



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

LA RELAJACION UTERINA DE LOS ESTEROIDES  
SEXUALES ES INDEPENDIENTE DEL SISTEMA  
GABAERGICO.

**T E S I S**

Q U E P R E S E N T A :

P A R A O B T E N E R E L T I T U L O D E :

Q U I M I C O F A R M A C E U T I C O B I O L O G O

S A T U R N I N O M O R A L E S V E R G A R A



MEXICO, D. F.,

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.



JURADO ASIGNADO:

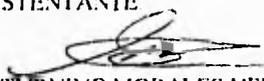
Presidente	DRA. RACHEL MATA ESSAYAGAMENEB PROFESIONALES
Vocal:	DRA. MERCEDES PERUSQUIA NAVA, DE QUIMICA
Secretario:	DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA.
1er. suplente:	Q.F.B. MARTHA LETICIA JIMENEZ PARDO.
2do. suplente:	BIOL. MANUEL MIRANDA ANAYA.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA :  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO,  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS.  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR.  
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGIA DE LA REPRODUCCION.

ASISOR DEL TEMA.

  
DRA. MERCEDES PERUSQUIA NAVA.

SUSTENTANTE

  
SATURNINO MORALES VERGARA

A LA DRA. MERCEDES PERUSQUIA N.  
POR SU GRAN AYUDA E INVALUABLE  
ASESORIA PARA LA REALIZACION DEL  
PRESENTE TRABAJO

MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO AL  
Q.F.B. RICARDO HERNANDEZ AVILA  
POR SUS SUGERENCIAS Y APOYO.

A LA U.N.A.M., FACULTAD DE QUIMICA Y AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMEDICAS PROFESORES, TRABAJADORES Y COMPAÑEROS QUE DE ALGUNA  
FORMA CONTRIBUYERON A LA TERMINACION DEL PRESENTE

A MI FAMILIA EN GENERAL.

A FELIX HUMBERTO Y DANIEL ISAAC.

POR HABERME PERMITIDO ALGO DE SU TIEMPO.

A ELDA M.V. POR SU GRAN APOYO Y COMPRESIÓN.

*El que no es capaz de soñar,*

*Jamás realizará sus sueños.*

*Heráclito*

*Nosotros no cesaremos de explorar*

*Y al final de nuestra exploración*

*Llegaremos donde habíamos comenzado*

*Y donde conocimos el lugar por vez primera.*

*A través de lo ignoto, se recuerda un camino*

*Cuando el último confín de la tierra dejado para descubrir.*

*Es aquel que se encontraba al comienzo;*

*En el venero del río más caudaloso*

*La voz de la cascada oculta,*

*Y los niños en el manzano*

*No saben por qué no han buscado*

*Pero sí oído, o semioído, el silencio*

*Entre dos olas del mar.*

*T. S. Eliot*

## INDICE

Resumen.	3
I. Introducción	4
a) Generalidades de las acciones de las hormonas esteroides	4
b) Acciones no-genómicas de los esteroides	5
c) Mecanismo de acción para los efectos no-genómicos de los esteroides	5
II. Planteamiento del problema.	9
III. Hipótesis.	10
IV. Objetivos.	11
General.	11
Particulares.	11
V. Material y métodos.	12
1) Modelo animal.	12
2) Sistema de registro.	13
3) Protocolo experimental.	14
a) Respuesta de los esteroides	14
b) Respuesta de los esteroides en presencia de bicuculina.	15
4) Cuantificación de los datos.	17
5) Compuestos utilizados.	19
VI. Resultados.	20
a) Respuesta de los esteroides.	20
1) Experimentos concentración-respuesta de progesterona.	20

2) Efecto de los metabolitos de progesterona.	23
b) Esteroides probados en presencia de bicuculina.	23
VII. Discusión	30
VIII. Conclusiones.	35
IX. Referencias.	36

## RESUMEN

### "LA RELAJACION UTERINA DE LOS ESTEROIDES SEXUALES ES INDEPENDIENTE DEL SISTEMA GABAERGICO."

Las hormonas esteroides producen un efecto relajante sobre la contractilidad uterina, sin embargo, su mecanismo de acción es aun desconocido. Debido a que los receptores GABA<sub>A</sub> han sido aislados en los tejidos reproductivos de la hembra, recientemente se ha postulado que el efecto útero-relajante de ciertos esteroides podría ser por interactuar alostericamente con los receptores GABAérgicos. Con el propósito de estudiar la acción relajante de una amplia serie de hormonas esteroides (progesterona y sus metabolitos 5-reducidos), sobre la actividad contráctil del útero de rata y la relación de su efecto con los receptores GABAérgicos, se decidió estudiar el efecto de los diferentes esteroides sobre la contractura de potasio en útero aislado de rata en diestro con y sin la preincubación de un antagonista GABA<sub>A</sub> (bicuculina). Para ello se registró su actividad mediante la técnica isométrica vertical para tejidos aislados. Los resultados mostraron que los esteroides probados inducen relajación uterina, el efecto se observó como una pérdida del tono de la contracción; asimismo, este efecto fue dependiente de la estructura molecular de la hormona ensayada. También se observó que la bicuculina produce relajación uterina, dándose una sumación (sinergismo) con el efecto de los esteroides, pero no antagonizando su efecto. Los datos demostraron que la relajación uterina que producen los esteroides no es a través de interactuar con el sistema GABA<sub>A</sub>-receptor.

## I INTRODUCCION

### **a) Generalidades de las acciones de las hormonas esteroides**

El descubrimiento del mecanismo molecular a través del cual los receptores de esteroides regulan diversos procesos celulares ha sido un cuestionamiento importante en la biología moderna. Los receptores intracelulares de los esteroides pertenecen a una familia de proteínas solubles, encontradas en las células de los vertebrados e invertebrados, donde se unen los esteroides gónadales y adrenales, hormonas tiroideas, metabolitos de la vitamina D, retinoides y numerosos ligandos aún indeterminados (Evans, 1988; Fuller, 1991).

En el modelo clásico de la acción de hormonas esteroides, los esteroides se difunden cruzando la membrana plasmática y uniéndose a los receptores citosólicos o nucleares en la célula blanco, incluyendo las neuronas. La unión del esteroide al receptor facilita la interacción del complejo receptor activado con los elementos de la respuesta hormonal sobre las moléculas de ADN, para así alterar la transcripción del gene (Yamamoto, 1985; Green y Chambon, 1988; Carson-Jurica y cols., 1990; Beato, 1991). En este contexto los receptores de esteroides actúan como factores dependientes de la transcripción del ligando direccionados hacia la síntesis de proteínas.

## **b) Acciones no-genómicas de los esteroides.**

Hace más de 50 años, Selye descubrió que los esteroides presentan un efecto anestésico y anticonvulsivo (Selye, 1941 y 1942). Desde entonces han sido numerosas las observaciones de los cambios inducidos por los esteroides en la actividad neuronal, los cuales ocurren con una latencia de segundos a muy pocos minutos ( Duval y cols., 1983; Weiss y Gurrpide, 1988; Schumacher, 1990; McEwen, 1991). La rapidez de estas acciones no podrían explicar un mecanismo de acción genómico. Sin embargo, únicamente la latencia no puede ser suficiente para distinguir entre acciones genómicas y no genómicas de los esteroides, especialmente cuando la respuesta ocurre con una latencia de minutos.

Los efectos no-genómicos de los esteroides existen también en otros tejidos excitables, que no es el sistema nervioso, como es el útero donde se ha mostrado un cambio rápido en la actividad muscular provocado por los esteroides (Kubli-Garfias y cols., 1987b; Penusquia y cols., 1990).

## **c) Mecanismo de Acción para los efectos no-genómicos de los esteroides.**

Ha sido de interés reciente el estudio de los efectos no-genómicos de los esteroides sobre la función cerebral, la cual ha incrementado los avances en el estudio del mecanismo molecular que media los efectos rápidos de ciertos esteroides. Investigaciones hechas con respecto a la acción anestésica de los esteroides revelaron que algunos esteroides pueden alostericamente modular los receptores del ácido gamma aminobutírico (GABA) (Harrison y Simmonds, 1984), el mayor neurotransmisor inhibitorio del cerebro. Subsecuentemente fue encontrado que concentraciones fisiológicas de esteroides endógenos son también potentes moduladores del receptor

GABA/benzodiazepinas, *i.e.*, el receptor GABA<sub>A</sub> (Majewska y cols., 1986). Estos esteroides relacionados con el receptor GABA<sub>A</sub> pertenecen a la clase de esteroides, referidos como neuroesteroides, los cuales son sintetizados en el cerebro. Así, la modulación de los esteroides al receptor GABA<sub>A</sub> está bien establecida desde el punto de vista farmacológico y, este puede ser solo un mecanismo entre varios de los que son utilizados por los esteroides para efectuar rápidos cambios en la actividad neuronal.

Por otro lado, se ha descrito que la progesterona es activamente metabolizada en el útero a numerosos metabolitos 5 $\alpha$  y 5 $\beta$  (Saffran y cols., 1974; Karavolas y Nuti, 1976; Junkermann y cols., 1977). El efecto inhibitor de la progesterona sobre las contracciones uterinas de la coneja fue mostrado desde 1930 por Reynolds, más tarde Csapo y Corner (1952) encontraron que conejas pretratadas con progesterona revertían el efecto de la estimulación eléctrica. También se reportó que la administración de progesterona tanto *in vivo* como *in vitro*, inhibe la actividad mecánica e inducida eléctricamente de útero de rata preñada (Marshall y Csapo, 1961). Posteriormente los trabajos de Kubli-Garfias y cols. (1979 y 1980) demostraron que muchos de los metabolitos de la progesterona, particularmente los de la serie 5 $\beta$ -reducidos, son más potentes que progesterona para inhibir la contractilidad uterina.

Los metabolitos que fueron efectivos para inhibir la contractilidad uterina en los estudios de Kubli-Garfias y cols. (1979 y 1980) son también potentes anestésicos *in vivo* (Simmonds y Turner, 1987; Gee y cols., 1988), encontrando que la cinética de respuesta en neuronas es similar que en el útero (extremadamente rápida). Sugiriendo que los esteroides pueden actuar en la membrana celular para ejercer sus efectos sobre estos sistemas excitables (efectos no-genómicos).

Para explicar el mecanismo de acción a través del cual los esteroides inducen relajación muscular en el útero se ha postulado lo siguiente:

1) Los receptores GABA existen también en los tejidos reproductivos femeninos tales como: el oviducto (Erdö y cols., 1982a; Apud y cols., 1984), ovarios (Erdö y Lapis, 1982b; Schaeffer y Hsueh, 1982; Del Rio y Caballero, 1984), útero (Erdö, 1984), y Placenta (Erdö y cols., 1985). Sugiriendo una modulación de la respuesta contráctil por el GABA en el músculo liso de los tejidos reproductivos. Específicamente en el útero, los sitios GABA<sub>A</sub> han sido detectados en la rata y la coneja (Erdö, 1984), donde se ha propuesto que el efecto relajante que induce 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona en el útero de coneja (Majewska y Vaupel, 1991) y la acción inhibitoria de esta progestina y 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona en útero de rata (Putnam y cols., 1991) es mediado a través del sistema GABA<sub>A</sub>.

2) Por otro lado, se ha postulado que en el mecanismo de acción de los esteroides para inducir relajación uterina, se encuentran involucrados algunos iones, así Batra (1973) estudió la captación de calcio por mitocondrias de miometrio humano tratado con estrógenos y observó que los estrógenos sintéticos inhiben la captura de calcio mitocondrial dependiente de ATP y que la progesterona no afectaba la fijación de calcio por las mitocondrias. Posteriormente se mostró que esta hormona disminuye la fijación de calcio del miometrio (Batra y Bengtsson, 1978). Más tarde se reportó que una amplia serie de progestinas y andrógenos inducen relajación uterina tanto en la rata no preñada (Kubli-Garfias y cols., 1979 y 1980) como en la rata preñada (Kubli-Garfias y cols., 1983a) y se ha encontrado que estos esteroides producen un efecto calcio-antagónico semejante al de verapamil por

inhibir la contracción inducida por calcio en útero despolarizado de rata, estos datos también han sugerido que el calcio-antagonismo que producen los esteroides sea debido a la inactivación de los canales de calcio operados por voltaje (Perusquia y cols., 1990). Recientemente se ha descrito que andrógenos y progestinas son capaces de antagonizar la actividad contráctil inducida por oxitocina (Perusquia y Campos, 1991a), serotonina (Perusquia y cols., 1991b), acetilcolina (Perusquia y cols., 1991c) y prostaglandinas  $E_2$  y  $F_{2\alpha}$  (Perusquia y Kubli-Garfias, 1992), proponiendo que en el efecto útero-relajante de las hormonas esteroides se encuentren también involucrados los canales de calcio operados por receptor, explicado por el antagonismo de la respuesta contráctil a varios compuestos con actividad uterotónica como una inactivación de los canales de calcio operados por receptor.

## **II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

El mecanismo del efecto membranal de las hormonas esteroides es aún desconocido y actualmente existe una fuerte controversia con respecto a las hipótesis que se manejan para explicar el mecanismo de acción membranal que los esteroides utilizan para inducir relajación uterina. En algunos trabajos se ha mencionado que quizás el mecanismo de acción membranal que utilizan dos progestinas ( $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -pregnan-20-ona y  $3\beta$ -hidroxi- $5\beta$ -pregnan-20-ona), sea a través del complejo receptor  $GABA_A$  (Majewska y Vaupel, 1991; Putnam y cols., 1991).

Sin embargo, existen datos que sugieren que la acción membranal para relajar el útero de una amplia gama de andrógenos y progestinas sea a través de bloquear los canales de calcio operados por voltaje (Perusquía y cols., 1990) y los operados por receptor (Perusquía y cols., 1991abc y 1992).

Con el propósito de esclarecer la actual incertidumbre sobre el mecanismo de acción de los esteroides en su efecto útero-relajante, se planteó el siguiente proyecto; debido a que han sido reportados receptores  $GABA$ érgicos en útero de rata (Erdö, 1984), se pretende probar una amplia serie de andrógenos y progestinas sobre la contracción tónica sostenida (inducida por potasio alto), del útero aislado de rata en presencia o ausencia de un antagonista  $GABA_A$  (bicuculina), con la finalidad de observar si existe alguna interacción de los esteroides con los receptores de  $GABA$ .

### **III HIPOTESIS.**

Se conoce que los esteroides producen un efecto relajante en el músculo liso uterino y que la depresión que inducen en el sistema nervioso central es explicado por una interacción del esteroide con el complejo receptor  $GABA_A$ , entonces suponemos que si los esteroides producen relajación por la interacción con los receptores  $GABA$ érgicos, el efecto de los esteroides será bloqueado por el antagonista  $GABA_A$  (bicuculina).

## **IV. OBJETIVOS.**

### **GENERAL:**

Contribuir al conocimiento del mecanismo de acción membranal que las hormonas esteroides utilizan para ejercer relajación uterina.

### **PARTICULARES:**

1) Construir la curva concentración-respuesta del efecto del precursor (progesterona) de los metabolitos a utilizar, sobre la contracción inducida por  $K^+$  40 mM en útero aislado de rata en diestro.

2) Obtener la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) de progesterona sobre la contracción de  $K^+$  40 mM.

3) Observar el efecto de esteroides 5-reducidos (andrógenos y progestinas), a la concentración equimolecular de la  $CI_{50}$  de progesterona sobre la contracción tónica de  $K^+$  40 mM.

4) Relacionar la potencia de los esteroides  $\Delta$ -4 y 5-reducidos para inducir relajación de la contractilidad uterina.

5) Determinar el efecto de un  $GABA_A$  antagonista (bicuculina), sobre la contractura de  $K^+$  40 mM.

6) Establecer si el antagonista  $GABA_A$  es capaz de bloquear el efecto relajante de los esteroides.

## **V MATERIALES Y METODOS.**

### **1) MODELO ANIMAL.**

Para este estudio se utilizaron ratas hembras adultas (180-250 g) de la cepa Wistar y en la fase de diestro, la cual fue determinada por toma cotidiana de muestras vaginales, usando una pipeta Pasteur de punta roma, que contenía solución salina fisiológica al 0.9 %. Las muestras fueron observadas en un microscopio de luz (Carl Zeiss junior, modelo K-4D), donde se determinó la fase de diestro por la presencia de abundantes leucocitos y escasas células basales.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente el útero fue disecado y colocado en una caja de petri que contenía solución Ringer Krebs-Henseleit, con la siguiente composición en mM de: Glucosa 12.0,  $\text{NaHCO}_3$  25.0, NaCl 119.0, KCl 4.6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{MgSO}_4$  1.2 y  $\text{CaCl}_2$  1.5. El Ringer fue precalentado a  $37^\circ\text{C}$  y burbujeadó continuamente con una mezcla gaseosa de 5 % de  $\text{CO}_2$  en 95 % de  $\text{O}_2$  para estabilizar el pH a 7.4.

El útero fue limpiado de tejido graso y conectivo, ambos cuernos uterinos se cortaron en anillos de aproximadamente 1 cm de longitud, los cuales fueron colocados en cámaras de incubación con un volumen de 10 ml de solución Ringer Krebs-Henseleit.

## 2) SISTEMA DE REGISTRO.

Uno de los extremos del anillo uterino se sujetó a la base de la cámara y el otro se fijó a un transductor Grass modelo FT03C, (ver figura 1a), el cual convierte la señal mecánica en eléctrica y es transmitida a un polígrafo Grass (modelo 79) de cuatro canales que nuevamente convierte la señal eléctrica en mecánica y esta es registrada por el gráfico del polígrafo. (Figura 1b).

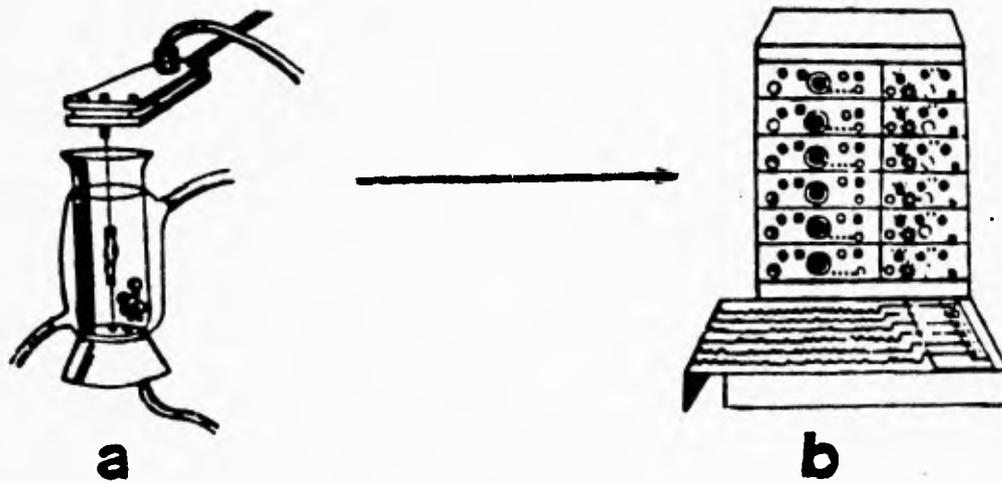


Figura 1 Representación esquemática del sistema de registro que muestra: a) cámara de incubación y transductor, b) Polígrafo

El tejido fue previamente sometido a una fuerza de tensión de 10 mN (1.0 g de tensión = 2 cm de desplazamiento de la pajilla), después de mantener dicha tensión durante 30-40 minutos, la línea basal se regresó a su posición original, dejando que los tejidos se estabilizaran en las condiciones *in vitro* durante un período aproximado de 30 minutos.

### **3) PROTOCOLO EXPERIMENTAL.**

Después del tiempo de estabilización, los tejidos fueron despolarizados induciendo una contracción tónica sostenida con Ringer modificado de potasio alto, el cual fue preparado por sustitución equimolecular de KCl (40 mM) por NaCl (84 mM).

La amplitud y el tono de la contracción inducida por potasio alto se mantuvo constante por más de 40 minutos, sobre esta contracción fueron ensayados los esteroides  $\Delta$ -4, 5 $\alpha$ - y 5 $\beta$ -reducidos, el antagonista GABA<sub>A</sub> (bicuculina) y los vehículos en los que se disolvieron los esteroides y el antagonista GABA<sub>A</sub>.

#### **a) Respuesta de los esteroides.**

Después de inducir la contracción por potasio alto, se registró un período de 10 minutos, el cual fue considerado como control. Inmediatamente después se adicionó progesterona a diferentes concentraciones  $\mu$ M (no acumulativas) y el efecto fue registrado también durante 10 minutos. Cada concentración probada de progesterona fue observada en diferentes experimentos, repitiendo por lo menos 8 veces para cada concentración. El efecto fue comparado *versus* su control (100 %), en

términos de porcentaje de inhibición. Los valores fueron gráficamente para obtener la curva concentración respuesta de progesterona, la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) de la progesterona, la cual es la mitad de la respuesta máxima producida por progesterona sobre la contracción inducida por potasio alto, asimismo la  $CI_{16}$  y la  $CI_{84}$ , los límites de confianza y la pendiente de la recta fueron obtenidos por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

Los metabolitos de progesterona también se probaron 10 minutos después de inducir la contracción tónica sostenida por potasio alto, tomando a este período como valor control y cada esteroide fue probado a la concentración equimolecular de la  $CI_{50}$  de progesterona (22  $\mu$ M), su efecto fue registrado durante 10 minutos y de esta manera se obtuvo el porcentaje de inhibición que induce cada esteroide en relación al valor del control. Al término de este tiempo los tejidos fueron lavados cuatro veces con cambios de Ringer Krebs-Henseleit, registrando 20 minutos más, para ver la recuperación de la actividad espontánea. Después de este tiempo, se indujo nuevamente la contracción tónica sostenida con potasio alto para verificar la viabilidad y recuperación del tejido.

#### **b) Respuesta de los esteroides en presencia de bicuculina.**

La bicuculina, un antagonista  $GABA_A$ , fue disuelto en HCl 0.1N (el vehículo fue previamente probado sobre la contracción tónica inducida por potasio alto y no causó efecto alguno), la bicuculina se adicionó al baño a una concentración de 30  $\mu$ M, concentración a la cual no cambia esencialmente la actividad espontánea, pero bloquea la fase inhibitoria de la respuesta  $GABA$  y la relajación inducida

por muscimol sobre la contractilidad del ileo (Pencheva y cols., 1991). Diez minutos posteriores a la inducción de la contracción tónica de potasio alto (control), la respuesta de bicuculina fue observada durante 20 minutos. Posteriormente en otra serie de experimentos, se adicionó bicuculina 30  $\mu\text{M}$ , 10 minutos después de provocada la contracción tónica de potasio alto, preincubando así el tejido con este antagonista y a los 10 minutos se adicionaron los diferentes esteroides, cada uno por separado, a la concentración de 22  $\mu\text{M}$  y, su efecto fue registrado durante 10 minutos.

El efecto de cada esteroide con y sin bicuculina fue comparado con el primer periodo de 10 minutos (control). Al término del tiempo de registro del efecto del esteroide, el tejido fue lavado cuatro veces con cambios de Ringer Krebs-Henseleit y después de 20 minutos, la contracción de potasio alto fue inducida nuevamente para comprobar la viabilidad y recuperación del tejido. Se hicieron replicas de 8 experimentos para cada tratamiento.

#### 4) CUANTIFICACION DE LOS DATOS.

Los datos se cuantificaron midiendo el área bajo la curva (en  $\text{cm}^2$ ) de las contracciones, en intervalos de 10 minutos con un Planímetro digital Tamaya, modelo Planix 7., (Figura 2). La respuesta fue reportada en porcentaje de inhibición de una media de 8 experimentos  $\pm$  D. E.



Figura 2. Planímetro digital utilizado para medir el área bajo la curva de las contracciones uterinas.

La relación de la potencia de cada esteroide, para inducir relajación de la contracción inducida por potasio alto, fue obtenida por la siguiente fórmula:

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

Asumiendo un valor de 1.00 a su precursor, progesterona.

Los resultados del efecto de cada esteroide en ausencia y presencia de bicuculina, fueron comparados entre sí y estadísticamente evaluados mediante la prueba t de "Student", tomando como significativos los valores de  $p < 0.05$ .

## 5) COMPUESTOS UTILIZADOS.

Bicuculina (GABA<sub>A</sub> antagonista) 6-(5,6,7,8-tetrahidro-6-metil-1,3-dioxolo [4,5-g]isoquinolin-5-il) furo [3,4-e]-1,3-benzodioxol-8(6H)-ona. La cual se disolvió en HCl 0.1 N.

Los diferentes esteroides utilizados fueron:

**PROGESTINAS:** 4-pregnen-3,20-diona (progesterona), 3β-hidroxi-5β-pregnan-20-ona (pregnanolona), 3α-hidroxi-5β-pregnan-20-ona (epipregnanolona), 3α-hidroxi-5α-pregnan-20-ona (3α,5α-tetrahidroprogesterona, 3α,5α-THP), 3β-hidroxi-5α-pregnan-20-ona (5α-pregnanolona, alopregnanolona), 5β-pregnan-3,20-diona (pregnandiona) y 5α-pregnan-3,20-diona (5α-pregnandiona, alopregnandiona).

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

Los esteroides fueron disueltos en etanol absoluto (Merck, México, S. A.) a una concentración final de 17.14 mM y aplicados a un volumen final de 0.1 %. Todos los esteroides y el antagonista GABA<sub>A</sub> fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA.

## VI. RESULTADOS.

### **a) Respuesta de los esteroides.**

#### **1.- Experimentos concentración-respuesta de progesterona.**

Sobre la contracción tónica sostenida, inducida por potasio alto, se observó que la progesterona a diferentes concentraciones (5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$ ) induce un efecto relajante, apreciado como una disminución de la contracción inducida por potasio, el cual fue dependiente de la concentración como lo muestran los resultados de la tabla I.

**TABLA I.**

Efecto de diferentes concentraciones de progesterona sobre la contracción inducida por potasio (40 mM) en el útero de rata en diestro.	
Concentración ( $\mu\text{M}$ )	% de inhibición $n \geq 8 \pm \text{D.E.}$
5.0	15.37 $\pm$ 3.11
10.0	28.10 $\pm$ 6.35
20.0	53.50 $\pm$ 6.80
40.0	76.50 $\pm$ 6.88
80.0	83.05 $\pm$ 4.60

Con los resultados obtenidos se trazó la curva concentración-respuesta de progesterona (figura 3).

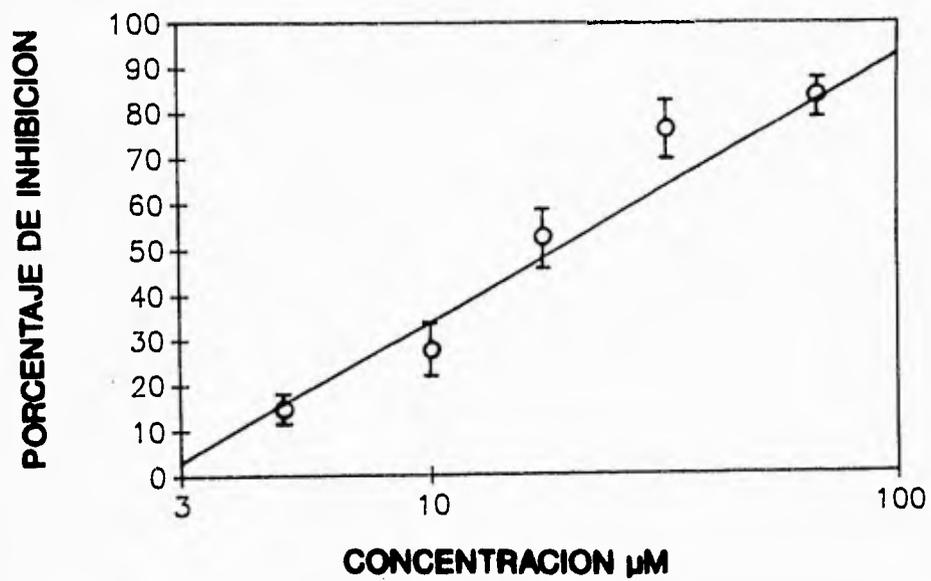


Figura 3. Curva concentración-respuesta de progesterona sobre la contracción tónica sostenida inducida por potasio alto en útero de rata en diestro. Los puntos representan los valores de las medias ( $n \geq 8$ ), las barras verticales la D. E.

De la figura 3 se desprende que el comportamiento del efecto de progesterona, sigue una relación lineal dependiente de la concentración, por interpolación en la recta se obtuvieron los valores de las concentraciones inhibitorias ( $CI_{16}$ ,  $CI_{50}$  y  $CI_{84}$ ), de acuerdo al método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Se calcularon también los límites de confianza, inferior y superior, de la  $CI_{50}$  de la progesterona y el valor de la pendiente de la recta (tabla II)

**TABLA II**

<b>Concentraciones inhibitorias (CI) de progesterona sobre la contracción inducida por potasio alto.</b>				
$CI_{16}$	$CI_{50}$	$CI_{84}$	Límites* inferior-superior	Pendiente
4.9 $\mu$ M	22.0 $\mu$ M	98.0 $\mu$ M	11.68-41.42	4.47
Las concentraciones fueron obtenidas por interpolación en la figura 3 según el método de Lichfield y Wilcoxon (1949).				
*Valores con respecto a la $CI_{50}$				

## 2) Efecto de los metabolitos de progesterona.

Con el valor obtenido de la  $CI_{50}$  de progesterona (22  $\mu\text{M}$ ), se probaron todos los esteroides antes mencionados sobre la contracción tónica inducida por potasio alto, observando que estos compuestos son capaces de producir relajación de la contracción inducida por potasio. Sin embargo, su potencia inhibitoria fue diferente, encontrándose la siguiente relación:

Pregnandiona > epipregnanolona > pregnanolona > 5 $\beta$ -DHT > androsterona  $\geq$  progesterona = androstandiol > testosterona > 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP > alopregnanolona > alopregnanolona.

Esta relación de potencias (Tabla III), nos muestra que los esteroides 5 $\beta$ -reducidos (andrógenos y progestinas) son más potentes que su precursor progesterona, y los andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos son de una potencia media, similar a la de progesterona. El andrógeno  $\Delta$ -4 (testosterona) y las progestinas 5 $\alpha$ -reducidas, fueron de una potencia menor que progesterona, para inducir relajación de la contracción tónica de potasio alto. El vehículo en el que se disolvieron los esteroides (etanol absoluto) no modificó la contracción tónica sostenida de potasio alto (Figura 4).

### b) Esteroides probados en presencia de bicuculina.

Previamente se probó el vehículo en el que se disolvió la bicuculina (HCl 0.1N), observando que no modifica la contracción de potasio (Figura 4). Sin embargo, la bicuculina (30  $\mu\text{M}$ ) mostró un efecto de relajación sobre la contracción tónica, de potasio alto, con una inhibición de  $20.49 \pm 3.35\%$  en una replica de cuando menos 8 experimentos (Figura 5).

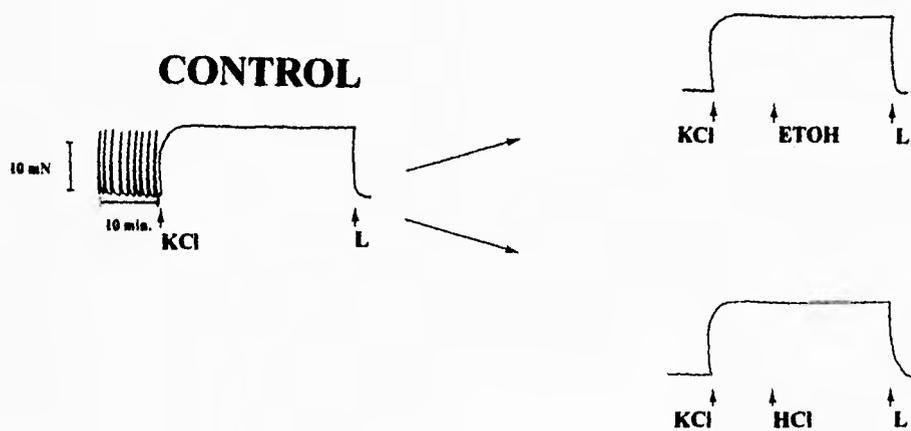


Figura 4. La solución de potasio alto (KCl 40 mM) induce una contracción tónica sostenida sobre la actividad espontánea de útero de rata (control). Arriba a la derecha, se muestra que el etanol (ETOH 17.14 mM), no modifica la contractura de KCl. Abajo a la derecha, se observa que el ácido clorhídrico (HCl 0.1 N), no afecta la contracción inducida por KCl. Notese la repolarización del tejido cuando es lavado (L.) con Ringer normal (KCl 4.6 mM)

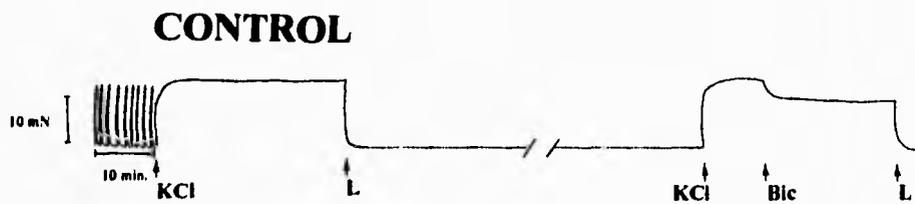


Figura 5. Registros típicos de la contracción tónica sostenida inducida por potasio 40 mM (KCl) donde se muestra que el tono de la contracción no se modifica durante el tiempo de la experimentación (control). A la derecha se muestra el efecto relajante de bicuculina (Bic 30  $\mu$ M) sobre la contracción inducida por KCl. Después de cada tratamiento el tejido fue lavado (L) con solución Ringer Krebs-Henseleit.

Cuando el tejido fue preincubado con bicuculina, se observó que el efecto relajante de los esteroides (andrógenos y progestinas) no fue bloqueado por la presencia de bicuculina, ya que la relajación del esteroide persistió (Figura 6 y 7). Al obtener el porcentaje de relajación del esteroide en ausencia y presencia del antagonista  $GABA_A$  (bicuculina), se observó que el efecto de relajación de los esteroides fue mayor, pero no antagonizado en presencia de bicuculina como lo muestran las figuras 6 y 7 y la tabla III

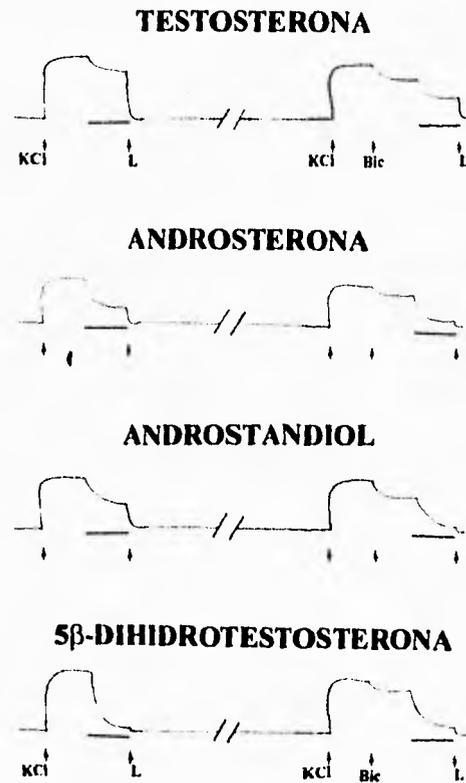


Figura 6. En panel superior izquierdo se muestra que el vehiculo etanol (ETOH 17.14 mM) no modifica la respuesta de la contracción inducida por potasio 40 mM (KCl). De la misma manera se observa, en el lado derecho, que la adición de ambos vehiculos, el de bicuculina (HCl 0.1 N) y el del esteroide (ETOH), no producen efecto sobre la contractura de KCl. Los registros inferiores muestran el efecto de los diferentes andrógenos probados a 22  $\mu$ M, (la barra negra representa el tiempo de incubación) en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de bicuculina (Bic 30  $\mu$ M).

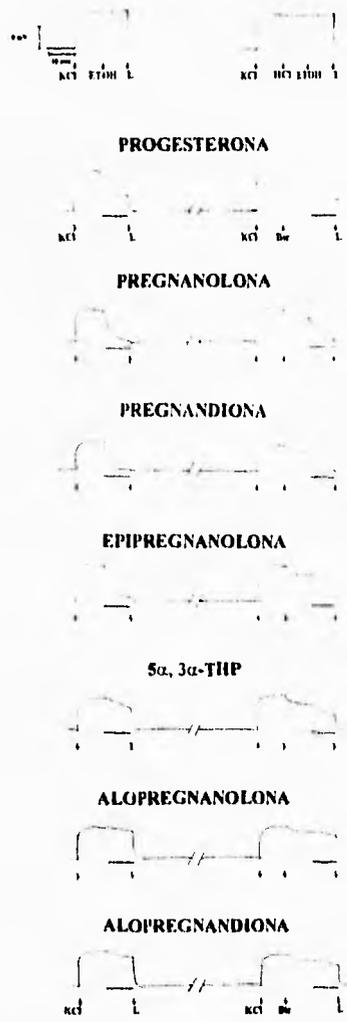


Figura 7. En panel superior izquierdo muestra que el vehículo del esteroide, etanol (ETOH 17.14 mM) no modifica la respuesta de la contracción inducida por potasio 40 mM (KCl). De la misma manera se observa, en el lado derecho, que la adición de ambos vehículos, el de bicuculina (HCl 0.1 N) y el del esteroide (ETOH), no producen efecto sobre la contractura de KCl. Los registros inferiores muestran el efecto de las diferentes progestinas probadas a 22  $\mu$ M, (la barra negra representa el tiempo de incubación) en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de bicuculina (Bic 30  $\mu$ M).

**TABLA III.**

Efecto relajante de progestinas y andrógenos a la concentración equimolecular de 22 $\mu$ M, en ausencia y presencia de bicuculina (30 $\mu$ M) sobre la contracción inducida por $K^+$ 40 mM en útero aislado de rata.			
Hormona 22 $\mu$ M.	% de relajación en ausencia de Bicuculina.	% de relajación en presencia de Bicuculina.	Potencia <sup>b</sup>
<b>PROGESTINAS:</b>			
Progesterona	50.00 <sup>a</sup>	58.22 $\pm$ 3.72**	1.00
Pregnanolona	70.46 $\pm$ 2.88	79.51 $\pm$ 3.52*	1.40
Pregnanodiona	71.60 $\pm$ 3.84	82.22 $\pm$ 2.67*	1.43
Epipregnanolona	70.67 $\pm$ 5.25	80.71 $\pm$ 4.17*	1.41
Alopregnanolona	7.31 $\pm$ 0.59	23.71 $\pm$ 4.20*	0.14
Alopregnanodiona	12.22 $\pm$ 1.98	31.66 $\pm$ 1.83*	0.24
3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP	19.42 $\pm$ 2.09	46.11 $\pm$ 2.41*	0.40
<b>ANDROGENOS:</b>			
Testosterona	35.12 $\pm$ 2.22	51.40 $\pm$ 3.71*	0.70
Androsterona	50.66 $\pm$ 4.18	69.94 $\pm$ 3.19*	1.01
Androstandiol	50.10 $\pm$ 2.55	68.99 $\pm$ 5.44*	1.00
5 $\beta$ -DHT	69.09 $\pm$ 4.21	77.32 $\pm$ 4.18*	1.38

Los valores son las medias de  $n \geq 8 \pm D. E.$

<sup>a</sup>Valor teórico de progesterona obtenido por el método de Litchfield y Wilcoxon.

<sup>b</sup>Potencia fue obtenida por la relación: % de relajación del esteroide / % de relajación de progesterona, dando el valor de 1.00 a progesterona.

\* $P < 0.01$  y \*\* $P < 0.001$ . Nota: tomando como significativos  $P < 0.05$ .

Al analizar los valores del porcentaje de inhibición de los esteroides en ausencia y presencia de bicuculina mediante la prueba de t de "Student", se observó una diferencia significativa ( $P < 0.01$  y  $P < 0.001$ ). Por lo que se concluye que el efecto inhibitorio de los esteroides en presencia de bicuculina es de mayor potencia donde se puede observar que hay un aumento en promedio del 14.83 % del efecto relajante de los esteroides cuando el tejido se preincuba con bicuculina, lo cual es debido al efecto que mostró la bicuculina por sí sola sobre la contracción tónica sostenida de potasio alto, sugiriendo la sumación (sinergismo) del efecto de bicuculina y el esteroide.

## **VII DISCUSION.**

El efecto inhibitorio de los esteroides en el útero, se observó como relajación de la contracción tónica sostenida inducida por potasio alto, lo cual concuerda con trabajos previos en donde se ha observado el efecto relajante producido por andrógenos y progestinas 5-reducidos en diferentes tipos de músculo liso como el uterino no grávido (Kubli-Garfias y cols., 1979 y 1980) y grávido (Kubli-Garfias y cols., 1983a), intestinal (Kubli-Garfias y cols., 1987a), epidídimo y vesícula seminal (Kubli-Garfias y cols., 1983b) así como en la musculatura vascular lisa (Hudgiens y Weiss, 1968; Lara-Lemus y cols., 1986; Rojas-Mejía y cols., 1986; Hillard y cols., 1992; Hernández-Avila, 1994).

La inhibición de la contracción uterina por estas hormonas esteroides se observó como una rápida caída del tono muscular, disminuyendo la amplitud de la contractura. El rápido y reversible efecto relajante de los esteroides en el músculo uterino involucra eventos no-genómicos. Los resultados muestran una clara y evidente relación estructura química-actividad biológica donde los metabolitos 5 $\beta$ -reducidos (andrógenos y progestinas) fueron considerablemente más potentes que su precursor progesterona para producir relajación uterina mientras que los andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos (androsterona y androstandiol) mostraron tener una potencia similar a progesterona, siendo las de menor potencia la testosterona y las progestinas 5 $\alpha$ -reducidas (alopregnanolona, alopregnandiona y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP). Lo anterior demuestra que la estructura química de los esteroides, está relacionada con la actividad biológica. Al parecer la configuración 5( $\alpha$  ó  $\beta$ ) es de gran importancia, los datos encontrados mostraron que la 5 $\beta$ -reducción *i.e.*, isómero cis, serie 5 $\beta$  hace que la molécula tenga un

mayor efecto, esta evidencia está de acuerdo con los trabajos en donde se ha demostrado que las progestinas  $5\beta$ -reducidas, particularmente epipregnanolona y  $5\beta$ -pregnandiona son más potentes que los compuestos  $\Delta$ -4, 3-ceto para provocar sincronización electroencefalográfica (Kubli-Garfias y cols., 1976). También se sabe que los compuestos  $5\beta$ -reducidos inhiben la liberación de noradrenalina en la corteza cerebral (Kubli-Garfias y cols., 1983c). Esta misma correlación ha sido observada en el útero (Kubli-Garfias y cols., 1979 y 1980, Perusquia y cols., 1990), intestino (Kubli-Garfias y cols., 1987a), epidídimo y vesícula seminal (Kubli-Garfias y cols., 1983b), donde los metabolitos  $5\beta$ -reducidos son más potentes que sus análogos  $5\alpha$  para producir relajación muscular, infiriendo que los metabolitos  $5\beta$  de progesterona pueden jugar un importante papel fisiológico en el control de la contractilidad uterina. Así, los esteroides podrían estar suprimiendo la contracción uterina para proporcionar un ambiente quieto para el mejor desarrollo fetal en el útero.

La relajación inducida por los esteroides no fue bloqueada por la bicuculina, ya que contrariamente se observó un aumento del efecto relajante con el pretratamiento del antagonista, el cual aparentemente es el resultado de la suma del efecto relajante que induce tanto la bicuculina como el esteroide, dado que la bicuculina *per se*, produce una relajación justamente en el rango en que se ve aumentada la relajación de los esteroides. La relajación inducida por bicuculina en el útero de rata es consistente con los hallazgos de otros investigadores. En esos trabajos la bicuculina actúa como un antagonista no-competitivo de baja afinidad al receptor  $GABA_A$  en el cerebro (Maksay, 1988), y probablemente el efecto relajante pueda ser explicado como una interacción directa de la bicuculina con el complejo receptor de acetilcolina-canal iónico, dado por el hecho de que este antagonista  $GABA$ érgico es capaz de bloquear la respuesta de acetilcolina, como ha sido reportado en células de vertebrados (Zhang y Feltz, 1991). En consecuencia los datos nos sugieren un efecto sinérgico de

ambos compuestos, descartando por completo un efecto antagónico por el bloqueador GABA<sub>A</sub>, bicuculina.

El efecto depresivo que producen los esteroides en tejidos excitables como en el sistema nervioso central (Seyle 1941 y 1942) y músculo liso uterino (Kubli-Garfias y cols., 1979 y 1980), ha tratado de ser explicado como una potenciación del neurotransmisor inhibitorio GABA, proponiendo una interacción de un solo esteroide natural (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP) con el complejo GABA<sub>A</sub> receptor (Majewska y cols., 1989). Sin embargo, resulta interesante que el esteroide 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP ha sido el compuesto que ha marcado la pauta para generalizar el efecto de todos los esteroides a través del complejo receptor GABA<sub>A</sub>, cuando a este esteroide se le ha reportado como un tenue relajante uterino, tanto en el presente trabajo como en anteriores (Kubli-Garfias y cols., 1979). Por lo que la relación 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP con el receptor GABA<sub>A</sub> no puede aportar información para explicar el mecanismo de acción anestésico e hipnótico de los esteroides en general, dado que otros esteroides químicamente relacionados como son; progestinas 5 $\alpha$  y 5 $\beta$ -reducidas, estradiol y testosterona fueron inactivos para actuar en el sitio del receptor GABA<sub>A</sub> (Majewska y cols., 1986).

Específicamente en útero, Majewska y Vaupel (1991), y Putnam y cols. (1991), postulan que el mecanismo de acción de los esteroides para inhibir la respuesta contráctil uterina es a través del complejo GABA<sub>A</sub> receptor, su hipótesis se basa en experimentos donde se utilizan los antagonistas GABA<sub>A</sub> (bicuculina y picrotoxina) además del antagonista intracelular de progesterona (RU 486) Putnam y cols. (1991), informaron que al incubar el tejido uterino de rata en presencia del antagonista GABA<sub>A</sub> (picrotoxina) el efecto de los esteroides pregnanolona y 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -THP era bloqueado por la

picrotoxina, pero el efecto de progesterona y pregnandiona no fue bloqueado por picrotoxina sino por el antagonista intracelular de progesterona RU 486, el cual actúa como bloqueador de las acciones genómicas de los esteroides. Interesantemente, el rápido efecto de los esteroides sobre la contracción uterina involucra acciones no-genómicas y recientemente se ha reportado que el RU 486, antes de su acción genómica, primero induce una acción no genómica como relajante uterino más fuerte que el de progesterona (Perusquia y Kubli-Garfias, 1994). Por su parte Majewska y Vaupel (1991) reportaron que la bicuculina potencia la actividad espontánea del útero de coneja. En el presente trabajo se probó una amplia serie de esteroides; progestinas y andrógenos  $\Delta$ -4 y 5-reducidos, en presencia del antagonista GABA<sub>A</sub> (bicuculina), y los resultados no están de acuerdo con los reportados por Majewska y Vaupel (1991), dado que en este trabajo no se observó el bloqueo del efecto relajante del esteroide en presencia de la bicuculina ni tampoco se observó aumento sobre la amplitud de la contracción tónica sostenida inducida por potasio alto, sino contrariamente presentó un efecto relajante sobre la contracción. Esto podría ser explicado por las diferencias entre especies ya que Majewska y Vaupel utilizaron conejas y en este trabajo se utilizaron ratas.

Se propone que el mecanismo de acción de los esteroides en útero no es a través del complejo GABA<sub>A</sub> receptor, para explicar su posible mecanismo de acción, nuestro grupo ha propuesto la siguiente hipótesis; donde la relajación uterina producida por los esteroides, es por disminuir la entrada de calcio, efecto calcio antagónico, probablemente por el bloqueo de los canales de calcio sensibles al voltaje (Perusquia y cols, 1990) y bloqueo también de los canales de calcio operados por receptor (Perusquia y cols, 1991abc y 1992)

El efecto relajante de la bicuculina, observado sobre la contracción tónica sostenida de potasio alto, puede ser debido a que la bicuculina bloquea los receptores colinérgicos (Zhang y Feltz, 1991).

Por lo tanto la imposibilidad de abolir el efecto relajante de los esteroides por el GABA<sub>A</sub> antagonista (bicuculina), sugiere que los receptores GABA<sub>A</sub> no están involucrados en el mecanismo de la acción relajante de los esteroides en este tejido, como ha sido propuesto en el efecto no-genómico de dos esteroides sobre la función cerebral (Majewska y cols., 1986). Por lo cual esta propuesta difiere con el conflictivo reporte de Majewska y Vaupel (1991), porque la evidencia del presente estudio, excluye el sitio de reconocimiento de los barbitúricos, asociados con el receptor GABA<sub>A</sub>, como *locus* de la acción de los esteroides en el útero de rata. Por otro lado, la proposición de que los esteroides ejercen un efecto bloqueador de la entrada de calcio, puede ser solo un mecanismo entre algunos de los que son utilizados por los esteroides para efectuar rápidos cambios en la excitabilidad.

Lo anterior es apoyado por algunas evidencias, ya que en experimentos colaterales en nuestro laboratorio han mostrado que la acción relajante de los esteroides sobre la contracción inducida por potasio en el útero de rata puede ser revertida por la adición de calcio (datos no publicados) pero no bloqueada por un GABA<sub>A</sub> antagonista, apoyando un mecanismo alternativo para explicar que el efecto de los esteroides es dependiente del influjo de calcio. En adición a esto, French-Mullen (1991) también encontró que los esteroides pueden rápida y reversiblemente suprimir las corrientes de calcio en los canales sensibles al voltaje en neuronas de hipocampo.

## VIII CONCLUSIONES.

1.- Los resultados mostraron que el efecto relajante de los esteroides no fue bloqueado por el antagonista GABA<sub>A</sub> (bicuculina).

2.- El efecto relajante de los esteroides fue sumatorio al el efecto relajante de la bicuculina.

3.- Se concluye que el efecto membranal que los esteroides utilizan para producir relajación uterina no es modulado por el complejo GABA<sub>A</sub>-receptor.

4.- La potencia de cada esteroide para inducir relajación uterina fue diferente. Los esteroides 5 $\beta$ -reducidos, andrógenos y progestinas (pregnandiona, pregnanolona, epipregnanolona y 5 $\beta$ -dihidrotestosterona), resultaron ser más potentes que los compuestos  $\Delta$ -4, progesterona y testosterona, siendo las progestinas 5 $\alpha$ -reducidas de menor potencia que su precursor progesterona y los andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos (androsterona y androstandiol) mostraron ser equipotenciales a progesterona.

## **IX REFERENCIAS.**

- Apud, J. A., Tappaz, M. L., Celotti, F., Negri-Cesi, P., Masotto, C. and Racagni, G. Biochemical and immunochemical studies on the GABAergic system in the rat Fallopian tube and ovary. *J. Neurochem.* **43**: 120-125 (1984).
- Batra, S.C. Effect of some estrogens and progesterone on calcium uptake calcium release by myometrial mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* **22**: 803-809 (1973).
- Batra, S. and Bengtsson, B. Effects of diethylstilboestrol and ovarian steroids on contractile responses and calcium movements in rat uterine smooth muscle. *J. Physiol.* **276**: 329-342 (1978).
- Beato, M. Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB. J.* **5**: 2044-2051 (1991).
- Carson-Jurica, M. A., Schrader, W. T. and O'Malley, B. W. Steroid receptor family: Structure and functions. *Endocr. Rev.* **11**: 201-220 (1990).
- Csapo, A. I. and Corner, G. W. The antagonistic effects of estrogens and progesterone on the staircase phenomenon in uterine muscle. *Endocr.* **51**: 378-385 (1952).
- Del Rio, R. M. and Caballero, A. L. Presence of gamma-aminobutyric acid in rat ovary. *J. Neurochem.* **34**(6): 1584-1586 (1984).
- Duval, D., Durant, S. and Homo-Delarche, F. Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochem. Biophys. Acta.* **737**: 409-442 (1983).
- Erdő, S. L., Rosdy, B. and Szpomy, L. Higher GABA concentrations in Fallopian tube than in brain of the rat. *J. Neurochem.* **38**: 1174-1176 (1982a).
- Erdő, S. L., and Lapis, E. Bicuculline sensitive GABA receptors in rat ovary. *Eur. J. Pharmacol.* **85**: 243-246 (1982b).
- Erdő, S. L. Identification of GABA receptor binding sites in rat and rabbit uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**: 18-24 (1984).
- Erdő, S. L., Laszlo, A., Kiss, B. and Zsolnai, B. Presence of gamma aminobutyric acid and its specific receptor sites in the human term placenta. *Gynecol. Obstet. Invest.* **20**: 199-203 (1985).
- Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* **240**: 889-895 (1988).
- French-Mullen, J. M. H. and Spence, K. T. Neurosteroids block  $Ca^{2+}$  channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **202**: 269-272 (1991).

- Fuller, P. J. The steroid receptor superfamily: mechanisms of diversity. *FASEB J.* **5**: 3092-3099 (1991).
- Gee, K., Bolger, M., Brinton, R., Coirini, H. and McEwen, B. Steroid modulation of the chloride ionophore in rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **246**: 803-812 (1988).
- Green, S., and Chambon, P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* **4**: 309-314 (1988).
- Harrison, N. L., and Simmonds, M. A. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res.* **323**: 287-292 (1984).
- Hernández-Avila, (1994) Efecto relajante de esteroides 4-en y 5-reducidos sobre la contracción inducida en aorta torácica aislada de rata. Tesis Profesional Facultad de Química UNAM. México. pp 1-73.
- Hillard, T. C., Bovine, T. H., Campbell, S., Collins, W. P., Crayford, T. B., and Whitehead, M. I. Differential effects of transdermal estradiol sequentias progestogens on impedance to flow within the uterine arteries of postmenopausal woman. *Fertil. Steril.* **58**(5): 959-963 (1992).
- Hudgens, P. H. and Weiss, G. B. Differential effects of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by norepinephrine, histamine and potassium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **159**: 91-97 (1968).
- Junkermann, H., Runnebaum, B. and Lisboa, B. P. New progesterone metabolites in human myometrium. *Steroids* **30**: 1-14 (1977).
- Karavolas, H. J. and Nuti, K. M. Progesterone metabolism by neuroendocrine tissues. In: "subcellular mechanisms in reproductive neuroendocrinology" Chapter 15, Naftolin F., Ryan K. J. and Davis J. (Eds) Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam (1976): 305-326.
- Kubli-Garfias, C., Cervantes, M. and Beyer, C. Changes in multiunit activity and EEG induced by the administration of natural progestins to flexed 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 $\alpha$  and 5 $\beta$  progestins. *Steroid* **34**: 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. *Steroid* **35**: 633-640 (1980).
- Kubli-Garfias, C., Hoyo-Vadillo, C., López-Nieto, E. and Ponce-Monter, H. Inhibition of spontaneous contractions of the rat pregnant uterus by progesterone metabolites. *Proc West Pharmacol Soc.* **26**: 115-118 (1983a).

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

Kubli-Garfias, C., Azpeitia, J., Villanueva-Tello, T., and Ponce-Monter, H. Inhibition of noradrenaline release by 5 $\beta$ -progesterin cerebral cortex slices. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **266**: 135-138 (1983c).

Kubli-Garfias, C., Medina-Jiménez, M., García-Yañez, E., Vázquez-Alvarez, A. M., Perusquia, M., Gomez-Garcia, N., Almanza, J., Ibáñez, R. and Rodríguez, R. Relaxant action of androgens, progestins and corticosteroids on the isolated ileum of the guinea pig. *Acta Physiol. et Pharmacol. Latinoam.* **37**: 357-364 (1987a).

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

Lara-Lemus, A., Perusquia, M., Amezcua, J. L. y Kubli-Garfias, C., Efecto relajante de la pregnanolona sobre la arteria coronaria del perro contraída con ergonovina y clonuro de potasio. *XXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Guanajuato, Gto. del 17 al 20 de Agosto pag. 71* (1986).

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

Majewska, M. D., Harrison, N. L., Schwartz, R. D., Barker, J. L. and Paul, S. M. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science* **232**: 1004-1007 (1986).

Majewska, M. d., Falkay, G. and Baulieu, E. E. Modulation of uterine GABA<sub>A</sub> receptors during gestation and by tetrahydroprogesterone. *Eur. J. Pharmacol.* **174**: 43-47 (1989).

Majewska, M. D. and Vaupel, D. B. Steroid control of uterine motility via gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors in the rabbit: a novel mechanism? *J. Endocr.* **131**: 427-434 (1991).

Maksay, G. GABA<sub>A</sub> receptor populations bind agonist and antagonists differentially and with opposite affinities. *J. Neurochem.* **50**: 1865-1871 (1988).

Marshall, J. M. and Csapo, A. I. Hormonal and ionic influences on the membrane activity of uterine smooth muscle. *Endocr.* **68**: 1026-1035 (1961).

McEwen B. S., Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 141-147 (1991).

Pencheva, N., Radomirov, R. and Venkova, K. GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor-mediated effects on the spontaneous activity of the longitudinal layer in cat terminal ileum. *Gen. Pharmac.* **22**(1): 159-163 (1991).

Perusquía, M., García-Yañez, E., Ibañez, R. y Kubli-Garfias, C. Non-Genomic mechanism of action of  $\Delta$ -4 and 5-reduced androgens and progestins on the contractility of the isolated rat myometrium. *Life Sci.* **47**(17): 1547-1553 (1990).

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 contractions 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. and Kubli-Garfias, C. External calcium dependence of the uterine contraction induced by prostaglandins  $E_2$  and  $F_{2\alpha}$  and its antagonism with natural progestins. *Prostaglandins* **43**: 445- 455 (1992).

Perusquía, M. and Kubli-Garfias, C. Progesterone-like relaxant effect of RU 486 in the rat myometrium. *Life Sci.* **54**(20): 1506-1513 (1994).

Putnam, C. D., Brann, D. W., Kolbeck, R. C. and Mahesh, V. B. Inhibition of uterine contractility by progesterone and progesterone metabolites: Mediation by progesterone and gamma amino butyric acid<sub>A</sub> receptor systems. *Biol. Reprod.* **45**: 266-272 (1991).

Reynolds, S. R. M. Studies on the uterus. I. A method for recording uterine activity chronic experiments on unanaesthetized animals. *Amer. J. Physiol.* **92**:420-429 (1930).

Rojas-Mejía, Y., Moreno J. A., García-Marquez, F., Perusquía, 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 de 1986 pag. 243.

Saffran, J., Loeser, B., Haas, B. and Stavely H. Metabolism of progesterone in rat uterus. *Steroids* **23**: 117-132 (1974).

Schaeffer, J. M. and Hsueh, A. J. Identification of gamma-aminobutyric acid and its binding sites in the rat ovary. *Life Sci.* **30**: 1599-1604 (1982).

Schumacher, M. Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trens Neurosci.* **13**: 359-362 (1990).

Selye, H. Anaesthetic effects of steroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **46**: 116-121 (1941)

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

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Simmonds, M. and Turner, J. Potentiators of responses to activation of gamma-aminobutyric acid (GABA<sub>A</sub>) receptors. *Neuropharmacol.* **26**: 923-930 (1987).

Weiss, D. J. and Gurside, E. Non-genomic effects of estrogens and antiestrogens. *J. Steroid Biochem.* **31**: 671-676 (1988).

Yamamoto, K. R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.* **19**: 209-252 (1985).

Zhang, Z. W. and Feltz, P. Bicuculline blocks nicotinic acetylcholine response in isolated intermediate lobe cells of the pig. *Br. J. Pharmacol.* **102**: 19-22 (1991).