



29
2ej^o

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

ANTAGONISMO DEL EFECTO EXCITADOR DE
OXITOCINA, ACETILCOLINA Y SEROTONINA
POR ESTEROIDES 5-REDUCIDOS SOBRE EL
UTERO AISLADO DE LA RATA

T E S I S

JOSE LUIS CORONA FLORES

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

TESIS CON
FALLA DE OR.GEN

1991



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. Introducción.	2
1) Importancia Biológica de los Esteroides y Biosíntesis.	3
2) Efectos de los Esteroides (5-reducidos) en el Sistema Nervioso Central.	8
3) Efectos en Músculo Liso.	10
4) Efectos Genómicos y No-genómicos.	12
5) Modulación de la Contractilidad Uterina.	14
5.1) Inervación del Utero.	14
5.2) Oxitocina.	16
5.3) Acetilcolina.	18
5.4) Serotonina.	20
6) Ciclo Contracción-Relajación del Músculo Liso Uterino.	21
6.1) Segundos Mensajeros.	25
7) Canales de Calcio.	28
7.1) Canales Operados por Voltaje.	30
7.2) Canales Operados por Receptor.	31
II. Planteamiento del Problema.	32
III. Hipótesis.	33
IV. Objetivos.	34
V. Material y Métodos.	35
VI. Resultados.	40
VII. Discusión.	53
VIII. Conclusiones.	59
IX. Referencias.	60

I. INTRODUCCION.

1) Importancia Biológica de los Esteroides.

Los esteroides son compuestos orgánicos de amplia distribución en la naturaleza y su estructura molecular consta de un núcleo de ciclo-pentano-perhidro-fenantreno basada en un sistema de cuatro anillos, los cuales, pueden tener diferentes orientaciones en relación uno con otro.

Estos compuestos tienen el mismo esqueleto esteroideal, pero difieren en los sustituyentes unidos a los 17 átomos de carbono o en la dirección en la estereoquímica.

Se considera como altamente improbable que existan organismos que no sintetizen esteroides. Los esteroides juegan un papel muy 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. La presencia de un fenómeno protector de los esteroides en plantas, sapos, escarabajos, equinodermos, etc., sugiere un mecanismo antiquísimo de defensa que estos organismos utilizan (Witzmann, 1977).

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

De tal manera los esteroides han tomado parte en procesos tales como la regulación de funciones esenciales para la vida en la tierra.

La importancia de los derivados del fenantreno, que son finalmente parte de la clave química que los diferencia en su acción biológica, se muestra claramente por el hecho de que

muchos compuestos sintéticos y metabolitos esenciales pertenecientes a este grupo se utilizan con fines terapéuticos. Por ejemplo, la morfina, codeína, colchicina, los ácidos biliares, los digitálicos, muchos hidro-carburos carcinógenos, el veneno de las glándulas parótidas de algunas especies de sapos, el grupo de la vitamina D, el colesterol y las hormonas esteroideas todas poseen el fenantreno o núcleo perhidrofenantreno (Selye, 1942), Fig. 1.

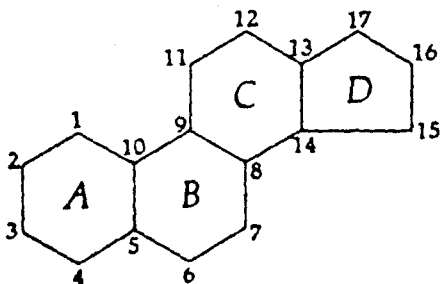


Figura 1.

Estructura común de todos los esteroides basada en un sistema anular tetracíclico. Los cuatro anillos se designan mediante las letras A, B, C y D.

Biosíntesis.

El colesterol es un compuesto esteroideal y componente estructural de las membranas celulares, pero varía en concentración representando entre 0-40 % de los lípidos totales de la membrana. Debido a su estructura de anillo fusionado que no

es tan flexible como una cadena hidrocarbonada extendida, se ha propuesto que la presencia del colesterol puede aportar mayor rigidez (dureza) a la membrana celular. La mayoría de los eslabones de la biosíntesis enzimática del colesterol son conocidos con cierto detalle, (Bloch, 1985), mostrando que tanto el núcleo como la cadena lateral de ocho carbonos del colesterol proceden del escualeno, un hidrocarburo isoprenoide de cadena abierta (más concretamente un dihidrotriterpeno), que a su vez se sintetiza a partir del acetato. En la última etapa de la biosíntesis del colesterol, el escualeno experimenta una oxidación por el oxígeno molecular, formando el escualeno 2,3-epóxido, el cual experimenta su ciclación a lanosterol, que es el primer esteroide que se produce. La conversión de lanosterol en colesterol implica la eliminación de tres grupos metilo (dos del átomo de carbono 4 y uno del carbono 14), la saturación del doble enlace de la cadena lateral, y el desplazamiento del doble enlace desde la posición 8-9 a la 5-6 del anillo B. Fig.2., (Lehninger, 1982).

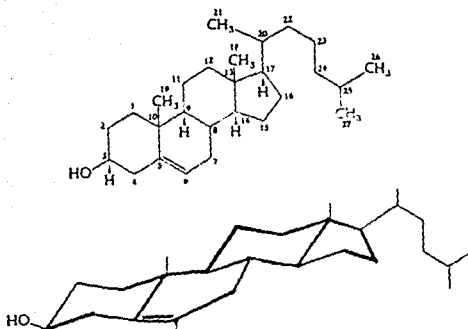


Figura 2.
Representación estructural del colesterol.

El colesterol es también el precursor metabólico primario que da origen a la pregnanolona, que a su vez es el precursor de otros esteroides como la progesterona. Por ejemplo en la glándula suprarrenal se produce aldosterona y cortisona la primera influye en el metabolismo de los electrolitos y del agua, mientras la última regula el metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas, incluyendo ácidos biliares y hormonas sexuales (Pina y cols., 1982).

Al lado de las glándulas animales que conducen sus secreciones al exterior del organismo, como las salivales, las sudoríparas, etc., hay que considerar las que producen las "secreciones internas" (glándulas endocrinas) que a través del torrente circulatorio, provocan determinadas funciones. Las sustancias secretadas por este tipo de glándulas han recibido el nombre de hormonas, palabra que procede del griego y que significa "excitar o provocar" (Devore, 1975).

Las hormonas se clasifican químicamente como :

- a) Hormonas polipeptídicas como la oxitocina.
- b) Hormonas del tipo amina como la vasopresina y
- c) Hormonas esteroidales como la progesterona.

Las hormonas esteroidales se dividen a su vez en cuatro familias: 1) Corticosteroides, 2) Estrógenos, 3) Andrógenos y 4) Progestinas, las últimas tres familias son también llamadas esteroides sexuales, Fig. 3.

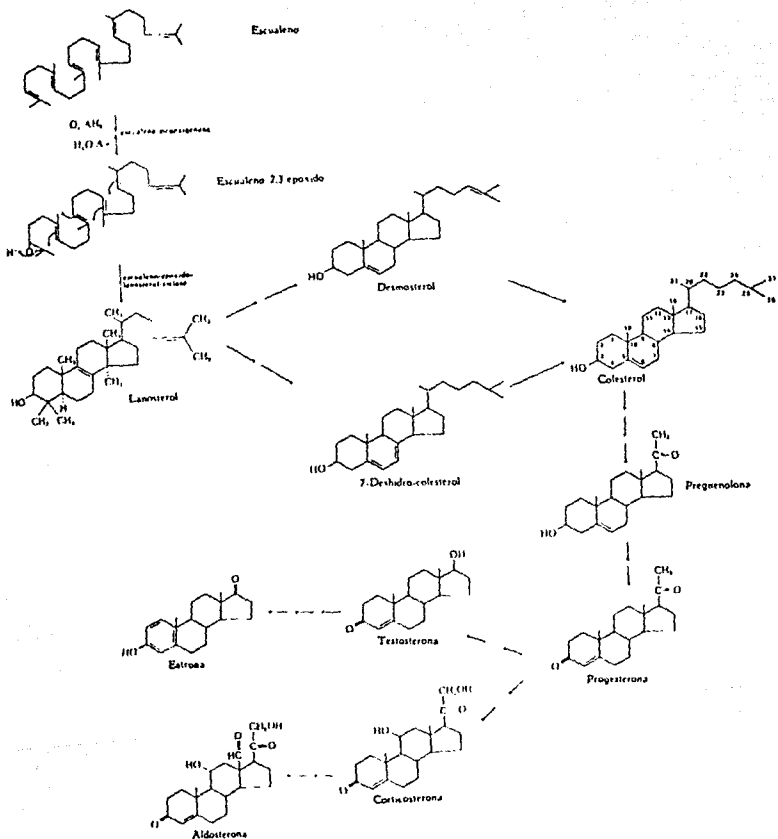


Figura 3.

Representación de la biosíntesis de algunos esteroides.
(Las flechas indican varios pasos)

2) Efecto de los Esteroides en el Sistema Nervioso Central

El primer reporte sobre el efecto anestésico de los metabolitos de la progesterona en el sistema nervioso central (SNC) fue hecho en 1942 por Selye.

Estudios posteriores (P'An y Laubach, 1964; Gyermek, Genter y Fleming, 1967) demostraron que algunos compuestos 5β -reducidos derivados de la progesterona poseen una potencia anestésica mayor que ésta, ya que el tiempo de pérdida de la conciencia, el reflejo postural y la insensibilidad del animal (rata y ratón) a estímulos nociceptivos es mayor con la progesterona que con los compuestos 5β -reducidos a dosis iguales. Todos estos experimentos evidenciaron un efecto claro de los esteroides derivados del pregnano sobre el SNC. Sin embargo, surgieron preguntas acerca de su sitio y mecanismo de acción y sobre todo de su importancia en la fisiología del SNC y de su conexión con otras funciones de tipo endocrino.

La progesterona ha sido un compuesto muy estudiado, sin embargo, a pesar de la gran variedad de acciones que se le conocen, existe muy poca información acerca de las posibles acciones o del papel fisiológico de sus derivados reducidos en posición cinco. Por lo cual, es posible que en algunos casos los efectos observados como consecuencia de la administración de la progesterona sean debidos a uno o varios de estos metabolitos.

En la actualidad varios efectos sobre el SNC por parte de la progesterona y sus metabolitos 5β y 5α son conocidos, por ejemplo se sabe que dichos compuestos producen sincronización de la actividad eléctrica cerebral y disminución de la frecuencia de

disparo de las neuronas en la corteza cerebral, el mesencéfalo y algunas zonas diencefálicas (Gyermek, Genter y Fleming, 1967; Kubli-Garfias, Cervantes y Beyer, 1976; Kubli-Garfias y cols., 1982a). Algunas de estas progestinas participan en el control de la secreción de gonadotrofinas, sobre todo de hormona luteinizante y de hormona foliculo-estimulante (Brown-Grant, 1974; Zanisi y Martini, 1975; Nuti y Karavolas, 1977; Karavolas y Hodges, 1990).

Asimismo las progestinas 5 β -reducidas antagonizan el efecto convulsivo de la 4-aminopiridina (Kubli-Garfias y cols., 1985b). Con respecto a la conducta sexual, sobre todo el despliegue de la conducta de lordosis por la hembra, las progestinas favorecen esta respuesta en la rata tratada previamente con estrógenos (Whalen y Gorzalka, 1972; Kubli-Garfias y Whalen, 1977). La progesterona y las progestinas 5 β -reducidas inhiben la liberación de noradrenalina en cortes de corteza cerebral de la rata (Kubli-Garfias y cols., 1983c).

Se ha reconocido que el cerebro es un complejo órgano blanco de hormonas esteroideas y éstas pueden producir en el encéfalo una gran variedad de efectos, los cuales son manifestación de las dos vías de acción: efectos genómicos y efectos membranales o no-genómicos (McEwen, Coirini y Schumacher, 1990).

3) Efectos en Músculo Liso.

Desde hace más de 50 años se sabe que la fisiología uterina está modulada por hormonas esteroides (Reynolds y Allen 1932; Robson, 1937). Se ha demostrado experimentalmente la importancia fisiológica del ovario en la actividad miométrial (Athias 1919; Blair, 1922).

Posteriormente registros " in vivo " de las contracciones uterinas (Reynolds, 1930), mostraron el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la actividad uterina de la coneja.

La regulación de la contracción espontánea uterina por la progesterona es una función descrita desde hace tiempo, estudios realizados con estrógenos y progesterona sobre útero de conejas ovariectomizadas, mostraron que las tiras musculares pretratadas con estrógenos aumentaban la tensión al ser estimuladas eléctricamente pero se relajan si los animales se pretratan con progesterona (Csapo y Corner, 1952).

Por otro lado, se ha demostrado experimentalmente, la capacidad de los metabolitos 5-reducidos, para relajar el músculo liso uterino (Kubli-Garfias, 1979, 1980).

Los esteroides producen relajación en diferentes tipos de músculo liso como el vascular, arterias pulmonares y en la aorta del conejo (Hudgiens y Weiss, 1968).

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, 1983a). Esta relajación es similar a la producida por la pregnanolona en arteria coronaria de perro in

vitro sobre la contracción inducida por ergonovina o KCl (Lara-Lemus y cols., 1986). Por otro lado la androsterona produce relajación en la actividad contractil de la aorta de la rata, además éste andrógeno ha mostrado una disminución de la frecuencia de las contracciones de las aurículas aisladas de rata macho preincubadas con atropina (Rojas-Mejía y cols., 1986).

Se ha observado que los andrógenos, las progestinas y los corticosteroides producen una relajación del íleon aislado de cobayo (Kubli-Garfias; y cols. 1987b).

Algunos tejidos, tales como el intestino delgado, esto es, íleon y yeyuno del cobayo y del conejo respectivamente, resultan ser más sensibles que el miometrio a la acción de los esteroides 5-reducidos. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de que diferentes tipos de músculo liso sean también blanco de hormonas esteroides.

El mecanismo de esta acción puede ser consecuencia de una disminución de la captación de Ca^{2+} por parte del miometrio (Batra y Bengtsson, 1978).

4) Efectos Genómicos y No-genómicos.

Las investigaciones realizadas en las dos últimas décadas sugieren dos diferentes mecanismos 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 (McEwen, y Parsons, 1982; McEwen, Coirini y Schumacher, 1990).

a) Efectos Genómicos.

Los complejos hormona-receptor fueron de las primeras moléculas a las cuales, se les reconoció que modulaban la expresión genética en los eucariotes (Chan y O'Malley, 1976). Asimismo la demostración de que en el tejido del oviducto de la gallina se ha hallado un receptor específico para la progesterona (O'Malley y cols., 1976), hacen pensar en un efecto sobre el núcleo.

Actualmente es aceptado que los receptores intracelulares para esteroides son miembros de una familia de proteínas unidas al ácido desoxirribonucleico (ADN) (McEwen, 1990; O'Malley, 1990). El complejo esteroide-receptor es reconocido como una nueva entidad que provoca la respuesta biológica. Los efectos mediados por mecanismos genómicos son de larga latencia y duración, en contraste con los mecanismos no-genómicos. Un ejemplo de la acción biológica genómica es la activación provocada por estradiol, de la conducta sexual en ratas hembras que presenta una latencia de 18 a 24 horas (McEwen y Parsons, 1982).

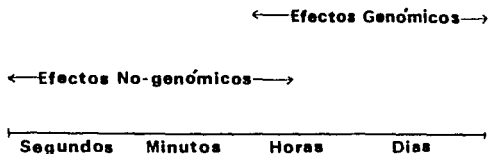
b) Efectos No-genómicos.

Por otro lado, es evidente la existencia de efectos ejercidos por los esteroides que se realizan tan rápidamente, que posiblemente no impliquen una mediación por el genoma, ejemplo de ello es la relajación que causa la progesterona y algunos de sus derivados en el músculo uterino, estos efectos se llevan a cabo en un rango de 30 a 60 segundos (Csapo y Takeda, 1965; Kubli-Garfias, 1979, 1980). Por lo que son considerados mecanismos no-genómicos (McEwen, Coirini y Schumacher, 1990).

Los mecanismos no-genómicos son de corta latencia y duración. Los efectos no-genómicos de los esteroides son observados con los estrógenos (McEwen y Parsons, 1982). Estos efectos se observan en la membrana celular y se manifiestan como modificaciones en la excitabilidad, así como la modulación de la acción y de la liberación de neurotransmisores (McEwen, 1980).

Una escala de tiempo tal como se muestra en la figura 4 sirve para distinguir la rapidez con que se llevan a cabo los efectos no-genómicos, contra los efectos genómicos más lentos y ésta escala comprende una zona de ambigüedad en el intervalo de minutos a horas (McEwen, Coirini y Schumacher, 1990).

Figura 4. Escala de el tiempo de los Efectos Genómicos y No-genómicos de los esteroides.



Efectos No-genómicos Rápidos.- Segundos, Minutos.
Corta Duración.- Desaparecen después de quitar el esteroide del tejido

Efectos Genómicos Lentos.- Minutos, Horas.
Larga Duración.- Persisten después de que el esteroide desaparece del tejido

5) Modulación de la Contractilidad Uterina.

5.1) Inervación del útero.

Aunque la inervación del útero de los mamíferos ha sido estudiada extensivamente, se tiene poca información sobre las relaciones intrínsecas de los componentes colinérgico y adrenérgico (Adham y Schenk, 1969; Bülbring y Tomita, 1987). El útero tiene inervación parasimpática (Acetilcolina) y simpática (Noradrenalina). Receptores muscarínicos excitatorios (Bolton y Kitamura, 1983) así como receptores α -adrenérgicos (excitadores) y β -adrenérgicos (inhibidores, hiperpolarizantes) que son claramente reconocidos en el miometrio de los mamíferos

(Moawad, 1973; Douglas, 1980; Bülbring y Tomita, 1987; Gazis y cols., 1989). Además de la inervación directa adrenérgica y colinérgica, el músculo liso uterino tiene la influencia directa de otros transmisores como: Serotonina (5-HT), Dopamina (DA) histamina, angiotensina y una variedad de sustancias moduladoras incluyendo esteroides, oxitocina y prostaglandinas, (Hoyle, 1983) entre otros.

De acuerdo con los estudios realizados con la técnica de fluorescencia histoquímica, los únicos almacenes identificables de histamina y serotonina en el útero de rata, son las células cebadas (McKercher, 1973). Este tipo de células se encuentran discontinuamente a lo largo del cuerno uterino (Levier y Spaziani, 1966). Las aminas son liberadas de las células cebadas por desgranulación o exocitosis (Johnson y Moran, 1969; Ellis y cols., 1970). El útero de algunas especies se contrae con histamina y el de rata se relaja (Black, 1972).

La angiotensina, por ejemplo, provoca contracción en el íleon de cobayo y útero de rata in vitro.

Las prostaglandinas (PG) E₂ y F_{2a} producen fuerte contracción del útero aislado de cobayo tanto en estro como en diestro. Las tiras de útero humano no grávido se contraen con las PGF_{2a} y se relajan con las PGE₂ (Moncada y cols., 1980). De esta manera se nota la gran variedad de compuestos que influyen sobre la modulación de la contractilidad uterina, por la existencia de sus receptores membranales en la célula del músculo liso uterino.

identificados en el útero de rata, conejo y humano (Fuchs, 1983b); los receptores a oxitocina han sido identificados en la membrana celular miometrial (Nissenson, 1978; Alexandrova y Soloff, 1980a, b y c; Fuchs, 1983b; Anselmi y cols., 1987; Carsten, 1974; 1987; Crankshaw, 1987).

En conejos, la cicloheximida previene el incremento de receptores a oxitocina inducidos por estradiol, esto sugiere que el efecto de los estrógenos involucra la síntesis de nuevos receptores protéicos (Nissenson y cols., 1978).

La oxitocina es el más potente de todos los agentes conocidos para provocar contracción uterina al término de la gestación y juega un papel muy importante tanto para la iniciación como para el mantenimiento del trabajo de parto (Fuchs, 1983; Popescu, 1985; Crankshaw, 1986; Anselmi, 1987 y Engstrom, 1988).

La oxitocina altera el intercambio iónico a través de la membrana en las células del músculo liso del miometrio para producir la contracción uterina eficaz. La contractilidad del miometrio estimulada por la oxitocina puede ser inhibida por los agonistas β -adrenérgicos, el sulfato de magnesio o la inhalación de anestésicos (Katzung, 1986).

Se ha propuesto que las contracciones fásicas inducidas por oxitocina son promovidas por la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio activados por su receptor específico (Matsuo y Masaatsu-Koujirou, 1987).

5.3.) Acetilcolina.

La estructura relativamente simple de la acetilcolina (ACh) que es el éster acetilo de la colina, se ilustra en la figura 6.

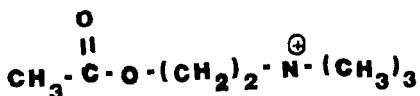


Figura 6.

Estructura de la Acetilcolina

La acetilcolina parece actuar directamente sobre la célula del músculo liso produciendo un efecto contráctil (Paton y Zar, 1968; Johnson y Marshall, 1972). Este agonista muscarínico interacciona sobre sus receptores específicos localizados en la superficie de la membrana celular, ya que la liberación iontoforética cerca de la membrana en el líquido extracelular, produce despolarización mientras que la liberación intracelular no produce efecto (Purves, 1974).

Se considera que la acción excitatoria producida por la ACh en músculo liso es debida a un aumento del influjo de Ca^{2+} a la célula por activar los canales de Ca^{2+} operados por su receptor específico (Bolton y Kuriyama, 1983, Bolton y Large, 1986).

Los agonistas muscarínicos como la ACh pueden incrementar las concentraciones de GMPc, sin embargo no se conoce su función en la regulación de la célula. La activación del receptor

muscarínico también aumenta el flujo de potasio a través de la membrana celular. No obstante aún no se sabe si las alteraciones en los canales de potasio están directamente acopladas a los receptores muscarínicos, ni tampoco se conoce si intervienen uno o más "mensajeros" en la mediación del cambio en el flujo del ión. Además, los agonistas muscarínicos activan el recambio de los fosfolípidos del inositol en las membranas de las células que poseen receptores muscarínicos (Katzung, 1986).

Aunque el significado fisiológico de esta observación es incierto, se están acumulando pruebas de que el ión Ca^{2+} , en su circulación a través de la membrana plasmática celular, es afectado por la acetilcolina y participa directamente en la regulación de la permeabilidad de la membrana al sodio y en el acople entre la despolarización de la membrana y la contracción (Mayer, 1980).

5.4) Serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT).

La serotonina es una indoletilamina, 3-(beta-aminoetil-5-hidroxiindol (Douglas, 1980; Katzung, 1986), Fig. 7.

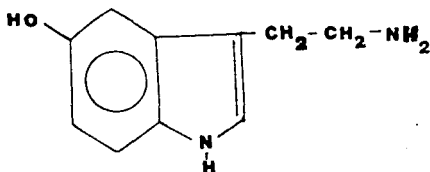


Figura 7

Estructura química de la serotonina.

Es bien conocido que el útero aislado de la rata es altamente sensible a la acción de 5-HT durante el estro o el embarazo y este efecto disminuye durante el diestro, posparto o después de ovariectomizar a las ratas. La administración de estradiol a ratas ovariectomizadas induce sensibilidad uterina (respuesta contráctil) a 5-HT (Robson y cols., 1954; Ichida y cols., 1983).

La contracción inducida por 5-HT en el útero de la rata ha sido relacionada con la entrada de calcio a la célula por activar los canales operados por el receptor serotoninérgico (Ichida y cols., 1985)

Los receptores para la 5-HT localizados en la superficie celular están poco caracterizados, pero es evidente que existen distintos tipos de receptores para la 5-HT por su amplia gama de

susceptibilidad a diferentes fármacos bloqueadores (Douglas, 1980). Se han identificado tres tipos de receptores para serotonina y se designaron 5-HT₁, (subtipos A, B, C y D), 5-HT₂ y 5-HT₃ (Receptor Nomenclature, 1990). La mayor parte de los receptores periféricos para la serotonina (en plaquetas y músculo liso) parecen ser de la variedad 5-HT₂ (Katzug, 1986).

Estudios "in vitro" utilizando pelanserín, un potente antagonista 5-HT₂, muestran que las contracciones inducidas por serotonina en el útero de la rata están mediadas por una interacción con receptores 5-HT₂, ya que el pelanserín produce una inhibición no competitiva de la respuesta contráctil a serotonina (Campos-Lara y cols., 1989).

6) Ciclo Contracción-Relajación del músculo liso uterino.

La contractilidad uterina depende de Ca²⁺ para el acople excitación-contracción (Somlyo y Somlyo, 1968; Hurwitz y Suria 1971). En el músculo liso la movilización del ión Ca²⁺; tanto intracelular como extracelular es necesaria para mantener la contracción (Ebashi y Endo, 1968), asimismo es el agente que activa las proteínas contráctiles (Somlyo y Somlyo, 1968; Hurwitz y Joiner, 1971). Por lo tanto, el incremento de la concentración de Ca²⁺ intracelular es el evento indispensable para activar el desarrollo de la tensión en la musculatura lisa (Bolton, 1979).

El acoplamiento contracción-relajación es el resultado de una

serie de factores que intervienen entre si. Según Kuriyama (1981) este evento en el músculo liso se puede dividir en cuatro pasos:

1) El potencial de acción entra hacia las células por las caveolas que son el homólogo funcional del sistema tubular del músculo estriado. 2) La despolarización de la membrana de las caveolas induce la liberación de Ca^{2+} almacenado en las cisternas terminales del retículo endoplásmico. 3) El Ca^{2+} así liberado alcanza a los filamentos delgados y produce la contracción. 4) Cuando termina la influencia de la despolarización, el Ca^{2+} es reacumulado en la superficie del retículo endoplásmico por un proceso dependiente de ATP.

También influye importantemente en el acoplamiento excitación-contracción del músculo liso la liberación de Ca^{2+} de depósitos intracelulares como el retículo endoplásmico, mitocondrias, caveolas, membranas y el Ca^{2+} fijado por los glicolípidos y la colágena (Villar, D'Ocon y Anselmi, 1985; Giembycz y Rodger, 1987), los cuales contribuyen en conjunto con el medio externo en la donación de Ca^{2+} para aumentar la concentración intracelular y de esta manera se dispara el mecanismo contráctil.

La fluctuación de la concentración intracelular de Ca^{2+} es el detector celular para que se inicie el fenómeno contracción-relajación, cuando la variación de concentración se desplaza en un intervalo de 0.3 a 2.1 μM (Giembycz y Rodger, 1987), siendo la concentración extracelular de Ca^{2+} de aproximadamente 1.5 mM (O'Doherty y cols., 1980; Daniel, Grover y Kwan, 1983) contribuyendo de importante manera en la entrada de Ca^{2+} para aumentar la concentración citoplasmática necesaria para producir una contracción mediante el complejo calcio-calmodulina (Carsten

y Miller, 1987; Bülbring y Tomita, 1987), el cual activa a la miosin-quinasa de cadena ligera para ser fosforilada. Fig.8.

La característica más importante del sistema contráctil del músculo liso es que, en contraste con el músculo esquelético, una mezcla de actina y miosina purificadas no muestran actividad ATPásica y la interacción de estas dos proteínas no ocurre en presencia de ATP. En presencia de Ca^{2+} se activa el sistema.

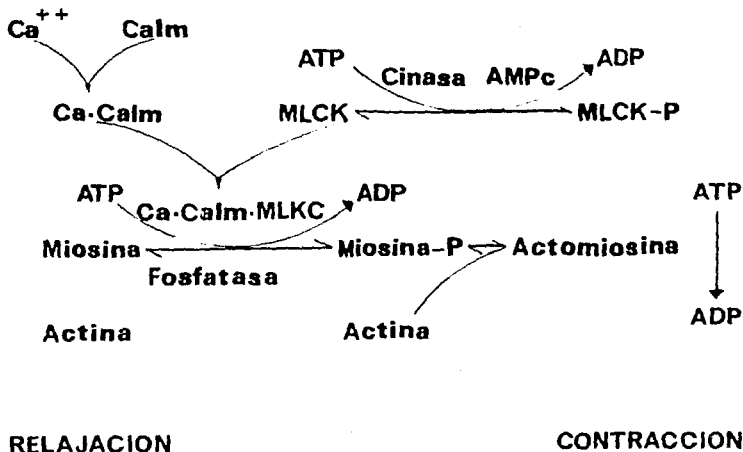


Figura 8.

Diagrama del ciclo contracción-relajación del músculo liso.
 Calm : Calmodulina; Cinasa AMPc : Proteín-cinasa dependiente de AMPc (monofosfato de adenosin cíclico); MLCK : Miosin-cinasa de cadena ligera; MLCK-P : Miosin-cinasa de cadena ligera fosforilada; Miosina-P : Miosina fosforilada; Actomiosina-P : Actomiosina fosforilada; ADP : Adenosindifosfato; ATP : Adenosin trifosfato.

6.1) Segundos Mensajeros.

Por otro lado se ha descrito que la movilización interna de Ca^{2+} es mediada por compuestos denominados segundos mensajeros.

Para que el Ca^{2+} se movilice hasta las proteínas contráctiles se presentan una serie de eventos:

El primero, está mediado por activación de la adenilato ciclasa y a la generación de AMP cíclico.

El segundo, se cree que comprende acciones que alteran la permeabilidad de la membrana citoplasmática a iones inorgánicos, particularmente mayor permeabilidad al sodio y al calcio que les permite entrar a la célula por medio de gradientes electroquímicos y movilización de calcio intracelular, lo cual se ve reflejado en el incremento del calcio citosólico. Con excepción de la membrana plasmática, el sitio de donde se movilizará calcio requiere de la intervención de una molécula que actuará como segundo mensajero. Dado que el mecanismo postulado para los nucleótidos era inadecuado para explicar la contracción al unirse una hormona liposoluble a su receptor, se propuso que el recambio de fosfatidilinositol (PI) en la membrana plasmática era la respuesta primaria a la intervención de las hormonas dependientes de calcio con su receptor (Michell, 1981).

Así se demuestra en la glándula salival de la mosca que la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1,2-diacilglicerol ocurría en 3 segundos, estos resultados dan la idea de que el IP_3 pudiera funcionar como segundo mensajero en la movilización de calcio intracelular (Berridge e Irvine, 1985). Otros trabajos realizados

por ellos demuestran que la adición de IP_3 en el rango micromolar induce la movilización de calcio del retículo sarcoplásmico, este efecto puede interpretarse como efecto específico del IP_3 .

Se sabe actualmente que la calmodulina tiene múltiples papeles en sistemas dependientes de calcio sirviendo por ejemplo como; reguladora de fosfodiesterasa, adenilato ciclasa, Ca^{2+} , Mg^{2+} - ATPasa, etc. y es determinante para activar a la miosina-cinasa de cadena ligera, como complejo calcio-calmodulina en el ciclo contracción relajación (Trigle, 1988).

Este tipo de mecanismo está propuesto para hormonas que son dependientes de calcio, Fig.9.

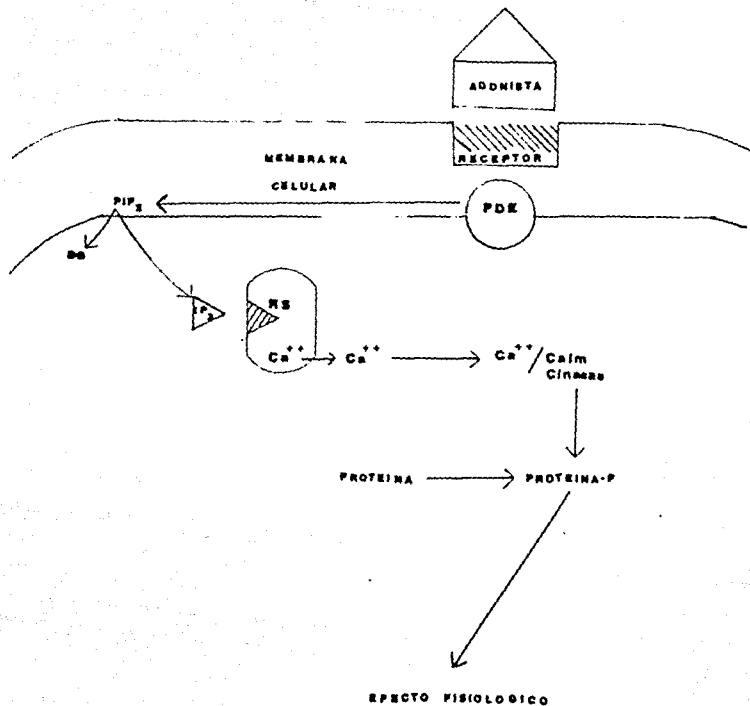


Figura 9

PDE = fosfodiesterasa; PIP₂ = fosfatidilinositol-4,5 -bifosfato;
 IP₃ = inositol 1,4, - trifosfato; DG = Diacilglicerol.

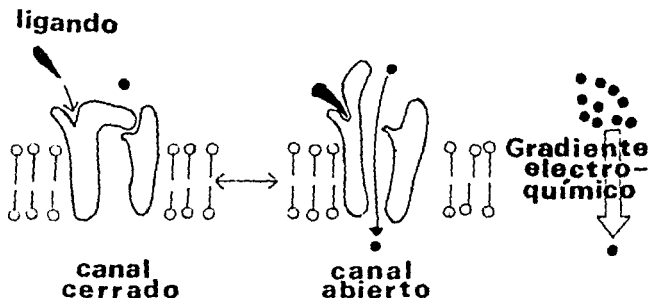
7) Canales de calcio.

Ya se mencionó con anterioridad que las contracciones en el músculo liso dependen grandemente de la entrada de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. La entrada de Ca^{2+} se realiza básicamente a través de los canales de calcio, éstos residen en las membranas de las células eucariotas (Bolton, 1979). Estos pueden ser considerados como poros o canales de origen protéico, que se encuentran en la membrana celular y permiten el intercambio de pequeños iones entre los fluidos intra y extracelular a través de la membrana.

Los efectos de las sustancias que incrementan o decrementan la tensión del músculo liso sugieren que hay dos tipos de canales iónicos a calcio en la membrana celular que permiten la entrada a este ión :

- Los canales de calcio operados por voltaje y
- Los canales de calcio operados por receptor (Bolton, 1979), ver Figura 10.

A) CANAL OPERADO POR LIGANDO



B) CANAL OPERADO POR VOLTAJE

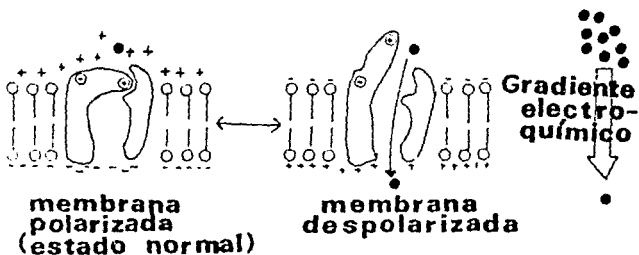


Figura 10

Diagrama esquemático de los dos tipos de canales. El canal en A es operado por ligando y se abre cuando un ligando extracelular se une al receptor, mientras que el canal B es operado por voltaje y se abre cuando la membrana es despolarizada.

7.1) Canales operados por voltaje.

Este tipo de canales son una población que se abren cuando un potencial de acción recorre la membrana. El músculo liso, normalmente no genera potenciales de acción, y entonces es posible que estos canales se abran cuando la membrana es despolarizada gradualmente (Bolton, 1979).

La característica esencial de este tipo de canal se deriva originalmente de registros de corriente eléctrica en tejidos intactos y en células aisladas, esto es, el flujo de corriente iónica a través de los canales (Somlyo y Somlyo, 1968). En últimas fechas las técnicas de registro han sido mejoradas usando la técnica de "Patch-clamp" (Somlyo y Franzini-Armstrong, 1985) que registra las corrientes de calcio a través de un solo canal (Reuter, 1983).

Los canales de Ca^{2+} operados por voltaje son disparados por el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática. En la despolarización de la membrana plasmática, las corrientes internas de Ca^{2+} llegan a un potencial aparente de alrededor de -40 mV y alcanza un máximo alrededor de 0 mV. La selectividad de los canales de Ca^{2+} no es absoluta, dado que de hecho los iones Ba^{2+} y Sr^{2+} son transportados por medio de estos canales. Se ha propuesto que los canales de calcio poseen un filtro selectivo responsable de la exclusión de cationes monovalentes. Cuando el filtro llega a ser dañado, el Na^+ también cruza estos canales (Kostyuk, 1989). La despolarización de la membrana que aumenta la conductancia iónica es consecuencia directa de la apertura de los canales de Ca^{2+} (Hurwitz, 1986).

7.2) Canales operados por receptor.

Algunos de éstos canales, están continuamente abiertos, otros solo se abren transitoriamente. Estos últimos canales se dice que son "disparados" o activados, se abren en respuesta a la unión de un ligando extracelular con un receptor específico que se encuentra dentro o sobre la membrana celular, y son llamados canales operador por ligando, (Bolton, 1979; Bolton y Large, 1986). En el caso de la interacción de los receptores de oxitocina con este tipo de canales se les ha llamado canales operados por hormona (Carsten, 1987).

Muchos esfuerzos se han realizado en los últimos años para estudiar cómo varían las concentraciones de los iones inorgánicos presentes en el medio extracelular cambiando el potencial de membrana, considerado como una consecuencia directa de la activación o desactivación de tales canales operados por receptor (Kostyuk, 1989).

Estos canales de Ca^{2+} se encuentran muy cerca de los receptores de membrana y se activan por la interacción agonista-receptor. Los canales de Ca^{2+} operados por receptor son menos estudiados que los canales de Ca^{2+} operados por voltaje, ya que sus propiedades específicas aún son desconocidas (Hurwitz, 1986).

Se considera que la acción de fármacos que inducen contracción o relajación en músculo liso están relacionados con la activación o desactivación de los canales de calcio operados por el receptor específico a estas sustancias (Bolton y Large 1986).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En trabajos previos, se ha encontrado que los andrógenos y las progestinas 4-en-3-ceto y 5a y 5B reducidos poseen un efecto intenso de tipo relajante sobre la actividad contractil del útero de la rata (Kubli-Garfias, 1979, 1980, 1983a y b). El mecanismo de acción mediante el cual los esteroides producen relajación sobre el músculo liso uterino es aún desconocido y son pocos los datos relacionados a éste. El mecanismo de esta acción relajante puede ser consecuencia de una disminución en la captación de Ca^{2+} por el miometrio, (Batra y Bengtsson, 1978).

En forma preliminar se observó que los andrógenos y las progestinas 5-reducidos antagonizan el efecto excitador provocado por el Ca^{2+} (Kubli-Garfias y cols., 1982b).

Por otro lado Kubli-Garfias y cols., 1982; 1984, mostraron que el aumento en la concentración de Ca^{2+} estimula la contractilidad del útero de la rata, mientras las progestinas 5-reducidas lo antagonizan. También se ha reportado que los andrógenos y las progestinas producen relajación en las contracciones inducidas por Ca^{2+} en úteros despolarizados de ratas preñadas y no preñadas (Kubli-Garfias y cols., 1984b y c; Perusquia, Ponce-Monter y Kubli-Garfias, 1984). Con estos antecedentes se propone que estos esteroides tienen un efecto, mediado por mecanismos no-genómicos en la contractilidad uterina al modificar la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} (Kubli-Garfias y cols., 1985a).

Estudios recientes han mostrado que el efecto útero-relajante de los esteroides podría ser dado por un bloqueo de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje al antagonizar las contracciones

inducidas por Ca^{2+} en útero despolarizado de rata (Perusquia y cols., 1990), sin embargo, se abre la posibilidad de una interacción de los esteroides con el tipo de canales operados por un receptor.

III. HIPOTESIS.

La rapidez con que el músculo liso responde a los cambios en la concentración de Ca^{2+} extracelular, muestra una dependencia de este tejido por el Ca^{2+} externo. Tal dependencia sugiere fuertemente que la membrana plasmática es un sitio importante para la interacción esteroide-calcio, debido al efecto relajante de los esteroides producido en este tejido.

Los andrógenos y las progestinas de acuerdo a su estructura química producen relajación del músculo liso. Se postula que el mecanismo de acción útero-relajante de los andrógenos y progestinas es debido a que disminuyen el influjo de Ca^{2+} a la célula, (Kubli-Garfias y cols., 1982b). Que se lleva a cabo principalmente tanto por los canales de Ca^{2+} operados por voltaje como por los canales de Ca^{2+} controlados por hormona (Carsten y Miller, 1987).

Por lo que se espera que progesterona y algunos de sus metabolitos 5-reducidos antagonicen las respuestas contráctiles inducidas por oxitocina, acetilcolina y serotonina en el útero aislado de la rata, que involucran la activación de los canales de Ca^{2+} controlados por receptor.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo específico : Contribuir al conocimiento del mecanismo de acción que los esteroides (andrógenos y progestinas 5-reducidos) emplean para afectar la contractilidad uterina.

Objetivos intermedios :

- a) Observar si los compuestos 5-reducidos derivados de la testosterona y la progesterona son capaces de relajar la contracción inducida por ; oxitocina, acetilcolina y serotonina en el útero aislado de la rata.
- b) Estudiar la relación del efecto útero-relajante de los esteroides en el influjo de Ca^{2+} a través de los canales de calcio controlados por receptor.
- c) Determinar si la disminución de la entrada de Ca^{2+} producida por los esteroides varía de acuerdo al tipo de receptor que opera los canales.
- d) Establecer una relación estructura química-actividad biológica de estos compuestos y los efectos observados.

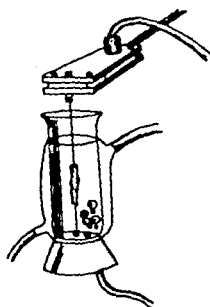
V. MATERIAL Y METODOS.

Descripción del material biológico utilizado.

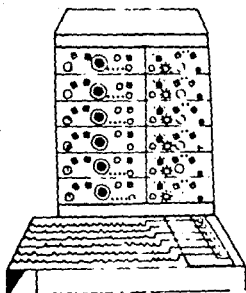
Se usaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar de aproximadamente 200-250 g de peso, alimentadas ad libitum. Las ratas fueron tratadas, administrándoseles por vía subcutánea, 100 µg / Kg de peso de benzoato de estradiol 24 horas antes del experimento.

Los animales utilizados fueron sacrificados mediante dislocación cervical, para abrir el abdomen y poder realizar la histerectomía. El útero fué disecado en una caja de petri con una solución de Ringer Krebs-Henseleit, que contenía (en mM) : NaCl, 119; KCl, 4.6; CaCl₂, 1.5; MgSO₄, 1.2; KH₂PO₄, 1.2; NaHCO₃, 25 y glucosa 12.2, a pH de 7.4, manteniendo la temperatura a 37°C y con burbujeo constante de una mezcla de 95 % O₂ / 5 % CO₂. Los cuernos uterinos fueron cortados, cada uno, en tres anillos de aproximadamente 1 cm de longitud, los cuales fueron fijados en cámaras de incubación (volumen 10 ml) que contenían la misma solución Ringer. 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 señales mecánicas de las contracciones y las envió a un poligrafo Grass de 8 canales modelo 7D (Fig. 11). La tensión empleada en el tejido fue de 1 g, lo cual corresponde a 2 cm de desplazamiento de la pajilla.

Los efectos se cuantificaron en porcentaje midiendo el área bajo la curva de las contracciones mediante el uso de un planímetro digital modelo Planix 7 . (Fig.12).



a



b

Figura 11.
Esquema del sistema de registro.
a) Cámara con el músculo y transductor.
b) Polígrafo.

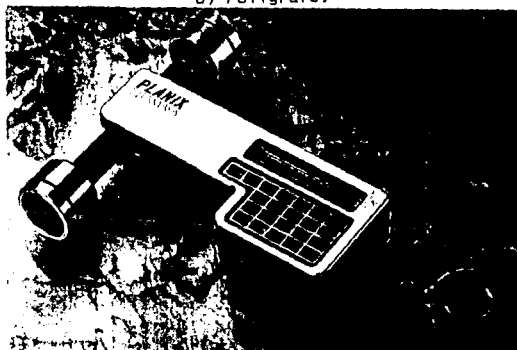


Figura 12.
Planímetro digital para valorar el área bajo la curva de las contracciones.

Descripción de las sustancias utilizadas.

Se probaron 3 diferentes concentraciones de cada uno de los siguientes esteroides (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.):
PROGESTINAS; 4-pregnen-3, 20-diona (progesterona), 5 β -pregnan-3,20-diona (pregnandiona), 3 β -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (pregnanolona) y 3 α -hidroxi-5 β -pregnan-20-ona (epipregnanolona).
ANDROGENOS: 17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona), 17 β -hidroxi-5 β -androstan-3-ona (5 β -dihidrotestosterona, 5 β -DHT.), 5 α -androstan-3 α -17 β -diol (androstadiol), y 3 α -hidroxi-5 α -androstan-17-ona; (androsterona).

Todos los esteroides fueron disueltos en propilen glicol. La concentración final de este compuesto fue de 1.43 μ M.

Como agonistas se utilizaron:

Oxitocina (Syntocinon, Sandoz ampollitas 5 U.I./ml), a una concentración de 5 mUI/ ml, cloruro de acetilcolina (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) a 100 μ M y Serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT), complejo de sulfato de creatinina (Sigma Chemical Co. St. Louis Mo.) utilizada a una concentración final de 10 μ M.

Los agonistas fueron disueltos en un volumen de 10 μ l de agua destilada.

Descripción del experimento.

Después de 30 minutos de estabilización del tejido, se produjo una respuesta contráctil por el agonista durante 10 minutos que fue tomada como control, posterior a este periodo el tejido fue lavado con solución Ringer Krebs-Henseleit y en un segundo ensayo, el tejido fue preincubado con el esteroide durante 5 minutos (un esteroide para cada concentración), posteriormente se adicionó el agonista a la misma concentración para comparar esta respuesta con el control, observando el efecto durante 10 minutos después de los cuales se lavó el tejido con el fin de retirar el efecto del esteroide y el agonista. Finalmente se obtuvo una tercera respuesta con el agonista a la misma concentración con el propósito de observar si el tejido era capaz de recuperarse.

Se construyeron las curvas concentración-respuesta y se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de cada uno de los esteroides utilizados, según el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

En otros experimentos se provocó la respuesta del agonista y se observó durante 20 minutos, para ser tomada como control, después de lavar el tejido, se probó la CI₅₀ de los esteroides 10 minutos después de una segunda contracción inducida por el agonista, a la misma concentración que se utilizó para el control, para observar durante 10 minutos la respuesta del esteroide sobre la contracción que produce el agonista.

Previamente fueron hechos los controles de? vehículo (propilen glicol, 1.43 μ M) en el cual se disolvieron los esteroides para determinar si ésta concentración del vehículo producía algún

efecto sobre la contracción uterina provocada por el agonista. Los datos obtenidos son el promedio de 8-12 experimentos de cada una de las concentraciones utilizadas de los diferentes esteroides probados \pm desviación estándar. Determinándose así cada punto para la construcción de la curva concentración-respuesta del efecto de diferentes concentraciones de esteroides sobre la contracción inducida por los tres tipos de agonistas utilizados.

La potencia de los esteroides fue evaluada mediante la fórmula CI_{50} progesterona / CI_{50} esteroide asumiendo que la progesterona tiene valor de 1.00.

VI. RESULTADOS.

Efecto de los andrógenos y las progestinas sobre la contracción provocada por oxitocina, acetilcolina y serotonina en el tejido uterino.

En este estudio se observó que los andrógenos y las progestinas utilizados producen un efecto inhibitorio de la contracción uterina inducida por los tres tipos de agonistas utilizados; oxitocina, acetilcolina y serotonina, tanto antes como después de provocar la contracción con los diferentes agonistas. El efecto inhibitorio sobre las contracciones inducidas por estos tres tipos de agonistas fue observada con una disminución del tono así como también de la frecuencia y amplitud de la contracción.

La respuesta del tejido a los agonistas después de observar el efecto inhibitorio esteroide-agonista fue recuperada en un 100 %. El vehículo utilizado para disolver los esteroides no produjo un efecto significativo (menor al 2 % de relajación) sobre la contractilidad uterina (Figuras 13, 14 y 15).

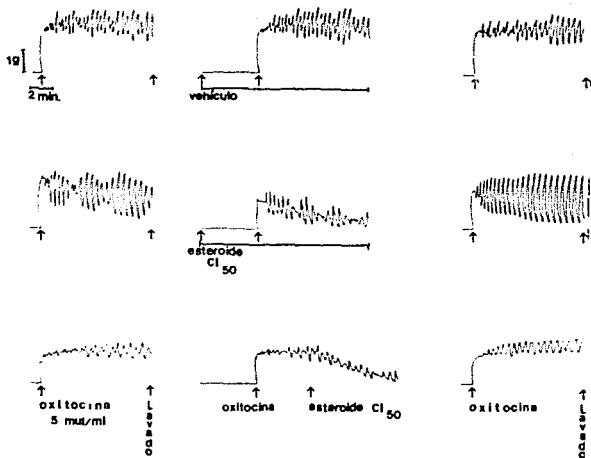


Figura 13.
Registros típicos del efecto antagonístico del esteroide (CI₅₀) antes y sobre la contracción inducida por oxitocina. Nótese la recuperación del tejido en un 100 % en el segundo control.

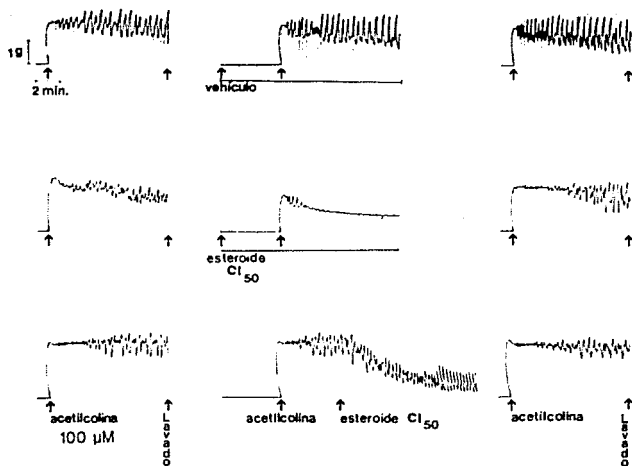


Figura 14.
 Efecto de un esteroide 5-reducido, produciendo un 50% de inhibición (CI₅₀) de la contracción inducida por acetilcolina.

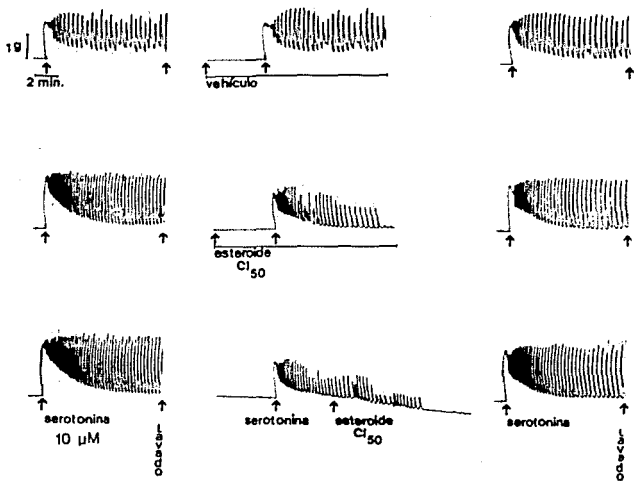


Figura 15.

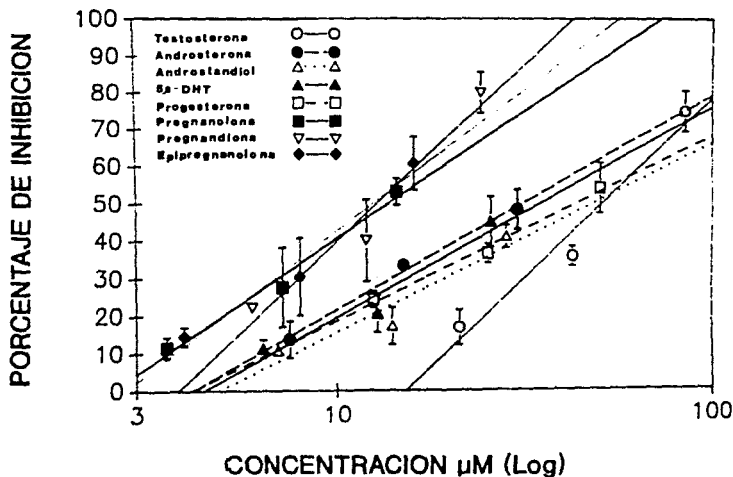
Efecto relajante de un esteroide (CI₅₀) sobre la respuesta contráctil a serotonina en el útero aislado de la rata. Notesé la inhibición de la contracción antes y durante la contracción inducida por serotonina.

El efecto inhibitorio de cada uno de los esteroides sobre la contracción de oxitocina, acetilcolina y serotonina a las diferentes concentraciones utilizadas es mostrada en la tabla I, donde se observa que este efecto sigue una relación lineal dependiente de la concentración, mostrado en las gráficas 1, 2 y 3.

TABLA I

COMPUESTO	CONCENTRACION (µM)	% DE INHIBICION DE LA CONTRACCION INDUCIDA POR DJITOCINA	% DE INHIBICION DE LA CONTRACCION INDUCIDA POR ACETILCOLINA	% DE INHIBICION DE LA CONTRACCION INDUCIDA POR SEROTONINA
PROGESTINAS				
PROGESTERONA	12.50	24.79 ± 2.80	6.41 ± 3.52	15.55 ± 2.16
	25.00	26.49 ± 2.54	22.40 ± 4.39	33.87 ± 2.33
	50.00	55.40 ± 3.61	70.33 ± 9.50	59.69 ± 5.42
PREGNANOLONA	3.00	11.48 ± 2.84	20.59 ± 3.52	44.35 ± 3.19
	7.20	27.55 ± 10.65	40.11 ± 5.72	53.63 ± 2.56
	14.40	53.05 ± 3.55	68.69 ± 5.58	70.94 ± 2.11
PREGNANDIONA	5.00	22.07 ± 2.05	40.15 ± 4.87	41.51 ± 5.48
	12.00	40.03 ± 10.95	55.65 ± 9.43	56.89 ± 2.62
	24.00	75.74 ± 5.68	73.27 ± 6.95	65.70 ± 6.16
EPIPEGNANOLONA	4.00	14.42 ± 2.55		
	8.00	30.38 ± 10.35	40.10 ± 4.87	41.84 ± 2.14
	16.00	60.65 ± 7.22	53.19 ± 2.76	55.03 ± 2.95
	32.00		75.60 ± 3.59	82.04 ± 2.92
ANDROGENOS				
TESTOSTERONA	21.00	16.75 ± 4.74	19.07 ± 3.07	20.73 ± 2.00
	42.00	35.07 ± 2.94	30.19 ± 3.92	44.52 ± 9.69
	85.00	74.57 ± 3.75	53.88 ± 6.12	73.49 ± 7.11
ANDROSTERONA	7.50	13.61 ± 4.96	20.18 ± 3.74	30.73 ± 1.55
	15.00	33.40 ± 2.29	35.31 ± 6.52	55.60 ± 3.50
	30.00	48.22 ± 6.33	59.89 ± 7.85	71.00 ± 3.91
	60.00	70.57 ± 8.63		
ANDROSTANDIOL	7.00	10.06 ± 0.87		
	14.00	17.15 ± 2.86	33.71 ± 4.83	47.36 ± 1.78
	28.00	40.96 ± 2.82	46.60 ± 7.28	57.48 ± 1.67
	56.00	61.35 ± 2.10	67.54 ± 3.67	71.35 ± 0.92
5B-DHT	8.40	11.15 ± 2.25		
	12.60	21.00 ± 4.33	38.27 ± 7.41	48.31 ± 0.78
	25.20	41.94 ± 7.71	57.71 ± 5.72	61.08 ± 1.15
	51.00	67.60 ± 4.15	82.31 ± 3.39	73.35 ± 0.78

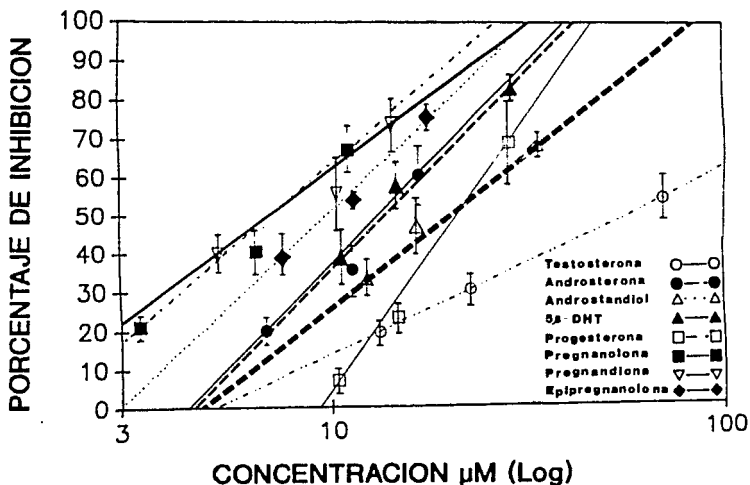
Los valores son las medias ± Desviación Estándar de más de 8 experimentos.



GRAFICA 1

Curvas concentración-respuesta del efecto inhibitorio de los diferentes andrógenos y progestinas sobre la contracción inducida por oxitocina (5mUI/ml) en el útero aislado de la rata.

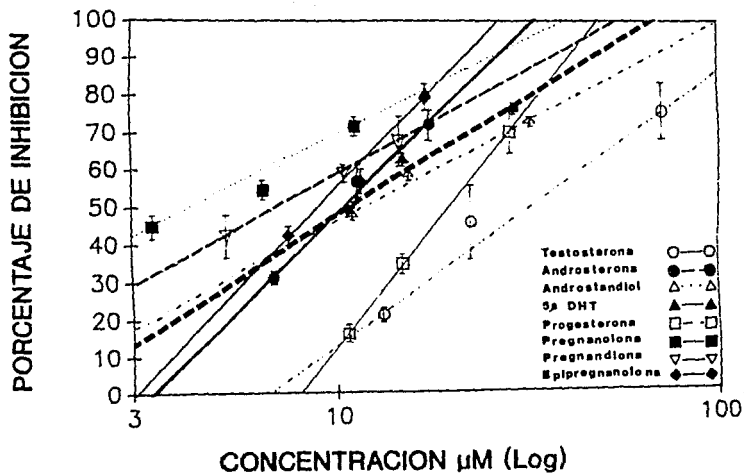
Las barras verticales representan la desviación estándar. Nótese una mayor pendiente para el efecto de los metabolitos de testosterona y progesterona.



GRAFICA 2

Los puntos representan el efecto inhibitorio de cada una de las concentraciones de los diferentes esteroides utilizados sobre la contracción inducida por acetilcolina.

Las barras verticales representan la desviación estándar. Nótese una pendiente mayor para el efecto de los metabolitos de testosterona y progesterona.



GRAFICA 3

Comportamiento del efecto inhibitorio (\pm desviación estándar, $n > 8$) de los diferentes andrógenos y progestinas sobre la contracción inducida por serotonina.

En las tablas II, III y IV, se muestran las diferentes Cl_{50} obtenidas para cada esteroide, así como sus límites de confianza, la pendiente de la recta y la potencia en relación a la progesterona que presentaron cada uno de los esteroides para producir el efecto inhibitorio de la contracción inducida por: oxitocina (tabla II), acetilcolina (tabla III) y serotonina (tabla IV).

Los datos muestran que existe una diferencia de potencia para producir el efecto inhibitorio entre cada uno de estos compuestos, que parece depender de la estructura química de la molécula, así, se observa una clara correlación entre la estructura química y la actividad biológica del compuesto, donde los esteroides 5-reducidos mostraron ser más potentes que sus precursores; progesterona y testosterona. Sin embargo, las progestinas 5 β -reducidas siempre mostraron ser mucho más potentes que progesterona para relajar la contracción de oxitocina, acetilcolina y serotonina. En relación a los andrógenos 5 β -reducidos como 5 β -DHT, en el caso de inhibir la contracción de oxitocina fue más potente que testosterona y uno de los andrógenos 5 α -reducidos como es androstandiol pero menos potente que androsterona (tabla IV).

TABLA II

EFFECTO ANTAGONICO DE LOS ESTEROIDES 5-REDUCIDOS SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR OXITOCINA EN EL UTERO AISLADO DE LA RATA.

COMPUESTO	CI ₅₀ (µM)	LIMITES	PENDIENTE	POTENCIA*
<u>ANDROGENOS</u>				
Testosterona	40.00	25.56-65.44	2.37	0.94
Androsterona	31.00	16.76-57.35	3.50	1.39
Androstanediol	39.00	20.53-74.10	3.72	1.10
5β-DHT	34.00	19.32-59.84	3.17	1.26
<u>PROGESTINAS</u>				
Progesterona	43.00	18.14-101.90	4.43	1.00
Pregnanolona	13.00	7.10-23.80	2.99	3.30
Pregnandiona	12.50	7.35-21.25	2.62	3.44
Epipregnanolona	12.50	7.18-21.75	2.84	3.44

* La potencia fue comparada por la formula: CI₅₀ progesterona/CI₅₀ esteroide asumiendo valor de 1.00 para progesterona.

Para inhibir la contracción de acetilcolina, andrógenos y progestinas 5 β -reducidos presentaron mayor potencia que sus precursores y que los derivados 5 α -reducidos (tabla III).

TABLA III

EFFECTO ANTAGONICO DE LOS ESTEROIDES 5-REDUCIDOS SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR ACETILCOLINA EN EL UTERO AISLADO DE LA RATA.

COMPUESTO	CI ₅₀ (μ M)	LIMITES	PENDIENTE	POTENCIA*
ANDROGENOS				
Testosterona	72.00	37.89-136.80	2.96	0.48
Androsterona	22.00	9.65-50.16	3.55	1.57
Androstandiol	27.00	9.71-75.00	4.82	1.28
5 β -DHT	18.00	9.52-34.02	3.16	1.92
PROGESTINAS				
Progesterona	34.50	23.47-50.72	1.97	1.00
Pregnanolona	9.00	4.81-16.83	1.87	3.83
Pregnandiona	8.80	3.48-22.26	5.09	3.92
Epipregnanolona	12.00	5.00-28.80	4.40	2.88

* La potencia fue comparada por la fórmula CI₅₀ Progesterona/CI₅₀ esteroide asumiendo valor de 1.00 para progesterona.

Con respecto a la contracción inducida por serotonina (5-HT) fueron también los compuestos 5 β -reducidos los que presentaron una mayor potencia para inducir el efecto inhibitorio, como en el caso particular de pregnanolona que fué 6 veces más potente que progesterona para producir el 50 % de inhibición (tabla IV).

TABLA IV

EFFECTO ANTAGONICO DE LOS ESTEROIDES 5-REDUCIDOS SOBRE LA CONTRACCION INDUCIDA POR 5-HIDROXITRIPTAMINA (SEROTONINA) EN EL UTERO AISLADO DE LA RATA

COMPUESTO	CI ₅₀ (μ M)	LIMITES	PENDIENTE	POTENCIA*
ANDROGENOS				
Testosterona	47.00	27.98-78.96	2.62	0.66
Androsterona	15.00	4.45-35.13	4.90	2.07
Androstandiol	17.00	4.38-33.26	3.85	1.82
5 β -DHT	13.00	4.51-34.29	4.10	2.38
PROGESTINAS				
Progesterona	31.00	19.02-50.53	2.42	1.00
Pregnanolona	4.80	1.66-13.96	7.18	6.45
Pregnandiona	9.00	4.02-20.16	4.59	3.44
Epipregnanolona	10.50	5.28-20.90	3.47	2.95

* La potencia fue comparada por la fórmula : $CI_{50} \text{ Progesterona} / CI_{50} \text{ esteroide}$ asumiendo valor de 1.00 para progesterona.

VII. DISCUSION.

El efecto inhibitorio presentado por andrógenos y progestinas 5-reducidos sobre la respuesta excitadora producida por; oxitocina, acetilcolina y serotonina, mostraron un claro efecto antagónico de los esteroides 4-en y 5-reducidos sobre la contracción inducida por estos agonistas en el útero aislado de la rata.

Ha sido descrito el efecto relajante producido por andrógenos, progestinas y corticosteroides en diferentes tipos de músculo liso como en el uterino (Kubli-Garfias, 1979, 1980), vascular (Hudgiens y Weiss, 1968; Lara-Lemus y cols., 1986; Rojas-Mejía y cols., 1986), intestinal (Kubli-Garfias y cols., 1987) así como también en algunos tejidos del aparato reproductor del macho como en la vesícula seminal y epididimo (Kubli-Garfias, 1983b). Sin embargo, son muy pocos los datos que existen acerca de su mecanismo de acción.

Algunos trabajos han mostrado que el efecto anestésico de los esteroides, podría ser debido a una estabilización de la membrana, disminuyendo la fluidez y alterando la permeabilidad iónica, (Seyle, 1942).

Algunos resultados apoyan tal suposición. Así se mostró que la progesterona posee un efecto bloqueador de la entrada de Ca^{2+} en el miometrio (Batra y Bengsston, 1978). Posteriormente fue mostrado un claro antagonismo al Ca^{2+} por los esteroides 5-reducidos en este tejido (Kubli-Garfias y cols., 1982b).

Estudios recientes evidencian que los esteroides pueden bloquear la entrada de calcio a través de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (Perusquía y cols., 1990).

Sin embargo, es posible que los esteroides puedan bloquear los canales operados por receptor también llamados canales de calcio controlados por hormona (Carsten, 1987).

Por otro lado se sabe que el efecto contráctil que produce oxitocina, acetilcolina y serotonina en el útero, se lleva a cabo primero por la interacción hormona-receptor y posteriormente por activación de los canales de calcio para permitir la entrada de este ión y de esta manera producir la contracción.

Por lo cual, el efecto antagónico a la contracción inducida por oxitocina, acetilcolina y serotonina por los diferentes compuestos esteroides utilizados en este estudio, muestra que los esteroides podrían también estar interactuando con los canales de Ca^{2+} operados por receptor, lo cual parece indicar que el mecanismo de acción del efecto útero-relajante de los esteroides, podría ser dado por disminuir la entrada de Ca^{2+} a la célula, a través de bloquear tanto los canales de Ca^{2+} operador por voltaje (Perusquía y cols., 1990) como los canales de Ca^{2+} operados por receptor (Presentes datos).

Por otra parte es poco probable que el esteroide interactúe directamente con el receptor específico a oxitocina, acetilcolina o serotonina, debido en primer lugar a la diferencia que existe entre la estructura molecular de los esteroides y estos compuestos para interactuar con sus receptores específicos, segundo; debido a las propiedades fisicoquímicas de los esteroides como son: su alta liposolubilidad, hace que los

esteroides se introduzcan entre las cadenas alifáticas de los fosfolípidos, con lo cual se disminuye la fluidez de la membrana y la permeabilidad iónica.

Lo anterior apoya la hipótesis de que los esteroides al introducirse en la membrana lipídica alteren la proteína que conforma los canales de Ca^{2+} , ya sea los operados por voltaje o por receptor, inactivándolos y de esta manera disminuyendo el influjo del ión Ca^{2+} produciendo por consecuencia la relajación muscular.

En el presente trabajo se observó que la contracción de oxitocina presenta una mayor resistencia al efecto antagonico de los esteroides, probablemente por la alta especificidad de los receptores oxitócicos a diferencia de los colinérgicos y serotoninérgicos. Esto significa que existen receptores específicos para oxitocina en el útero, lo cual naturalmente se observa en el efecto oxitócico por excelencia de esta hormona nonapeptídica. La acetilcolina y la serotonina al tener varios tipos de receptores distribuidos en diferentes órganos y sistemas, y por supuesto en útero, no actúan con la selectividad con que lo hacen los de oxitocina debido tal vez a que los receptores oxitócicos coadyuvan al trabajo de parto.

De manera general, los datos obtenidos indican que los compuestos 5 β -reducidos tales como 5 β -DHT, pregnanolona, pregnandiona y epipregnanolona son más potentes que los 5 α -reducidos y los compuestos 4-en-3-ceto como testosterona y progesterona, precursores de los compuestos anteriores, son los menos potentes. La testosterona fue el compuesto que menor efecto tuvo para inhibir la contracción de los tres agonistas

utilizados. Por otro lado, para inhibir la contracción provocada por oxitocina se requieren concentraciones mayores a las utilizadas para obtener el mismo efecto que sobre la contracción producida por acetilcolina. De tal manera la contracción inducida por serotonina resultó ser más sensible a la acción de los esteroides.

El efecto relajante de estos compuestos sobre la contractilidad uterina parece estar relacionado con su estructura química. Las progestinas 5 β -reducidas son mejores que los compuestos 5 α y 4-en para inducir relajación miometrial. Sin embargo, la cadena lateral en el carbono 17 es también importante, puesto que los andrógenos 5 β -reducidos tienen un efecto menor que las progestinas, tanto en el útero como en el SNC. La relajación notable producida por los derivados de la progesterona sobre el útero se correlaciona con un efecto depresor observado en el SNC, donde la progestinas 5 β -reducidas fueron las más potentes (Kubli-Garfias y cols., 1979, 1982a y b, 1984a, b y c). En el presente estudio se observó la misma correlación ya que los derivados 5 β -reducidos de la progesterona son, según los resultados obtenidos, de 2 a 6 veces más potentes que su precursor, seguidas por los andrógenos 5-reducidos, los cuales fueron activos, independientemente de que su configuración fuera trans o cis (5 α ó 5 β) respectivamente, pero es bien sabido que los compuestos 5 α -reducidos son efectivos solamente si poseen una configuración 3 α -hidroxi-5 α en el anillo A, como androsterona y androstandiol (Kubli-Garfias y cols., 1980). Los compuestos 4-en, esto es, la progesterona y la testosterona presentan menor potencia. Es interesante hacer notar como éste último andrógeno

fue el compuesto que menor potencia presentó con los tres diferentes agonistas.

La importancia fisiológica del efecto relajante de la progesterona y de la testosterona, así como de sus metabolitos puede ser reforzada por el hecho de que los niveles plasmáticos están incrementados durante la mitad de la gestación en ratones, y en el tercer período de la gestación de la rata. En la mujer el incremento de los niveles de testosterona y de pregnanolona se nota durante el primer tercio del embarazo. Es importante recordar que durante el embarazo, cuando grandes cantidades de progesterona son secretadas, producen una atonía uterina, necesaria para permitir la anidación del producto y evitar un aborto temprano.

Muchos estudios deberán hacerse aún para conocer la modulación de la actividad contráctil del útero, la importancia fisiológica de los compuestos 5 β -reducidos para regular la motilidad uterina ha quedado mostrada, evidenciando que el útero es por excelencia órgano blanco de hormonas esteroides, al parecer el efecto relajante de los esteroides sobre músculo liso es un fenómeno inespecífico, caracterizado como una acción membranar (No-genómica), cuyo mecanismo de acción para producir relajación muscular podría ser por bloquear ambos tipos de canales de Ca²⁺, tanto los operados por voltaje como los operados por receptor.

Los experimentos de tipo farmacológico como los presentes nos ayudan a contribuir en el conocimiento de la fisiología uterina así como al entendimiento del mecanismo de acción de las hormonas

esteroides, sin embargo, es necesario realizar otro tipo de experimentos para corroborar la hipótesis sugerida en este estudio, recurriendo a técnicas bioquímicas para cuantificar el calcio intracelular y técnicas electrofisiológicas para medir las corrientes de calcio en canales únicos.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) Los esteroides están involucrados en la regulación de la contractilidad del músculo liso uterino.
- 2) Los esteroides delta 4 y 5-reducidos antagonizan la respuesta contractil de ; oxitocina, acetilcolina y serotonina en el útero de la rata.
- 3) La respuesta contractil de oxitocina, acetilcolina y serotonina en el útero de rata es producida por un aumento de la entrada de Ca^{2+} a la célula, por lo tanto se postula que el efecto inhibitorio de los esteroides a estas contracciones sea debido a un bloqueo del influjo de Ca^{2+} .
- 4) Los esteroides ejercen una acción membranal disminuyendo el influjo de Ca^{2+} probablemente a través de inactivar tanto los canales de Ca^{2+} operados por voltaje como los operados por receptor.
- 5) Existe una correlación obvia entre la estructura química de los esteroides y su actividad biológica. Los metabolitos 5 β -reducidos son más potentes en relación a los 5 α , sin embargo, ambos son más potentes que su precursor progesterona para producir el efecto antagónico de las contracciones inducidas por; oxitocina, acetilcolina y serotonina.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1) Adham, N. y Schenk, E. A. Autonomic innervation of the rat vagina, cervix, and uterus and its cyclic variation. *Am. J. Obst. Gynec.* 104 : 508-516 (1969).
- 2) Alexandrova, M. y Soloff, M.S. Oxytocin receptors and parturition. I. Control of oxytocin receptor concentration in the rat myometrium at term. *Endocrinology.* 106 : 730-735 (1980a).
- 3) Alexandrova, M. y Soloff, M.S. Oxytocin receptors and parturition. II. Concentration of receptors for oxytocin and estrogen in the gravid and nongravid uterus at term. *Endocrinology* 106 : 736-738 (1980b).
- 4) Alexandrova, M. y Soloff, M.S. Oxytocin receptors and parturition. III. Increases in estrogen receptor and oxytocin receptor. Concentration in the rat myometrium during prostaglandin F_{2α}-Induced abortion. *Endocrinology* 106 : 739-743 (1980c).
- 5) Anselmi, E., D'Ocon, P. y Villar, A. A comparison of uterine contraction induced by PGE₁ and oxytocin in Ca-free solution. *Prostaglandins* 34 : 351-359 (1987).
- 6) Athias, M. Effets de la castration sur les mouvements automatiques de l'uterus chez la cobaye. *J. Physiol. Path. Gen.* 18 : 731-737 (1919).
- 7) Batra, S. y Bengtsoon, B. Effects of diethylstilboestrol and ovarian steroids on the contractile responses and calcium movements in rat uterine smooth muscle. *J. Physiol.* 276 : 329-342 (1978).
- 8) Berridge, M.J. e Irvine, R.J. Inositol triphosphates and calcium mobilization in inositol and phosphoinositides, ed Bleasdale J.E., Eichberg and Hauser G. pp. 351-366 (1985).
- 9) Black, J.W., Duncan, W.A.M., Durant, C.J., Ganellin, C.R. y Parsons, E.M. Definition and antagonism of histamine H₂-receptor. *Nature*; 236: 385-390 (1972).
- 10) Blair, E.W. Contraction rate of uterine musculature of the rat with reference to the oestrus cycle. *Anat. Rec.* 23 : 9-10 (1922).
- 11) Bloch, K. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150 : 19-28 (1965).
- 12) Bolton, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59 : 606-718 (1979).

- 13) Bolton, T.B. y Kitamura, K. Evidence that ionic channels associated with the muscarinic receptor of smooth muscle may admit calcium. *Br. J. Pharmac.* 78 : 405-416 (1983).
- 14) Bolton, T.B. y Large, W. A. Are junction potentials essential?. Dual mechanism of smooth muscle cell. Activation by transmitter released from autonomic nerves. *Quart. J. Exp. Physiol.* 71 : 1-28 (1986).
- 15) Brown-Grant, K. Failure of ovulation after administration of steroid hormones and hormones antagonist to female rats during the neonatal period. *J. Endocrinol.* 82 : 683-684 (1974).
- 16) Bülbring, E. y Tomita T. Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacological Reviews.* 39 : 49-96 (1987).
- 17) Campos-Lara, G., Caracheo, F., Valencia-Sánchez, A. y Ponce-Monter, H. The sensitivity of rat uterus to serotonin in vitro is a late estrogenic response. *Arch. Invest. Med. (Méx.)*, 21 : 71-75 (1990).
- 18) Carsten, M.E. Prostaglandins and oxytocin : Their effect on uterine smooth muscle. *Prostaglandins.* 5 : 33-40 (1974).
- 19) Carsten, M.E. y Miller, J.D. A new look at uterin muscle contraction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 157 : 1303-1315 (1987).
- 20) Chan, L. y O'Malley, B.W. Mechanism of action of the sex steroid hormones (1st of three parts). *N. Engl. J. Med.* 294 : 1322-1328 (1976).
- 21) Crankshaw, D.J. The sensitivity of the longitudinal and circular muscle layers the rat's myometrium to oxytocin in vitro during pregnancy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65 : 773-777 (1986).
- 22) Csapo, I. A. y Corner G. W. The antagonistic effects of estrogen and progesterone on the staircase phenomenon in uterine muscle. *Endocrinology* . 51 : 378-385 (1952).
- 23) Csapo, A.I. y Takeda, H. Effect of progesterone on the electric activity and intra-uterine pressure of pregnant and parturient rabbits. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 91 : 221-231 (1965).
- 24) Devore, G. *Química Orgánica, 3a. reimpresión. Publicaciones Cultural S.A. Méx. D. F.* (1975).
- 25) Douglas, W.W. Histamina y 5-Hidroxitriptamina (Serotonina) y sus antagonistas. En : *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* Gilman, G.A., Godman, L.S., y Gilman, A. Editorial Panamericana. pp. 626-633 (1980).

- 26) Ebashi, S. y Endo, M. Calcium ion and muscle contraction. *Proc. Biophys. Molec. Biol.* 18 : 125-183 (1968).
- 27) Ellis, H.V., Johnson, A.R. y Moran, N.C. Selective release of histamine from rat mast cells by several drugs. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 175: 627-631 (1970).
- 28) Engstrom, T., Atke, A. y Vilhardt, H. Receptor-binding characteristics and contractile responsiveness of the myometrium followin prolonged infusion of bradikinin and oxytocin in rats. *J. Endocr.* 188 :81-85 (1988).
- 29) Fuchs, A.-R. The role of oxytocin in parturition. En : the endocrinology of pregnancy and parturition. L. Martini and V.H.T. James eds. Academic Press New York. pp. 231-260 (1983).
- 30) Fuchs, A.-R., Periyasamy, S., Alexandrova, M. y Soloff, M.S. Correlation between oxytocin receptors concentration and responsiveness to oxytocin in pregnant rat myometrium: Effects of ovarian steroids. *Endocrinol.* 113: 742-749 (1983).
- 31) Fuchs, F. *Endocrinology of pregnancy*. Thirt edition. Eds. Haroer and Row, Publishers. Philadelphia, (1983).
- 32) Ganong, W.F. *Fisiología Médica*. Editorial : El Manual Moderno, S.A. 11a. edición. pp. 75-78, 204-205 y 219-222 (1988).
- 33) Gazis, D., González, G., y Mendlowitz, M. Adrenergic interactions in uterus and vascular smooth muscle in rats in vivo. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67 :1586-1590 (1989).
- 34) Giembycz, M.A. y Rodger, I.W. Electrophysiological and other aspects of excitation-contraction coupling and uncoupling in mammalian airway smooth muscle. *Life Science* 41 : 111-132 (1987).
- 35) Grove, A.K., Kwan, C.Y. y Daniel, E.E. Na-Ca exchange in rat myometrium membrane vesicles highly enriched in plasma membranes. *Amm. J. Physiol.* 240 : (Cell Physiol. 9), C175-C182 (1981).
- 36) Gyermek, L., Genther, G. y Fleming, N. Some effects of progesterone and related steroids on the central nervous system. *Int. J. Neuropharmacol.* 6: 191-198 (1967).
- 37) Hoyle, G. Smooth muscle and other vegetative muscles. En : *Muscles and their neural control*. Ed. John Wiley and sons. 1st edition. pp. 325-331 (1983).
- 38) Hudgiens, P.H. y Weiss, G. Differential effects of calcium removal upon vascular smooth muscle contraction induced by norepinephrine, histamine and potassium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 159 : 91-96 (1968).

- 39) Hurwitz, L. Pharmacology of calcium channels and smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26 : 225-258 (1986).
- 40) Hurwitz, L. and Joiner, P.D. Mobilization of cellular calcium for contraction in intestinal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 218 : 12-18. (1971).
- 41) Hurwitz, L. y Suria, A. The link between agonist action and response in smooth muscle. *Ann. Rev. Pharmacol.* 11 : 303-326 (1971).
- 42) Ichida, S., Oda, Y., Tokunaga, H., Hayashi T., Murakami T. y Kita, T. Mechanisms of specific change by estradiol in sensitivity of rat uterus to serotonin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229 : 244-249 (1983).
- 43) Ichida, S., Hayashi, T., Kita, T. y Murakami, T. Estradiol-induced increase of specific [³H] Ketanserin binding sites on rat uterin membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 108 : 257-264 (1985).
- 44) Johnson, A.R. y Moran, N.C. Selective release of histamine from rat mast cells by compound 48 / 80 and antigen. *Am. J. Physiol.* 216: 453-459 (1969).
- 45) Johnson, P.N. y Marshall, J.M. Desensitization in the rat myometrium. *Am. J. Physiol.* 223 : 249-255. (1972).
- 46) Karavolas, H.J. y Hodges, D.R. Neuroendocrine metabolism of progesterone and related progestins. En : *Steroids and neuronal activity*. Ed. John Wiley and Sons (Ciba Foundation Symposium 153) pp. 22-55 (1990).
- 47) Katzung, B.G. *Farmacología Básica y Clínica*. Editorial: El Manual Moderno, S.A. 2a. Ed. pp. 68-80 y 452-453 (1986).
- 48) Kostyuk, P.G. Diversity of calcium ion channels in cellular membranes. *Neuroscience.* 28 : 253-261 (1989).
- 49) Kubli-Garfias, C., Cervantes, M. y Beyer, C. Changes in multiunit activity and EEG induced by the administration of natural progestins to flaxedil immobilized cats. *Brain Res.* 114 : 71-81 (1976).
- 50) Kubli-Garfias, C. y Whalen, R. E. Induction of lordosis behavior in female rats by intravenous administration of progestins. *Horm. Behav.* 9 : 380-386 (1977).
- 51) Kubli-Garfias, C., Medrano-Conde, L., Beyer, C. y Bondani, A. *In vitro* inhibition of rat uterine contractility induced by 5a and 5β progestins. *Steroids* 34 : 609-617 (1979).

- 52) Kubli-Garfias, C., López-Fiesco, A., Pacheco-Cano, M.T., Ponce-Monter H. y Bondai, A. *In vitro* effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility. *Steroids*. **35** : 633-641 (1980).
- 53) Kubli-Garfias, C., Canchola, E., Arauz-Contreras, J. y Feria-Velasco, A. Depressant effect of androgens on the cat brain electrical activity and its antagonism by ruthenium red. *Neuroscience* **7** : 2777-2782 (1982a).
- 54) Kubli-Garfias, C., Ponce-Monter, H., Medrano-Conde, L., López-Fiesco, A. y Bondani, A. 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 (1982b).
- 55) Kubli-Garfias, C., Hoyo-Vadillo, C. y Ponce-Monter, H. Relaxant effect of testosterone and 5 α -reduced androgens on the smooth muscle of the male rat reproductive system. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26** : 31-34 (1983a).
- 56) Kubli-Garfias, C., Hoyo-Vadillo, C., López-Nieto, E. y Ponce-Monter, H. Inhibition of spontaneous contractions of the rat pregnant uterus by progesterone metabolites. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26** : 115-118 (1983b).
- 57) Kubli-Garfias, K., Azpeitia, E., Villanueva-Tello, T. y Ponce-Monter, H. Inhibition of noradrenaline release by 5 β -progestins in cerebral cortex slices. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26**: 135-138 (1983c).
- 58) Kubli-Garfias, C. Physiological role of 5 α and 5 β progesterone metabolites on the SNC. *Trends in Pharmacol. Sci.* **5** : 439-442 (1984a).
- 59) Kubli-Garfias, C., Perusquía, M., Hoyo-Vadillo, C. y Ponce-Monter, H. Calcium antagonist as mechanism of action of natural androgens and progestins on uterine smooth muscle. *Satellite symposium of 7th International Congress of Endocrinology. Abstracts P22, Montreal Canada (1984b)*.
- 60) Kubli-Garfias, C., Perusquía, M. y Ponce-Monter, H. Antagonism of androgens to the calcium induced contractions of pregnant rat myometrium. *7th International Congress of Endocrinology. Abstracts 1265. Québec, Canada (1984c)*.
- 61) Kubli-Garfias, C., Ortega-Suárez, P., Hoyo-Vadillo, C. y Ponce-Monter, H. Evidence that 5 β -progestines produced uterine relaxation by diminishing cellular calcium permeability. *Drug. Dev. Res.* **6** : 103-107 (1985a).

- 62) Kubli-Garfias, C., Rocha-Arieta, L., Melgarejo-Salgado, A., Hoyo-Vadillo, C., Perusquia, M. y Valadez-Rodríguez, J. Cambios electroencefalográficos y de la conducta producidos por derivados 5B de la progesterona y su antagonismo por la 4-aminopiridina. Arch. Invest. Méd. (Méx.). 16 : (Supl 3) 133-141 (1985b).
- 63) Kubli-Garfias, C. Modulatory action of 5-reduced androgens and progestins on the excitability of CNS and smooth muscle. J. steroid Biochem. 27 : 631-634 (1987a).
- 64) 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. Relaxant action of androgens, progestins and corticosteroids on the isolated ileum of the guinea-pig. Acta Physiol. et Pharmacol. Latinoam. 37 (3) : 357-364 (1987b).
- 65) Lara-Lemus, A., Perusquia, M., Amecua, J.L. y Kubli-Garfias, C. Efecto relajante de la pregnanolona sobre la arteria coronaria de perro contraída con ergonovina y cloruro de potasio. XXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Guanajuato, Gto. del 17 al 20 de agosto. Pag. 71 (1986).
- 66) Lehninger, Albert. L. Bioquímica. Editorial : Omega, S.A. 2a.edición. pp.304-305, 695-699 y 1006-1007 (1982).
- 67) Levier, R.R. y Spaziani, E. The effect of estradiol on the occurrence of mast cells in the rat uterus. Exp. Cell. Res. 41 : 244-252 (1966).
- 68) Litchfield, J. T. y Wilcoxon, F.A. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. exp. ther. 96 : 99-108 (1949).
- 69) Matsuo, K. y Masaatsu-Koujirou, U. Opposite effects of By K 8644 and nicardipine on the inhibitory effect of Ca²⁺ on rat myometrium. European. J. Pharmacol. 140 : 295-301 (1987).
- 70) Mayer, S.E. Transmisión neurohumoral y sistema nervioso autónomo. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Gilman, A.G., Goodman, L.S. y Gilman, A. Editorial Panamericana. pp. 72-104 (1980)
- 71) McEwen, B. S. Gonadal steroids : Humoral modulators of nerve-cell function. Molec. and Cell. Endocrinol. 18 : 151-164 (1980).
- 72) McEwen, B. S. y Parsons, B. Gonadal steroid action on the brain : neurochemistry and neuropharmacology. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 22 : 555-598 (1982).
- 73) McEwen, B.S., Coirini, H. y Schumacher, M. Steroid effects on neuronal activity : When is the genome involved ?. En : Steroids and neuronal activity. Ed. John Wiley and Sons (Ciba

- Foundation Symposium 153) pp. 3-21 (1990).
- 74) McKercher, T.C. Estrogen-Induced biogenesis amine reduction in rat uterus. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 185 : 514-522 (1973).
 - 75) Meyer, H. F. y Jawetz, E. Manual de Farmacología Clínica, editorial, El Manual Moderno, S.A. 5a. Ed. pp. 425-426 (1982).
 - 76) Michel, R.H. y Kirk, C.J. Why is phosphatidylinositol degraded in response to stimulation of certain receptors, trend in Pharmacological Sci. 2: 86-89 (1981).
 - 77) Moawad, A.H. The sympathetic nervous system and the uterus. En: Uterine contraction. Jasimovich, J.B. Ed. Jhon Wiley & Sons. New York. pp. 65-82 (1973).
 - 78) Moncada, S., Flower, R.J. y Vane J. R. Prostaglandinas. En : Las bases farmacológicas de la terapéutica. (Eds. Gilman, A.G., Goodman, L.S. y Gilman, A.). Ed. Panamericana (1980).
 - 79) Nissenson, R. Opposing effects of estradiol and progesterone on oxytocin receptors in rabbit uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 2044-2048 (1978).
 - 80) Nuti, K.M. y Karavolas, H.J. Effect of progesterone and its 5 α -reduced metabolites on gonadotropin levels in estrogen-primed ovariectomized rats. *Endocrinol.* 100: 777-781 (1977).
 - 81) O'Doherty, J., Youmans, S.J., McArmstrong, W. y Stark, R.J. Calcium regulation during stimulus-secretion coupling; continuous measurements intracellular calcium activities. *Science* 209 510-513 (1980).
 - 82) O'Malley, B.W., y Schrader, W.T. The receptor of steroid hormones. *Sci. Am.* 234 : 32-43 (1976).
 - 83) O'Malley, B. The steroid receptor superfamily: More excitement predicted for the future. *Mol. Endocrinol.* 4 : 363-369 (1990).
 - 84) P'An, S.Y. y Laubach, G.D. Steroid central depressants. In Dorfman, R.E. ed.: *Methods in Hormone Research III*. Academic Press, New York. (1964).
 - 85) Paton, W.D.M. y Zar, M.A. The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal muscle strips. *J. Physiol.* 194 : 13-33 (1968).
 - 86) Perusquía, M., Ponce-Monter, H. y Kubli-Garfias, C. Inhibition by progestins of the calcium activated myometrial contractions. 7th International Congress of Endocrinology. Abstracts 1815, Québec, Canada (1984).
 - 87) Perusquía, M., Hoyo-Vadillo, C. y Kubli-Garfias, C. Biphasic effect of corticosteroids on the contraction of isolated rat

- uterus. Arch. Invest. Med. (Méx.). 17 : 203-209 (1986).
- 88) Perusquía, M., Corona, J.L., y Kubli-Garfias, C. 5 β -progestins antagonized the tonic and phasic contractions induced by oxytocin in the rat myometrium. J. Steroid. Biochem. 36 : (suppl) 131S (1990a).
- 89) Perusquía, M., García-Yañez, E., Ibañez, R. y Kubli-Garfias, C. Non-Genomic Mechanism of action of delta-4 y 5-reduced androgens and progestins on the contractility of the isolated rat myometrium. Life Sciences 47(17); 1547-1553 (1990b).
- 90) Pine, H.S., Hendrickson, J.B., Cram, D.J. y Hammond, G.S. Química Orgánica. 4a. Ed., 2a. en Español, Mc Graw-Hill (1982).
- 91) Popescu, L.M., Nutu, O. y Panoiu, C. Oxytocin contracts the human uterus at term by inhibiting the myometrial Ca²⁺-extrusion pump. Bioscience Reports. 5 : 21-28 (1985).
- 92) Purves, R.D. Muscarinic excitation : a microelectrophoretic study on cultured smooth muscle cells. Br. J. Pharmacol. 52 : 77-86 (1974).
- 93) Receptor Nomenclature Supplement. Trends in Pharmacol. Sci. January 1990.
- 94) Reuter, H. Exchange of calcium ions in the mammalian myocardium. Circulation Research. 34 : (5) 599-605 (1974).
- 95) Reynolds, S.R.M. Studies on the uterus. A method for recording uterine activity in chronic experiments on unanesthetized animals. Am. J. Physiol. 92 : 420-429 (1930).
- 96) Reynolds, S.R.M. y Allen, W. M. The effect of progestin-containing extracts of corpora lutea on uterine motility in the unanesthetized rabbit with observations on pseudopregnancy. 102 : 39-55 (1932).
- 97) Robson, J.M. Reactions of the uterine muscle and endometrium of the rabbit to testosterone. Quart. J. Exp. Physiol. 26 : 355-359 (1937).
- 98) Robson, J.M. Factors affecting the response of the uterus to serotonin. J. Endocrinol. 10: 129-132 (1954).
- 99) Rojas-Mejía, Y., Moreno, J.A., García-Marquez, F., Perusquía, M., Medina-Jimenez, M., García-Yañez, E. y Kubli-Garfias, C. Efectos producidos por la androsterona sobre la contractilidad de las aurículas aisladas de la rata. XXIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas., Guanajuato, Gto., del 17 al 20 de agosto de 1986 pag. 243.
- 100) Selye, H. Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. Endocrinology. 30 : 437-453 (1942).

- 101) Somlyo, A.V. y Somlyo, A.P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 159: 129-145 (1968).
- 102) Somlyo, A.V. y Franzini-Armstrong, C. News views of smooth muscle structure using freezing deep-etching and rotary shadowing. *Experientia* 41 : 841-856 (1985).
- 103) Triggle, D.T. Smooth muscle physiology and pharmacology. *Allergy* 2 : 494-508 (1988).
- 104) Villar, A., D'Ocon, M.P. y Anselmi, E. Calcium requirements of uterine contraction induced by prostaglandin E-1 importance of intracellular calcium stores. *Prostaglandins* 30 : (3) 491-496 (1985).
- 105) Whalen, R.E. y Gorzalka, B.B. The effects of progesterone and its metabolites on the induction of sexual receptivity in rats. *Horm. Behav.* 3 : 221-226 (1972).
- 106) Wilsman, N.J., Farnum, C.E. y Reed-Aksanit, D.K. Caveolar system of the articular chondrocyte. *J. Ultrastruct. Res. USA* 74/ 1 : 1-10 (1981).
- 107) Zanisi, M. y Martini L. Effects of progesterone metabolites on gonadotrophin secretion. *J. Steroids. Biochem.* 6 : 1021-1023 (1975).