

00381  
2ej.  
11



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

Facultad de Ciencias

“ACCION MODULADORA DE LAS HORMONAS ESTEROIDES  
SOBRE LA CONTRACTILIDAD DEL MUSCULO LISO”

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

( Biología )

presenta

M en C. Maria Mercedes Perusquia Nava

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

I. RESUMEN -----	9
II. INTRODUCCION -----	10
1) Historia evolutiva de los esteroides. -----	10
2) Estructura química y biosíntesis.-----	13
3) Mecanismo de acción.-----	16
a) Mecanismos genómicos -----	16
b) Mecanismos no-genómicos -----	19
4) Acción de las hormonas esteroides.-----	21
5) Tejido muscular.-----	22
6) Ciclo contracción-relajación.-----	25
7) Canales de calcio -----	32
a) Canales sensibles al voltaje -----	32
b) Canales operados por un receptor -----	34
8) Ionóforos de calcio -----	35
9) Efecto de los esteroides en tejidos excitables.-----	37
10) Efecto de los esteroides en el SNC.-----	38
11) Efecto de los esteroides en el útero.-----	40
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	43
IV. HIPOTESIS -----	45
V. OBJETIVOS -----	46
VI. MATERIAL Y METODOS -----	48
1) Sistema de registro.-----	48
2) Corticosteroides en el útero.-----	50
3) Andrógenos, progestinas y corticosteroides en el intestino.-----	51

4) Andr6genos y progestinas en la membrana celular uterina.-----	52
a) andr6genos y progestinas en el 6tero despolarizado -	52
b) Ion6foros de calcio.-----	54
c) Preparaci6n miog6nica del 6tero de la rata.-----	54
VII . RESULTADOS -----	56
1) Efecto de los corticosteroides en el 6tero.-----	56
2) Efecto de andr6genos, progestinas y corticosteroides en el intestino.-----	60
3) Efecto de los andr6genos y las progestinas en la tejido uterino. -----	64
4) Reversi6n parcial del efecto relajante de los esteroides por ion6foros de Calcio.-----	68
5) Efecto de los andr6genos y las progestinas sobre preparaciones miog6nicas .-----	71
VIII. DISCUSION -----	76
1) Importancia Biol6gica.-----	88
IX. CONCLUSIONES -----	90
X. ALTERNATIVAS A FUTURO -----	91
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS -----	92

## I. RESUMEN

La acción biológica de los esteroides en los mamíferos se manifiesta desde la edad más temprana. Así, se describieron acciones organizadoras y moduladoras de los esteroides, secretados por las gónadas y las glándulas suprarrenales en el embrión, durante la pubertad y la madurez del individuo. Además, las hormonas esteroides son susceptibles de ser metabolizadas en órganos periféricos y dar origen a una rica variedad de metabolitos con posible acción biológica. En este trabajo se describe el efecto relajante de andrógenos, progestinas, corticosteroides y algunos de sus metabolitos sobre tejidos excitables y se pone de manifiesto un mecanismo de acción sobre la contractilidad de diferentes tipos de músculos lisos. Se observaron algunas diferencias marcadas entre el músculo liso uterino y el intestinal, siendo éste último más sensible a la acción de estos compuestos. La relación entre la estructura química y la actividad biológica fue muy marcada, ya que las progestinas reducidas en posición 5 fueron las más activas. Dentro de los corticosteroides destacó la corticosterona con un efecto comparable al de la progesterona. Los experimentos se efectuaron en tejidos aislados y se midieron los efectos sobre la actividad espontánea y en contracciones inducidas por calcio en tejidos despolarizados con soluciones de potasio alto. En virtud de que el efecto observado sistemáticamente fue la relajación muscular, hemos postulado una acción sobre los mecanismos membranales que controlan la permeabilidad al calcio que es el ión más importante en el acoplamiento excitación-contracción del músculo liso. Para apoyar esta hipótesis se hicieron experimentos con los ionóforos de calcio A-23187 y X-537 en tejidos despolarizados y bajo la acción de los esteroides. Donde se observó que los ionóforos revierten el efecto de los esteroides. Un punto importante, es la posibilidad de que los esteroides produzcan un efecto relajante a través de un mecanismo indirecto como por ejemplo la liberación de neurotransmisores útero-relajantes. Para descartar lo anterior se probaron los esteroides en tejidos pretratados con antagonistas  $\beta_2$  adrenérgicos (propranolol), y  $H_2$  histaminérgicos (cimetidina). Puesto que el efecto relajante persistió se concluyó por estos datos que el efecto de los esteroides es miogénico y probablemente a través de bloquear los canales de calcio sensibles al voltaje. La importancia mayor de estos compuestos estriba en la modulación de la entrada del ión calcio en las células musculares, lo que se traduce en un control sutil y eficiente sobre las contracciones del músculo liso. Se concluye que además de los efectos genómicos de las hormonas esteroides está su acción membranar que en conjunto resulta de importancia crucial en el mantenimiento de la homeostasis.

## II. INTRODUCCION

### 1) Historia evolutiva de los esteroides

Los esteroides son compuestos orgánicos de amplia distribución en la naturaleza, poseen una estructura molecular basada en un sistema de cuatro anillos que recibe el nombre de núcleo ciclo-pentano-perhidrofenantreno.

Estas sustancias tienen importantes acciones fisiológicas en plantas y animales y tal vez son derivadas de sustancias primarias encontradas en la tierra primitiva, los estudios realizados en depósitos geológicos y fósiles, muestran la existencia de esteroides en diferentes eras geológicas de la tierra; por ejemplo en el periodo terciario, en todos los periodos de la era mesozoica (cretácico, jurásico y triásico), y en los periodos pérmico y cámbrico de la era paleozoica y finalmente en la era precámbrica.

Las investigaciones realizadas en este campo concluyen que los primeros esteroides fueron biosintetizados por organismos primitivos hace 1.5 billones de años (Witzman, 1977). Esta información puede ser de gran ayuda para determinar cómo la biosíntesis y la función de los esteroides ejercieron su influencia durante la evolución de la vida. También los esteroides mostraron cambios durante el paso del tiempo siendo posible su análisis en formas primitivas y en los más antiguos fósiles vivientes que existen como son los hongos y bacterias. En estos organismos unicelulares se encuentran una gran variedad de esteroides, algunos de los cuales fueron adquiridos también por

organismos superiores. La habilidad que estos organismos poseen para sintetizar y utilizar esteroides para provocar cambios en los procesos vitales, ha sido reconocida y se les considera como ayuda esencial en la investigación de los esteroides.

Por las investigaciones realizadas, se considera que es altamente improbable que existan organismos que no sintetizen esteroides. Los esteroides juegan un papel importante en el desarrollo de la vida ya que están asociados con funciones vitales y algunos han tenido funciones específicas en el curso de la evolución.

En los vertebrados, funciones como; la reproducción el metabolismo y la conducta, así como también algunas funciones membranales están relacionadas con los esteroides.

De tal manera los esteroides han tomado parte en procesos de control de funciones esenciales para la vida en la tierra desde hace más de 2 billones de años. Sin embargo, la investigación sobre los esteroides fue realizada hasta dos mil años más tarde. La relación existente entre las gónadas y las características sexuales de los animales, así como los efectos de la castración fueron descritos desde los tiempos de los filósofos griegos y los médicos egipcios y romanos.

En el siglo XVIII Hunter (citado en Raspé, 1969) realizó los primeros experimentos de transplante de testículos. Posteriormente Berthold en 1849 (citado en: Raspé, 1969) mostró que al extirpar los testículos de gallos, se atrofiaron los colgajos de la cresta y la barba, se modificó el plumaje y desapareció la actividad genésica y la acometividad. Lo que constituyó la prueba fehaciente de la existencia de una secreción

interna. Además este hallazgo dió como resultado el nacimiento de la endocrinología.

En 1929 Butenandt mostró la existencia de las hormonas sexuales, llamadas así desde entonces. Más tarde Knauer y Halban llevan a cabo los transplantes de ovarios en cobayos y en conejos, onservando los cambios en la citología vaginal (Marrian, 1950; Raspé, 1969) aportando conclusiones similares a los experimentos de Berthold en gallos, lo cual fijó la atención sobre las gónadas. Originandose los trabajos de Fraenkel en 1903 sobre la función del cuerpo lúteo y el mantenimiento del embarazo (Raspé, 1969). Así, se llegó a la conclusión de que los ovarios producían hormonas femeninas. Por su parte el bioensayo diseñado por Allen-Doisy ( citado en: Marrian, 1950) permitió ver la actividad estrogénica en la vagina en roedores; otro ensayo descrito por Ascheim y Zondek en 1927 (citado en: Marrian, 1950) permitió usar la orina de mujeres embarazadas para determinar el tipo de hormonas y sus cantidades, con lo que Doisy primero y después Butenandt (citado en: Marrian, 1950) comunican el aislamiento de la hormona " folicular" del ovario. Así, Butenandt infirió la estructura al señalar que se trataba de un esteroide al cual dió el nombre de estrona. Más tarde descubrió la androsterona en 1931 (citado en: Marrian, 1950) y la "hormona del cuerpo" lúteo en 1934 (citado en: Marrian, 1950) a la que finalmente se le llamó progesterona. Un año después la testosterona fue descubierta por David y cols., (citado en: Marrian, 1950).



## 2) Estructura Química y Biosíntesis

Los esteroides son compuestos químicos derivados del hidrocarburo tetracíclico saturado (ciclo-pentano-fenantreno), poseen un esqueleto de cuatro anillos designados A, B, C y D. Estas sustancias también tienen en común un número consecutivo de átomos de carbono y en muchos casos un átomo de oxígeno en el carbono 3, lo que constituye un remanente de su biosíntesis a partir del escualeno.

Los esteroides difieren en el número y en la posición de sus dobles enlaces, en el tipo, localización y número de sus grupos funcionales sustituyentes, en la configuración ( $\alpha$  o  $\beta$ ) de los enlaces entre sus grupos sustituyentes y el núcleo, y en la configuración que adoptan los anillos entre sí, en estos compuestos el hidrocarburo originario posee seis centros de asimetría. Los principales puntos de sustitución son: el carbono 3 del anillo A, el carbono 11 del anillo C y el carbono 17 del anillo D. Todos los esteroides se originan a partir del escualeno triterpeno lineal que se cicla con facilidad. El primer producto esteroide importante de esta ciclación es el lanosterol, que es el precursor del colesterol (Lehninger, 1978). El colesterol con 27 átomos de carbono es el precursor de los esteroides fecales, de los ácidos biliares y las hormonas esteroides animales. Se distinguen seis grupos importantes con 27, 24, 23, 21, 19 o 18 átomos de carbono.

Los esteroides sexuales se dividen básicamente en tres familias: las progestinas, los andrógenos y los estrógenos.

La producción de hormonas esteroides a partir del colesterol se realiza a partir de un compuesto intermedio, pregnenolona, el cual contiene el núcleo del colesterol con una cadena lateral de tan solo dos carbonos. La pregnenolona es el precursor de la progesterona, que es la hormona progestacional de la placenta y del cuerpo lúteo, y a su vez, la precursora tanto de los andrógenos u hormonas sexuales masculinas, como la androsterona y la testosterona, como de los estrógenos u hormonas sexuales femeninas como la estrona y el estradiol. Además de los corticosteroides adrenales, la corticosterona y la aldosterona (Figura 1).

Para cada paso de transformación existen enzimas específicas que regulan la conversión de un compuesto a otro. Actualmente los pasos enzimáticos para la biosíntesis y metabolismo de las hormonas esteroides están bien caracterizados (Bentley, 1976).

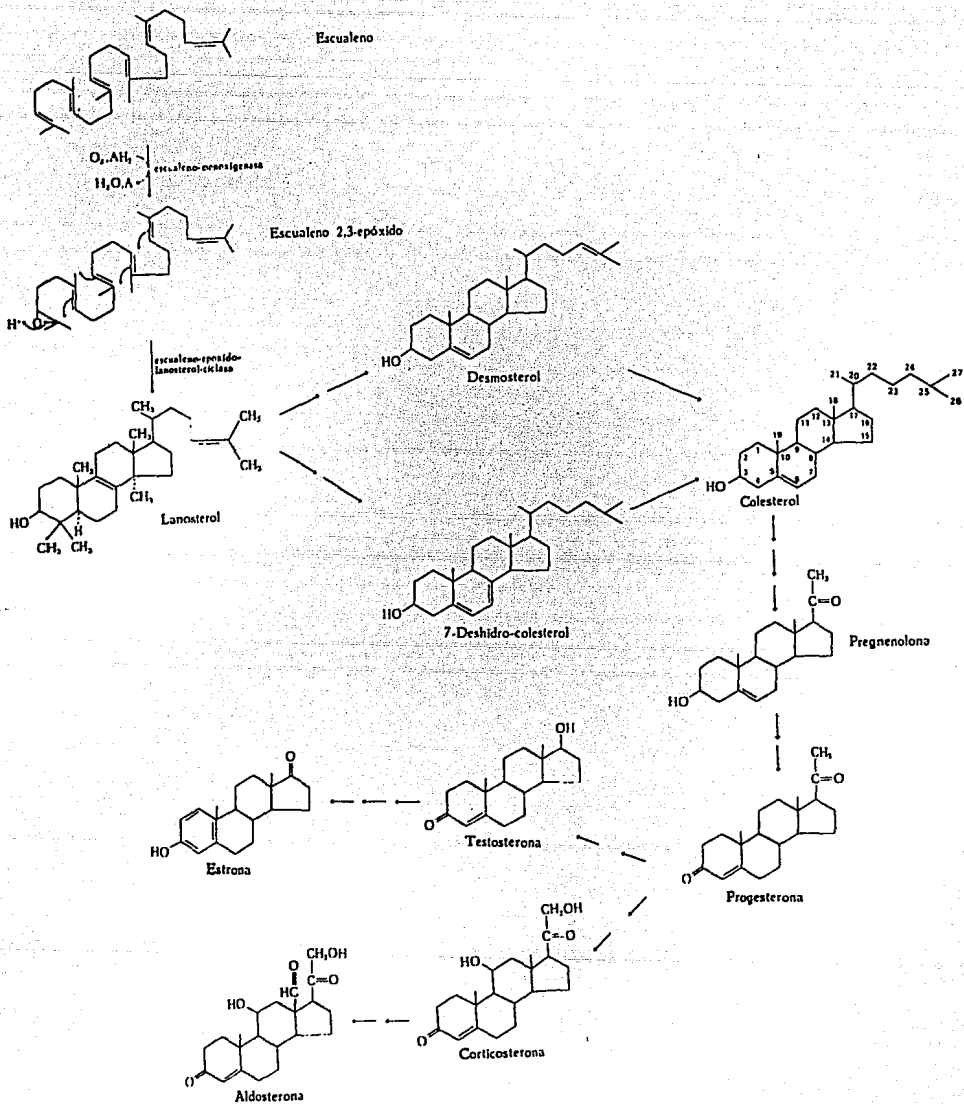


Figura 1. Biosíntesis de hormonas esteroides.

### 3) Mecanismo de acción

Las investigaciones realizadas en la última década sugieren dos principios básicos de la gran variedad de acciones biológicas de las hormonas esteroides, se distinguen cuando menos dos instancias. Los efectos que tienen acción en el genoma y los efectos en otras áreas o no-genómicos, como los observados en la membrana.

#### a) Mecanismos Genómicos

Actualmente es aceptado que debido a las propiedades fisicoquímicas de los esteroides como su liposolubilidad, éstos compuestos atraviesan la membrana celular con relativa facilidad, probablemente por un mecanismo de difusión simple. Aunque en algunos casos pueden ser transportados por acarreadores (O'Malley, Sherman y Toft, 1970). Una vez dentro de la célula el esteroide se une reversiblemente en forma no-covalente a una proteína oligomérica intracelular a la que se denomina genéricamente receptor. De esta manera se forma un complejo esteroide-receptor de alta afinidad (Westphal, 1980).

Las funciones de estos receptores comprenden el reconocimiento de la hormona dentro de la célula y la transducción y amplificación de la señal hormonal, además de transportar al esteroide en el interior de la célula. El complejo esteroide-receptor es reconocido como una nueva entidad que provoca la respuesta biológica. La localización de receptores intracelulares de estrógenos, andrógenos, progestinas y glucocorticosteroides han sido identificados caracterizados y mapeados en el SNC, el útero y otros tejidos (McEwen, Krey y Luine, 1978; McEwen, 1980).

Las propiedades fisicoquímicas de los receptores son poco conocidas, aunque se distinguen cuando menos tres zonas en estas proteínas; la primera que se une al esteroide se llama "meroreceptor" y puede incluir a todo el esteroide o a solo una parte. La segunda es la zona de interacción con el ADN y la última es un componente inmunoactivo el cual parece ser común a receptores de varios esteroides. En el caso de los receptores a glucocorticosteroides, estudios genéticos demostraron que el gene responsable de la síntesis de los receptores es de tipo autosomal y se localiza en el cromosoma 18 en las células del ratón. Entre los factores que regulan este receptor se encuentra una proteína llamada "tioredoxina" que previene la inactivación y la transformación. Además el ión  $Ca^{2+}$  y los procesos de fosforilación son también factores de regulación (Walters, 1985).

El mecanismo de acción genómico de las hormonas esteroides, comprende la formación del complejo esteroide-receptor, el cual se transloca al núcleo donde se une a la cromatina e inicia cambios en la expresión genética. Al unirse el complejo esteroide-receptor con la cromatina adquiere el nombre de transformado, este cambio es promovido por el esteroide que forma un ligando alostérico. La transformación da como resultado la exposición de cargas positivas en su superficie lo que le facilita la unión con polianiones, incluyendo al propio ADN. La interacción esteroide-receptor-genoma es el evento primario en la inducción de la transcripción de un gene previamente programado.

El receptor a los estrógenos se localiza en la matriz nuclear, es decir, se trata de una proteína nuclear, por lo tanto no es necesaria la translocación del complejo esteroide-receptor. Además, aunque este receptor se encuentra inmovilizado en la matriz nuclear, puede cambiar su conformación cuando se une el estradiol lo que modifica su interacción nuclear (Gorski, Welshons y Sakai, 1984).

Cuando se mostró que la matriz nuclear esta involucrada en la replicación y transcripción del ADN, resultó ser importante determinar los mecanismos utilizados por esta matriz nuclear para regular los factores biológicos. Dentro de estos mecanismos se realizaron estudios en relación a la acción de esteroides sexuales. Así el grupo de Barrack (Alexander y cols., 1986; Barrack, 1983; Barrack, Hawkins y Coffey, 1979; Diamond y Barrack, 1984) identificaron y caracterizaron receptores específicos a esteroides, los cuales se asocian con la matriz nuclear de aquellos tejidos que responden a los estrógenos y los andrógenos, como es el caso de los receptores estrogénicos en la matriz nuclear del útero de rata (Barrack y cols., 1977; Barrack y Coffey, 1982), del hígado de rata (Alexander, Greene y Barrack, 1986) y del hígado de gallina (Barrack y Coffey, 1980, 1982; Barrack, Hawkins y Coffey, 1979). Además identificaron receptores androgénicos en la matriz celular de células de la rata (Barrack y Coffey, 1980, 1982; Diamond y Barrack, 1984) y las células de la prostata humana (Barrack, Bujnovsky y Walsh, 1983).

En lo relativo a la progesterona se mostró que la síntesis de sus receptores que también captan 5 $\alpha$ -pregnandiona es modulada en parte por las concentraciones de estrógenos. Los receptores a

corticosteroides y a otros esteroides también modifican tanto su afinidad como su cantidad a lo largo del ciclo celular. Además, las concentraciones intracelulares del ión  $Ca^{2+}$ , a través de su papel como segundo mensajero, modula la unión esteroide-receptor y por lo tanto su acción biológica.

Es importante mencionar que los conocimientos sobre el mecanismo de acción genómico de las hormonas esteroides es un área que evoluciona rápidamente y que se basa fundamentalmente en modelos; por lo tanto, los mecanismos precisos están aún por establecerse.

Por otro lado, es también evidente la existencia de efectos ejercidos por los esteroides que se realizan tan rápidamente, que posiblemente no impliquen una mediación por el genoma. Estos efectos se efectúan por mecanismos llamados no-genómicos.

#### b) Mecanismos No-genómicos

Los mecanismos no-genómicos son de corta latencia y de corta duración. Los efectos no-genómicos de los esteroides son observados con los estrógenos (McEwen y Parsons, 1982) y fundamentalmente con los metabolitos 5-reducidos de la testosterona y la progesterona (Kubli-Garfias, 1984, 1987). Estos efectos se observan en la membrana celular y se manifiestan como modificaciones en la excitabilidad, y en la modulación de la acción y de la liberación de neurotransmisores (McEwen, 1980). Por ejemplo, el  $17\beta$ -estradiol aplicado por iontoforésis, en el área preóptica y en el hipotálamo inhibe el disparo celular en

milisegundos . Así se sugirió que los estrógenos modulan el disparo neuronal en el área preóptica y modifican la permeabilidad de la membrana celular por alterar los canales de  $K^+$ . Además, producen liberación de histamina y modifican la permeabilidad de la membrana celular de los lisosomas (Kelly, Moss y Dudley, 1977).

En relación a las progestinas, se mostró que una serie de metabolitos de la progesterona, particularmente 5-reducidos poseen efectos anestésicos (Selye, 1942). Estudios posteriores mostraron que los metabolitos  $5\beta$ -reducidos son aún más potentes para aumentar el umbral de respuesta a estímulos nociceptivos (Kubli-Garfias y Whalen, 1977). Además, estos compuestos producen una sincronización electroencefalográfica y una disminución en la frecuencia de descarga espontánea en diferentes regiones cerebrales (Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976). Estos esteroides antagonizan el efecto excitador del rojo de rutenio (Kubli-Garfias y cols., 1982a) y de la 4-amino-piridina (Kubli-Garfias y cols., 1985b).

Por otra parte, se demostró experimentalmente, la capacidad de los metabolitos 5-reducidos, para modificar la dinámica de algunos neurotransmisores (Kubli-Garfias y cols., 1983d) para relajar el músculo liso uterino (Kubli-Garfias y cols., 1979 y 1980).

En contraste, a estas acciones, los efectos mediados por mecanismos genómicos son de larga latencia y duración. Por ejemplo, la activación provocada por estradiol de la conducta sexual femenina en ratas presenta una latencia de 18 a 24 horas



(Green, Luttge y Whalen, 1970). Además los efectos rápidos de la progesterona, los cuales inducen la facilitación de la conducta sexual femenina, pueden ser bloqueados por anisomicina que provoca inhibición de la síntesis de proteínas (Rainbow, Davis y McEwen, 1980).

#### 4) Acción de las hormonas esteroides

Las hormonas secretadas por glándulas endocrinas pueden influir en las funciones celulares de diferentes tejidos.

El SNC es influenciado por hormonas esteroides durante todo el desarrollo embrionario, la diferenciación sexual, la pubertad y la madurez. Estas influencias incluyen las manifestaciones conductuales y procesos de adaptación al medio ambiente. Las glándulas productoras de esteroides son fundamentalmente las gónadas, la corteza suprarrenal y la placenta. Aunque, existen otros tejidos capaces de metabolizar estas hormonas, entre ellos se encuentra el SNC, el hígado, el riñón y la piel.

Las hormonas adrenocorticales, además de regular la producción y utilización de energía y el balance de electrolitos como el sodio y el potasio, también ejercen acciones en ciertas áreas del cerebro. En relación a los esteroides gonadales (secretados por los ovarios y los testículos) sus acciones se ejercen más específicamente en tejidos asociados a las funciones sexuales; en las hembras, en la vagina, el útero, el oviducto y las glándulas mamarias y en los machos en las vesículas seminales y la próstata. Las hormonas sexuales también estimulan la

conducta sexual actuando en las células nerviosas del cerebro (McEwen, 1976).

#### 5) Tejido Muscular

El tejido muscular, el cuarto tejido básico, está especializado en la contractilidad. Los primeros anatomistas encontraron, mediante disección, que los músculos están compuestos por estructuras alargadas que llamaron fibras. Con el advenimiento del microscopio de luz y la teoría celular, se observó que cada fibra era una célula (citado por Ham, 1975; Lesson y Lesson, 1977).

Una de las principales características de las fibras musculares es que, durante la contracción se acortan en su eje largo, que tira de las inserciones de sus dos extremos para acercarlas entre sí. Para efectuar este trabajo las fibras musculares consumen (metabolización) energía. La descripción del proceso de la mecánica de la contracción muscular constituyó un problema durante décadas. El microscopio electrónico permitió descubrir que la función mecánica del músculo se realiza en los filamentos proteínicos de disposición longitudinal que se encuentran dentro de la fibra. Estos filamentos son de dos tipos; unos gruesos, que contienen la proteína miosina, y los otros, más delgados, los cuales contienen la proteína actina. En la fibra muscular relajada, estos dos tipos de filamentos tienen interdigitaciones, pero solo sobre una parte de su longitud. Cuando se contrae una fibra, la atracción entre ambos filamentos se hace tan grande que se deslizan uno a lo largo del otro (Ham, 1975).

Existen tres clases de tejido muscular, los cuales aunque están compuestas por fibras musculares, se distinguen entre sí por las siguientes características; estructuras microscópicas, distribución, inervación y el tipo de función que realizan.

Un tipo de músculo denominado estriado, está unido con los huesos del esqueleto por lo cual también recibe el nombre de músculo esquelético y su función es la locomoción de los huesos ejecutando acciones voluntarias. Esta clase de músculo es el más típico e investigado.

El segundo tipo de músculo se localiza en las paredes del corazón y de las venas pulmonares, es involuntario y se conoce como músculo cardíaco. Tanto las fibras musculares estriadas como las cardíacas tienen filamentos similares y su actina y miosina se ha investigado a fondo.

La tercera clase, conocida como músculo liso, es distinta a las otras dos; cada célula es fusiforme, alargada y están en relación íntima con el tejido conectivo. Su distribución es principalmente visceral, es la parte contractil del aparato digestivo, respiratorio, y urogenital, también se encuentra en arterias, venas grandes, conductos linfáticos, dermis, iris y cuerpo ciliar del ojo. Su función principal es controlar los calibres de las luces.

La contracción del músculo liso se distingue en muchos aspectos de la de los otros músculos, sobre todo porque es más lenta con respecto a la contracción de los otros dos tipos de músculos. El músculo liso también contiene actina y miosina, pero su distribución y organización son distintos al de las proteínas

correspondientes en los músculos estriado y cardíaco y se parecen a las que se encuentran en tipos de células dotadas de cierta contractilidad.

Los tres tipos de músculos, esquelético, cardíaco y liso, contienen en los vertebrados los filamentos de actina y miosina, y parece que emplean el mismo conjunto básico de interacciones moleculares.

La descripción del mecanismo de contracción muscular, seguida por el deslizamiento mecánico de los filamentos de la actina y la miosina en el músculo estriado (Huxley, 1945ab) fue el paso previo que indujo a dilucidar los eventos moleculares que siguen los filamentos. Una gran parte del volumen de las células musculares lo ocupan sus elementos contractiles; las miofibrillas, las cuales están dispuestas en haces paralelos al eje de contracción, cada miofibrilla contiene múltiples miofilamentos.

Las moléculas de miosina se orientan con sus cabezas dirigidas hacia fuera del centro del filamento grueso. Estas cabezas se proyectan lateralmente y sobresalen del haz dispuestas de manera helicoidal regular, formando unos puentes transversales. Las cabezas de miosina, las cuales parecen púas, y varían en la distancia con que sobresalen del filamento grueso, situación que depende del estado de relajación o de contracción muscular (Lehninger, 1978).

Hanson y Huxley (1955), y Huxley (1957) propusieron varias teorías sobre el deslizamiento de los filamentos, basadas en las propiedades cíclicas de los puentes transversales. El modelo de Huxley describe un ciclo de interacciones entre los filamentos de

actina y miosina. En este ciclo eslabonado, la miosina se ligaría a la actina por movimientos directos como un elemento elástico, y después se despegaría. Hasta la actualidad este modelo o hipótesis propuesta por Huxley es aceptado en forma general (Hibberd, 1986).

#### 6) Ciclo contracción relajación

Existe una serie de eventos relacionados entre sí para el entendimiento del mecanismo que promueve el ciclo contracción-relajación. El primer evento consiste en la propagación del potencial de acción hacia el interior de la célula a través del sistema tubular (sistema T) en el músculo esquelético, y a través de las caveolas en el músculo liso, las cuales son el homólogo funcional del sistema T (Kuriyama, 1981). En este sentido, las caveolas son un sistema complejo de invaginaciones de la membrana las cuales se abren al espacio extracelular y pueden secuestrar iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Wilsman, Farnum y Reed-Aksamit, 1981). A diferencia del músculo estriado, la célula del músculo liso depende en gran medida del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para contraerse (Kuriyama, 1981). El  $\text{Ca}^{2+}$  ejerce un papel, preponderante en la regulación del ciclo contracción-relajación tanto del músculo liso (Hurwitz y Suria, 1971; Somlyo y Somlyo, 1968), así como del músculo estriado (Sandow, 1970) y del músculo cardíaco (Langer, 1968).

En algunos tipos de músculo liso; como el que se encuentra en las arterias pulmonares y en la aorta de conejo (Hudgiens y

Weiss, 1968) se localiza una poza intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  que determina significativamente la actividad mecánica de la contracción. En otros tipos de músculo liso, como el encontrado en la taenia coli del conejo, la función de esta poza intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es aún dudosa (Devine, Somlyo y Somlyo, 1972) además, en el músculo liso intestinal de cobayo, existe también una poza intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  la cual desempeña una función mínima en la actividad mecánica del músculo (Hurwitz y Joiner, 1971). En el acoplamiento excitación-contracción están involucrados la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de depósitos intracelulares (Villar, D'ocón y Anselmi, 1985). Estos depósitos intracelulares, los cuales tienen la capacidad de donar  $\text{Ca}^{2+}$  para que ocurra el proceso de la contracción del músculo liso, incluyendo el retículo endoplásmico (RE), las mitocondrias, las caveolas, membranas, y el  $\text{Ca}^{2+}$  fijado por los glicolípidos y la colágena (Giembycz y Rodger, 1987). El  $\text{Ca}^{2+}$  es el agente que activa a las proteínas contráctiles en las fibras del músculo liso (Somlyo y Somlyo, 1968; Hurwitz y Joiner, 1971). La cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  necesario para inducir tal excitación, depende en gran medida de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Sommerville y Hartshorne, 1986), en general es aceptado que la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de cualquiera de los dos sitios; tanto intracelular como extracelular son necesarios para mantener la contracción del músculo liso (Ebashi y Endo, 1968; Borle, 1981).

El incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) es el evento indispensable para activar el desarrollo de la tensión en el músculo liso (Bolton, 1979; Ebashi, 1980). En células totalmente relajadas la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  fluctúa entre 50 y 350

nM, dependiendo del tipo de músculo liso (Rasmussen y Barret, 1984). Esta cantidad es insuficiente para activar a las proteínas contráctiles y únicamente cuando la  $[Ca^{2+}]_i$  aumenta (0.3 a 2.1  $\mu$ M) se activan los mecanismos bioquímicos dependientes de  $Ca^{2+}$  que producen la contracción muscular (Giembycz y Rodger, 1987). Por su parte, la concentración de  $Ca^{2+}$  en el líquido extracelular ( $[Ca^{2+}]_e$ ) es entre 10 000 y 15 000 veces mayor que la  $[Ca^{2+}]_i$ . Los valores son de aproximadamente 1.5 mM (O'Doherty y cols., 1980; Daniel, Grover y Kwan, 1983). El aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  activa a las proteínas contráctiles del plasmalema que se asocian con los depósitos de  $Ca^{2+}$ , esta activación puede liberar  $Ca^{2+}$  hacia el citosol y provocar una concentración suficiente para generar el desarrollo de la tensión.

Recientemente se mostró que en el músculo esquelético, el mio-inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) actúa como segundo mensajero químico en la despolarización del sistema T y en la liberación de  $Ca^{2+}$  del RE (Vergara, Tsien y Delaym, 1985). También se dan evidencias del papel fisiológico que el IP3 y otro producto lipolítico, el 1,2-diacilglicerol (DAG), ponen en la contracción muscular, indicando que la primera función del IP3, es la movilización rápida de gran cantidad de  $Ca^{2+}$  del RE requerida para el desarrollo de la fuerza de contracción dependiente de la calmodulina en el músculo liso (Baron y cols., 1984; Hashimoto y cols., 1986; Duncan y cols., 1987). El DAG por otro lado, está involucrado en los procesos, los cuales controlan el mantenimiento de la tensión muscular (Rasmussen y Barret, 1984;

Park y Rasmussen, 1986). Esta última idea estimada de la observaciones de que en presencia de fosfatidilserina y otros fosfolípidos asociados a la membrana el DAG activa rápidamente la C-Kinasa cuando la célula está en reposo (Dale y Obianine, 1985).

Existen proteínas acopladas al  $\text{Ca}^{2+}$ , que son: la calmodulina y la miosina. La calmodulina tiene una alta afinidad para unirse al  $\text{Ca}^{2+}$  y actuar como un componente del sistema Ca-buffer. El complejo Ca-calmodulina es capaz de activar a la cadena de la miosina ligera kinasa, con lo cual también regula la actividad contráctil. Así la fosforilación de la miosina establece una conformación activa, lo que provoca la fijación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la troponina. Esta acción promueve la activación del ciclo de los puentes transversales, provocando el deslizamiento de los filamentos, lo cual es esencial para la iniciación de la contracción (Sommerville y Hartshore, 1986) (Figura 2A).

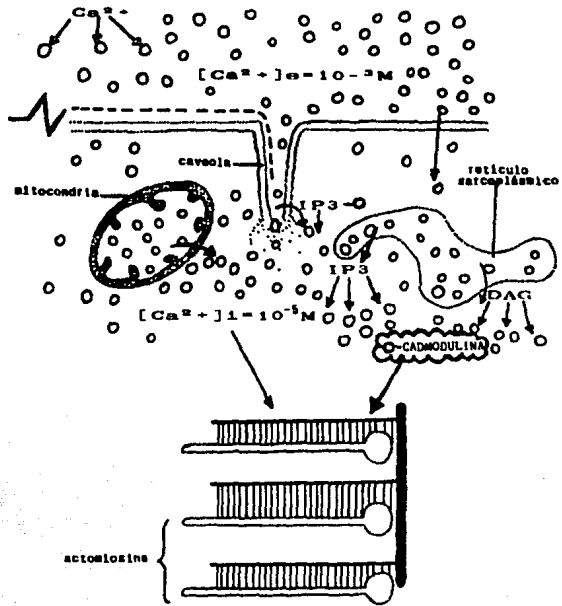
La teoría de la fosforilación sugiere que en la contracción muscular se llevan a cabo los siguientes eventos: 1) En presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  una cadena ligera de miosina kinasa se activa y fosforila a la cadena ligera de miosina; 2) La Mg-ATPasa de la miosina fosforilada a su vez es activada por la actina lo que estimula el deslizamiento de los puentes transversales para el desarrollo de la tensión; 3) En ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  la kinasa no es activada, y una fosfatasa remueve el grupo fosfato; 4) La miosina desfosforilada no activada por actina, disocia el complejo actina-miosina provocando con ello la relajación muscular (Hartshone, Gorecka y Askoy, 1977). Esto sugiere que la cadena ligera de la miosina kinasa es el factor importante que activa las proteínas contráctiles del músculo liso (Kuriyama,



1981).

Estas observaciones muestran que el aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$  es el inductor principal para que se lleve a cabo la contracción. De tal forma la relajación es provocada por la disminución de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Esta disminución es producida por diferentes causas: 1) Secuestro de  $Ca^{2+}$  por RE y/o mitocondrias al revertir la dirección en la que operan las bombas de  $Ca^{2+}$  (Yamada y Tonomura, 1972; Endo, 1977). 2) Por la expulsión directa al espacio extracelular consecuencia de la acción de bombas de  $Ca^{2+}$  y 3) Por la expulsión al medio extracelular de iones  $Ca^{2+}$ , resultado del mecanismo intercambiador Na-Ca (Kuriyama, 1981) (Figura 2B).

2A.



2B.

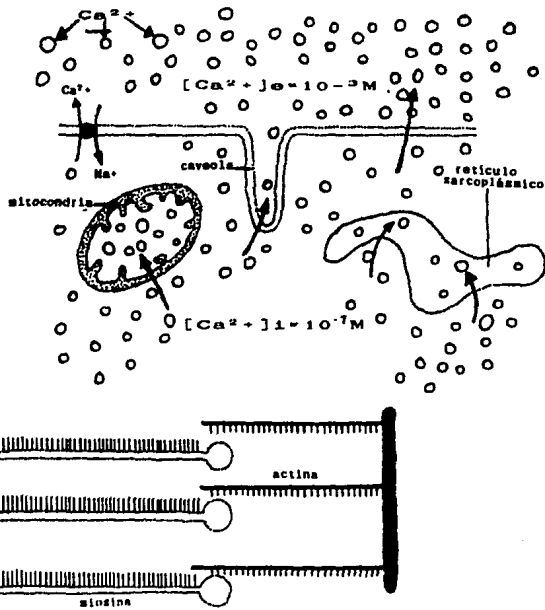


Figura 2., 2A. la figura muestra el mecanismo de contracción del músculo liso. IP3 (Mio-inositol 1,4,5-trifosfato), DAG (1,2-diacilglicerol).

2B. Se muestra el mecanismo de relajación del músculo liso.

## 7) Canales de calcio

Anteriormente se mencionó que las contracciones dependen fuertemente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior de la célula del músculo liso se realiza básicamente a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  residen en la membrana de las células eucariontes y poseen una estructura macromolecular la cual consiste esencialmente de una o más glicoproteínas (Lakshminarayanaiah, 1981; Hille, 1984; Towart y Schramm, 1984). Existen dos clases de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en el músculo liso: canales sensibles al voltaje y canales operados por un receptor (Bolton, 1979; Droogmans, Himpens y Casteels, 1985; Hurwitz, 1986).

### a) Canales sensibles al voltaje.

Utilizando la técnica de fijación de voltaje ha sido posible examinar la relación que existe entre el valor del potencial de membrana y la magnitud de la corriente iónica a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje. Así, se mostró que es necesario que la membrana se despolarise (produciendo un nivel más positivo) hasta un punto umbral, antes de que llegue una corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  detectable (Brown y cols., 1981; Lakshminarayanaiah y Beirao, 1979). El incremento progresivo de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  es una consecuencia directa del incremento progresivo en la conductancia iónica (i.e. disminución en la resistencia eléctrica) el cual se refleja en el incremento de la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hille, 1984).

El comportamiento de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  fluctua entre el estado activado y desactivado. En general, un canal podría estar en una conformación cerrada o en una conformación activada. Mediante los registros de "Patch clamp" se muestran que los canales, en algunos casos, pueden presentar más de un estado activado con diferentes magnitudes del flujo de corriente (Hille, 1984). Así, se observa que los canales pueden tener conformación abierta o cerrada y a la vez estar en un estado activado o desactivado (Hille, 1984). Un canal en estado activado, igual que un canal en estado desactivado, con una conformación cerrada, no permite el flujo de iones a través del poro acuoso (Hurwitz, 1986). Estas combinaciones dan evidencias de la existencia de por lo menos tres diferentes maneras del comportamiento de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hess, Lansman y Tsien, 1984). Estas etapas dependen del tiempo que permanezcan permeables al ión, y cada una reacciona por reducción del potencial de membrana. La despolarización de la membrana que aumenta la conductancia iónica es consecuencia directa de la apertura de los canales (Hurwitz, 1986). Por otra parte la inactivación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  presenta una cinética más lenta y ocurre dentro de un rango de potencial de membrana más positivo que la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje (Eckert y Chad, 1984).

## b) Canales operados por un receptor

Estos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentran muy cerca de los receptores de membrana y se activan por la interacción agonista-receptor. Esta clase de canales juega un papel importante en el comportamiento funcional del músculo liso y muchas células secretoras. Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por un receptor son menos estudiados que los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje, ya que sus propiedades específicas aún son desconocidas (Hurwitz, 1986).

Existe una gran variedad de sustancias químicas capaz de afectar indirectamente a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  por modificar las condiciones que regulan su función. Estas, incluyen fármacos que inducen o impiden cambios en el potencial de membrana, los fármacos que alteran la concentración extracelular y/o intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , fármacos que modifican las reacciones bioquímicas involucradas en la operación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (i.e. reacciones de fosforilación y desfosforilación, etc.,) y fármacos que activan o impiden la activación de los receptores membranales cercanos a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Frecuentemente un solo agente es capaz de provocar una serie de respuestas celulares las cuales afectan a más de un tipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ejemplo, la acetilcolina, al activar a los receptores colinérgicos en las células del músculo liso, activa a los canales operados por un receptor que están directamente asociados con los receptores colinérgicos en la membrana. Esto provoca un incremento en la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$

hacia el interior de la célula, así como también, un incremento en otras corrientes iónicas inducidas por la activación de los receptores colinérgicos, como consecuencia se reduce el potencial de membrana (Bolton, 1979). Este efecto puede ser de magnitud suficiente para iniciar la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje (Bolton, 1979).

Es interesante hacer notar que la modificación indirecta de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje, es también consecuencia de la acción de varios neurotransmisores y hormonas (Hurwitz, 1986).

En 1964, Fleckenstein reportó que los agentes químicos del tipo del verapamil y prenilamina presentan un efecto inhibitor del músculo cardíaco. Desde entonces se encontraron un gran número de compuestos orgánicos con diferentes estructuras químicas que poseen un efecto inhibitor similar (Janis y Triggle, 1983; Spedding, 1985). Los miembros de este grupo de compuestos fueron originalmente llamados calcio-antagonistas, por que el mecanismo de acción de su efecto inhibitor es revertido como consecuencia de incrementar la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Recientemente también son referidos como agentes bloqueadores de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  o bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hurwitz, 1986).

## 8) Ionóforos de calcio

Los ionóforos son pequeñas moléculas hidrofóbicas, las cuales son sintetizadas por microorganismos. Algunas de estas moléculas han sido utilizadas como antibióticos. La acción de estos compuestos, consiste en incrementar la permeabilidad de la membrana a diversos iones, acción realizada gracias a su incorporación a la doble capa lipídica de la membrana, lo que altera la estructura de la misma (Gómez-Puyou y Gómez-Lojero, 1977).

Los ionóforos son divididos en dos tipos; el tipo neutral de acarreadores, los cuales están caracterizados por poseer una estructura en forma de anillo sin un grupo ionizable, y el tipo carboxílico de acarreadores, que son moléculas abiertas las cuales poseen un grupo carboxílico ionizable (Simon y Morf, 1973). Estos últimos tienen la estructura más frecuente y se encuentran entre ellos el X-537A y el A-23187. Estos ionóforos son selectivos a cationes divalentes, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$  (Pressman y De Guzmán, 1974).

El A-23187 y el X-537A, transfieren  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana y son ampliamente empleados para disparar ciertos procesos metabólicos que dependen del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ .



## 9) Efecto de los esteroides en tejidos excitables

La modulación de la fisiología uterina por hormonas esteroides es reconocido desde hace más de 50 años. Así Frank y cols., (1925) mostraron un incremento en la actividad uterina consecuencia de la administración de estrógenos.

Más tarde Reynolds y Allen (1932) mostraron que la aplicación de extractos del cuerpo lúteo, producen una inhibición de la actividad espontánea del útero de la coneja y posteriormente Csapo (1956) mostró el efecto bloqueador de la progesterona sobre el músculo uterino.

Además, desde los trabajos de Rothschild y Meyer (1940) se describió que la progesterona puede prevenir el aborto y mantener el embarazo. Por su parte Selye en 1942 observó el efecto anestésico de varios esteroides, entre ellos algunos andrógenos y progestinas. Más tarde, Csapo y Wiest (1969) mostraron la acción de la progesterona sobre el tono uterino en varias especies de animales (rata y coneja) y en la mujer, consecuencia de un efecto hiperpolarizante sobre la membrana celular (Kuriyama y Csapo, 1961; Marshall y Csapo, 1959).

Aunque el mecanismo por el cual las hormonas ováricas influyen sobre la actividad contráctil del útero, es aún desconocido. Se ha postulado que en su mecanismo de acción se encuentran involucrados algunos iones, así se demostró que las sales de  $\text{Ca}^{2+}$  producen un incremento de las contracciones uterinas en la coneja (Reynolds, 1933). Además, se reportó que la progesterona modifica los flujos del ión potasio ( $\text{K}^+$ ) en las células miometriales (Wagatsuma, Sullivan y Kumar, 1967).

Con el objeto de describir el efecto bloqueador de la progesterona, sobre la contractilidad del miometrio, Carsten (1974) empleando microsomas de útero de bovino en presencia del esteroide estudió el transporte del  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de ATP. Este autor encontró que la hormona incrementa significativamente la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por su parte, Batra en 1973 estudió la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocondrias de miometrio humano tratado con estrógenos y observó que los estrógenos sintéticos inhiben la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial dependiente de ATP y que la progesterona no afectaba la fijación de  $\text{Ca}^{2+}$  por las mitocondrias. Más tarde se mostró que esta hormona disminuye la fijación de  $\text{Ca}^{2+}$  del miometrio (Batra y Bengtsson, 1978).

#### 10) Efecto de los esteroides en el SNC

Los estudios iniciales encaminados a analizar los efectos de los esteroides en el SNC (P'An y Laubach, 1964; Gyermek, 1967) mostraron que algunos compuestos  $5\beta$  reducidos derivados de la progesterona, poseen una potencia anestésica mayor, comparados con la misma progesterona. En estos casos el tiempo de pérdida de la conciencia, del reflejo postural y la insensibilidad del animal a estímulos nociocéptivos es mayor a dosis iguales. Estos experimentos dieron evidencias del un efecto claro de los esteroides derivados del pregnano sobre el SNC. Además, surgieron preguntas acerca de su sitio, mecanismo de acción y sobre todo de su importancia en la fisiología del SNC así como de la conexión entre estos efectos, con otras funciones de tipo endocrino.

A pesar de que la progesterona es un compuesto muy estudiado con una gran variedad de efectos descritos, existe muy poca información relativa a las acciones o el significado fisiológicos de sus derivados reducidos en posición cinco. En condiciones fisiológicas, la biotransformación de la progesterona da origen a cerca de 20 diferentes compuestos. Existen datos que sugieren de que en algunos casos los efectos observados, posterior a la administración de esta hormona sean debidos a las acciones ejercidas por uno o varios de sus metabolitos.

Varios efectos ejercidos por los derivados  $5\alpha$  y  $5\beta$  de la progesterona y la testosterona sobre el SNC son ampliamente reconocidos. Por ejemplo se describió que dichos compuestos inducen una sincronización de la actividad eléctrica cerebral y una disminución de la frecuencia de descarga de las neuronas en el mesencéfalo y algunas zonas diencefálicas (Gyernek, 1967; Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976; Kubli-Garfias y cols., 1982a). Así mismo las  $5\beta$  progestinas antagonizan el efecto convulsivo de la 4-aminopiridina (Kubli-Garfias y cols., 1985b). También algunas de esta progestinas participan en el control de la secreción de gonadotrofinas, sobre todo de la hormona luteinizante y la folículoestimulante (Brown-Grant, 1974; Zanisi y Martini, 1975; Fink y Henderson, 1977; Nuti y Karavolas, 1977).

En relación a la conducta sexual, sobre todo el despliegue de la conducta de lordosis en la hembra, las progestinas favorecen la respuesta en la rata tratada previamente con estrógenos (Whalen y Gorzalka, 1972; Kubli-Garfias y Whalen, 1977). La progesterona, la  $20\alpha$ -OH-Progesterona y las progestinas

5 $\beta$  reducidas inhiben la liberación de noradrenalina en rebanadas de corteza cerebral (Kubli-Garfias y cols., 1983d). Estos autores encontraron que la 5 $\beta$  pregnandiona es menos potente que la pregnanolona y la epipregnanolona para deprimir el disparo neuronal. Todas estas observaciones probablemente son consecuencia de los diferentes mecanismos de acción, dependientes de la estereoquímica de las progestinas, que involucran un bloqueo del influjo de Ca<sup>2+</sup> del cual depende la liberación de neurotransmisores (Kubli-Garfias, 1984).

Toda esta variedad de resultados son evidencia de que el cerebro es un órgano blanco de esteroides y de que estas sustancias pueden producir en el encéfalo una gran variedad de efectos, los cuales son una manifestación de las dos diferentes vías de acción (efectos genómicos y efectos no-genómicos).

#### 11) Efecto de los esteroides en el útero

El efecto de los esteroides ováricos sobre la actividad muscular uterina fue consecuencia del hallazgo de que el cuerpo lúteo es esencial para mantener el embarazo en la coneja (Fraenkel, 1905). Por su parte, Athias en 1919 y Blair en 1922 mostraron experimentalmente que el ovario es un importante regulador de la actividad miometrial. Posteriormente, Reynolds (1930) desarrolló una técnica para registrar las contracciones uterinas in vivo y mostró el efecto inhibitor de la progesterona sobre las contracciones del útero de la coneja.

Después de la identificación química de las hormonas ováricas, estudios in vivo (Allen y Corner, 1939; Reynolds, 1930) e in vitro (Robson, 1937) mostraron efectos relajantes de la progesterona sobre la actividad miométrial.

En 1932 Reynolds y Allen, describieron que la administración de extractos lúteos que contenían progestinas, inducen una marcada reducción de la contractilidad uterina de la coneja en estro. Con respecto a los andrógenos fue Robson quien en 1937 mostró que la testosterona produce un efecto relajante sobre el útero aislado de la coneja. Por otra parte, estudios realizados por Csapo y Corner en 1952, registraron en condiciones isométricas, tiras de músculo uterino obtenidos de conejas castradas y pretratadas con estrógenos. En estas circunstancias los autores mostraron que estas tiras musculares aumentaban su tensión cuando se estimularon eléctricamente. Sin embargo, si los animales se pretrataban con progesterona, se provocaban el efecto contrario. Posteriormente Marshall y Csapo en 1961, mostraron que la administración de progesterona in vivo e in vitro, inhibe las actividades tanto mecánica como eléctrica del útero de rata preñada.

También en el útero aislado, se observó un efecto relajante tanto en la rata preñada como en la no preñada (Kubli-Garfias y cols., 1979; 1980; 1983a).

En la rata macho, la androsterona y el androstandiol producen un efecto relajante en la vesícula seminal y el epidídimo cuando son estimulados con adrenalina o con bario (Kubli-Garfias, Hoyo-Vadillo y Ponce-Monter, 1983b).

En nuestro laboratorio, observamos que los andrógenos, las progestinas y los corticosteroides producen una relajación del ileon aislado de cobayo (Kubli-Garfias., y cols., 1987). Esta relajación es similar a la producida por la pregnanolona en arterias de perro in vitro contraídas con ergonovina y KCl (Lara-Lemus y cols., 1986) y a la relajación provocada por la androsterona en aorta de rata (Rojas-Mejia y cols., 1986). El mecanismo de esta acción puede ser consecuencia de una disminución en la captación de  $Ca^{2+}$  del miometrio, (Batra y Bengtsson, 1978). Por su parte, Kubli y Cols. (1982b; 1984ab), mostraron que el aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$  estimula la contractilidad del útero de rata, mientras que las progestinas 5-reducidas lo antagonizan. También se observó que los andrógenos y las progestinas producen una relajación en las contracciones inducidas por  $Ca^{2+}$  en úteros despolarizados de ratas preñadas y no preñadas (Kubli-Garfias y cols., 1984ab; Perusquia, Ponce-Monter y Kubli-Garfias, 1984). Todos estos compuestos que relajan las contracciones espontáneas también inhiben la contracción tónica inducida por  $K^+$  (Kubli-Garfias y cols., 1985a).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En trabajos previos, se ha encontrado que los andrógenos y las progestinas 4-en-3-cetona y  $5\alpha$  y  $5\beta$ -reducidos, poseen un efecto intenso de tipo relajante sobre la actividad del útero de la rata (Csapo, 1969, Kubli-Garfias y cols., 1979, 1980, 1983c). El mecanismo de acción mediante el cual los esteroides producen un efecto relajante sobre el músculo liso uterino es aún desconocido.

Por otro lado, los corticosteroides, hormonas bien conocidas por sus efectos en el metabolismo y la regulación mineral, son derivados de la progesterona y poseen como su precursor una configuración 4-en-3-ceto. Debido a esta característica los corticosteroides podrían compartir con la progesterona y algunas otras progestinas 4-en, como la  $20\alpha$ -OH-Progesterona, algunos efectos no-genómicos, tales como su acción sobre el miométrio donde los corticosteroides han sido poco estudiados (Stucki y Gleen, 1961; Ishida y cols., 1972).

Por otro lado se ha observado que la progesterona inducen un efecto relajante en el uréter, el intestino delgado y el estómago (Kumar, 1962). Sin embargo, son pocos los datos relativos al efecto de la progesterona, y compuestos relacionados con esta hormona, sobre el músculo liso intestinal (Bruce y Behsudi, 1979; 1980). Tanto la cantidad, como la biodisponibilidad de estos compuestos en el organismo es importante por lo que cabría esperar que estos esteroides podrían producir una disminución de la contractilidad del músculo intestinal.

En un intento de describir el efecto bloqueador de la progesterona, Carsten (1974) observó que la progesterona incrementa en forma significativa la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por mitocondrias o retículo sarcoplásmico del músculo liso uterino. Además, se mostró que los estrógenos y la progesterona pueden bloquear el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula uterina (Batra y Bengtsson, 1978).

En forma preliminar se observó que los andrógenos y las progestinas 5-reducidos antagonizan el efecto excitador provocado por el  $\text{Ca}^{2+}$  (relación antagonica esteroide-calcio) (Kubli-Garfias y cols., 1982b). Con estos antecedentes se propone que estos esteroides tienen un efecto, mediado por mecanismos no-genómicos en la contractilidad úterina al modificar la permeabilidad de la membrana al  $\text{Ca}^{2+}$  (Kubli-Garfias y cols., 1985a).



#### IV. HIPOTESIS

Aunque los esteroides sexuales juegan un papel importante en la regulación de la fisiología contractil del útero, aún no se conoce completamente la relación precisa de los mecanismos subyacentes a estos efectos reguladores. También otras clases de hormonas esteroides como son los corticosteroides son involucrados en la activación de la contractilidad uterina, pero no se han realizado estudios sistemáticos para describir sus efectos sobre la actividad del miométrio. Existe entonces la posibilidad de que, los esteroides sexuales así como los esteroides de la corteza adrenal pueden extender su acción no-genómica en diferentes tipos de músculo liso no involucrado en la reproducción.

La rapidez con que el músculo liso respone a los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, muestra una dependencia de este tejido por el  $\text{Ca}^{2+}$  externo. Tal dependencia sugiere importantemente que la membrana plasmática es un sitio importante para la interacción esteroide- calcio.

Los andrógenos, las progestinas y los corticosteroides de acuerdo a su estructura química, producen relajación del músculo liso. Se postula que el mecanismo de acción útero-relajante de los andrógenos, las progestinas y sus metabolitos es debida a una acción moduladora de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje.

## V. OBJETIVOS

### OBJETIVO MAYOR:

Conocer el efecto de tres grupos de esteroides (andrógenos, progestinas y corticosteroides) sobre la contractilidad del músculo liso intestinal y postular el posible mecanismo de acción que los esteroides emplean para afectar la contractilidad del músculo liso uterino e intestinal.

### OBJETIVOS INTERMEDIOS:

- a) Estudiar el efecto de los principales corticosteroides sobre la contractilidad del músculo liso uterino.
  
- b) Analizar los efectos observados por la administración de los compuestos 5-reducidos sobre la contractilidad del músculo liso intestinal correlacionados con aquellos descritos en el miometrio. Intentando relacionar su estructura química con su actividad biológica.
  
- c) Estudiar el efecto de los andrógenos y los progestinas 5-reducidos sobre las contracciones inducidas por  $Ca^{2+}$  en el útero de rata despolarizado.
  
- d) Estudiar el efecto de los ionóforos de  $Ca^{2+}$  sobre las células uterinas relajadas por los esteroides.

- e) Estudiar la relación de los esteroides en el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y discriminar entre los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje y operados por un receptor en preparaciones miogénicas.
  
- f) Aportar datos para apoyar la hipótesis de los compuestos 5-reducidos derivados de la testosterona y la progesterona son moduladores de la excitabilidad en general.

**1) Sistema de registro:**

Para el estudio de las contracciones in vitro se empleó un sistema de registro isométrico convencional. Se utilizaron segmentos de tejido de 1 cm de longitud, los cuales fueron fijados en cámaras de incubación que contenía soluciones salinas (volumen 5 ml), a pH 7.4 con burbujeo constante de oxígeno y mantenidos a una temperatura de 37°C. En estas condiciones el tejido se sujetó de un extremo al piso de la cámara y del otro a un transductor Grass modelo FT 03C, el cual detectó las contracciones y las envió a un polígrafo Grass de 8 canales modelo 7D. La tensión para calibrar fue de 1 g, lo cual corresponde a 2 cm de desplazamiento de la pajilla. La señal mecánica registrada por el polígrafo fue enviada a un sistema de microcomputadora. Este sistema consta de un convertidor analógico-digital (A/D) y un paquete de programas en Basic. De esta manera las contracciones se capturaron, almacenaron y procesaron. Mediante este sistema los valores de estas contracciones pudieron ser enviados a una impresora y/o a un graficador (Kubli-Garfias y cols., 1983), (figura 3).

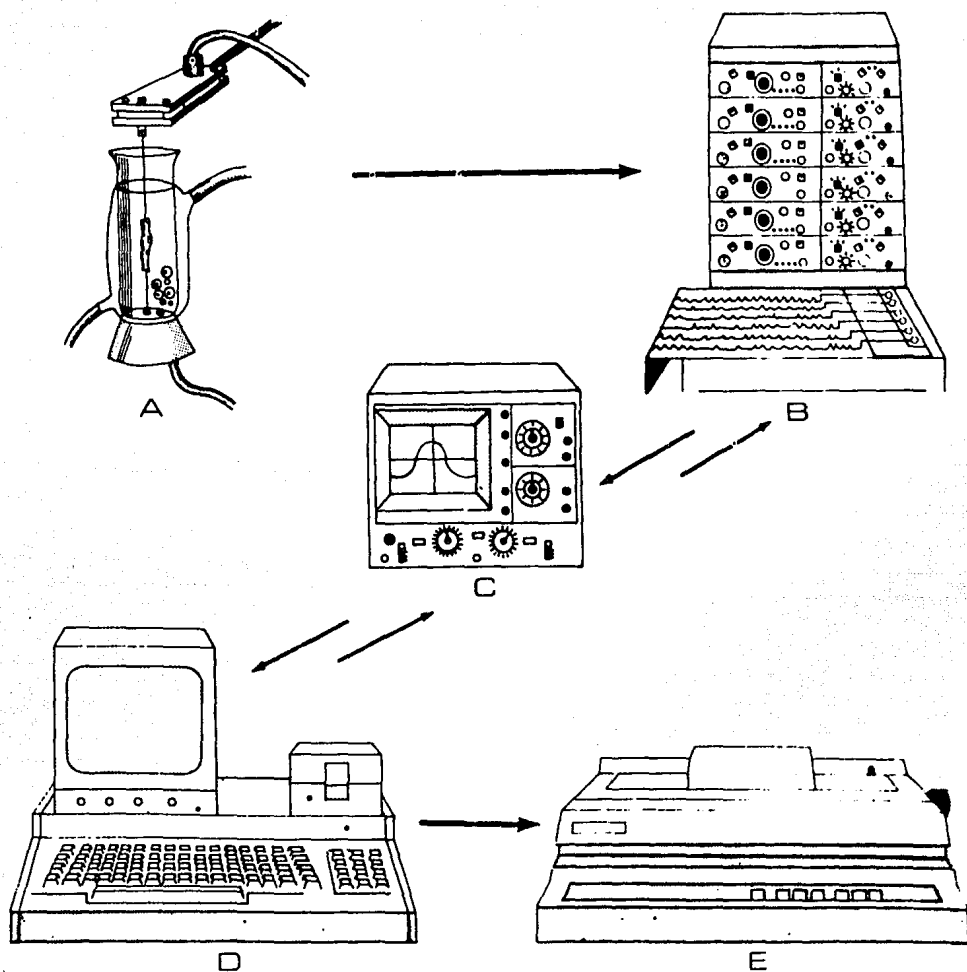


Figura 3. Esquema del Sistema de Registro y análisis.

- A) Cámara con el músculo y transductor,
- B) Poligrafo,
- C) Osciloscopio,
- D) Microcomputadora,
- E) Impresora

Los efectos se cuantificaron determinando el área bajo la curva y las dosis efectivas medias ( $DE_{50}$ ) fueron obtenidas por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949), se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney para análisis estadístico.

Los animales utilizados en este estudio fueron mantenidos en un bioterio con un ciclo luz-oscuridad de 10-14 hrs., a una temperatura de 21°C, alimentados ad libitum con Purina Chow para rata.

Todos los animales utilizados fueron sacrificados mediante un golpe en la nuca.

El vehículo en que se disolvieron los compuestos (propilén glicol) fue probado previamente en el sistema, y se observó que no producía cambios significativos.

## 2) Corticosteroides en el útero

Se utilizaron ratas hembras adultas de un peso de 250 a 300 g de la cepa Sprague-Dawley. El ciclo estral fue seguido durante tres veces consecutivas mediante la técnica de frotis vaginal y se seleccionó la fase de diestro. El útero se disecó en una solución de Ringer Krebs Henseleit que contenía (en mM): NaCl 119, KCl 4.6,  $CaCl_2$  1.5,  $MgSO_4$  1.2,  $KH_2PO_4$  1.2,  $NaHCO_3$  20, glucosa 11.1. El pH se ajustó a 7.4 y se sometió a burbujeo continuo con 5% de  $CO_2$  en  $O_2$ .

Los siguientes esteroides fueron probados (Sigma Chemical Co. St. Louis MO.): 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona, 17 $\alpha$ -OH-P), 21-hidroxi-4-pregnen-3,20-diona

(deoxicorticosterona, DOC),  $11\beta,21$ -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona (corticosterona),  $17\alpha,21$ -dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona ( $11$ -desoxicortisol,  $11$ -D-cortisol) y  $11\beta,17\alpha,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3,20-diona (cortisol). Las hormonas se disolvieron en propilenglicol y se adicionaron al baño a un volumen final de  $10 \mu\text{l}$ . Después de un periodo de estabilización de 45 minutos de la actividad espontánea que se consideraba como basal. Dos periodos de 10 minutos uno antes, como control (100%) y otro después de adicionar cada hormona fueron cuantificados comparativamente para analizar el efecto de cada fármaco. Las contracciones fueron cuantificadas como porcentaje de relajación con respecto al control, al medir el área bajo la curva. Se estudiaron las curvas dosis-respuesta con límites de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M (concentración final en el baño de 5 ml).

### 3) Andrógenos, progestinas y corticosteroides en el intestino delgado

Se utilizaron anillos de ileon de cobayos machos adultos de un peso de 800 a 1000 g de la cepa Hartley. Los segmentos se mantuvieron en solución Krebs que contenía (en mM): NaCl 118, KCl 4.7,  $\text{CaCl}_2$  2.5,  $\text{MgCl}_2$  1.2,  $\text{NaHCO}_3$  25, glucosa 11 y cloruro de colina 0.929. El pH se mantuvo a 7.4, burbujeado continuamente con una mezcla gaseosa de 5% de  $\text{CO}_2$  en  $\text{O}_2$ .

Se probaron tres diferentes clases de esteroides (Sigma Chemical Co. St. Louis MO): ANDROGENOS;  $17\beta$ -hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona),  $17\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -androstan-3-ona (5 $\beta$ -dihidrotestosterona, 5 $\beta$ -DHT), 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona

(androsterona), 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol (androstadiol).  
PROGESTINAS: 4-pregnen-3,20-diona (progesterona), 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona, 17 $\alpha$ -OH-P), 5 $\alpha$ -pregnen-3,20-diona (5 $\alpha$ -pregnandiona, alopregnandiona), 5 $\beta$ -pregnen-3,20-diona (pregnandiona), 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnen-20-ona, 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnen-20-ona (alopregnanolona), 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnen-20-ona (pregnanolona), 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnen-20-ona (epipregnanolona), 5 $\alpha$ -pregnen-3 $\beta$ ,20 $\beta$ -diol (5 $\alpha$ -pregnandiol) y 5 $\beta$ -pregnen-3 $\alpha$ -20 $\beta$ -diol (5 $\beta$ -pregnandiol). CORTICOSTEROIDES: 21-hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (deoxicorticosterona, DOC), 11 $\beta$ ,21-dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona (corticosterona), 17 $\alpha$ ,21-dihidroxi-4-pregnen-3,20-diona (11-desoxicortisol, 11-D-cortisol) y 17 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihidroxi-4-pregnen-3,20-diona (cortisol). Los compuestos se disolvieron en 10  $\mu$ l de propilen glicol.

La actividad espontánea se registró durante un periodo de estabilización de 30 minutos, se tomaron 10 minutos de control antes de poner la hormona y durante 10 minutos se observó el efecto. De la misma manera se estudiaron las curvas dosis-respuesta con límites de 3 a 58 M.

#### 4) Andrógenos y progestinas en la membrana celular uterina

##### a) andrógenos y progestinas en el útero despolarizado:

Para este experimento se utilizaron ratas hembras adultas de un peso de 250 a 300 g de la cepa Sprague-Dawley en fase de diestro, el útero se mantuvo en solución Trizma que contenía (en mM): NaCl 120, KCl 4.5, tris 10, MgCl<sub>2</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, CaCl<sub>2</sub> 1.5, glucosa 11.4, pH 7.4, burbujeado con O<sub>2</sub>.



Después del periodo de estabilización de 30 minutos, el tejido se despolarizó con una solución Trizma de  $K^+$  alto y libre de  $Ca^{2+}$  (por sustitución equimolecular de NaCl por KCl), que contenía (en mM): NaCl 84.5, KCl 40, tris 10,  $MgCl_2$  1.2,  $KH_2PO_4$  1.2, EGTA 2, glucosa 11.4, pH 7.4, burbujeado con  $O_2$ .

En un periodo de 45 minutos después del inicio de la despolarización se adicionó  $CaCl_2$  (1 mM), lo que indujo una contracción tónica sostenida durante 10 minutos, que fue tomada como control y fue interrumpida al cambiar el medio por solución libre de  $Ca^{2+}$ . Esta contracción fue inducida nuevamente al preincubar el tejido con el esteroide 10 minutos antes de la administración de  $CaCl_2$ , 10 minutos después el tejido fue lavado y a los 30 minutos se indujo una tercera contracción con  $CaCl_2$  a la misma dosis.

Los esteroides empleados fueron (Sigma Chemical Co. St Louis MO): ANDROGENOS; testosterona,  $5\beta$ -DHT, androsterona, y androstandiol. PROGESTINAS: progesterona, alopregnandiona, pregnandiona, alopregnanolona, pregnanolona y epipregnanolona. Todos los esteroides fueron disueltos en propilen glicol (10  $\mu$ l).

La segunda contracción inducida por  $Ca^{2+}$ , en presencia del esteroide, fue comparada con el control. Además, se realizaron las curvas dosis-respuesta para obtener la  $DE_{50}$ . Al igual que en el diseño descrito anteriormente, se utilizó verapamil en lugar del esteroide y se obtuvo la  $DE_{50}$  misma que fue comparada con la  $DE_{50}$  de los esteroides.

## b) Ionóforos de calcio

Para analizar el efecto de los ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó el mismo procedimiento farmacológico (descrito anteriormente), es decir, se indujeron las contracciones con  $\text{Ca}^{2+}$  cuando el esteroide se encontraba presente en el medio a la  $\text{DE}_{50}$ , Después de 10 minutos se adicionó al medio, ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Para este estudio se utilizaron dos diferentes tipos de ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ : A-23187 (ácido libre) 20  $\mu\text{M}$  y A(x-537A) (lasaloside) 20  $\mu\text{M}$ , de Sigma Chemical Co. El efecto de cada ionóforo fue observado durante 10 minutos en presencia de esteroide.

El efecto del ionóforo fue cuantificado en relación con el efecto  $\text{Ca}^{2+}$ -antagónico de los esteroides.

## c) Preparación miogénica del útero de rata.

Se utilizaron ratas hembras adultas de 250 a 300 g de peso de la cepa Sprague-Dawley en fase de diestro, el útero se mantuvo en solución Krebs-Henseleit (descrita en la pag. 50), 30 minutos después del periodo de estabilización, el tejido se despolarizó con solución Krebs-Henseleit de  $\text{K}^+$  alto que contenía (en mM): NaCl 84.5, KCl 40,  $\text{NaHCO}_3$  25,  $\text{MgCl}_2$  1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  1.5, glucosa 11, pH 7.4, estabilizado con 5% de  $\text{CO}_2$  en  $\text{O}_2$ .

En esta contracción tónica provocada por  $\text{K}^+$  alto, se observaron los efectos agonista-antagonista de la noradrenalina (5  $\mu\text{M}$ ), el propranolol (20 $\mu\text{M}$ ), la histamina (20 $\mu\text{M}$ ) y la cimetidina (20 $\mu\text{M}$ ) de Sigma Chemical Co versus el efecto

relajante de los andrógenos y las progestinas a la DE<sub>50</sub>  
previamente calculada.

## VII. RESULTADOS

### 1) Efecto de los corticosteroides en el útero

En este estudio se observó que los corticosteroides estudiados producen un efecto relajante en el útero aislado de rata, se observó que las dosis entre límites de  $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M son inefectivas mientras que la DOC a la dosis de  $10^{-9}$  y el cortisol a dosis de  $10^{-6}$  produjeron un efecto excitador que incrementó las frecuencia de las contracciones (figura 4). Sin embargo, a dosis mayores de  $6 \times 10^{-5}$ , la DOC produjo un efecto inhibitor con un 89% de relajación a las dosis más altas ( $6 \times 10^{-4}$ ), mientras que la  $17\alpha$ -OH-P y el 11-D-cortisol inhibieron la actividad uterina cerca del 50% con la dosis anterior (gráfica 1).

Tanto la corticosterona como el cortisol no mostraron un efecto depresor de la actividad miometrial con alguna de las dosis empleadas (tabla 1).

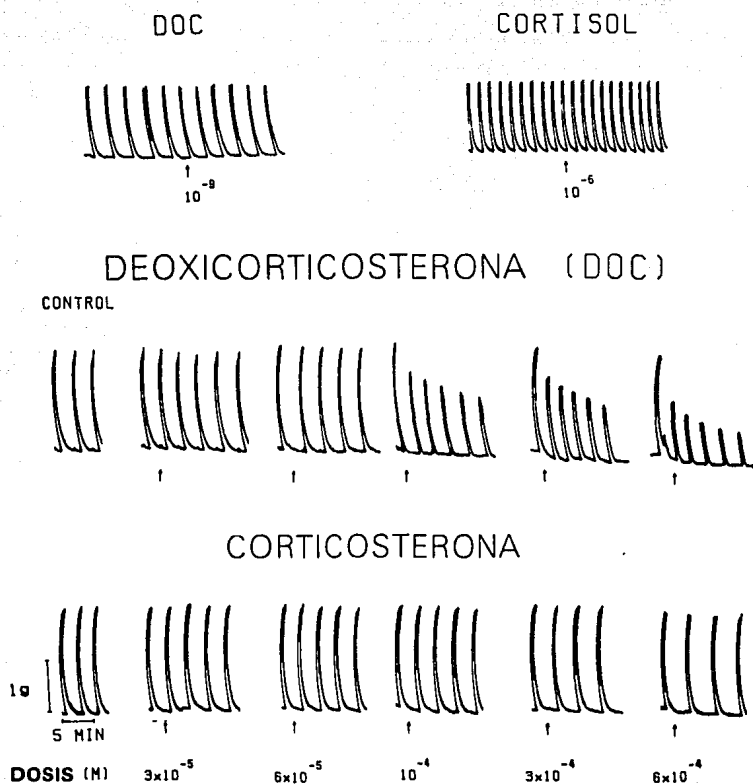
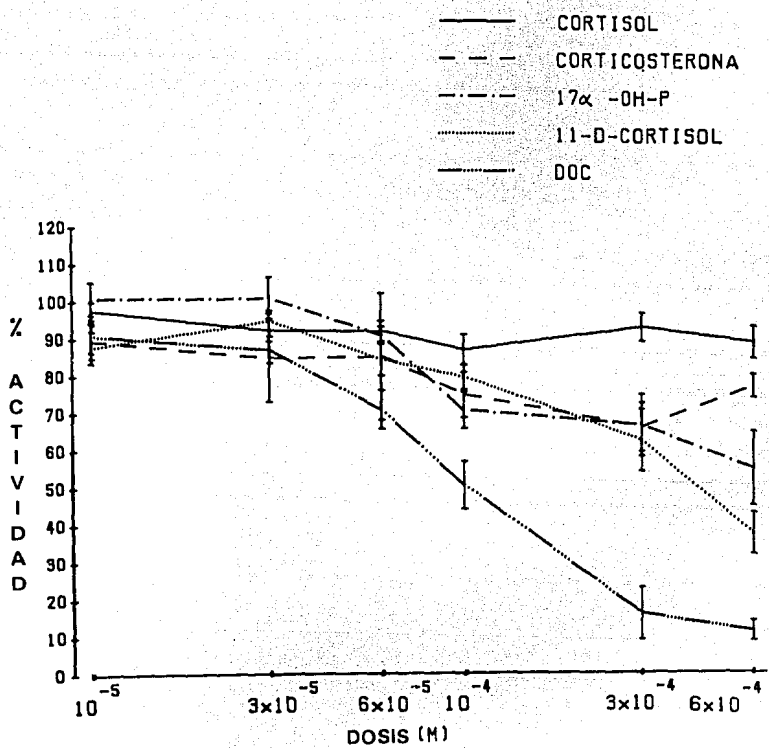


Figura 4. Registros típicos que muestran el efecto excitador de la desoxicorticosterona y el cortisol sobre las contracciones del útero aislado de la rata. Se observa un aumento de la frecuencia de las contracciones (trazos superiores). Asimismo, se muestra el efecto relajante de dosis altas de desoxicorticosterona y el efecto nulo de la corticosterona.



Gráfica 1. Las curvas representan el efecto ( $\pm$  error estándar) de los diferentes corticosteroides empleados (a partir de  $10^{-5}$  M). se considero como 100% de contractilidad. Nótese el efecto menor de los compuestos con un radical hidroxí en el carbono 11 (cortisol y corticosterona), el efecto intermedio de la 17- $\alpha$ -OH-P (17- $\alpha$ -hidroxí-progesterona) y el 11-D-cortisol (11-desoxicortisol), (ambos con un radical 17- $\alpha$ -OH), y aumento del efecto relajante con un 21-hidroxí-desoxicorticoesterona (DOC).

TABALA 1  
EFECTO DE LOS CORTICOSTEROIDES SOBRE LA CONTRACTILIDAD UTERINA

DOSIS (M)	17aOH-P	DOC	11-D-CORTISOL	CORTICOSTERONA	CORTISOL
$10^{-9}$	89.4±4.1	107.1±3.7 <sup>1</sup>	90.0±2.9	100.9±3.2	96.7±2.8
$10^{-8}$	102.2±4.4	90.7±4.3	91.6±2.0	89.9±4.6	104.4±3.8
$10^{-7}$	94.7±5.0	89.5±2.7	91.9±3.3	96.4±2.8	94.2±7.3
$10^{-6}$	96.7±3.4	99.1±1.9	92.2±4.2	96.7±4.3	107.6±3.6 <sup>1</sup>
$10^{-5}$	100.3±3.9	90.3±3.5	89.3±3.9	88.9±4.1	97.1±1.9
$3 \times 10^{-5}$	100.4±5.2	84.5±3.1 <sup>**</sup>	94.3±2.3	84.4±11.5 <sup>**</sup>	91.7±2.6
$6 \times 10^{-5}$	90.2±1.9	70.3±4.8 <sup>**</sup>	63.8±3.9 <sup>1</sup>	84.5±16.6 <sup>**</sup>	91.3±2.4
$10^{-4}$	70.0±4.5 <sup>**</sup>	49.9±6.0 <sup>**</sup>	78.9±3.0 <sup>**</sup>	74.1±5.7 <sup>**</sup>	86.2±3.6 <sup>1</sup>
$3 \times 10^{-4}$	65.8±7.9	15.5±6.5 <sup>**</sup>	61.8±7.8 <sup>**</sup>	65.3±6.0 <sup>**</sup>	92.0±2.4
$6 \times 10^{-4}$	54.2±9.4 <sup>**</sup>	10.7±2.2 <sup>**</sup>	36.8±5.1 <sup>**</sup>	76.2±2.7 <sup>**</sup>	87.9±3.8 <sup>1</sup>

<sup>\*\*</sup> p < 0.01; <sup>1</sup> Diferentes p < 0.05. Promedios ± error estándar, n > 7. Los cambios fueron computados asumiendo 100% de contractilidad bajo el efecto de prepilén glicol (control).

## 2) Efecto de andrógenos, progestinas y corticosteroides en el intestino

El ileon aislado de cobayo resultó ser muy sensible a la acción de los diferentes esteroides probados. La mayor parte de los compuestos produjeron una relajación tanto en los componentes fásicos como tónicos de las contracciones (figura 5).

Con algunas diferencias sutiles, se observó una clara correlación entre la potencia biológica y la estructura química de los esteroides, independientemente de la familia a la cual pertenezcan. Tal correlación mostró que los compuestos  $5\beta$  tales como la  $5\beta$ -DHT, la pregnandiona, la pregnanolona y la epipregnanolona fueron los más potentes, mientras que los compuestos 4-en-3-ceto como la testosterona, la progesterona, la  $17\alpha$ -OH-Progesterona y corticosteroides provocaron un efecto intermedio.

También se observaron efectos diferenciales entre los andrógenos y las progestinas  $5\alpha$ ; en este caso los andrógenos fueron más potentes; de hecho, solamente la  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -pregnan-20-ona produjo relajación, mientras que la  $5\alpha$ -pregnandiona y los pregnandioles fueron prácticamente inefectivos para producir relajación del ileon (tabla 2).

Algunos corticosteroides produjeron un efecto excitador transitorio a dosis bajas, tales acciones fueron observadas en su mayor parte como un incremento en la amplitud de las contracciones (figura 6).



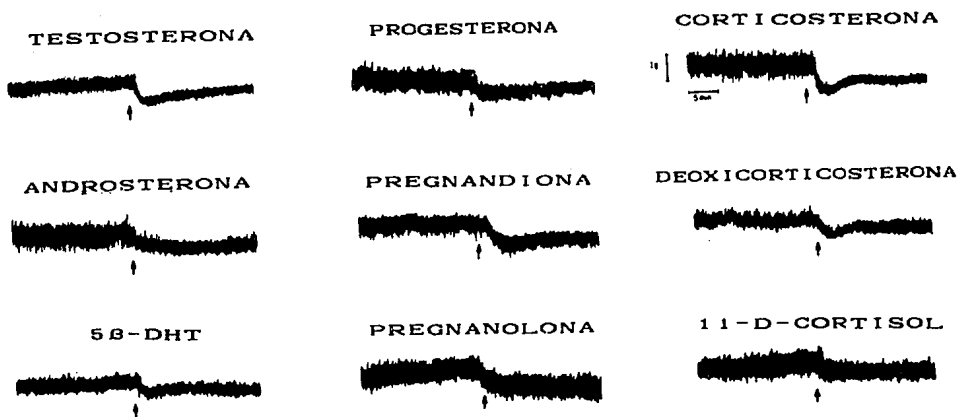


Figura 5. Registros típicos de la actividad espontánea del ileon de cobayo que muestran el efecto relajante de la DE <sub>50</sub> de la progesterona y algunos de sus derivados. Las flechas marcan la administración de los esteroides. Para valores vease Tabla 2.

TABLA 2

EFFECTO RELAJANTE DE ANDROGENOS, PROGESTINAS Y CORTICOSTEROIDES

SOBRE  
LA ACTIVIDAD ESPONTANEA DEL ILEON AISLADO DE COBAYO.

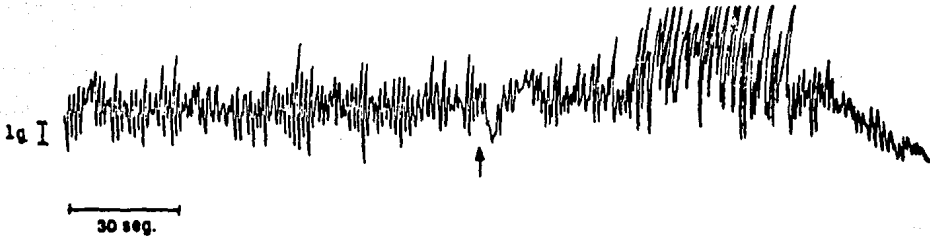
COMPUESTO	DE <sub>50</sub> (μM)	LIMITES	PENDIENTE	POTENCIA+
<u>ANDROGENOS</u>				
Testosterona	17.0	6.5-44.4	6.2	0.7
Androstandiol	8.0	3.1-20.3	5.9	1.4
Androsterona	6.6	3.0-14.3	4.8	1.7
5β-Dihidro- testosterona	3.0	0.7-12.7	19.1	3.8
<u>PROGESTINAS</u>				
Progesterona	11.6	3.1-43.1	14.6	1.0
17α-hidroxi- progesterona	10.0	6.0-16.6	2.8	1.1
5α-pregnandiona*				
3α-hidroxi-5α pregnan-20-ona	7.8	4.6-13.1	1.6	1.4
Alopregnanolona	49.0	22.6-106	4.8	0.2
Pregnandiona	4.5	1.1-18.1	7.5	2.6
Pregnanolona	4.0	1.7- 9.3	5.1	2.9
Epipregnanolona	6.1	2.5-14.5	5.2	1.9
5α-pregnandiol*				
5β-pregnandiol*				
<u>CORTICOSTEROIDES</u>				
Corticosterona	58.0	26.3-127.7	5.0	0.2
Deoxicorticos- terona	14.5	8.9-23.3	2.6	0.8
11-Desoxicortisol	12.0	5.9-24.1	4.1	0.9
Cortisol	20.5	4.8-86.4	15.6	0.2

+ La potencia fué calculada por la formula  $DE_{50}/DE_{50}$ , al asumir que la progesterona tiene un valor de 1.

Los valores de cuando menos 8 experimentos.

\* Sin efecto.

## CORTICOSTERONA



## CORTISOL



Figura 6. Registros que muestran el efecto excitador transitorio de la corticosterona ( $10^{-6}$  M) y el cortisol ( $10^{-6}$  M) sobre la actividad espontánea del ileon de cobayo. Las flechas marcan la administración del esteroide.

### 3) Efecto de los andrógenos y las progestinas en el tejido uterino

De la misma manera que los esteroides producen su efecto relajante sobre la actividad espontánea del útero, estos también disminuyen la contracción inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 7). La  $\text{DE}_{50}$  de este efecto ejercido por los esteroides fue comparada con la  $\text{DE}_{50}$  del verapamil, el cual es un fármaco bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

También en este caso los esteroides mostraron una clara correlación entre su potencia biológica y su estructura química. Todos los compuestos  $5\beta$  tales como: la  $5\beta$ -DHT, la pregnandiona, la pregnanolona y la epipregnanolona fueron más potentes que sus precursores, mientras que los andrógenos y las progestinas  $5\alpha$  como: el androstandiol, la androsterona, la alopregnanolona y la alopregnanolona que fueron prácticamente inefectivos.

Los compuestos  $5\beta$  más potentes en la familia de los andrógenos fueron: la  $5\beta$ -DHT, que es 37.5 veces menos efectiva y en la familia de las progestinas fue la epipregnanolona que es 20 veces menos potente con respecto al verapamil (tabla 3).

Los datos muestran que los esteroides poseen una potencia menor en relación al verapamil.

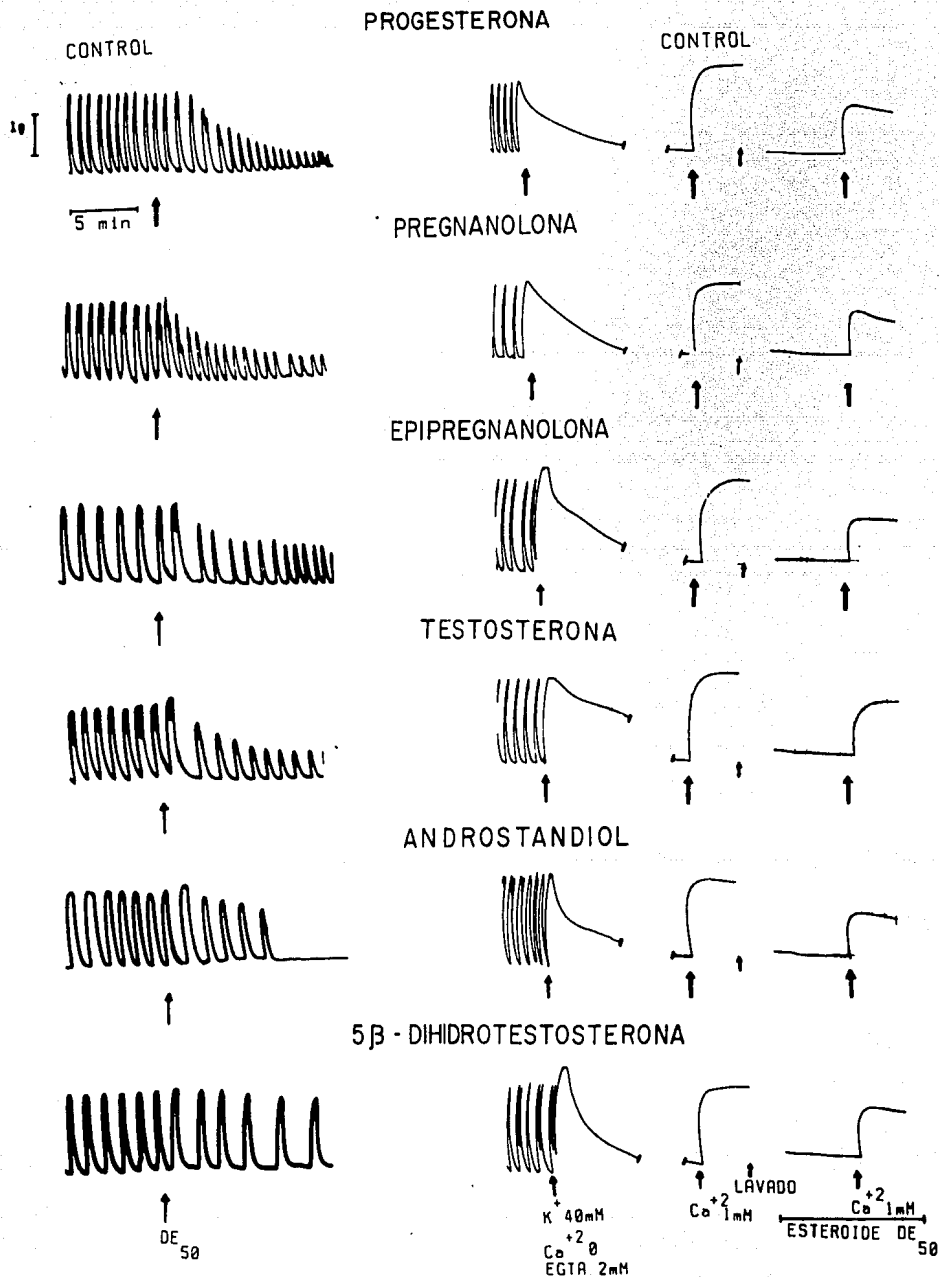


Figura 7.

Figura 7. Registros muestran el efecto de relajante a la DE<sub>50</sub> de los esteroides sobre el útero de la rata en la actividad espontánea (izquierda) y en tejidos despolarizados con potasio alto, libre de calcio y con EGTA, en las contracciones inducidas por calcio.

TABLA 3

REVERSION POR EL IONOFORO A(X-537A) DEL EFECTO RELAJANTE DE ANDROGE Y PROGESTINAS, EN EL MIOMETRIO DE LA RATA CONTRAIDA CON CALCIO.

COMPUESTOS	DE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	RELAJACION <sup>a</sup> (EFECTO CALCIO- ANTAGONISTA) DE ESTEROIDES	INCREMENTO POR <sup>a</sup> EL A(X-537A) SOBRE EL CALCIO- ANTAGONISMO DE LOS ESTEROIDES
<u>ANDROGENOS</u>			
Testosterona	55.00	43.49±9.52	25.45±11.99
Androsterona	16.00	58.90±20.99	40.55±17.19
Androstandiol	14.50	51.15±6.53	19.97±5.40
5 $\beta$ -dihidrottestosterona	7.50	39.16±3.63	22.40±6.72
<u>PROGESTIMAS</u>			
Progesterona	10.00	46.76±2.98	20.80±7.46
Pregnandiona	7.25	50.19±9.95	66.80±21.78
Pregnanolona	4.80	54.40±7.98	29.10±12.26
Epipregnanolona <sup>c</sup>	4.00	51.27±3.25	37.16±11.35
Alopregnandiona <sup>c</sup>			
Alopregnanolona <sup>c</sup>			

<sup>a</sup> valores en porcentaje

<sup>b</sup> comparación de la potencia del esteroide a la DE<sub>50</sub> (veces menos potente que el verapamil.

<sup>c</sup> efecto muy pobre o nulo

Los datos corresponden a cuando menos ocho experimentos

4) Reversión parcial del efecto relajante de los esteroides por los ionóforos de calcio

La adición de los ionóforos (A-23187 y X-537) revirtieron parcialmente el efecto relajante de los esteroides, tal reversión se manifestó con un incremento de la contracción inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  cuando el esteroide se encuentra presente en el medio (figura 8).

La acción del ionóforo A(X-537A) sobre el efecto relajante producido por los esteroides analizados, se observó como un incremento parcial en la contracción inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 9).



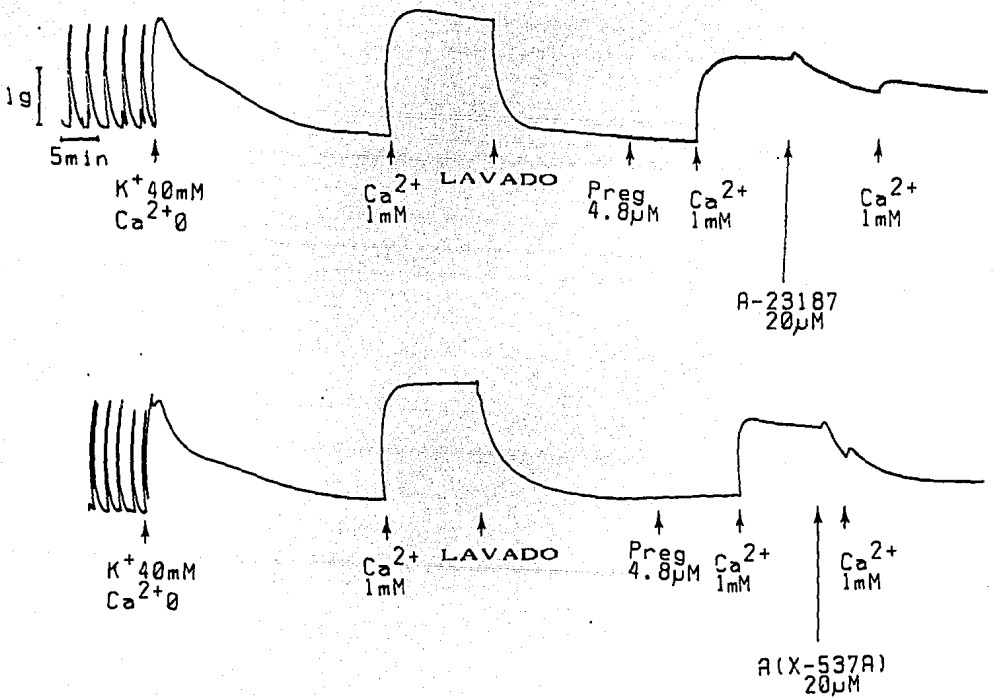


Figura 8. Muestra el efecto reversor de los ionóforos de calcio (A-23187 y A(X-537A) sobre el efecto relajante de la pregnanolona (preg) a la  $DE_{50}$  en el útero despolarizado de la rata.

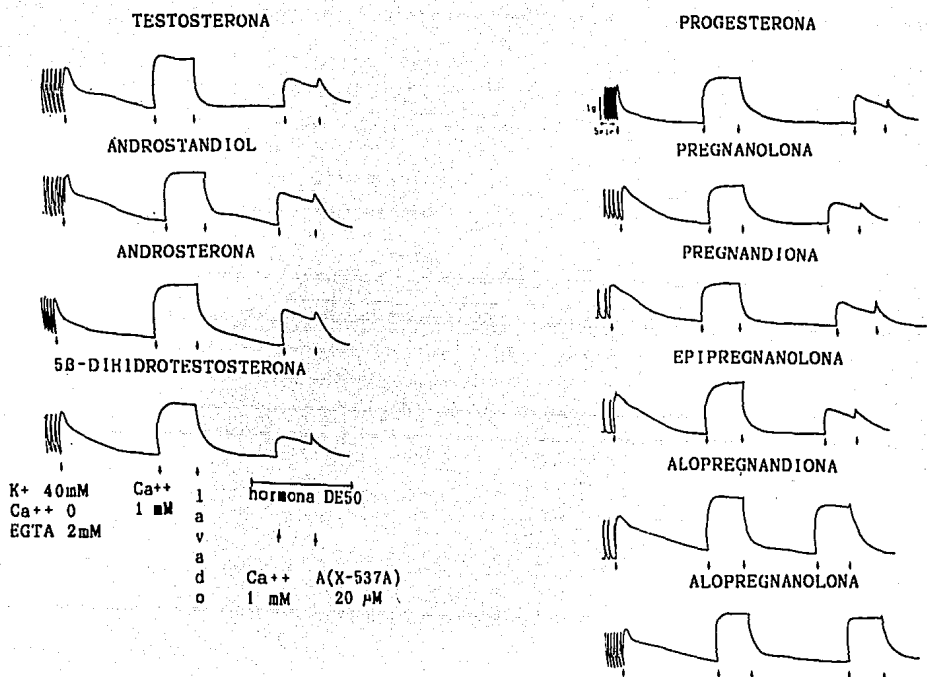


Figura 9. Efecto antagonista del A(X-537A) sobre la acción relajante de andrógenos y progestinas en el útero despolarizado de rata.

## 5) Efecto de los andrógenos y las progestinas sobre preparaciones miogénicas

Se observó que la noradrenalina y la histamina en el útero despolarizado de la rata producen un efecto relajante, el cual fue completamente bloqueado por la adición de sus respectivos antagonistas, el propranolol y la cimetidina. Sin embargo, el efecto relajante provocado por los esteroides en el útero de rata en las mismas condiciones experimentales no pudo ser bloqueado por ninguno de los dos antagonistas; propranolol o cimetidina (figura 10 y tabla 4).

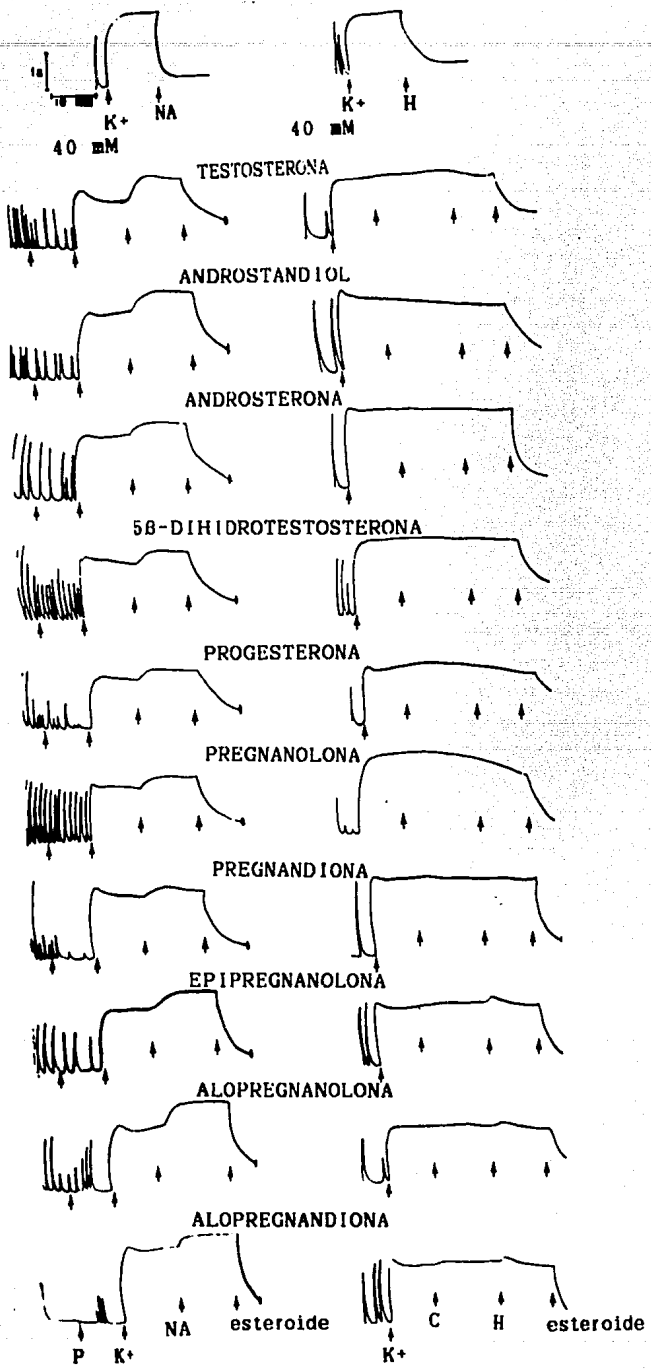


Figura 10.

Figura 10. Registros de la parte superior muestran el efecto relajante de la noradrenalina  $5 \mu\text{M}$  (NA) y la histamina  $20 \mu\text{M}$  (H). Los registros inferiores muestran el antagonismo del efecto de la NA por propranolol  $20 \mu\text{M}$  (P) y efecto relajante de los esteroides  $\text{DE}_{50}$  (izquierda). Antagonismo del efecto de la H por cimetidina  $20 \mu\text{M}$  (C) y efecto relajante de los esteroides  $\text{DE}_{50}$  (derecha) en úteros de rata despolarizados con potasio  $40 \text{ mM}$ .

TABLA 4

EFFECTO DE ANDROGENOS Y PROGESTINAS EN PRESENCIA DE ANTAGONISTAS  $\beta_2$ -ADRENERGICOS Y  $H_1$ -HISTAMINERGICOS SOBRE EL UTERO DESPOLARIZADO DE LA RATÁ.

COMPUESTO	DOSIS DE 50 ( $\mu$ M)	% DE RELAJACION CON PROPRANOLOL	% DE RELAJACION CON CIMETIDINA
<u>ANDROGENOS</u>			
Testosterona	55.0	83.45 $\pm$ 7.55	81.45 $\pm$ 4.43
Androstandiol	14.5	72.63 $\pm$ 5.79	78.09 $\pm$ 13.16
Androsterona	16.0	67.43 $\pm$ 7.96	74.74 $\pm$ 9.97
5 $\beta$ -DHT	7.5	60.51 $\pm$ 15.84	59.23 $\pm$ 12.45
<u>PROGESTINAS</u>			
Progesterona	10.0	29.12 $\pm$ 19.55	46.59 $\pm$ 15.80
Pregnanolona	4.8	67.07 $\pm$ 4.52	65.82 $\pm$ 11.08
Pregnandiona	25.0	44.74 $\pm$ 11.19	69.62 $\pm$ 7.56
Epipregnanolona	4.0	21.42 $\pm$ 14.65	67.00 $\pm$ 7.16
Alopregnandiona	10.0*	2.05 $\pm$ 12.20	45.81 $\pm$ 8.50
Alopregnanolona	10.0*	11.29 $\pm$ 2.86	45.48 $\pm$ 10.87

\* Dosis igual a progesterona por ser muy altos sus valores teóricos.

$\pm$  (desviación estándar)

Los datos corresponden cuando menos a ocho experimentos.

## VIII. DISCUSION

Los resultados de estos estudios muestran que algunos corticosteroides administrados en dosis bajas producen un efecto excitador manifestado, por un incremento en la frecuencia de las contracciones uterinas; mientras que las dosis altas producen un efecto relajante. Este efecto relajante de los corticosteroides sobre la contractilidad uterina parece estar relacionado con su estructura química. Así, todos los compuestos estudiados que mostraron algún efecto tienen una configuración 4-en-3-ceto, similar a su precursor la progesterona. Por lo tanto, la potencia del efecto inhibidor sobre la contractilidad uterina parece estar relacionada con las diferencias en la cadena lateral del carbono-17, así cuando la progesterona es hidroxilada en el carbono-21 originando la desoxicorticosterona (DOC), su efecto es casi equipotencial al observado con la progesterona (Kubli-Garfias y cols., 1979). Sin embargo, la  $\alpha$ -hidroxilación en el carbono-17 suprime su efecto, como es el caso de la  $17\alpha$ -OH-P. Adicionalmente cuando la molécula posee ambos grupos hidroxilos, en el carbono-17 y en el carbono-21, resulta un efecto intermedio como se observa con el 11-D-cortisol. Por el contrario la incorporación de un radical oxhidrilo en el carbono-17 (corticosterona y cortisol) producen moléculas que no poseen efecto alguno.

La potencia menor de los corticosteroides para inhibir la actividad uterina apoya la hipótesis de que la reducción de la progesterona en posición 5, puede ser el paso metabólico más importante para la producción de compuestos que intervengan en el control de las contracciones uterinas. Así, se comunicó que las

progestinas  $5\beta$  son mejores que los compuestos 4-en para inducir relajación miometrial (Kubli-Garfias y cols., 1979). Sin embargo, la cadena lateral en el carbono-17 es también importante, puesto que los andrógenos  $5\beta$  reducidos tienen un efecto menor que las progestinas, tanto en el útero como en el SNC (Kubli-Garfias y cols., 1980; 1982a).

Un hallazgo interesante fué que el cortisol y la desoxicorticosterona (DOC), estimularon el útero cuando se administraron en concentraciones bajas. Un efecto oxitócico similar fué comunicado por Mossman y Conrad (1969) para un cortisol soluble (17-hidroxi-corticosterona-21-hemisuccinato de sodio) administrado a dosis bajas en el útero preñado del ratón y humano. Estos autores, también encontraron que a dosis mayores de estos compuestos producen una relajación del útero. Sin embargo, como se observó en los presentes resultados, el cortisol es inefectivo en la rata.

El efecto bifásico de los corticosteroides sobre la contractilidad uterina no es fácil de explicar, ya que estos compuestos producen efectos genómicos y no-genómicos. Sin embargo, el efecto relajante que producen los corticosteroides posiblemente esté involucrado, un efecto bloqueador del influjo, o movilización intracelular de  $Ca^{2+}$ , como ocurre con la progesterona, (Batra y Bengtsson, 1978) y posiblemente con algunos de sus metabolitos  $5\beta$  reducidos (Kubli-Garfias y cols., 1985a).



Un punto importante debe ser discutido con respecto a los corticosteroides. La corticosterona es producida durante el ciclo estral y el embarazo en grandes cantidades (Ogle y Kitay, 1977) y es el corticosteroide principal en el ratón y la rata, mientras que el cortisol casi no existe en estas especies y solamente se encuentran pequeñas concentraciones de DOC y desoxicortisol (Schulster, Burstein y Cooke, 1976). En la mujer y particularmente durante el embarazo, se producen grandes cantidades de DOC, corticosterona y cortisol (Wintour y cols., 1978; Nolte, Lindeimer y Ruckert, 1978). Más aún, se postuló que estos compuestos están involucrados en la regulación de la actividad mecánica uterina durante el embarazo (Bassett y Thorburn, 1979; Kamoun, 1970). algunos tienen efecto sobre el útero aislado (Stucki y Gleen, 1961; Ishida y cols., 1972; Mossman y Conrad, 1969). Tales observaciones sugieren por lo tanto, que la acción biológica de los corticosteroides sobre la contractilidad uterina puede jugar un papel importante durante el embarazo o en situaciones de estrés.

Los resultados del presente trabajo muestran que el músculo liso del ileon de cobayo es sensible a la acción de los andrógenos, las progestinas y los corticosteroides, tal conclusión se deriva de los resultados que mostraron que tanto los componentes fásicos como los tónicos de las contracciones espontáneas, son inhibidos por la mayor parte de los esteroides probados. La relajación así observada fue dependiente de la dosis, aunque, las DE<sub>50</sub> fueron diferentes, y relacionada con la estructura química de los compuestos. Así, las progestinas 5 $\beta$

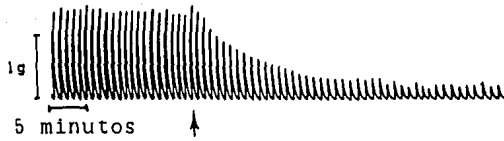
reducidas fueron los esteroides más potentes seguidos por los andrógenos 5 reducidos, los cuales activaron, independientemente de que su configuración fuera trans o cis ( $5\alpha$  o  $5\beta$ ). Los compuestos 4-en, i.e., la testosterona, la progesterona, la  $17\alpha$ -OH-P y los corticosteroides presentaron menor potencia. La  $5\alpha$ -pregnandiona y los pregnandioles fueron prácticamente inefectivos. Estos últimos resultados concuerdan con lo comunicado por Ishida y cols.(1972), quienes también observaron una relajación del íleon por algunos esteroides cuando fue estimulado por algunos neurotransmisores. Sin embargo, es notable que los corticosteroides con grupo polar oxhidrilo en las moléculas, a bajas dosis producen un efecto excitador transitorio.

La relajación notable producida por los derivados de la progesterona en el íleon es parecida a la que se observa en el útero y se correlaciona con un efecto depresor observado en el SNC, donde las  $5\beta$  progestinas fueron las más potentes (Kubli-Garfias y cols., 1979; 1984). La sensibilidad del íleon a los esteroides fue mayor en relación a lo observado en el útero.

El umbral bajo del intestino podría ser debido a su alta dependencia del control nervioso. Por lo consiguiente, los esteroides pueden ejercer un doble efecto sobre la contractilidad, una se ejerce a través de una acción directa en el músculo y otra, por una inhibición en la liberación de neurotransmisores de los botones presinápticos como ocurre en la corteza cerebral (Kubli-Garfias y cols., 1983).

Aunque los resultados fueron obtenidos en tejidos aislados, es posible que en condiciones fisiológicas el ileon sea relajado por una extensa variedad de esteroides. La alta sensibilidad del músculo liso del ileon descrito en el presente trabajo, convierte a este órgano, blanco de hormonas esteroides. Tal relación puede ser parte de un mecanismo que intervenga en la regulación de su excitabilidad. El efecto relajante de los esteroides es observado en otros músculos lisos. La pregnanolona al ser un metabolito  $5\beta$  reducido, es uno de los compuestos más potentes para producir relajación, tanto en el útero, como en el ileon. También se observó que este metabolito produce relajación en el músculo liso de la arteria coronaria de perro contraída con ergonovina o con  $K^+$  alto (Lara-Lemus y cols., 1986) así como en preparaciones de yeyuno de conejo tratado con atropina (Kubli-Garfias, 1987a), (figura 11).

## Yeyuno



## Ileon



## Arteria Coronaria



Figura 11. Registros que muestran el efecto de la pregnanolona  $4\mu\text{M}$  en tres diferentes tipos de musculos lisos. Registro superior, preparación miogénica de yeyuno de conejo bajo el efecto de atropina y el efecto relajante del esteroide. Registro Intermedio, muestra la acción relajante de la hormona sobre la actividad espontánea del ileon de cobayo. Registro Inferior, finalmente se muestra la contracción provocada por cloruro de potasio ( $80\text{ mM}$ ) en la arteria coronaria de perro y el efecto relajante de la progestina. Las flechas indican la adición del esteroide.

En la rata macho la androsterona y el androstandiol muestran un efecto relajante en la vesícula seminal y en el epidídimo cuando son estimulados con adrenalina o bario (Kubli-Garfias, Hoyo-Vadillo y Ponce-Monter, 1983b). Además la androsterona ha mostrado una disminución de la frecuencia de las contracciones de las aurículas aisladas de ratas macho, preincubadas con atropina (Rojas-Mejía y cols., 1986).

Por las observaciones realizadas en este estudio podemos afirmar que existe una correlación obvia entre la estructura química de los esteroides y su actividad biológica. Así, las  $5\beta$  progestinas (configuración cis de los anillo A/B) son los compuestos más efectivos, su estructura también tiene un grupo 20-ceto. Al quitar la cadena del carbono-17, resultado de la  $5\beta$  configuración, los compuestos androstanos mostraron una potencia menor. Lo que indica que la cadena del carbono-17 es esencial para el efecto biológico.

De acuerdo con sus efectos, los esteroides de configuración trans ( $5\alpha$ ) pueden ser divididos en dos grupos. El primer grupo son compuestos con una configuración  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ , como es el caso de la androsterona, el androstandiol y la  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -pregnan-20-ona, los cuales ejercen un efecto intermedio. Tal efecto es menor que el ejercido por las  $5\beta$  progestinas pero mayor que la acción de los 4-en-3-ceto, como es el caso de los corticosteroides y sus precursores la testosterona y la progesterona. El segundo grupo está integrado por los compuestos  $5\alpha$ -3-ceto tales como: la  $5\alpha$ -DHT y la  $5\alpha$ -

pregnandiona, los cuales no tienen efecto. Los pregnandioles, sin importar su configuración  $5\alpha$  o  $5\beta$ , son prácticamente inefectivos. En este caso la reducción del grupo cetona en el carbono-20 aumenta la polaridad y la hidrosolubilidad del esteroide. Tales cambios pueden explicar la ineffectividad de los pregnandioles.

El mecanismo de acción que emplean los esteroides estudiados para modificar la contractilidad del ileon y otros músculos lisos, no fue explorado. Sin embargo, la hipótesis de un bloqueo de la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula por los esteroides, ha sido sustentada por los estudios realizados en el útero y el SNC (Kubli-Garfias y cols., 1985a). Por lo tanto, un mecanismo similar podría relacionarse con el efecto relajante de estas hormonas en otros músculos lisos.

Además, en virtud de que los efectos de los andrógenos y progestinas  $5\alpha$  y  $5\beta$  reducidos fueron observados como cambios en la excitabilidad, se sugiere que la membrana celular es el sitio de acción de estos compuestos. El posible mecanismo involucrado puede ser un efecto bloqueador del influjo de  $Ca^{2+}$ . Algunos resultados apoyan tal suposición. Así se mostró que la progesterona posee un efecto bloqueador de la entrada de  $Ca^{2+}$  (Batra y Bengtsson, 1978). Asimismo se observó un claro antagonismo al  $Ca^{2+}$  por los esteroides  $5$  reducidos (Kubli-Garfias y cols., 1982b). De igual forma, en el SNC, la inhibición de la liberación de la noradrenalina puede ser un bloqueo del influjo de  $Ca^{2+}$  en la membrana presináptica (Kubli-Garfias y cols., 1983d).

Puesto que los andrógenos y las progestinas disminuyeron significativamente la contracción inducida por el  $\text{Ca}^{2+}$ , se apoya la idea de una interacción esteroide-calcio, aunque estos esteroides resultaron ser menos potentes que un conocido calcio-antagonista como es el verapamil, es posible que los esteroides actuaran como moduladores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula puede ser realizada a través de dos diferentes tipos de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ; los sensibles al voltaje o los sensibles al receptor (Bolton, 1979; Droogmans, Himpers y Casteels, 1985).

La despolarización del músculo liso por  $\text{K}^+$  alto produce un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual provoca una contracción sostenida. Este modelo implica la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje y ha sido usado para probar el mecanismo de acción de los esteroides 5 reducidos. Todos estos compuestos que relajan la actividad espontánea, también inhiben las contracciones tónicas inducidas por  $\text{K}^+$  (Kubli-Garfias y cols., 1985a). Entonces, la despolarización del músculo liso por  $\text{K}^+$  y libre de  $\text{Ca}^{2+}$ , provoca la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje. En la mayoría de los músculos lisos, la contracción desaparece cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  es removido del medio externo, lo que sugiere un importante papel de este ión en la contracción muscular (Ashoori, 1985).

En este estudio se observó que cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se adiciona en el medio externo se observa una respuesta inmediata, observándose una contracción tónica sostenida, provocada por el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales sensibles al voltaje, los cuales se encuentran activados por la despolarización. Asimismo, cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  se retira del medio, el músculo se relaja. En este modelo fué posible repetir la contracción inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , con la misma amplitud. Esta contracción fué disminuida cuando los esteroides estuvieron en el medio externo antes que el  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual sugiere un impedimento del paso de  $\text{Ca}^{2+}$  por los canales sensibles al voltaje.

En otras circunstancias cuando los tejidos son expuestos a soluciones libres de  $\text{Na}^+$ , se observa una contracción provocada por un mecanismo intercambiador, el cual promueve el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  y saca  $\text{Na}^+$ . Tal efecto se realiza por la activación de un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en la membrana (Grove, Kwan y Daniel, 1981). Lo que apoya la hipótesis propuesta.

Una importante contribución al entendimiento del mecanismo de acción de estos esteroides en el presente trabajo, fue el uso de ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$ , ambos el A-23187 y el X-537 son ionóforos selectivos a cationes divalentes, tales como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Aunque el X-537 es selectivo también a cationes monovalentes, éste presenta baja afinidad por ellos (Pressman y De Guzman, 1984). Los dos ionóforos transportan cationes divalentes, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$ , a través de la membrana. Así, se observó que cuando los esteroides 5 reducidos presentan el efecto de antagonizar la



entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , este ión puede entrar por una vía distinta promovida por el ionóforo, y se observó que el efecto del esteroide se revierte, esto podría explicarse porque hay un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula por otra entrada hecha por el ionóforo, y que no son los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje, los cuales posiblemente se encuentren bloqueados por el esteroide. Aunque es necesario considerarse que estos ionóforos ejercen además una amplia variedad de efectos i.e., influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular y/o eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  de reservorios intracelulares al citoplasma y subsecuentemente salida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular (Lymangrove y Keku, 1984). Por esta razón, después del aumento de la contracción por influjo de  $\text{Ca}^{2+}$ , la adición del ionóforo produce relajación inmediata, sin embargo, cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  es adicionado nuevamente, la contracción es aumentada por incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  interno, pero seguida de una relajación inmediata. Como posible explicación se propone una desestabilización y/o liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas.

Los experimentos con ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  sugieren que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula es el estímulo suficiente para revertir el efecto relajante que producen los esteroides. Estos efectos membranales aparentemente están relacionados con el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  externo. Estos datos apoyan la hipótesis de que el mecanismo de acción es un efecto  $\text{Ca}^{2+}$ -antagónico. Otra implicación a estas observaciones abren la posibilidad de que la inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pueda ser

promovida por la activación de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos y  $H_2$  histaminérgicos que inducen relajación en el útero de la rata. Con los resultados que aquí se presentan se mostró que el efecto relajante de los esteroides no fué antagonizado con propranolol o cimetidina. Se puede inferir que los receptores  $\beta_2$  adrenérgicos y  $H_2$  histaminérgicos no tienen participación en el bloqueo del influjo de  $Ca^{2+}$  por los esteroides. De tal manera se sugiere que los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al receptor no están involucrados en el mecanismo de acción de estos esteroides, y que su efecto útero-relajante se ejerce al impedir el influjo de  $Ca^{2+}$  a través de un bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje.

La estabilización membranal es un efecto inespecifico y parece ser la clave de la acción de los esteroides 5 reducidos. Así, las propiedades de los esteroides: alta liposolubilidad con alto coeficiente de partición lípido-agua (Heap, Symons y Watkins, 1971) hacen que los esteroides se introduzcan entre las cadenas alifáticas de los fosfolípidos, con lo cual se disminuye la fluidez de la membrana, así como otras propiedades estructurales, al alterar la función de las proteínas membranales y la permeabilidad iónica.

Esta hipótesis se ve apoyada por los datos de O'Learly y cols., (1984) quienes encontraron una correlación entre el efecto de algunos esteroides anestésicos y la modificación de la movilidad de los fosfolípidos membranales medidos por espectroscopia de Raman. En este estudio se observó que la eficacia anestésica de los esteroides está relacionada con la cadena sustituyente del carbono-17. Sin embargo, una acción

directa sobre las proteínas membranales, por ejemplo, en los canales iónicos no puede ser descartada ya que los anestésicos pueden asociarse directamente a algunas proteínas de la membrana (Franks y Lieb, 1977).

#### 1) Importancia Biológica

La modulación de la excitabilidad es un papel destacado que juegan los andrógenos y las progestinas  $5\beta$  reducidas. Es probable que tanto la excitabilidad neuronal, así, como también la liberación de neurotransmisores en el SNC puede estar influida por estos compuestos. Además, la secreción de gonadotrofinas puede también estar regulada entre otras sustancias, por los esteroides  $5\beta$  reducidos (Frank, Bonham y Gustavson, 1925; Kim, Park y Ramírez, 1985).

La regulación de la contractilidad uterina por la progesterona es una función descrita desde hace tiempo (Csapo, 1961). Los metabolitos  $5\beta$  de la progesterona son más potentes para producir relajación uterina, esto se ha observado claramente en el útero de la rata preñada y no preñada (Kubli-Garfias y cols., 1979, 1983c).

La producción de progesterona durante la gestación se encuentra a concentraciones muy altas (Pearlman, 1957) y por consecuencia su metabolismo hacia progestinas  $5\alpha$  y  $5\beta$  está también aumentado (Klopper y Michie, 1956). Por lo tanto, todos estos compuestos junto con la testosterona, la progesterona y la  $20\alpha$ -OH-progesterona pueden ser responsables del control de la actividad miometrial durante este estado fisiológico.

Algunos tejidos, tales como el intestino delgado, i.e., ileon y yeyuno del cobayo y del conejo respectivamente, resultaron ser más sensibles que el miometrio a la acción de los esteroides 5 reducidos. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que el intestino delgado sea también blanco de andrógenos y progestinas. Así, en las primeras etapas del embarazo en la mujer, se observa una atonicidad muscular general del músculo liso intestinal y se presentan alteraciones gastrointestinales tales como; la exageración del reflejo gastroesofágico y la constipación. Tales alteraciones pueden ser explicados por el metabolismo activo de la progesterona y por la sensibilidad alta del músculo liso gastrointestinal a estas hormonas.

El efecto de los esteroides 5 reducidos fue mostrado inicialmente en los órganos reproductores de los mamíferos, además, se observó que estos compuestos presentan un amplio espectro de acción y tejidos tales como el músculo liso del intestino delgado y de los vasos sanguíneos. Estos resultados sugieren que otros tejidos pueden ser blanco de la acción depresora de los esteroides 5 reducidos y que estos compuestos pueden modular la excitabilidad en general de una forma no específica.

## IX. CONCLUSIONES

1. Los esteroides pueden estar involucrados en la regulación de la excitabilidad del músculo liso.
2. Existe una correlación obvia entre la estructura química de los esteroides y su actividad biológica.
3. Los esteroides ejercen una acción membranal.
4. Los esteroides ejercen un efecto bloqueador del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (interacción esteroide-calcio).
5. Los esteroides posiblemente actúan a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje.

## X. ALTERNATIVAS A FUTURO

Los presentes datos basados en experimentos farmacológicos, indican que los esteroides relajan el músculo liso al impedir el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de la célula al bloquear los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje, evitando que se lleve a cabo el acoplamiento excitación-contracción. Sin embargo, es necesario sustentar esta hipótesis en análisis electrofisiológicos. Pues la modulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  por neurotransmisores y drogas puede ser estudiado mediante la técnica de "patch-clamp" (Hamil y cols., 1981) la cual sería conveniente para sustentar esta hipótesis. Esta técnica permite el registro de un solo canal iónico en la membrana de una célula aislada, midiendo de esta forma, el flujo de corriente a través del poro (Neher y Sakman, 1976). Por lo que sería una gran ayuda para la descripción de las acciones moleculares de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  involucrados en el mecanismo mediante el cual los esteroides impiden el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula.

Los fármacos bloqueadores de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  son un grupo de compuestos químicamente heterogéneos. Estos compuestos constituyen una herramienta útil para el tratamiento clínico de trastornos cardiovasculares. Sin embargo, este amplio espectro de usos clínicos, proporcionan la necesidad de nuevos agentes de esta categoría que puedan ser de mayor utilidad en estos trastornos (Stone y cols., 1980; Flaim y Zelis, 1982; Janis y Triggle, 1983). Por lo cual se considera básico en el interés

clínico la definición de sitios y mecanismos de acción de este grupo de agentes, así como son mecanismos fisiológicos que emplean las células para el manejo del ión  $\text{Ca}^{2+}$ .

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alexander, R.B., Greene, G.L., y Barrack, E.R. (1986). Estrogens receptors in the Nuclear Matrix : Direct demonstration using monoclonete antireceptor antibody Endocrinology. 120 (5):1851-1857
2. Allen, W.M. y Corner, G.M. (1929): Physiology of corpus luteum: III Normal growth and implantation of embryos after early ablation of the ovaries under the influence of extracts of the corpus luteum. Amer. J. of Physiol. 88: 340-346.
3. Athias, M. (1919): Effets de la castration sur les mouvements automatiques de l'uterus chez la cobaye. J. Physiol. Path. Gen. 18: 731-737.
4. Atkinson, R.M., Davis, B., Pratt, M.A., Sharpe, M.H. y Tomich, E.G. (1965): Action of some steroids on the central nervous system of the mouse. II. Pharmacology, J. Med. Chem., 8: 426-432.
5. Ashoori, F., Hidaka, H., Takai, F. y Tomita, T. (1985): Contraction of smooth muscle in Ca-free solution. Jap. J. Smooth Muscle Res. 21: 57-69.
6. Axelson, M. y Sahlberg, B.L. (1983): Group separation and gas chromatography-mass spectrometry of conjugated steroid in plasma. J. Steroid Biochem. 18:313-321.
7. Baron, C.B., Cunninham, M., Strauss, J.F. y Coburn, R.F. (1984). Pharmacomechanical Coupling in smooth muscle may in volve phosphatidylinositol metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81: 6899-6903
8. Barrack, E.R., Hawkins, E.F., Allen, S.L., Hicks, L.L. y Coffey, D.S. (1977). Concepts Related to salt resistant estradiol receptors in the rat uterine nucleic : nuclear matrix. Biochem. Biophys. Res. Commun 79: 829-836.
9. Barrack, E.R., Hawkins, E.F., y Coffey, D.S. (1979). The Specific binding of estradiol to the nuclear matrix Adv. Exp. Med. Biol 117: 47-80.
10. Barrack, E.R., y Coffey, D.S. (1980). The Specific binding of estrogens and androgens to the nuclear matrix of sex hormone responsive tissues J. Biol. Chem. 255: 7265-7275
11. Barrack, E.R. y Coffey, D.S. (1982). Biological properties of de nuclear matrix : Steroid hormone binding. Recent Prog. Horm. Res. 38: 133-195.



12. Barrack, E.R. (1983). The nuclear matrix of the prostate contains acceptor sites for androgens receptors. Endocrinology 113: 430-432
13. Barrack, E.R., Bujnovszky, P., y Walsh, P.C. (1983). Distributions of the androgens receptors in human normal, benign hyperplastic, and malignant prostatic tissues. Cancer res. 43: 1107-1116.
14. Bassett, J.M. y Thorburn, G.D. (1969): Foetal plasma corticosteroids and the initiation of parturition in sheep. J. Endocr. 44:285-289
15. Batra, S.C. (1973): Effect of some estrogens and progesterone on calcium uptake and release by myometrial mitochondria. Biochem. Pharmacol 22: 803-809.
16. Batra, S. y Bengtsson, B. (1978): Effects of diethylstilboestrol and ovarian steroids on the contractile responses and calcium movements in rat uterine smooth muscle. J. Physiol. 276: 329-342.
17. Bentley, P.J. (1976): Comparative Vertebrate Endocrinology. Cambridge University Press. Great Britain.
18. Blair, E.W. (1922): Contraction rate of uterine musculature of the rat with reference to the oestrus cycle. Anat. Rec. 23: 9- 10.
19. Bolton, T.B. (1979): Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol. Rev. 59:606-718.
20. Borle, A.B. (1981). Control, modulation, and regulation of cell calcium Rev. Physiol. Biochem. Pharmac., 90: 13-169.
21. Bozler, E. (1941): Influence of estrone the motility characteristic and the motility of uterine muscle. Endocrinology. 29: 225-232.
22. Brown, A.N., Morimoto, K., Tsuda, y Wilson, D.L. (1981). Calcium currents-dependent and voltage-dependent inactivation of calcium channels in Helix aspersa. J. Physiol. 320: 193-218.
23. Bruce, L.A. y Behsudi, F.M. (1979): Progesterone effects on three regional gastrointestinal tissues. Life Sci. 25: 729-734.

24. Bruce, L.A. y Behsudi, F.M. (1980): Differential inhibition of regional gastrointestinal tissue to progesterone in the rat. Life Sci. 27: 427-434.
25. Brown-Grant, K. (1974): Failure of ovulation after administration of steroid hormone and hormone antagonists to female rats during the neonatal period. J. Endocrinol. 62: 683- 684.
26. Carsten, M.E. (1974): Hormonal regulation of myometrial calcium transport. Gynecol. Invest. 5: 269-275.
27. Csapo, A.I. y Corner, G.W. (1952): The antagonistic effects of estrogens and progesterone on the staircase phenomenon in uterine muscle. Endocr. 51: 378-385.
28. Csapo, A.I. (1956): Progesterone block. Amer. J. Anat. 98: 273-281.
29. Csapo, A.I. (1961): Defense mechanism of pregnancy. En : Progesterone and the Defence Mechanism of Pregnancy. Ciba Fdn. Study Group No. 9 (Ed: por G.E.W. Wolstenholme and M.P. Cameron). Little Brown. Boston. pp. 3-27.
30. Csapo, A.I. (1969): The four direct regulatory factors of myometrial function. Ed: G.E.W. Wolstenholme; J. KNIGHT. (eds): Progesterone: its regulatory effect on the myometrium, Ciba Fdn. study Group No. 34. Little, Brown and Co., Boston, Pág. 13.
31. Csapo, A.I. y Wiest, W.G. (1969): An examination of the quantitative relationship between progesterone and maintenance of pregnancy. Endocrinology. 85: 736-746.
32. Dale, M.M. y Obianine, W. (1985). Phorbol myristate acetate causes in guinea-pig lung parenchymal strip a maintained spasm which is relatively. FEBS Letts., 190 : 6-10.
33. Daniel. E.E., Grover, A.K. y Kwan, C.Y. (1983). En:Isolation and properties of plasma membrane from smooth muscle FED. PROC.41 (12):2898-2904.
34. Devine, C.E., Somlyo, A.J. y Somlyo, A.P. (1972): Sarcoplasmic reticulum and excitation contraction coupling in mammalian smooth muscle. J. Cell. Biol. 52: 690-696.
35. Diamond, D.A., y Barrack, E.R. (1984). The Relationship of androgens receptor levels to androgen responsiveness in the dunning R3327 rat prostate tumor sublines. J. Urol. 132: 821-827.

36. Driska, S., y Hartshorne, D.J. (1975): The contractil proteins of smooth muscle. Properties and components of a  $Ca^{2+}$ -sensitive actomyosin from chciken gizzard. Arch. Biochem. Biophys. 167: 203-212.
37. Droogmans, G., Himpens, B. y Casteels, R. (1985): Ca-exchange, Ca-channels and Ca-antagonist. Experientia 41: 895-900.
38. Duncan, R.A., Krazanowski, J.J., Davies J.S., Polson, J.B., Coffey, R.G., Shimoda, T. y Szetivany, A. (1987). Polyphosphoinositide metabolism in canine tracheal smooth muscle (CTSM) in response to a cholinergic stimulus. Biochem. Pharmac. 36:307-310.
39. Ebashi, S. y Endo, M. (1968). Calcium ion and muscle contraction. Proc. Biophys. Molec. Biol. 18: 123-183.
40. Ebashi, S. (1980). Regulation Muscle Contration. Proc. R. Soc. London [Biol] 207 (1168):259-286
41. Eckert, R., y Chad, J.E. (1984). Inactivation of Ca channels . Prog. Biophys. Mol. Biol. 44:215-267.
42. Endo, M. (1977). Calcium release from the sacoplasmic reticulum. Phisiol. Rev. 57: 71-108.
43. Filo, R.S., Bohr, D.F., y Ruegg, J.C. (1965): Glycerinated skeletal and smooth muscle: Calcium and magnesium dependence. Science 147: 1581-1583.
44. Fink, G. y Henderson, S.R. (1977): Steroids and pituitary responsiveness in female, androgenized female and male rats. J. Endocrinol. 157-164.
45. Flaim, S.F. y Zelis, R. .Eds. (1982). Calcium blockers. Mechanisms of action in clinical applications. Urban y Shwareznberg, Baltimore, Maryland.
46. Fleckstein, A. (1964). Die Bedeutung energiereischen phosphate für kontraktilitat und tonus des Myokards. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 70:81-99.
47. Fraenkel, L. (1905): Die funktion des corpus luteum. Arch. Gynaek. 68: 438-535.
48. Frank, R.T., Bonham, C. y Gustavson, R.G. (1925): A new method of assaying the potency of female sex hormone based upon its effect upon spontaneous contraction of the uterus of the white rats. Amer. J. Physiol. 74: 395-401.
49. Franks, N.P. y Lieb, W.R. (1976): Molecular mechanism of general anaesthesia. Nature, London. 300: 487-493.

50. Figdor, S.K., Kodet, M.J., Bloom, B.M., Agnello, E.J., P'An, S.Y. y Laubach, G.D. (1957): Central activity and structure in a series of water-soluble steroids. J. Pharmacol. Exp. Ther., 119: 299-309.
51. Giembycz, M.A. y Rodger, I.W. (1987). Electrophysiological and other aspects of excitation-contraction coupling and uncoupling in mammalian airway smooth muscle. Life science 41:111-132.
52. Gómez-Puyou, A. y Gómez-Lojero, C. (1977). The use of ionophores and channel formers in the study of the function of biological membranes. Current. Topics in Bioenergetics 6:222-256
53. Green, R., Luttge, W.G. y Whalen, R.E. (1970): Introduction of receptivity in ovariectomized female rats by a single intravenous injection of estradiol  $17\beta$ . Physiol. Behav., 5: 137- 141.
54. Gorski, J., Welshons, W. y D.Sakai. (1984). Remodeling the estrogen receptor model. Mol. Cell. Endocrinol. 26: 31-40.
55. Grove, A.K., Kwan, C.Y. y Daniel, E.E. (1981): Na-Ca exchange in rat myometrium membrane vesicles highly enriched in plasma membranes. Amm. J. Physiol. 240:(Cell Physiol. 9), C175-C182.
57. Gyermek, L. (1967). Pregnanolone: a highly potent naturally occurring hypnotic-anaesthetic agent. Proc. Soc. Exp. Biol 125: 1058-1060.
58. Ham, A.W. (1975): Tratado de histología. Ed. Interamericana México. pp. 493-515.
59. Hamil, O.P., Maty., A., Neher, E., Sakman, B., y Sigworth, F.J. (1981): Improber patch-clamp techiques for high-resolutions current recording from cells and cell free membrane patches. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 391:85-96
60. Hartshorne, D.J., Gorecka, A., y Askoy, M.O. (1977). Aspects of the regulatory mechanisms in smooth muscle. En: Excitation-Contraction coupling in smooth muscle, pp. 377-384. Ed. por R. Casteels, T. Godfraind y J. C. Rüegg. Elsevier/North-Holland Biomedical Press: Amsterdam, New York, Oxford.
61. Hashimoto, T., Hirata, M., Itho, T., Kanumura, Y. y Kuriyama, H. (1986). Inositol 1,4,5-triphosphate activates pharmacomechanical coupling in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. J. Phisiol. (Lond.) 370:605-

618.

62. Heap, R.B., Symons, A.M. y Watkins, J.C. (1971): An interaction between oestradiol and progesterone in aqueous solution in a model membrane system. Biochem. biophys. Acta. 233: 307-314.
63. Hess, T., Lansman, J. B. y Tsien, R.W.(1984). Difference models of Ca channels gating behavior favored by dihydropyridine Ca agonists and antagonist. Nature 311:538-544.
64. Hibberd, M.G. (1986): Relationship between chemical and mechanical events during muscular contractions. Ann. Rev. Biophys. Chem. 15:119-161
65. Hille, B. (1984). En :Ionic channels of excitable membranes ., pp. 58-75. Sunderland, Massachussets, Sinauer Associates.
66. Hudgiens, P.H. y Weiss, G. (1968): Differential effects of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by norepinephrine, histamine and potassium. J. Pharmacol. Exper. Ther.159: 91-96.
67. Hurwitz, L. y Joiner, P.D.(1971): Movilization of cellular calcium for contraction in intestinal smooth muscle. Am. J. Physiol. 218: 12-18.
68. Hurwitz, L. y Suria, A.(1971): The link between agonist action and response in smooth muscle. Ann. Rev. Pharmacol. 11: 303-326.
69. Hurwitz, L. (1986). Pharmacology of Calcium channels and smooth muscle.Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 26:225-258.
70. Huxley, A.F. , y Niedergerke, R. (1954). Structural changes in muscle during contraction: Interference microscopy of living muscle fibres.Nature, London 173:971-973.
71. Huxley, H. y Hanson, J.(1954). Changes in the cross-striations on muscle during contraction and strech and their structural interpretation.Nature 173:973-976.
72. Ishida, Y., Oshima, H., Aibara, S., y Ohmoto, M. (1972): Inhibitory actions of steroid hormones on isolated smooth muscle. J. Pharm. Soc. Jap. 92: 1175-1179.
73. Janis, R.A., y Triggle, D. J. (1983). New developments in calcium channels antagonism. J. Med. Chem. 26:775-785.
74. Jensen, E.V y DeSombre, E.R. (1972): Mechanism of action

of the female sex hormones. Ann. Rev. Biochem. 41: 203-230.

75. Kamoun, A. (1970): Activité cortico-surrénale au cours de la gestation de la lactation et du développement pré et post-natal chez le rat. I. concentration et cinétique de disparition de la corticostérone. J. Physiol. (Paris). 62: 5-32.
76. Kelly, M.J., Moss, R.L., y Dudley, C.A. (1977): The effects of microelectrophoretically applied estrogen, cortisol and acetylcholine on medial preoptic-septal unit activity through the estrous cycle of female rat. Exp. Brain Res. 30: 53-64.
77. Kim, K., Park, O. y Ramirez, V.D. (1985):  $5\beta$ -metabolites of progesterone stimulate LH-RH release from the rat hypothalamus superfused in vitro. 15<sup>th</sup> Annual Meeting, Society for Neuroscience. Abstr. 259.7.
78. Klopper, A. y Michie, E.M. (1956): The excretion of urinary pregnanediol after the administration of progesterone. J. Endocr. 13: 360-364.
79. Kubli-Garfias, C., Cervantes, M. y Beyer, C. (1976): Changes in multiunit activity and EEG induced by the administration of natural progestins to flaxedil immobilized cats. Brain Res. 114: 71-81.
80. Kubli-Garfias, C. y Whalen, R.E. (1977): Induction of lordosis behavior in female rats by intravenous administration of progestins. Horm. Behav., 9: 380-386.
81. Kubli-Garfias, C., Medrano-Conde, L., Beyer, C. y Bondani, A. (1979): In vitro inhibition of rat uterine contractility induced by  $5\alpha$  and  $5\beta$  progestins. Steroids. 34: 609-617.
82. Kubli-Garfias, C., López-Fiesco, A., Pacheco-Cano, M., Ponce-Monter, H. y Bondani, A. (1980): In vitro effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility. Steroids. 35: 633-641.
83. Kubli-Garfias, C., Canchola, E., Arauz-Contreras, J. y Feria-Velasco, A. (1982a). Depressant effect of androgens on the cat brain electrical activity and its antagonism by Ruthenium red. Neuroscience. 7: 2777-2782.
84. Kubli-Garfias, C., Ponce-Monter, H., Medrano-Conde, L., López-Fiesco, A. y Bondani, A. (1982b): Participación del calcio en la inhibición in vitro de la

- contractilidad del útero de la rata producida por andrógenos y metabolitos de la progesterona. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 13: 219-224.
85. Kubli-Garfias, C. y Ortega-Suarez, P. (1983a): Microcomputer acquisition and processing of uterine contractions. Acta physiol. latinoam. 33: 299-304.
  86. Kubli-Garfias, C., Hoyo-Vadillo, C. y Ponce-Monter, H. (1983b): 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.
  87. Kubli-Garfias, C., Hoyo-Vadillo, C., López-Nieto, E. y Ponce-Monter, H. (1983c): Inhibition of spontaneous contractions of the rat pregnant uterus by progesterone metabolites. Proc. West. Pharmacol. Soc. 26: 115-118.
  88. Kubli-Garfias, C., Azpeitia, E., Villanueva-Tello, T. y Ponce-Monter, H. (1983d): Inhibition of noradrenaline release by 5 $\beta$ -progestins in cerebral cortex slices. Proc. West. Pharmacol. Soc. 26: 135-138.
  89. Kubli-Garfias, C. (1984a): Physiological role of 5 $\alpha$  and 5 $\beta$ -progesterone metabolites on the CNS. Trends Pharmacol. Sci. 5:439-442.
  90. Kubli-Garfias, C., Perusquía, M., Hoyo-Vadillo, C. y Ponce-Monter, H. (1984b): Calcium antagonist as mechanism of action of natural androgens and progestins on uterine smooth muscle. Satellite simposium of 7th International Congress of Endocrinology. Abstracts P22, Montreal, Canada.
  91. Kubli-Garfias, C., Perusquía, M. y Ponce-Monter, H. (1984c): Antagonism of androgens to the calcium induced contractions of pregnant rat myometrium. 7th International Congress of Endocrinology abstract 1265, Québec, Canada.
  92. Kubli-Garfias, C., Ortega-Suarez, P., Hoyo-Vadillo, C. y Ponce-Monter, H. (1985a): Evidence that 5 $\beta$ -progestins produced uterine relaxation by diminishing cellular calcium permeability. Drug. Dev. Res. 6: 103-107.
  93. Kubli-Garfias, C., Rocha-Arrieta, L., Melgarejo-Salgado, A., Hoyo-Vadillo, C., Perusquía, M. y Valadéz-Rodríguez, J. (1985b): Electroencephalographic and behavioral changes produced by 5 $\beta$ -progestins and its antagonism by 4-

- aminopyridine. Arch. Invest. Méd. (Méx) 16(Suppl. 3): 133-141.
94. Kubli-Garfias, C. (1987): Modulatory action of 5-reduced androgens and progestins on the excitability of CNS and smooth muscle. J. Steroid Biochem. 26: 332-335.
  95. Kubli-Garfias, C., Medina-Jimenez, M., García-Yañez, E., Vazquez-Alvarez, A.M., Perusquia, M., Gómez-García, N., Almanza, J., Ibañez, R. y Rodríguez, R. (1987): Relaxant action of androgens, progestins and corticosteroids on the isolated ileum of the guinea-pig. Acta Physiol. et Pharmacol. Latinoam. 37(3): 357-364.
  96. Kumar, D. (1962): In vitro inhibitory effect of progesterone on extrauterine human smooth muscle. Am. J. Obstet. Gynec. 84: 1300-1304.
  97. Kuriyama, H. y Csapo, A.I. (1961): A study of parturients uterus with microelectrode technique. Endocrinology. 68: 1010-1025.
  98. Kuriyama, H. (1981): Excitation-contraction coupling in various visceral smooth muscle. Ed. Bülbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. and Tomita, T. (Eds). Smooth muscle. Eduard Arnold. London. pp: 171-197.
  99. Lakshminarayanaiah, N. y Beirao, P.S. (1979). Calcium System of a giant barnacle muscle fiber. Proc. West Pharmacol. Soc. 22:301-307.
  100. Lakshminarayanaiah, N. (1981). Calcium channels in the barnacle muscle membrane. En: New Perspectives on Calcium antagonist. Ed. G. B. Weiss, pp. 19-33. Baltimore: Williams & Wilkins.
  101. Lara-Lemus, A., Perusquia, M., Amezcua, J.L. y Kubli-Garfias, C. (1986): 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 Pág. 71.
  102. Langer, G.A. (1968): Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation of myocardial contractility. Physiol. Rev. 48: 708-757.
  103. Leeson, C.R. y Leeson, T.S. (1977): histología. Ed. Interamericana, México. pp. 171-188.
  104. Lehninger, A.L., (1983). Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona.
  105. Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F.A. (1949): A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exp. Ther. 96: 99-108.



106. Lymangrove, J.R. y Keku, E. (1984): Varying the duration of A23187 administration alters its effect on adrenal steroidogenesis. Life Science. 34: 371-377.
107. Marshall, J.M. y Csapo, A.I. (1959): Hormonal and ionic influences on the membrane activity of uterine smooth muscle cells. Endocrinology. 68: 1026-1029.
108. Marshall, J.M. y Csapo, A.I. (1961): Hormonal and ionic influences on the membrane activity of uterine smooth muscle. Endocrinology. 68: 1026-1035.
109. Marrian, G.F. (1950) The steroids—a historical review. En: A Symposium on Steroid Hormones. E.S. Gordon, Editor. pp 3-13. The University of Wisconsin Press.
110. McEwen, B.S. (1976): Interaction between hormones and nerve tissue. En: Hormones and Reproductive Behavior. Edited by W.H. Freeman and company. Scientific American. pp. 106-116.
111. McEwen, B.S., Krey, L.C y Luine, B.N. (1978): Steroid hormone action in the neuroendocrine system: When is the genome involved. Ed: Reichlin, S., Baldessarini, R.J. and Martin, J.B. (Eds.), The Hypothalamus. Raven Press, New York. pp 255-268.
112. McEwen, B.S. (1980): Gonadal steroids: Humoral modulators of nerve-cell function. Molec. and Cell. Endocrinol. 18:151-164.
113. McEwen, B.S. y Parsons, B. (1982): Gonadal steroid action on the brain: Neurochemistry and neuropharmacology. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22: 555-598.
114. Mossman, R.G. y Conrad, J.T. (1969): Oxytocic and Modulating effects of water-soluble hydrocortisone and methylprednisolone in vitro contractions of myometrium. Am. J. Obstet. Gynecol. 105:897-908.
115. Motta, M., Massa, R., Zanisi, M. y Martini, L. (1980): Mode of action of androgens and progestogens in neuroendocrine tissues. En: Pharmacological Modulation of Steroid Action. Ed: E. Genazzani, F. Di Carlo and W.I.P. Mainwaring. Raven Press, New York. pp. 187-204.
116. Neher, E. y Sakman, B. (1976). Single channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature. 260:799-807.

117. Nolten, W.E., Lindeimer, M.D., Oparil, y S., Ehrlich, E.N. (1978): Desoxycorticosterone in normal pregnancy. I. Sequential studies of the secretory patterns of desoxycorticosterone, aldosterone and cortisol. Am. J. Obstet. Gynecol. 132: 414-420.
118. Nuti, K.M. y Karavolas, H.J. (1977): Effect of progesterone and its 5 $\alpha$ -reduced metabolites on gonadotrophin levels in estrogen-primed ovariectomized rats. Endocrinology. 100: 777.
119. Ogle, T.F. y Kitay, J.I. (1977): Ovarian and adrenal steroids during pregnancy and the estrous cycle in the rat. J. Endocr. 74: 89-98.
120. O'Doherty, J., Youmans, S. J., McDArmstrong, W. y Stark, R. J. (1980). Calcium Regulation during stimulus-secretion coupling: continuous measurements intracellular calcium activities. Science 209:510-513.
121. O'Leary, T.J., Ross, P.D. y Levine, I.W. (1984): Effects of anesthetics and nonanesthetics steroids on dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes: a calorimetric and Raman spectroscopic investigation. Biochemistry. 23: 4636-4641.
122. O'Malley, B.W., Sherman, M.R. y Toft, D.O. (1970): Progesterone receptors in the cytoplasm of chick oviduct target tissues. Proc. Nat. Acad. Sci., 67: 501-508.
123. P'An, S.Y. y Laubach, G.D. (1964): Steroids central depressants. Ed: Dorfman, R.E. En: Methods in Hormone Research III. Academic Press, New York.
124. Park, S., y Rasmussen, H. (1986). Activation of tracheal smooth muscle contraction : Synergism between Ca<sup>2+</sup> and activators of protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82(24):8835-8839.
125. Pearlman, W.H. (1957): [16-<sup>3</sup>H] progesterone metabolims in advanced pregnancy and in oophorectomized-hysterectomized women. Biochem. J. 67: 1-5.
126. Perusquía, M., Ponce-Monter, H. y Kubli-Garfias, C. (1984) Inhibition by progesting of the calcium activated myometrial contractions. 7th International Congress of Endocrinology. abstratc 1815, Québec, Canada.
127. Perusquía, M., Hoyo-Vadillo, C. y Kubli-Garfias, C. (1986): Biphasic effect of corticosteroids on the contraction of isolated rat uterus. Arch. Invest. Méd. (Méx). 17: 203- 209.

128. Pressman, B.C. y De Guzman, N.T. (1974): Ann. N.Y. Acad. Sci. 227: 380-391.
129. Raspé, G. (1969) Eröffnung des Symposiums. Advances in the Biosciences 1. Pergamon Press Vieweg. Germany.
130. Rasmussen, H. y Barret, P. Q. (1984). Calcium messenger system: an integrated view. Physiol. Rev. 64(3):938-984.
131. Rainbow, T.C., Davis, P.G. y McEwen, B.S. (1980): Anisomycin inhibits the activation of sexual behavior by estradiol and progesterone Brain Res. 194: 548-555.
132. Reynolds, S.R.M. (1930): Studies on the uterus. I. A method for recording uterine activity in chronic experiments on unanaesthetized animals. Amer. J. Physiol. 92: 420-429.
133. Reynolds, S.R. y Allen, W.M. (1932): The effect of progestin-containing extracts of corporal lutea on uterine motility in unanaesthetized rabbit with observations on pseudopregnancy. Amer. J. Physiol. 102: 39-46.
134. Reynolds, S.R. (1933): The effect of certain calcium salts on the rhythmically contracting and quiescent uterine fistula, with observation on the action of posterior pituitary extracts. Am. J. Physiol. 105: 358-362.
135. Robson, J.M. (1937): Reaction of the uterine muscle and endometrium of the rabbit to testosterone. Quart. J. of Exp. Physiol. 26: 355-363.
136. Rojas-Mejía, Y., Moreno, J.A., García-Marquez, F., Perusquia, M., Medina-Jimenez, M., García-Yañez, E. y Kubli-Garfias, C. (1986): 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. Pág. 243.
137. Rotschild, I. y Meyer, R.K. (1940): Maintenance of pregnancy in castrated rats by means of progesterone. Proc. Soc. Exper. Biol. N.Y. 44: 402-405.
138. Rubin, R.P., (1982). Calcium and Cellular Secretion, Plenum Press. New York
139. Sandow, A. (1970): Skeletal muscle. An. Rev. Physiol. 32: 87-138.
140. Savolainen, T., Ojanotko, A., y Harry, M.P. (1982):

- Metabolism of progesterone in small intestine of normal and pregnant rat. J. Steroid Biochem. 17: XCX, abstract 285.
141. Schulster, D., Burstein, S. y Cooke, B.A. (1976): Moleculer endocrinology of the steroids hormones. John Wiley and Sons, London.
  141. Seeman, P. (1972): The membrane actions of anaesthetics and tranquillizers. Pharmac. Rev. 24: 583-655.
  142. Selye. H. (1942): Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. Endocrinology. 30: 437-453. Dekker, New York.
  143. Simon, W., y Morf, W.E. (1973). En :Membranes: A series of advances (G. Eisenmen, ed.) 2:329-375.
  144. Somlyo, A.P. y Somlyo, A.U. (1968): Vascular smooth muscle: Normal structure, pathology, biochemistry and biophysics. Pharmacol. Rev. 20: 197-272.
  145. Sommerville, L. E., y Hartshorne, D.J. (1986). Intracellular calcium and smooth muscle contraction. Cell. Calcium (England) 7 (5-6):353-364.
  146. Speding, M. (1985). Calcium antagonist subgroups. Trends Phramacol. Sci. 6: 109-114.
  147. Stone, P.H., Antman, E.M., Muller, J.E., y Braunwald, E. (1980): Calcium channels blocking agents in the treatment of cardiovascular disorders. II. Hemodynamics effects and clinical applications. Ann. Inter. Med. 93:886-890.
  148. Stucki, J.C. y Gleen, E.M. (1961): Endometrial proliferation pregnancy maintenance, parturition inhibition and myometrial block production with varius steroids. En A.C., Barnes. (ed.): Brook Lodge Simposium Progesterone, ed. Brook Lodge Press, Augusta Michigan. Pág. 25.
  149. Towart, R., y Shcram, M. (1984). Recent advances in pharmacology calcium channel. Trends Pharmacol Sci. 5:111-113.
  150. Vergara, J., Tsien, R.Y. y Delay, M. (1985). Inositol 1,4,5,-Triphosphate a posible chemical link in excitation-contraction coupling in muscle. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82 (18): 6352-6356.
  151. Villar, A., D'ocon M.P. y Anselmi, E. (1985). Calcium requirements of uterine contraction induced by prostaglandin E-1 importance of intracellular calcium

- stores. Prostaglandins 30 (3):491-496.
152. Wagatsuma, T., Sullivan, W.J. y Kumar, D. (1967). The mechanisms of action of potassium flux in human myometrium. Amer. J. Obstet. Gynecol. 98:1050-1053.
  153. Walters, M.R. (1985). Steroid hormone receptors and the nucleus. Endocrine. Rev. 6:512-541.
  154. Westphal, V. (1980). Mechanisms of steroid binding to transport proteins. En :Pharmacological modulation of steroids action. E. Genazzani, F. Di Carlo y W. I.R. Mainwaring editores. pp. 33-47. Raven Press, New York.
  155. Wilsman, N.J., Farnum, C. E. y Reed-Aksamit, D.K. (1981). Caveolar System of the articular chondrocyte. J. Ultrastruct. Res. USA 74/1:1-10.
  156. Whalen, R.E. y Gorzalka, B.B. (1972): The effects of progesterone and its metabolites on the induction of sexual receptivity in the rat. Horm. Behav., 3: 221-226.
  157. Wintour, E.M., Coghlan, J.P., Oddie, C.J., Scoggins, B.A. y Walters, W.A.W. (1978): A sequential study of adrenocorticosteroids level in human pregnancy. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 5: 399-403.
  158. Witzmann, R.F. (1977). en: Steroids Key to Life. Ed. Van Nostrand Reinhold Company. New York.
  159. Yamada, S. y Tomomura, Y. (1972). Phosphorylation of the  $Ca^{2+}$ -Mg<sup>2+</sup> dependent ATPase of the sacoplasmic reticulum coupled with cation traslocation. J. Biochem. 71:1101-1104.
  160. Zanisi, M. y Martini, L. (1975): Effects of progesterone metabolites on gonadotrophin secretion. J. Steroids Biochem. 6: 1021-1023.