumen (L).

TABLA I.

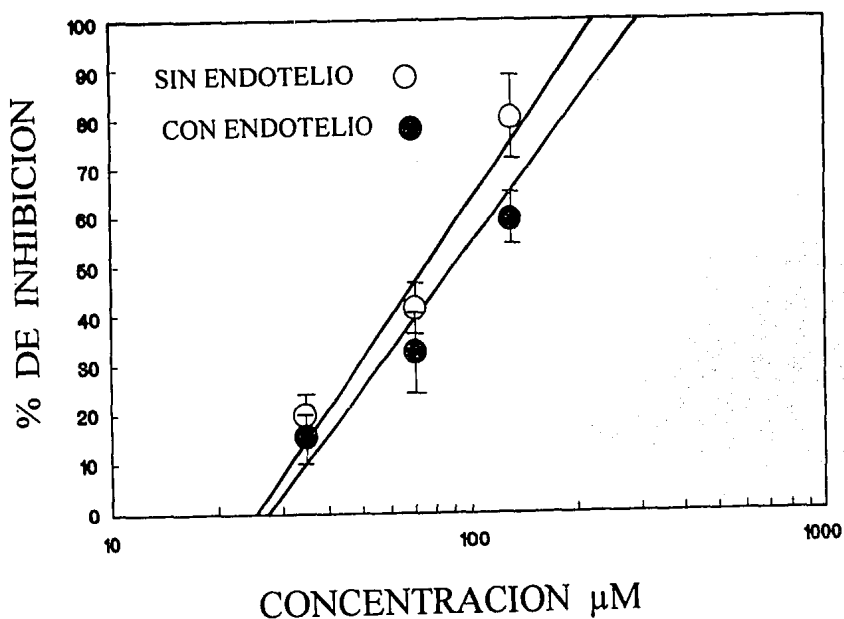
EFFECTO DE PROGESTERONA EN PREPARACIONES CON Y SIN ENDOTELIO DE LA AORTA TORACICA DE RATA *IN VITRO* SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR NORADRENALINA.

CONCENTRACION (μM)	PORCENTAJE DE INHIBICION. $n \geq 8 \pm \text{D.E.}$	
	CON ENDOTELIO	SIN ENDOTELIO
35	15.09 ± 5.08	20.75 ± 3.66
70	33.14 ± 8.66	42.63 ± 5.63
140	60.40 ± 5.12	81.96 ± 8.48

Los valores de las preparaciones sin endotelio resultaron ser significativamente diferentes $p < 0.00005$.

El comportamiento de la acción relajante de P_4 fue dependiente de la concentración. Esto podemos constatarlo en la curva concentración-respuesta

(gráfica I), donde se puede observar que la potencia de esta hormona para inducir relajación es mayor en las preparaciones sin endotelio.



Gráfica I. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de progesterona (P_4) sobre la contracción inducida por NA $0.3 \mu\text{M}$, en aorta torácica de rata tanto en presencia (\bullet) como en ausencia (\circ) de endotelio. Los puntos representan las medias de 8 experimentos y las barras verticales la desviación estándar. Nótese una mayor pendiente para el efecto de P_4 en preparaciones sin endotelio.

La pendiente del efecto de P₄ fue mayor en las preparaciones sin endotelio (tabla III). Asimismo, los datos obtenidos para las concentraciones inhibitorias, reflejan que los tejidos sin endotelio son más sensibles a la acción de P₄ (Tabla II y III).

TABLA II.

CONCENTRACIONES INHIBITORIAS DEL EFECTO RELAJANTE DE PROGESTERONA SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR NORADRENALINA EN LA AORTA TORACICA AISLADA DE RATA.

ANILLOS AORTICOS	CI ₁₆ (μ M)	CI ₅₀ (μ M)	CI ₈₄ (μ M)
CON ENDOTELIO	41.5	99	235
SIN ENDOTELIO	30	72	180

CI= Concentración inhibitoria obtenida por interpolación en la grafica I.

TABLA III.

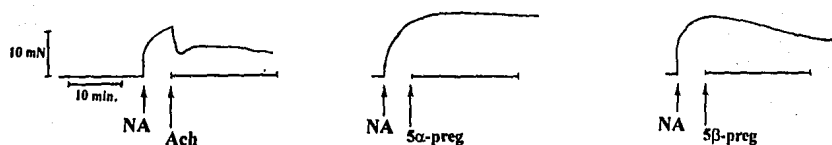
CONCENTRACION INHIBITORIA MEDIA DE PROGESTERONA SOBRE LA CONTRACCION DE NORADRENALINA EN AORTA TORACICA DE RATA *IN VITRO*; EN PREPARACIONES CON Y SIN ENDOTELIO, ASI COMO SUS LIMITES DE CONFIANZA Y EL VALOR DE LA PENDIENTE DE LA RECTA.

ANILLOS AORTICOS	CI ₅₀ (μ M)	LIMITES	PENDIENTE
		INFERIOR--SUPERIOR.	
CON ENDOTELIO	99	58.62-----167.18	0.4225
SIN ENDOTELIO	72	43.38-----119.49	0.5799

Los metabolitos de la P₄ (pregnanolona, alopregnanolona, testosterona, 5 α - y 5 β -DHT) que fueron valorados equimolecularmente a la CI₁₆ de P₄ tanto en ausencia (a 30 μ M) como en presencia (a 41.5 μ M) de endotelio, mostraron un efecto relajante. Sin embargo, resultaron ser más activos para inducir relajación de la contracción de NA en las preparaciones sin endotelio, con excepción de la

progestina 5α (alopregnanolona) que no mostró modificación de la contractura de NA en ambos tipos de preparaciones, siendo así inefectiva (fig. 6 y tabla IV).

AORTA SIN RASPAR



AORTA RASPADA



Figura 6. Arriba: Registro de preparaciones con endotelio (aorta sin raspar) mostrando el efecto relajante inducido por acetilcolina (Ach $20 \mu\text{M}$), sobre la contracción provocada por noradrenalina (NA $0.3 \mu\text{M}$), nótese que la adición de 5α -pregnanolona (5α -preg. $41.5 \mu\text{M}$) no causa efecto en la contracción de NA, contrastantemente al efecto relajante de 5β -pregnanolona (5β -preg. $41.5 \mu\text{M}$). Abajo: Preparaciones sin endotelio (aorta raspada) que muestra que Ach ($20 \mu\text{M}$) no afecta la contracción inducida por NA ($0.3 \mu\text{M}$), observese que la adición de 5α -pregnanolona (5α -preg. $30 \mu\text{M}$), no modifica la contracción inducida por NA; sin embargo, se observa el efecto relajante de 5β -pregnanolona (5β -preg. $30 \mu\text{M}$).

TABLA IV.

EFFECTO DE ANDROGENOS Y PROGESTINAS SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR NORADRENALINA EN AORTAS CON Y SIN ENDOTELIO A LA CONCENTRACION EQUIMOLECULAR DE PROGESTERONA.

ESTEROIDES	CON ENDOTELIO % DE INHIBICION (41.5 μ M). n \geq 8 \pm D.E.	POTENCIA.*	SIN ENDOTELIO % DE INHIBICION (30 μ M). n \geq 8 \pm D.E.	POTENCIA.*
<u>PROGESTINAS</u>				
PROGESTERONA	17.85 \pm 5.81	1.00	20.20 \pm 5.17	1.00
5 β - PREGNANOLONA	24.88 \pm 6.72 †	1.39	28.49 \pm 5.59 †	1.41
5 α - PREGNANOLONA	SIN EFECTO	0	SIN EFECTO	0
<u>ANDROGENOS</u>				
TESTOSTERONA	17.29 \pm 2.1	0.96	18.41 \pm 3.59	0.91
5 β -DHT	38.23 \pm 13.28 †	2.14	33.29 \pm 2.52 †	1.64
5 α -DHT.	26.70 \pm 6.65 †	1.49	23.59 \pm 6.86	1.16

* Relación de potencia obtenida por la formula: % de inhibición del metabolito / % de inhibición de progesterona. Asumiendo un valor de 1 a progesterona.

† Valor significativo P < 0.01 comparado con progesterona.

3. ACCION DE LOS ESTEROIDES.

Los datos muestran una interesante relación de potencia entre los diferentes metabolitos de progesterona (P_4) para ejercer su acción relajante en ambos tipos de preparaciones (tabla IV). En todos los casos se observó que P_4 y sus metabolitos fueron más activos en las preparaciones sin endotelio, excepto 5α -DHT y 5β -DHT que fueron ligeramente más efectivas en las preparaciones con endotelio. Los metabolitos más potentes (pregnanolona, 5α - y 5β -DHT) para inhibir la contracción de noradrenalina resultaron ser significativamente diferentes ($p < 0.01$) a su precursor P_4 . Sin embargo, el efecto de testosterona no mostró diferencia con respecto a P_4 , resultando ser estos dos compuestos equipotenciales.

En el caso de las progestinas, el metabolito 5β (pregnanolona) mostró una fuerte potencia relajante en contraste con su isómero 5α (alopregnanolona) que no produjo ningún efecto. Esta relación también fue observada para los andrógenos, donde 5β -DHT fue más potente que su isómero 5α -DHT, los precursores $\Delta 4$, progesterona y testosterona, presentaron un efecto medio para inducir relajación.

VII. DISCUSION.

Los resultados del presente estudio mostraron que los esteroides: progesterona, pregnanolona, testosterona, 5α - y 5β -dihidrotestosterona, son compuestos vasoactivos, lo cual postula al músculo liso vascular como tejido blanco de la acción de hormonas esteroides.

El efecto relajante inducido por los esteroides estudiados, sobre la contractura de NA en la aorta torácica aislada de la rata, evidencia una clara acción vasodilatadora que se relaciona con la relajación que producen en músculo liso uterino, intestinal, vesícula seminal y epidídimo (Kubli-Garfias y cols., 1979; 1980; 1983abc; Perusquia y cols., 1986). Estos datos concuerdan con el efecto relajante de algunos esteroides sobre la musculatura vascular lisa como el de: pregnanolona sobre contracciones inducidas en la arteria coronaria de perro (Lara-Lemus y cols., 1986), de androsterona (Rojas-Mejía y cols., 1986), 5α - y 5β -DHT (García-Valencia y cols., 1989) sobre la actividad contráctil de aurícula de rata y de estradiol sobre la arteria uterina humana (Hillard y cols., 1992).

El efecto vasodilatador de los compuestos probados, fue observado tanto en preparaciones con endotelio como en preparaciones libres de endotelio, revelando así que esta acción es independiente de los factores relajantes derivados del endotelio. La actividad relajante de los esteroides fue inmediata (de pocos segundos a un minuto) y reversible (recuperación total de la subsecuente contractura de NA) en ambos tipos de preparaciones, lo que sugiere un efecto membranal de tipo no genómico.

Sin embargo, existen algunas discrepancias en los presentes resultados con respecto a estudios realizados por otros autores, en los que se muestra que en aorta de conejo la respuesta contráctil dependiente del endotelio, inducida por ácido araquidónico y prostaglandinas se incrementa por el tratamiento crónico con estrógenos y que implantes subcutáneos de progesterona afectan las respuestas dependientes de esta capa endotelial (Miller y Vanhoutte, 1990). También se ha reportado que el óxido nítrico es necesario para mediar el efecto vaso dilatador de 17β -estradiol (Van Buren y cols., 1992). Por lo anterior, se ha propuesto que el efecto de estrógenos y progesterona es una respuesta que depende del endotelio vascular. Estas diferencias podrían ser en respuesta a la prolongada administración de los estrógenos, o bien a que las observaciones son hechas varios días después de su administración, lo que implicaría un efecto de tipo genómico de los esteroides, en el cual pueden estar involucrados otros procesos como: aumento de la población de diferentes tipos de receptores a otras sustancias y/o metabolismo de los compuestos administrados.

Las observaciones hechas en el presente trabajo mostraron que las preparaciones libres de endotelio son más sensibles a la acción de los esteroides, aún a concentraciones más bajas ($30 \mu\text{M}$), que las preparaciones con endotelio ($41.5 \mu\text{M}$). Se encontró que 5α - y 5β -DHT ejercen una actividad ligeramente mayor en las preparaciones con endotelio que las preparaciones sin endotelio, pero esta diferencia mínima no puede ser representativa, dado que ambos andrógenos están produciendo prácticamente el mismo efecto en las preparaciones con endotelio pero a una concentración mayor que en tejidos sin endotelio. Lo anterior indica que el esteroide ejerce su acción directamente en la membrana de la célula muscular y que la capa endotelial podría estar actuando como una barrera contenedora para los esteroides o bien el endotelio podría estar metabolizando los

esteroides de igual manera que lo hace con otras sustancias (Smith, 1990; Higsmith y cols., 1992), haciendo a éstos inactivos.

Por otra parte, Cauvin y col., (1985) han demostrado que la respuesta contráctil de NA en la aorta de conejo es el resultado de una serie de eventos: 1) interacción de NA con los receptores α -adrenérgicos, 2) activación de los canales de calcio operados por receptor y 3) aumento de entrada de calcio extracelular para producir la contracción. Por lo cual, se propone que la relajación de la contracción inducida por NA, causada por los esteroides en la aorta de rata, podría ser debida a una disminución de influjo de calcio, a través de bloquear los canales operados por receptor, como se ha propuesto para el mecanismo de acción del efecto útero relajante de los esteroides (Perusquía y cols., 1991abc; 1992).

Interesantemente se observó una clara relación entre la estructura química y la actividad biológica de los compuestos. Así, la progestina 5 β (pregnanolona) mostró una fuerte potencia relajante, en contraste con su isómero 5 α (alopregnanolona), el cual no produce ningún efecto, como se ha reportado para 5 α progestinas (alopregnanolona y alopregnandiona) que son prácticamente inefectivas en músculo liso uterino (Kubli-Garfias, 1979; 1987a; Perusquía, 1991abc; 1992) e intestinal (Kubli-Garfias y cols., 1987b). Esta relación fue también observada en el caso de los andrógenos, donde 5 β -DHT fue más potente que su isómero 5 α -DHT. Sin embargo, el fuerte efecto que mostró este 5 α -andrógeno, podría ser explicado por que es uno de los metabolitos más abundantes, encontrado en los niveles plasmáticos de los machos. Los precursores $\Delta 4$ (progesterona y testosterona) fueron equipotenciales con mediano efecto para inducir relajación vascular. Esta relación evidencia que la reducción del carbono 5 (cis/trans) es importante para la acción de los esteroides, concluyendo que los metabolitos 5 β -reducidos tienen

mejor actividad relajante, como ha sido descrito en otros músculos lisos (Kubli-Garfias y cols., 1987a; Perusquía y Kubli-Garfias 1992).

Finalmente es importante mencionar que los esteroides también están involucrados en la fisiología de la musculatura vascular, siendo moduladores del tono vascular. Desde el punto de vista fisiológico, es probable que estos hallazgos se relacionen con el padecimiento de la hipertensión arterial, que se presenta en la vejez por disminución de los niveles de las hormonas sexuales.

VIII. CONCLUSIONES.

El músculo liso vascular es sensible a la acción relajante de los esteroides. Proponiendo a éste tejido, blanco de hormonas esteroides por sus propiedades vaso activas.

El efecto relajante de los esteroides no es dependiente de los factores relajantes derivados del endotelio, siendo las preparaciones sin endotelio más sensibles a la acción vasodilatadora de los esteroides.

El efecto vasodilatador de los esteroides es directamente sobre la célula muscular y no sobre la endotelial.

El mecanismo por el cual las hormonas esteroides modulan las funciones cardiovasculares es probablemente por disminución del influjo de calcio extracelular a través de bloquear los canales de calcio operados por el receptor de noradrenalina.

Los esteroides probados mostraron una clara relación estructura química-actividad biológica en cuanto a su potencia para inducir vasodilatación, siendo $5\beta>4\text{-en}>5\alpha$.

IX. REFERENCIAS.

- Arnold, W. P., Mittal, C. K., Katsuki, S. and Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 3203-3207 (1977).
- Asthan, F. T., Somlyo, A. V. and Somlyo, A. P. The contractile apparatus of vascular smooth muscle: intermediate high voltage stereo electron microscopy. *J. Molec. Biol.* **98**: 17-29 (1975).
- Beasley, D., Schwartz, J. H. and Brenner, B. M. Interleukin-1 induces prolonged L-arginine-dependent cyclic guanosine monophosphate and nitrite production in rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **87**: 602-608 (1991).
- Becker, C. G. and Nachman, R. L. Contractile proteins of endothelial cells, platelets and smooth muscle. *Am. J. Pathol.* **71**(1): 1-22 (1973).
- Blaustein, M. P. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension; a reassessment and a hypothesis. *Am. J. Physiol.* **232**: C165-C173 (1977).
- Bobik, A. and Campbell, J. H. Vascular derived growth factors cell biology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **45**(1): 1-42 (1993).
- Bobik, A., Grooms, A., Millar, J. A., Mitchell, A. and Grinpukel, S. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **258**: C408-C415 (1990).
- Bruce, L. A. and Behsudi, F. M. Progesterone effects on three regional gastrointestinal tissues. *Life Sci.* **25**: 729-734 (1979).
- Bruce, L. A. and Behsudi, F. M. Differential inhibition of regional gastrointestinal tissue to progesterone in the rat. *Life Sci.* **27**: 427-434 (1980).
- Bruns, R. R. and Palade, G. E. Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. *J. Cell. Biol.* **37**: 277-299 (1988).
- Buga, G. M., Gold, M. E., Fukuto, J. M. and Ignarro, L. J. Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension.* **17**: 187-193 (1991).
- Buonassisi, V. and Verter, J. C. Hormone and neurotransmitter receptors in an established vascular endothelial cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**: 1612-1616 (1976).

Busse, R., Trogisch, G. and Bassenge, E. The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic. Res. Cardiol.* **80**: 475-490 (1985).

Campbell, G. R. and Chamley, J. H. Thick filaments in vertebrate smooth muscle. *Cell. Tiss. Res.* **156**: 201-216 (1975).

Casteels, R., Kitamura, H. and Suzuki, H. Excitation-contraction coupling in the smooth muscle cell of the rabbit main pulmonary artery. *J. Physiol.* **271**: 63-79 (1977).

Cauvin, C., Loutzenhiser, R., Hwang, O. and Van Breemen, C. α 1-adrenoceptors induced Ca influx and intracellular release in isolated rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.* **84**: 233-235 (1982).

Cauvin, C., Lukeman, S., Cameron, J., Hwang, O. and Van Breemen, C. Differences in norepinephrine activation and diltiazem inhibition of calcium channels in isolated rabbit aorta and mesenteric resistance vessels. *Circ. Res.* **56**: 822-828 (1985).

Chamley-Campbell, J. H., Campbell, G. R. and Ross, R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev.* **59**: 1-61 (1979).

Chand, N. and Altura, B. M. Acetylcholine and bradykinin relax intrapulmonary arteries by acting on endothelial cell: Role in lung vascular disease. *Science.* **213**: 1376-1379 (1981).

Choi, J. K. Fine structure of the smooth muscle of the chicken's gizzard, 5th. Int. congress for electron microscopy, New York 1962. Breese. S. S. ed. Academic Press: Vol. 2, M9.

Cliff, W. J. The aortic tunica media in growing rats studied with the electron microscope. *Lab. Invest.* **17**: 599-615 (1967).

Clyman, R. I., Blacksin, A. S., Sandler, J. A., Marganillo, V. C. and Vaughan, M. The role of calcium in regulation of cyclic nucleotide content in human umbilical artery. *J. Biol. Chem.* **250**: 4718-4721 (1975).

Cocks, T. M. Angus, J. A. and Campbell, G. R. Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelium in culture. *J. Cell. Physiol.* **123**: 310-320 (1985).

Creed, K. E. Functional diversity of smooth muscle. *Br. Med. Bull.* **35**: 243-247 (1979).

Csapo, A. I. and Corner, G. W. The antagonistic effects estrogen and progesterone on the staircase phenomenon in uterine muscle. *Endocrinology*. **51**: 378-385 (1952).

De Mey, J. M. and Vanhoutte, P. M. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. *Circ. Res.* **51**: 439-447 (1982).

Devine, C. E. Vascular smooth muscle morphology and ultra-structure. En: *Microcirculation*. ed. by Kaley, G. and Altura, B. M. University Park Press: Baltimore, Md. Vol. II, pp. 3-39 (1978).

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

Devine, C. E., Somlyo, A. V. and Somlyo, A. P. Sarcoplasmic reticulum and mitochondria as action accumulating sites in smooth muscle. *Phil. Trans. R. Soc.* **B265**: 17-23 (1973).

Diamond, J. and Blisard, K. S. Effects of stimulant and relaxant drugs on tension and cyclic nucleotide levels in canine femoral artery. *Mol. Pharmacol.* **12**: 688-692 (1976).

Dicorleto, P. E. and Bowen-Pope, D. F. Cultured endothelial cells produce a platelet-derived growth factor-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**: 1919-1923 (1983).

Didisheim, P. Animal models useful in the study of thrombosis and antithrombotic agents. *Progress in Hemostasis and Thrombosis*. **1**: 165-197 (1972).

Dunham, E. W., Haddox, M. K. and Goldberg, N. D. Alteration of vein cyclic-3',5'-nucleotide concentration during changes in contractility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**: 815-819 (1974).

Eldor, A., Falcone, D. J., Hajjar, D. P., Minick, C. R. and Weksler, B. B. Recovery of prostacyclin production by de-endothelialized rabbit aorta. Critical role of neointimal smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **67**: 735-741 (1981).

Emori, T., Hirata, Y., Ohta, K., Kanno, K., Eguchi, S., Imai, T., Shichiri, M. and Marumo, F. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopresin. *Hypertension*. **18**: 165-170 (1991).

Fanburg, B. L. and Glazier, J. B. Influence of physiological factors on angiotensin (A) 1 to 2 conversion in the isolated perfused dog lung. *Clin. Res.* **20**: 576-562 (1972).

Fawcett, D. W. Tejido Vascular. En: Tratado de Histología. por Herranz, R. G. Ed. Nva. Interamericana. Mex. D.F. pp. 267-312 (1990).

Fawcett, D. W. The fine structure of capillaries, arterioles and small arteries. En the microcirculation, by Reynolds, R. M. and Zweifach, B. W. Illinois pp. 1-17 (1959).

Fishman, A. P. Endothelium. A distributed organ of diverse capabilies. Ann. New York. Acad. Sci. 401: 1-9 (1982).

Fried, G. and Samuelson, U. Endothelin and neuropeptide are vasoconstrictors in human uterine blood vessels. Am. J. Obstet. Gynecol. 164: 1330-1336 (1991).

Furchgott, R. F. The pharmacology of vascular smooth muscle. Pharmacol. Rev. 7: 183-265 (1955).

Furchgott, R. F. and Bhadrakom, S. Reaction of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrate and other drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 108: 129-143 (1953).

Furchgott, R. F. The requirement for endothelial cells in the relaxation of arteries by acetylcholine and some other vasodilators. Trens Pharmacol. Sci. 7: 173-176 (1981).

Furchgott, R. F., Davidson, D. and Lin, C. I. Blood Vessels. 16: 213-214 (1979).

Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. Relaxation of rabbit aortic smooth muscle by acetylcholyne. Pharmacologist. 21: 271 (1979).

Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 288: 373-376 (1980).

Gabella, E. Structure of Smooth Muscle. En: Smooth muscle an assessment of current knowledge, by: Bülbring, E., Brading, A., Jones, A. W. and Tomita, T. Ed. Arnold. London pp. 1-46 (1981).

García-Valencia, V., Andrés-Trelles, F. e Hidalgo, A. Efectos de 5 α - y 5 β -dihidrotestosterona en aurícula izquierda de rata in vitro. Rev. Farmacol. Clin. Exp. 6(1): 15-21 (1989).

Garfield, R. E. and Daniel, E. E. Relation of membrane vesicles to volumen control and Na⁺ transport in smooth muscle: effect of metabolic and transport inhibition on fresh tissues. J. Mechanochem. Cell. Motility. 4: 113-155 (1977a).

Garfield, R. E. and Daniel, E. E. Relation of membrane vesicles to volume control Na^+ transport in smooth muscle: studies on Na^+ rich tissues. *J. Mechanochem. Cell Motility*. **4**: 157-176 (1977b).

Garfield, R. E. and Somlyo, A. P. Ultrastructural basis for vascular smooth muscle reactivity. En: *Factors influencing vascular reactivity*, by Carrier, O. and Shibita, S. Ed. Igaku-Shoin: Tokyo. pp. 1-25. 1977.

Gisclard, V., Miller, V. M. and Vanhoutte, P. M. Effect of 17β -estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**: 19-22 (1988).

Glass, D. B., Frey, W., Carr, D. W. and Goldberg, N. Stimulation of human platelet guanylate cyclase by fatty acids. *J. Biol. Chem.* **252**: 1279-1285 (1977).

Golenhofen, K. and Hermstein, N. Differentiation of calcium activation mechanisms in vascular smooth muscle by selective suppression with verapamil and D 600. *Blood Vessels*. **12**: 21-37 (1975).

Gonzales-Crussi, F. Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study. *Am. J. Anat.* **130**: 441-460 (1971).

Greene, E. C. Circulatory system. En *Anatomy of the rat*. Ed American Philosophical Society. Hatner Publishing Co; New York and London, pp. 192-199 (1963).

Griffith, T. M., Edwards, D. H., Lewis, M. J., Newby, A. C. and Henderson, A. H. The nature of endothelium-derived vascular relaxant factor. *Nature (Lond.)* **308**: 645-647 (1984).

Guyton, A. C. Contracción y excitación del músculo liso. En *Tratado de fisiología medica*, por Guyton, A. C. ed. Nva. Interamericana. Buenos Aires. pp. 91-99 (1992).

Ham, A. W. Tejido Muscular. En *Tratado de histología*, por Ham, A. V. ed. Nva. Interamericana, Mex. D.F. pp. 670-693 (1984).

Ham, K. N. The fine structure of normal rat aorta. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **40**: 341-352 (1962).

Hatt, P. Y. Electron microscopic study of arterial lesions in experimental hypertension. En: *Hypertension*. ed. by Genest, J. and Koiw, E. Ed. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg. pp. 196-212. (1972).

- Heüsler, H. Ein experimentelle nachweis schrauben förmiger struktur der arterienwand. Arch. Exper. Path. U. Pharmacol. 172: 302-313 (1978).
- Heldin, C. H., Westermark, B. and Wasterson, A. Demonstration of an antibody against platelet-derived growth factor. Exp. Cell. Res. 136: 255-261 (1981).
- Heuman, H. G. A regular actin filament lattice in a vertebrate smooth muscle. Experientia. 26: 1131-1132 (1970).
- Hidaka, H. and Asano, T. Stimulation of human platelet guanylate cyclase by unsaturated fatty acid peroxides. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 3657-3661 (1977).
- Highsmith, R. F., Blackburn, K. and Schmidt, D. J. Endothelin and calcium dynamics in vascular smooth muscle. Ann. Rev. Physiol. 54: 257-277 (1992).
- Hillard, T. C., Bourne, T. H., Campbell, S., Collins, W. P., Crayford, T. B. and Whitehead, M. I. Differential effects of transdermal estradiol sequential progestogens on impedance to flow within the uterine arteries of postmenopausal women. Fertility and Sterility. 58(5): 959-963 (1992).
- Hirata, Y., Takagi, Y. and Marumo, F. Endothelin is a potent mitogen for vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis. 78: 225-228 (1989).
- Hiroe, M., Hirata, Y., Marumo, F., Nagata, M., Toyozaki, T., Hasumi, M., Ohta, Y., Horie, T. and Sekiguchi, M. Immunohistochemical localization of endothelin in human vascular endothelial cells. Peptides. 10: 1281-1282 (1989).
- Hütter, I. and Galbiani, G. Vascular endothelium recent advances and unanswered questions. Lab. Inv. 47: 409-411 (1982).
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick C. R. Culture of human endothelial cell derived from umbilical veins. J. Clin. Inv. 52: 2745-2756 (1983).
- Jennings, M. A., Marchesi, V. T. and Florey, H. The transport of particles across the walls of small blood vessels. Proc. R. Soc. B156: 14-19 (1962).
- Johns, R. A., Peach, M. J., Linden, J. and Tichotsky, A. N-monomethyl L-arginine inhibits endothelium-derived relaxing factor-stimulating cyclic GMP accumulation in cocultures of endothelial and vascular smooth muscle cells by an action specific to the endothelial cell. Circ. Res. 67: 979-985 (1990).

Jones, A. W. Vascular smooth muscle and alterations during hypertension. En: Smooth muscle and assessment of current knowledge. Bülbiring, E., Brading, A. F., Jones A. W. and Tomita, T. ed. Arnold. London. pp 397-429 (1981).

Jurukova, Z., Hadjisky, P., Renais, J. and Scebat, L. Aortic smooth muscle cells reaction in rat spontaneous hypertension. *Pathol. Eur.* 11: 105-115 (1976).

Karker, H. E. An electron microscope study of the aorta in young and aging mice. *J. Ultrastruct. Res.* 5: 1-27 (1961).

Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C. and Murad, F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 3: 23-25 (1977).

Katsuki, S. and Murad, F. Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* 13: 330-341 (1977).

Keech, M. K. Electron microscope study of the normal rat aorta. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7: 533-538 (1960).

Killam, A. P., Rosenfeld, C. R., Battaglia, F. C. Makowski, E. L. and Meschia, G. Effect of estrogens on the uterine blood flow of oophorectomized ewes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 115: 1045-1052 (1973).

Kitazumi, K., Mio, M. and Tasaka, K. Involvement of the microtubular system in the endothelin-1 secretion from porcine aortic endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1079-1085 (1991).

Kohler, N. and Lipton, A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp. Cell. Res.* 87(Suppl.): 297-301 1974.

Kourembanas, S., Marsden, P. A., McQuillan, L. P. and Faller, D. V. Hypoxia induces endothelin expression and secretion in cultured human endothelium. *J. Clin. Invest.* 88: 1054-1057 (1991).

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

Kubli-Garfias, C., Medrano-Conde, L., Beyer, C. and Bondani, A. In vitro inhibition of rat uterine contractility induced by 5 α and 5 β Progestins. *Steroids*. **34**(6): 609-617 (1979).

Kubli-Garfias, C., López-Fiesco, A., Pacheco-Cano, M. T., Ponce-Monter, H. and Bondani, A. In vitro effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility. *Steroids*. **35**(6): 633-641 (1980).

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

Kubli-Garfias, C., Azpeitia, E., Villanueva-Tello, T. and Ponce-Monter, H. Inhibition of noradrenaline release by 5 β -progestins in cerebral cortex slices. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26**: 135-138 (1983a).

kubli-Garfias, C., Hoyo-vadillo, C; Lopéz-Nieto, E. and Ponce-Monter, H. Inhibitory of spontaneous contractions of the rat pregnant uterus by progesterone metabolites. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26**: 115-118 (1983b).

Kubli-Garfias, C., Hoyo-Vadillo, C. and Ponce-Monter, H. Relaxant effect of testosterone and 5 α -reduced androgens on the smooth muscle of the male rat reproductive system. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26**: 31-34 (1983c).

Kubli-Garfias, C. Modulatory action of 5-reduced androgens and progestins on the excitability of CNS and smooth muscle. *J. Steroid. Biochem.* **27**(1-3): 631-634 (1987a).

Kubli-Garfias, C., Medina-Jiménez, M., García-Yeñez, E., Vázquez-Alvarez, A., Perusquía, M., Gómez-García, N., Almanzan, J., Ibañez, R. and Rodríguez, R. Relaxant action of androgens, progestins and corticosteroids on the isolated ileum of the guinea pig. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **37**: 357-364 (1987b).

Kumar, D. In vitro inhibitory effect of progesterone on extrauterine human smooth muscle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **84**: 1300-1304 (1962).

Lara-Lemus, A., Perusquía, 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 al 20 de agosto. Pag. 71 (1986).

Lee, T. J. Direct evidence against acetylcholine as the dilator transmitter in the cat cerebral artery. *Eur. J. Pharmacol.* **68**: 393-394 (1980).

Lerman, A., Edwards, B. S., Hallett, J. W., Heublein, D. M., Sandberg, S. M. and Burnett, J. C. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* **325**: 997-1001 (1991).

Levine, M. G., Miodovnik, M. and Clark, K. E. Uterine vascular effects of estretrol in nonpregnant ewes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **148**: 753-738 (1984).

Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. A. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **96**: 99-108 (1949).

Martinet, Y., Bitterman, P. B., Mornex, J. F., Grotendorst, G. R., Martin, G. R. and Crystal, R. G. Activated human monocytes express the csis photo-oncogene and release a mediator showing PDGF-like activity. *Nature(Lond.)* **319**: 158-160 (1986).

Matthews, M. A. and Gardrier, D. L. The fine structure of the mesenteric arteries of the rat. *Angiology.* **17**: 902-928 (1966).

Mettal, C. K. and Murad, F. Activation of guanylate cyclase by superoxide of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 4360-4364 (1977).

Miller, V. M., Aarhus, L. L. and Vanhoutte, P. M. Effects of estrogens on adrenergic and endothelium-dependent responses in the ovarian artery of the rabbit. En: *Proceedings of the second international symposium on resistance arteries*, by Halpern, W., Brayden, J., McLaughlin, M., Osol, G. Pregram B. L. and Machey, K. Perinatology Press, Ithaca, New York: pp. 136-145 (1988).

Miller, V. M. and Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent contractions to arachidonic acid are mediated by products of cyclo oxygenase. *Am. J. Physiol.* **248**: H432-H437 (1985).

Miller, V. M. and Vanhoutte, P. M. 17 β -Estradiol augments endothelium-dependent contractions to arachidonic acid in rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* **258**: R1502-R1507 (1990).

Miller, V. M. and Vanhoutte, P. M. Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary and arteries. *Am. J. Physiol.* **26**: R1022-R1022 (1991).

Miyauchi, T., Tomobe, Y., Shiba, R., Ishikawa, T., Yanagisawa, M., Kimura, S., Sugishita, Y., Ito, I., Goto, K. and Masaki, T. Involvement of endothelin in the regulation of human vascular tonus: potent vasoconstrictor effect and existence in endothelial cell. *Circulation*. **81**: 1874-1880 (1990).

Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. and Vane, J. R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibit platelet aggregation. *Nature*. **263**: 663-665 (1976).

Moncada, S. and Higgs, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.* **21**: 361-374 (1991).

Moncada, S., Radomski, M. W. and Palmer, R. M. J. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone platelet function. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 2495-2501 (1988).

Morrison, A. D., Oriel, L., Berwich, L. and Winegrad, A. I. Significance of an intact endothelium with regard to the metabolism of aortic intima-media preparations. En: *The biochemistry of smooth muscle*. ed. Stephens, N. L. University park press, Baltimore. pp 83-103 (1977).

Murphy, R. A., Herlihy, J. T. and Megerman, J. Force-generating capacity and contractile protein content of arterial smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* **64**: 691-705 (1974).

Nicolson, G. L. Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components. *Biochim. Biophys. Acta.* **457**: 57-108 (1976).

Nilsson, J., Sjolund, M., Palmberg, L., Van Euler, A., Jonzou, B. and Thyberg, J. The calcium antagonist inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis*. **58** 109-122 (1985).

O'Brien, R. F., Robbins, R. J. and McMurtry, I. F. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J. Cell Physiol.* **132**: 263-270 (1987).

Palade, G. E. Transport in quanta across the endothelium of blood capillares. *Anat. Rec.* **136**: 254 (1960).

Palmer, R. M. J., Asthon, D. S. and Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. **333**: 664-666 (1988).

Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. **327**: 524-526 (1987).

Parker, F. An electron microscope study of coronary arteries. *Amer. J. Anat.* **103**: 247-275 (1958).

Pease, D. C. and Molinary, S. Electron microscopy of muscular arteries; pial vessels of the cat and monkey. *J. Ultrastruct. Res.* **3**: 447-468 (1960).

Perusquía, M. and Campos, G. Inhibitory effect of androgens and progestins on the contraction induced by oxytocin in the rat myometrium. *Med. Sci. Res.* **19**: 177-179 (1991a).

Perusquía, M., Campos, G., Corona, J. L. and Kubli-Garfias, C. Antagonism by 5-reduced steroids of the tonic and phasic contraction induced by serotonin in the isolated rat uterus. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **34**: 395-398 (1991b).

Perusquía, M., Corona, J. L. and Kubli-Garfias, C. Inhibitory effect of 5-reduced androgens and progestins on the uterine contraction induced by acetylcholine. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **34**: 89-92 (1991c).

Perusquía, M., Hoyo-Vadillo, C. and Kubli-Garfias, C. Biphasic effect of corticosteroids on the contraction of isolated rat uterus. *Arch. Invest. Med. (Mex.)*. **17**: 203-209 (1986).

Perusquía, M. and Kubli-Garfias, C. External calcium dependence of the uterine contraction induced by prostaglandin E₂ and F_{2α} and its antagonism with natural progestins. *Prostaglandins*. **43**: 445-455 (1992).

Rapoport, R. M. and Murad, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.* **52**: 352-357 (1983).

Reale, E. und Ruska, H. Die Feinstruktur wall der Gefäßwände. *Angiologica*. **2**: 314-366 (1965).

Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Hodson, H. F. and Moncada, S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.* **96**: 418-424 (1989).

Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Schutz, R., Hodson, H. F. and Moncada, S. Characterizations of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **101**: 746-752 (1990).

Resnik, R., Killan, A. P., Battaglia, F. C., Makowski, E. L. and Meschia, G. The stimulation of uterine blood flow by various estrogens. *Endocrinology*. 94: 1192-1196 (1974).

Resnik, R., Killan, A. P., Barton, M. D., Battaglia, F. C., Makowski, E. L. and Meschia, G. The effects of various vasoactive compounds upon the uterine vascular bed. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125: 201-206 (1976).

Rhodin, J. A. G. Fine structure of vascular wall in mammals with especial reference to smooth muscle component. *Physiol. Rev.* 42: 48-81 (1962).

Rice, R. V., Moses, J. A., McManus, G. M., Brady, A. C. and Blasik, L. M. The organization of contractile filaments in a mammalian smooth muscle. *J. Cell. Biol.* 47: 183-196 (1970).

Robbins, S. L. Vasos sanguíneos. En *Patología estructural y funcional*. por Stanley, L. R., Ramzi, S. C. and Vinay, K. Ed. Nva Interamericana. Mex, D.F. pp 501-544 (1988).

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 al 20 de agosto pag. 243 (1986).

Ryan, J. W., Roblero, J. and Stewart, J. M. Inactivation of bradykinin in rat lung. *Adv. Exp. Med. Biol.* 8: 263-267 (1970).

Sachs, E. S. Effects of autolysis in vitro on the fine structure on human aortic intimal cells. *J. Atheroscler. Res.* 7: 549-565 (1967).

Saito, Y., Nakao, K., Mukoyama, M and Imura, H., Increased plasma endothelin levels in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.* 322: 205-207 (1990).

Schini, V. B., Junquero, D. C., Scott-Burden, T. and Vanhoutte, P. M. Interleukin-1 induces the production of an L-argine-derived relaxing factor from cultured smooth muscle cells from rat aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 114-121 (1991).

Schmidt, H., Klein, M. M., Niroomand, F. and Bohme, E. Is arginine a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.* 148: 293-295 (1988).

Schmitt, W. Untersuchungen zur physiologie der plazentargefäße. *Biol.* 75: 19-78 (1972).

- Schultz, K.-D. Schultz, K. and Schultz, G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature*. **256**: 750-751 (1977).
- Scott, R. F., Morrison, E. S. and Kroms, M. Effect of cold shock on respiration and glycolysis in swine arterial tissue. *Am. J. Physiol.* **219**: 1363-1365 (1970).
- Seeman, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmac. Rev.* **24**: 583-655 (1972).
- Seifert, R. A., Schwartz, S. M. and Bowen-Pope, D. F. Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature(Lond.)* **311**: 669-671 (1984).
- Selye, H. Anaesthetic effect of steroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **46**: 116-121 (1941).
- Selye, H. Correlation between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology*. **30**: 437-458 (1942).
- Shimokado, K., Raines, E. W., Wadtes, O. K., Barrett, T. B., Benditt, E. D. and Ross, R. A. A Significant part of macrophage-derived growth factor consist of at least two forms of PDGF. *Cell*. **43**: 277-286 (1985).
- Singer, H. A. and Peach, M. J. Endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. II. Inhibition of relaxation stimulated by methacholine and A23187 with antagonists of arachidonic acid. *Acid metabolism. Pharmacol. Exp. Ther.* **226**: 796-801 (1983).
- Smith, L. H. Respiración. En *Fisiopatología. Principios biológicos de la enfermedad*. por Patrone, V. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires. pp 695-701 (1990).
- Smith, U. and J. W. Ryan. Substructural features of pulmonary endothelial caveolae. *Tissue Cell*. **4**: 49-54 (1972).
- Sokolovsky, M. Endothelins and sarafotoxins: physiological regulation, receptor subtypes and transmembrane signaling. *Trens Biochem.* **16**: 261-264 (1991).
- Sollmann, T. and Gilbert, A. J. Reaction of carotid arteries of small animals. *J. Pharmacol. and Exper. Therap.* **62**: 236-238 (1938).
- Somlyo, A. P., Devine, C. E., Somlyo, A. V. and Rice, R. V. Filament organization in vertebrate smooth muscle. *Phil. Trans. R. Soc., B*. **265**: 223-229 (1973).

Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., Ashton, F. T. and Vallieres. Vertebrate smooth muscle: Ultrastructure and function. En Gold spring harbor conference on cell proliferation. ed by Goldman, R., Pollard, T. and Rosenbaum. J. Cell. Motility. Vol. 3, pp 165-183. (1976).

Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. Vascular smooth muscle. I Normal structure, pathology, biochemistry and biophysics. Pharmacol. Rev. 20(4): 197-272 (1968).

Somlyo, A. P. and Somlyo, A. V. Vascular smooth muscle. II. Pharmacology of normal and hypertensive vessels. Pharmac. Rev. 22: 249-353 (1970).

Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., Devine, C. E., Peters, P. D. and Hall, T. A. Electron microscopy and electron probe analysis of mitochondrial cation accumulation in smooth muscle. J. Cell. Biol. 61: 723-742 (1974).

Somlyo, A. V., Vinall, P. and Somlyo, A. P. Excitation-contraction coupling and electrical events in two types of vascular smooth muscle. Microvasc. Res. 1: 354-373 (1969).

Spaet, T. H. and Erichson, R. B. The vascular wall in the pathogenesis of thrombosis. Thromb. Diath. Haemorrh. 21 (suppl.): 67-86 (1966).

Spaet, T. H. and Ts'ao, C. H. Vascular endothelium and thrombogenesis. En Thrombosis. Sherry, S. Brinkhous, K. M. Genton, E. and Stengle, J. M. ed. Nat. Acad. Sc. Washington. pp. 416 (1969).

Spiteri, M., Nguyen, J. and Het Panigel, M. Ultrastructure du muscle lisse des arteres di cordon ombilical humain. Pathol. Biol. 14: 348-357 (1966).

Stemerman, M. B. and Spaet, T. H. The subendothelium and thrombogenesis. Bull. New York Acad. Med. 48(2): 289-301 (1972).

Strong, K. C. A study of the structure of the media of the distributing arteries by the method of microdissection. Anat. Rec. 72: 151-162 (1932).

Strum, J. M. and Junod, A. F. Radioutographic demonstration of 5-hydroxytryptamine-3H uptake by pulmonary endothelial cells. J. Cell. Biol. 54(3): 456-467 (1972).

Tetsuda, M., Masahiko, K. and Noboru, T. Mechanisms of endothelium-dependent respons to vasoactive agents in isolated porcine coronary arteries. J. Cardiovasc. Pharmacol. 22: 228-234 (1993).

Todd, A. S. The histological localisation of fibrinolysin activator. *J. Pathol. Bacteriol.* **78**: 281-295 (1959).

Todd, M. E. and Friedman, S. M. The ultrastructure of peripheral arteries during the development of DOCA hypertension in the rat. *Zellforsch Mikrosk. Anat.* **128**: 538-554 (1972).

Tranzer, J. P. and Baumgarther, H. R. Filling gaps in the vascular endothelial with blood platelets. *Nature(London)*. **216**(120): 1126-1128 (1967).

Van Buren, G. A., Da-seng, Y. and Clark, K. E. Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**: 828-833 (1992).

Van Voorde, J. and Leusen, I. Histamine effects on aorta preparations. *Arch. Int. Physiol.* **90**: 21-22 (1982a).

Van Voorde, J. and Leusen, I. Vascular endothelium and the relaxation effect of histamine on aorta of the rat. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **256**: 329-330 (1982b).

Wabel, E. R. and Palade, J. E. New cytoplasmic component in arterial endothelium. *J. Cell. Biol.* **23**: 101-112 (1964).

Walch, D. and Pastan, I. Stimulation of guanylate cyclase of fibroblasts by free fatty acids. *J. Biol. Chem.* **251**: 5802-5809 (1976).

Warren, B. A. and De Bono, A. H. B. The ultrastructure of initial stages of platelet aggregation and adhesion to damaged vessel walls in vivo. *Br. J. Exp. Pathol.* **51**(4): 415-422 (1970).

Westman, J. and Nylander, G. Electron microscopy of the human gastropiploic artery. *Angiology.* **16**: 292-302 (1967).

Williams, S. P., Shackelford, D. P., Iams, S. G. and Mustafa, S. J. Endothelium-dependent relaxation in estrogen-treated spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **145**: 205-207 (1988).

Wolinsky, H. Respons of rat aortic media to hypertension. *Circ. Res.* **26**: 507-522 (1970).

Wolinsky, H. Effects of estrogen and progestogen treatment on the response of the aorta of male rats to hypertension. *Circ. Res.* **30**: 341-349 (1972).

Wootton, G. S. and Goodford, P. J. An Association between mitochondria and vesicles in smooth muscle. *Cell. Tiss. Res.* **161**: 119-132 (1975).

Yanagisawa, M., Kurihara, H. and Kimura, S. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* **332**: 411-415 (1988).

Yang, B. C., Chandna, V. K., Lawson, D. L. and Mehta, J. L. Platelets enhance anoxic contraction of aortic rings through platelet-activating factor-dependent mechanism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **21**: 249-255 (1993).

Yang, D. and Clark, K. E. Effect of endothelin-1 on the uterine vasculature of the pregnant and estrogen-treated nonpregnant sheep. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167**: 1642-1650 (1992).

Zeldis, S. M., Nemerson, Y., Pitlick, F. A. and Lentz, T. L. Tissue factor (thromboplastin): localization to plasma membranes by peroxidase-conjugated antibodies. *Science.* **175**(23): 766-768 (1972).