

82  
2E3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**"IMPORTANCIA DE LOS GRUPOS FUNCIONALES CARBONILO E HIDROXILO EN LA RELAJACIÓN UTERINA INDUCIDA POR 5 $\alpha$ -ANDROSTANOS EN LA RATA"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

P R E S E N T A :

**ERIKA NAVARRETE MONROY**

ASESORA: DRA. MA. MERCEDES PERUSQUIA NAVA



CIUDAD UNIVERSITARIA,

1999

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

**FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Importancia de los grupos funcionales carbonilo e hidroxilo en la relajación uterina inducida por 5 $\alpha$ -androstano en la rata"

realizado por Erika Navarrete Monroy

con número de cuenta 9012343-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra.Ma. Mercedes Perusquía Nava

Propietario Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Propietario M. en IBB Saúl Cano Colín

Suplente Biol. Horacio Villafán Monroy

Suplente Biol. David Garcíadiego Cázares

Consejo Departamental de Biología

*Edna M. Suárez D.*  
Dra. Edna María Suárez Díaz

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. Mercedes Perusquía Nava, le agradezco infinitamente su valiosa asesoría durante el desarrollo de esta tesis, además de todas sus críticas que considero invaluable para mi vida profesional.*

*Al Dr. Carlos Kubli Garfias, por sus fuertes críticas y enseñanzas.*

*A mis compañeros de laboratorio, David Barrera Hernández, Maricruz Anaya Reyes y Norma Angélica Galicia Canales, por todo lo que aprendimos juntos.*

*A Irma Rodríguez, por la amistad y la asesoría técnica que me brindó durante mi estancia en el laboratorio.*

*Al Biólogo Ricardo Vázquez Ramírez por su apoyo en el diseño gráfico de las estructuras moleculares y a la M. en C. Natalia Ivanovna Copitin, por compartir sus experiencias.*

*Al Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL), por la beca que me otorgó durante el desarrollo de esta tesis.*

*Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México, por todas las facilidades brindadas.*

## **DEDICATORIAS**

*A mis padres, Antonio Navarrete Caballero y Martina Monroy García, por darme la vida, por ser un admirable ejemplo y porque gracias a todos sus esfuerzos me han dado la mejor de las herencias, una profesión.*

*A mis hermanos, Leticia, Silvia, Maribel, Sonia y Rafael, por el apoyo y entusiasmo que siempre me han demostrado, y por ser parte esencial de mi vida.*

*A mis cuñados, Martín y Horacio, por el placer de que sean parte de la familia.*

*A mis queridos sobrinos, Yukie, Quetzali, Danae e Ivan, a quienes deseo lo mejor en la vida.*

*A Hugo Rodríguez García, por todo el amor, cariño y comprensión*

## LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

El presente trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), proyecto No. IN211597 y se desarrolló en el Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, perteneciente al Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Mercedes Perusquía Nava.

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>Pág.</b>
a) Importancia biológica de la contractilidad uterina	1
b) Fisiología de la actividad contráctil uterina	
i) Mecanismo de la contracción	1
ii) Factores que regulan la contractilidad uterina	2
c) Hormonas esteroides y relajación uterina	6
d) Estudios de la relación Estructura química - Actividad biológica del efecto relajante de los andrógenos en el útero de rata	11
e) Biosíntesis de Hormonas esteroides	13
f) Metabolismo de andrógenos	16
g) Mecanismo de la acción relajante inducida por los esteroides en el útero	19
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>22</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	
a) Objetivo general	24
b) Objetivos particulares	24

## **V. METODOLOGÍA**

1. Modelo biológico	26
2. Sistema de registro	27
3. Protocolo experimental	
a) Curva concentración-respuesta del androstandiol	30
b) Comparación de la potencia relajante del androstandiol con la androsterona y otras moléculas 5 $\alpha$ -reducidas	30
c) Análisis de los datos	31
4. Esteroides de prueba	32

## **VI. RESULTADOS**

a) Curva concentración-respuesta del androstandiol	34
b) Comparación de la potencia relajante del androstandiol con la androsterona y otras moléculas 5 $\alpha$ -reducidas	38

## **VII. DISCUSIÓN** 43

## **VIII. CONCLUSIONES** 47

## **IX. REFERENCIAS** 48

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **a) Importancia biológica de la contractilidad uterina**

El útero es el órgano donde se implantan y desarrollan, los productos de diversas especies de organismos durante su vida prenatal. La contractilidad uterina es una de las funciones fisiológicas más importantes de este órgano, la cual es de gran importancia en la Fisiología de la Reproducción, ya que se presenta en etapas en donde no existe embarazo, durante el embarazo mismo y en el momento del parto de todos los mamíferos, manifestando diferentes patrones de motilidad en cada caso. Sin embargo, a pesar de su importancia biológica, los factores que regulan este fenómeno, no han sido establecidos por completo.

### **b) Fisiología de la actividad contráctil uterina.**

#### **i) Mecanismo de la contracción**

Las células del músculo liso dependen en gran medida del calcio extracelular para contraerse. Este aumento de calcio puede ser causado por estimulación nerviosa de las fibras musculares, estimulación hormonal, o por cambios en el ambiente químico de la fibra.

A falta de la troponina, presente en el músculo esquelético, las células del músculo liso contienen una proteína reguladora llamada calmodulina.

La contracción muscular se lleva a cabo en los siguientes eventos:

1) El complejo calcio-calmodulina, se une y activa a la miosina cinasa que es una enzima fosforiladora.

2) Una de las cadenas ligeras de cada cabeza de miosina, denominada cadena reguladora, es fosforilada por acción de la miosina cinasa. Si esta cadena no está fosforilada no se produce el ciclo de enlace-separación de la cabeza con el filamento de actina. Cuando la cadena reguladora está fosforilada, la cabeza tiene la capacidad de unirse al filamento de actina, causando así la contracción muscular.

3) Cuando la concentración de calcio iónico disminuye a un nivel crítico, el proceso mencionado se revierte automáticamente, a excepción de la fosforilación de la cabeza de la miosina, para deshacerla se requiere de la intervención de otra enzima, la miosina fosfatasa, que se localiza en el citoplasma de la célula muscular lisa y que separa el fosfato de la cadena ligera reguladora (Guyton y Hall, 1997).

## **ii) Factores que regulan la contractilidad uterina**

La actividad contráctil uterina está bajo un control hormonal y neuronal, por numerosos agentes como neurotransmisores, hormonas y sustancias parácrinas (Perusquía, 1999).

El útero presenta inervación parasimpática y simpática; la primera por el nervio pélvico y la segunda por fibras posganglionares de los ganglios mesentérico inferior e hipogástrico (Ottesen y Fahrenkrug, 1990), (Fig. 1).

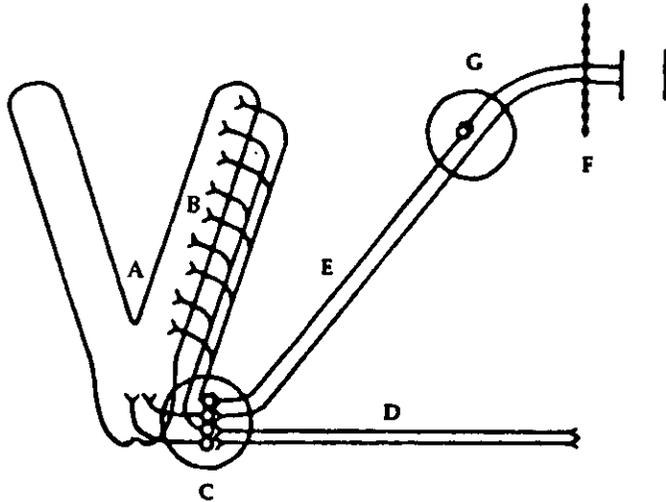


Figura 1. Inervación del útero de la rata. A. Cuernos uterinos, B. Neuronas, C. Ganglio paracervical, D. Nervio pélvico, E. Nervio hipogástrico, F. Cadena simpática lumbar y G. Ganglio mesentérico inferior. Tomado de Ottesen y Fahrenkrug, 1990.

Los nervios uterinos proceden del plexo hipogástrico inferior, de la parte anterior e intermedia conocida como plexo úterovaginal, que se sitúa dentro del ligamento ancho a cada lado del cuello. Las fibras parasimpáticas emergen de los nervios esplácnicos de la pelvis (S2, S3 y S4) y las simpáticas del plexo úterovaginal, en el que se encuentran pequeños ganglios paracervicales; uno de ellos suele ser más voluminoso y se conoce como ganglio del cuello uterino. Las fibras autonómicas del plexo úterovaginal son principalmente vasomotoras. La

mayoría de las fibras aferentes ascienden con el plexo hipogástrico inferior y penetran en la medula espinal a través de los nervios espinales T10 a T12 y L1 (Moore, 1993).

La estimulación eléctrica de los nervios hipogástricos causa contracción o relajación, dependiendo de la especie y del estado endócrino del animal (Marshall, 1970). El útero está innervado por nervios adrenérgicos y colinérgicos. Se ha descrito que en el útero de rata la innervación adrenérgica es muy pobre (Norberg y Fredericsson, 1966).

El efecto relajante uterino producido por las catecolaminas es debido a  $\beta_2$ -adrenoceptores, mientras que el efecto contráctil está mediado por  $\alpha_1$ -adrenoceptores (Diamond, 1990). Por otra parte, los agentes colinérgicos estimulan los receptores muscarínicos para inducir contracción uterina (Bolton y Kitamura, 1983). La población de los receptores en el útero, puede ser alterada por cambios en la concentración de estrógenos, es decir son estrógeno-dependientes (Diamond, 1990).

Algunos neurotransmisores que actúan sobre el útero son: la serotonina, la dopamina, la histamina y la angiotensina (Hoyle, 1983). El útero es muy sensible a contraerse por la acción de la serotonina (5-HT), por interacción con sus receptores específicos 5-HT<sub>2</sub>, presentes en la membrana uterina. De igual modo, la histamina induce contracción por interacción con los receptores H<sub>1</sub> en varios tejidos de mamíferos, no obstante en la rata y el ratón, la relajación es a través de los receptores H<sub>2</sub> (Perusquía, 1999).

El músculo liso uterino, es altamente susceptible a la influencia endocrina de las hormonas esteroides sexuales (estrógenos, progestinas y andrógenos), secretadas por los ovarios, y durante el embarazo por la placenta. Estas participan de manera esencial durante la gestación, manteniendo al útero relajado (Perusquía, 1999).

Entre los principales agentes uterotónicos que participan en la activación de las contracciones uterinas durante el trabajo de parto, se encuentran hormonas como la oxitocina y las prostaglandinas E<sub>2</sub> y F<sub>2α</sub> (Parkington y Coleman, 1996). En mujeres no embarazadas y durante el primer trimestre de embarazo la vasopresina actúa incluso de manera más potente que la oxitocina; su acción parece estar relacionada con la alta motilidad del útero durante la menstruación (Soloff, 1990).

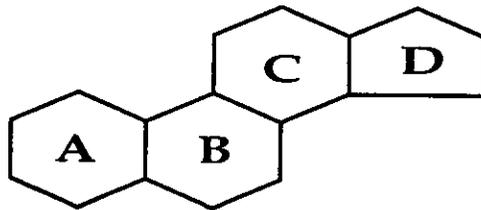
También algunos péptidos participan de manera importante en la actividad miometrial. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) inhibe la actividad uterina, otros péptidos que también la inhiben son: el neuropéptido (Y) y el péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP). En mujeres no embarazadas y en embarazos tempranos, la sustancia P induce contracción uterina (Ottesen y Fahrenkrug, 1990).

Asimismo, existen agentes exógenos con la capacidad de alterar el movimiento de la entrada de calcio a través de la membrana, estos son: i) los que bloquean la entrada de calcio a la célula e inducen relajación, denominados bloqueadores de la entrada de calcio (dihidropiridinas, derivados de verapamil, benzodiazepina y difenilaquilaminas) y ii) los que inversamente son capaces de

inducir contracción uterina por aumentar la entrada de calcio a la célula, llamados agonistas de la entrada de calcio, como Bay K 8644 (Perusquía, 1999).

### c) Hormonas esteroides y relajación uterina

Los esteroides son lípidos que poseen una estructura molecular basada en un sistema de cuatro anillos denominados; A, B, C y D que recibe el nombre de núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 2).



**Ciclopentanoperhidrofenantreno**

Figura 2. Estructura molecular básica de los esteroides.

Son compuestos orgánicos de amplia distribución en la naturaleza, que desempeñan un papel muy importante en el desarrollo de la vida. Muchos compuestos sintéticos y metabolitos esenciales pertenecientes a este grupo se

utilizan con fines terapéuticos. Por ejemplo, la morfina, la colchicina, los ácidos grasos biliares, muchos hidrocarburos carcinogénicos, el veneno de las glándulas parótidas de algunas especies de sapos, el colesterol, la vitamina D, los corticoesteroides y las hormonas sexuales que además, participan en un proceso de gran importancia como es la reproducción (Seyle, 1942), (Ver Fig. 3).

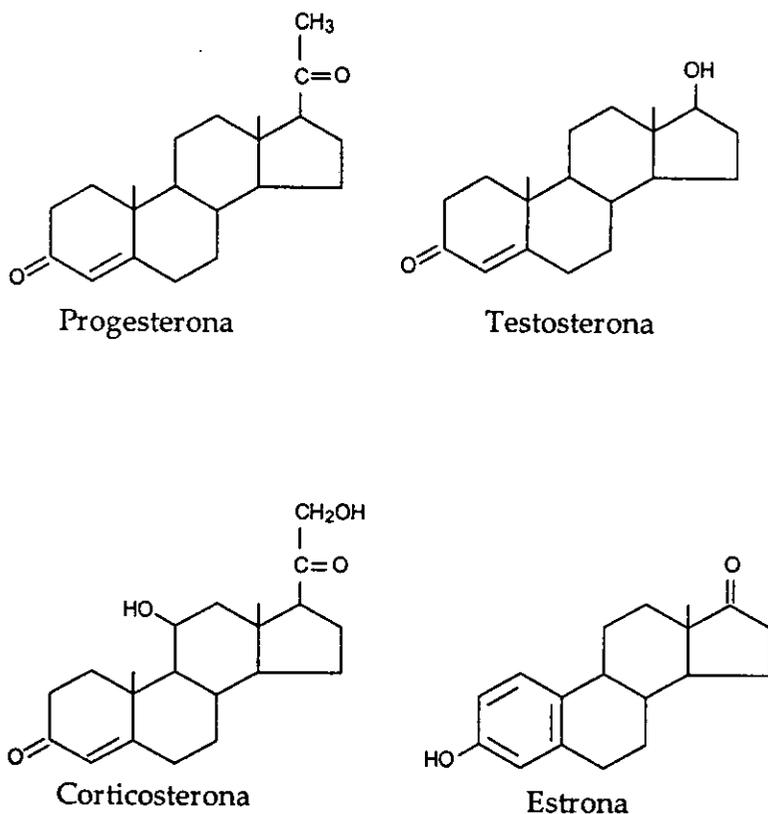


Figura 3. Estructura química de hormonas pertenecientes al grupo de los esteroides.

La influencia de los esteroides sobre la actividad contráctil uterina ha sido ampliamente aceptada; Knaus (1926) sugirió por primera vez que una hormona era la responsable de inducir un efecto relajante sobre la contractilidad uterina en conejas preñadas. Posteriormente se reportó que un extracto de cuerpo lúteo es capaz de inducir cambios progesteracionales y mantener el embarazo en conejas castradas (Allen y Corner, 1929); más tarde se observó la inhibición contráctil en útero de coneja *in vivo* (Reynolds, 1931). Después de numerosas evidencias se estableció que la progesterona es necesaria para el mantenimiento del embarazo (Csapo, 1959), siendo capaz de inhibir la actividad contráctil espontánea e inducida eléctricamente en útero *in vivo* e *in vitro* de rata preñada (Marshall y Csapo, 1961). También se reportó que la administración de progesterona en ratas ovariectomizadas puede mantener y llevar a término el embarazo (Csapo y Weist, 1969) y se demostró el efecto inhibitor *in vitro*, de la progesterona sobre el útero humano (Kumar et al., 1962).

En años posteriores se reportó que otros esteroides también inducen un efecto relajante sobre la contractilidad uterina. Las progestinas (hormonas con 21 átomos de carbono y una cadena lateral en el C<sub>17</sub>), inducen relajación sobre la actividad contráctil de la rata preñada (Kubli-Garfias et al., 1983a) y también de la no preñada (Kubli-Garfias et al., 1979), actuando de manera más potente, las progestinas 5 $\beta$ -reducidas en comparación a las 5 $\alpha$ -reducidas, que mostraron poca potencia. La actividad contráctil del útero humano grávido a término también es relajada por progestinas 5 $\alpha$ -reducidas, pero de manera no significativa (Löfgren et

al., 1992), en contraste con las progestinas  $5\beta$ -reducidas que fueron más potentes que las progestinas  $5\alpha$ -reducidas y que su precursor, la progesterona (Perusquía et al., 1997).

Los andrógenos (esteroides con 19 átomos de carbono, sin cadena lateral en el  $C_{17}$  y con dos grupos metilo en el  $C_{18}$  y en el  $C_{19}$ ), también producen relajación uterina. En 1937, Robson demostró que la testosterona induce un efecto inhibitor sobre el útero aislado de coneja. Posteriormente se demostró que además de la testosterona, otros andrógenos también relajan la contracción espontánea del útero de rata, siendo más potentes que su precursor (la testosterona), los metabolitos con configuración  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ , como la androsterona ( $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ -androstan-17-ona) y el androstandiol ( $5\alpha$ -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol), y por otra parte, también la  $5\beta$ -dihidrotestosterona ( $5\beta$ -DHT,  $17\beta$ -hidroxi- $5\beta$ -androstan-3-ona), mostró un potente efecto relajante, por lo que se propuso que en esta acción, la testosterona actúa como prehormona (Kubli-Garfias et al., 1980).

El efecto relajante de los andrógenos sobre el útero, no sólo se ha observado en contracciones espontáneas, sino también en contracciones inducidas, al despolarizar el tejido con KCl (Perusquía et al., 1990; Perusquía y Villalón, 1996), donde la  $5\beta$ -DHT, fue el andrógeno más potente. En contracciones inducidas por la serotonina (Perusquía et al., 1991a) y la acetilcolina (Perusquía et al., 1991b), también la  $5\beta$ -DHT, fue el andrógeno más potente. Sin embargo, en contracciones inducidas por la oxitocina, la androsterona resultó ser más potente (Perusquía y Campos, 1991).

Los andrógenos 5-reducidos también han mostrado la capacidad de inducir relajación en otros músculos lisos aislados; inhibiendo las contracciones en el epidídimo y la vesícula seminal (Kubli-Garfías et al., 1983b), en la aorta torácica de rata (Perusquía et al., 1996) y en el íleon de cobayo (Kubli-Garfías et al., 1987). Los andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos, que además presentan una configuración 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$  (androsterona y androstandiol), fueron más potentes para inducir relajación en vesícula seminal y epidídimo (Kubli-Garfías et al., 1983a). Sin embargo, la 5 $\beta$ -DHT fue el inhibidor más potente en la aorta torácica de la rata (Perusquía et al., 1996) y en el íleon aislado de cobayo (Kubli-Garfías et al., 1987).

Por su parte, los corticoesteroides (los cuales están constituidos por 21 átomos de carbono, con una cadena lateral en el C<sub>17</sub> y un grupo carbonilo o hidroxilo unido al C<sub>11</sub>), presentan un efecto inhibitor semejante al de la progesterona y la testosterona sobre la contracción espontánea del útero de rata, su baja potencia sugirió que la reducción de la progesterona en posición 5, es un paso metabólico importante en la producción de compuestos que regulan la contracción uterina (Perusquía et al., 1986).

Desde 1931 Reynolds observó que después de un período, posterior a su administración, los estrógenos (hormonas con 18 átomos de carbono, con un núcleo aromático en el anillo A y un grupo hidroxilo o carbonilo en el C<sub>17</sub>), incrementan la actividad uterina de conejas *in vivo*. Posteriormente estudios *in vitro* (Csapo y Corner, 1952) e *in vivo* (Schofield, 1955), demostraron que la actividad contráctil del útero de conejas es regulada por estrógenos. En el miometrio

humano, estudios *in vitro* revelaron que el estradiol provoca relajación uterina, disminuyendo la frecuencia de las contracciones (Kumar et al., 1964). Otros estudios *in vitro* en el útero de rata, mostraron una respuesta relajante de los estrógenos sobre la contractilidad uterina (De la Peña et al., 1991; Jasso-Kamel, 1999).

**d) Estudios de la relación Estructura química - Actividad biológica del efecto relajante de los andrógenos en el útero de rata.**

En 1961, Willmer enfatizó la importancia de los grupos unidos al C<sub>3</sub> y al C<sub>17</sub> en la acción fisiológica de los esteroides. Los efectos de la progesterona y los metabolitos 5-reducidos observados en tejidos excitables como el Sistema Nervioso Central (SNC) y el músculo liso uterino, mostraron una clara relación entre la estructura química y la actividad biológica de estas hormonas (Kubli-Garfias, 1987). Estudios realizados con andrógenos 5-reducidos sobre la contracción uterina (Kubli-Garfias et al., 1980), donde los andrógenos con configuración 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$  fueron más potentes que los andrógenos 5 $\beta$ -reducidos, y que su precursor  $\Delta$ 4-3,ceto (testosterona), establecieron que el anillo A podría ser la parte activa de la molécula para inducir relajación miometrial y que además los cambios de los sustituyentes en el C<sub>3</sub>, el C<sub>5</sub> y el C<sub>17</sub>, así como la conformación *cis* o *trans* en el C<sub>3</sub> y el C<sub>5</sub> podrían ser la clave de la acción relajante que inducen estos derivados.

La diferente potencia que presentan los esteroides en tejido uterino despolarizado, donde el andrógeno más potente es la 5 $\beta$ -DHT y los andrógenos con configuración 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$  son menos potentes, resulta controversial con lo anteriormente mencionado. Estas diferencias, fueron relacionadas con la estereoespecificidad molecular e interacción fisicoquímica de los esteroides con la membrana (Perusquía et al., 1990).

En otro estudio sobre tejido uterino despolarizado (Perusquía y Villalón, 1996), se confirmó que los andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos, son menos potentes que los compuestos 5 $\beta$ -reducidos, pero más potentes que los compuestos  $\Delta$ 4-3,ceto (progesterona y testosterona), postulándose nuevamente que la reducción en el anillo A, es muy importante en la actividad biológica

En el caso de las progestinas, se observó que las 5 $\beta$ -reducidas son más potentes que sus isómeros 5 $\alpha$ -reducidos, los cuales resultaron ineficaces a excepción de la 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ -pregnan-20-ona, que también presenta la configuración 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ , como la androsterona y el androstandiol (Kubli-Garfías et al., 1979). También se observó que las progestinas 5 $\beta$ , que además presentan un grupo ceto unido al C<sub>20</sub>, son más potentes, mientras que los compuestos 5 $\beta$ -reducidos, en los cuales no existe un grupo unido al C<sub>17</sub> son menos potentes, lo que indica que el grupo unido al C<sub>17</sub> es esencial para el efecto biológico. En el caso de los pregnandiolos, en los cuales el grupo ceto unido al C<sub>20</sub> se reduce, se plantea que la polaridad e hidrosolubilidad de estos esteroides podría estar relacionada con su ineficacia (Kubli-Garfías, 1987).

Otros estudios basados en cálculos químico-cuánticos, han tratado de establecer las propiedades de los androstanos para inducir relajación uterina, y han encontrado que los grupos carbonilo e hidroxilo en el C<sub>3</sub> y en el C<sub>17</sub> son los elementos que confieren las distintas propiedades biológicas que presentan estos compuestos, lo cual puede estar en relación con la magnitud del momento dipolar, ya que se ha reportado que éste cambia con la posición de los grupos funcionales (Kubli-Garfias et al., 1995). Así, el grupo carbonilo juega un papel diferente dependiendo de su posición: unido al C<sub>3</sub> tiene un mayor efecto sobre el momento dipolar y unido al C<sub>17</sub> tiene menor impacto (Kubli-Garfias et al., 1996).

También se ha reportado que el grupo hidroxilo tiene mayor estabilidad y por lo tanto menor reactividad, mientras que los grupos carbonilo aumentan la probabilidad de que los androstanos tengan una acción biológica (Kubli-Garfias et al., 1998).

#### **e) Biosíntesis de hormonas esteroides**

La biosíntesis de las hormonas esteroides (Fig. 4) comienza con el colesterol, que da lugar a un compuesto intermedio, la pregnenolona, de la cual derivan las hormonas sexuales, los glucocorticoides y los mineralcorticoides. La producción de pregnenolona está regulada por hormonas de naturaleza peptídica como son la hormona luteinizante (LH) en el ovario y testículo; la gonadotropina coriónica (GCH) en la placenta y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la corteza

suprarrenal. Así, la pregnenolona puede convertirse directamente a progesterona y posteriormente a aldosterona (Ruta A, Fig. 4), convertirse a  $17\alpha$ -OH-pregnenolona, precursora del cortisol (Ruta B, Fig. 4) o metabolizarse a los esteroides sexuales (Ruta C, Fig. 4). La ruta A puede contribuir a la ruta B y ésta a su vez a la ruta C. La Dehidroepiandrosterona (DHEA), primer producto de la ruta C, puede inhibir la cascada metabólica a través de la ruta B y C, por inhibir la conversión de pregnenolona a  $17\alpha$ -OH-pregnenolona.

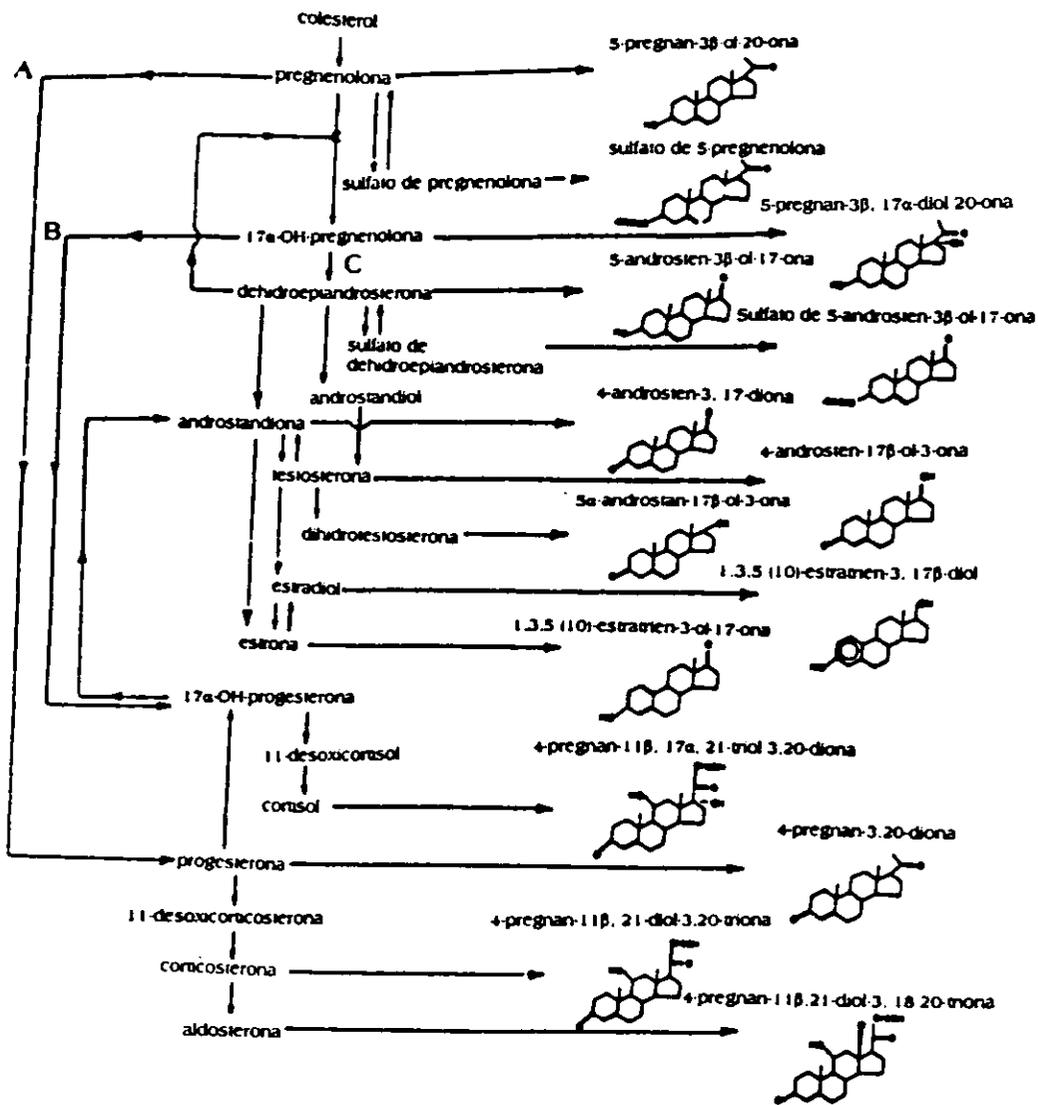


Figura 4. Biosíntesis de esteroides. Esquema modificado de Roberts, 1995.

## f) Metabolismo de andrógenos

La palabra andrógeno deriva de las palabras griegas *andro* (macho) y *gennum* (que produce) y se refiere a las sustancias que poseen actividad masculinizante. Los andrógenos participan en una infinidad de funciones biológicas como son la espermatogénesis, el funcionamiento del epidídimo, el desarrollo de la próstata; en la estimulación de folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas; en el desarrollo de los huesos, en la regulación del sistema vascular, intervienen en la hematopoyesis, en la regulación del nivel de lípidos en el plasma incrementando la masa muscular (Bhasin, 1998), además del efecto relajante antes mencionado, sobre la actividad contráctil del útero (Kubli-Garfias et al., 1980) y otros músculos lisos como el epidídimo y la vesícula seminal (Kubli-Garfias., 1983b), la aorta torácica de rata (Perusquía et al., 1996) y el fleón de cobayo (Kubli-Garfias et al., 1987).

La principal fuente de biosíntesis de andrógenos en mamíferos son las células de Leydig en los testículos, las células corticales en las glándulas suprarrenales y las células de la teca en los ovarios. Estas células pueden sintetizar andrógenos a partir de acetil CoA; no obstante la síntesis en general es a partir del colesterol, el cual se obtiene del plasma a través de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). El principal andrógeno es la testosterona, producido por las células de Leydig, mientras que las células adrenales producen androstandiona, dehidroepiandrosterona y su éster sulfatado (Bhasin, 1998).

El 95% de la testosterona circundante en mamíferos se deriva de la secreción testicular, sólo una pequeña cantidad de la dihidrotestosterona ( $\approx 70$   $\mu\text{g}$  diarios), es secretada directamente por los testículos, la mayor parte de la dihidrotestosterona circundante se deriva de la conversión de la testosterona, la cual es metabolizada predominantemente en el hígado (50-70%), aunque su degradación también ocurre en tejidos periféricos, particularmente en la próstata y la piel. El hígado toma a la testosterona de la sangre y a través de reacciones químicas que involucran  $5\alpha$ - y  $5\beta$ -reductasas,  $3\alpha$ - y  $3\beta$ -hidroxi deshidrogenasas, la transforma en dihidrotestosterona,  $3\alpha$ -androstandiol, androsterona y eticolanolona. Los dos últimos libres y conjugados, son los metabolitos predominantes en la orina (Robaire, 1998).

Matsui y Kinuyama (1977) y Matsui y Hakazaki (1977), estudiando el metabolismo biliar de la testosterona *in vivo*, determinaron la presencia de metabolitos  $5\alpha$ -reducidos, sin embargo hay pocas evidencias con respecto a la formación de andrógenos  $5\beta$ -reducidos.

Al estudiarse la unidad feto-placentaria (Mancuso et al., 1968) se observó que la testosterona es producida por la placenta, secretada al feto y metabolizada por éste en el hígado a andrógenos  $5\beta$ -reducidos, mientras que en otros tejidos fetales, la conversión es hacia metabolitos  $5\alpha$ -reducidos.

En cuanto al metabolismo de los andrógenos en el útero de rata, la testosterona (17 $\beta$ -hidroxi-4-androsten-3-ona) es reducida por medio de  $5\alpha$ -reductasas y 17 $\beta$ ,  $3\alpha$  y  $3\beta$ -hidroxiesteroide-oxidoreductasas hacia los siguientes

metabolitos: androstendiona (4-androsten-3,17-diona), 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona), androstandiol (5 $\alpha$ -androstan 3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol), 4-androsten-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 4-androsten-3 $\beta$ -17 $\beta$ -diol y androstanediona (5 $\alpha$ -androstan-3,17-diona) en menor proporción (Hoffmann et al., 1975), (Fig. 5).

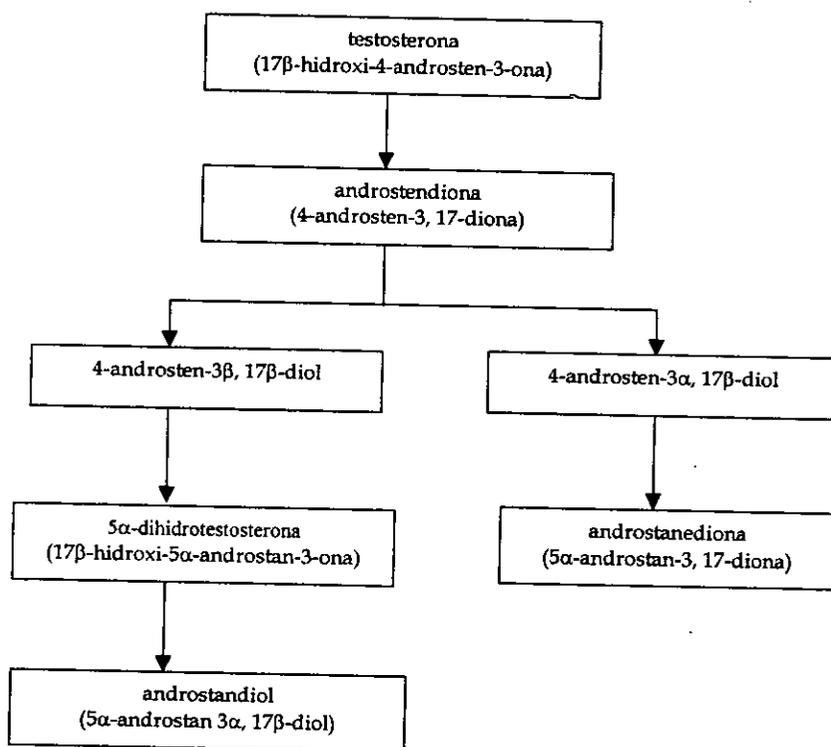


Figura 5. Metabolismo de la testosterona en el útero de rata. Hoffmann, 1975.

### **g) Mecanismo de la acción relajante inducida por los esteroides en el útero**

El efecto de los metabolitos de la progesterona sobre el SNC fue inicialmente reportado por Seyle (1941). Años más tarde se reportó un efecto rápido y reversible de algunos neuroesteroides y esteroides neuroactivos, los cuales inducen una acción sedativa/hipnótica, anestésica y anticonvulsiva (Baulieu et al., 1978; Schumacher, 1990; McEwen, 1991). Estos estudios sugirieron que la unión al receptor nuclear, la transcripción de genes y la síntesis de proteínas no intervienen en esta acción, determinando que se trata de efectos de tipo no genómicos.

La respuesta inmediata (de segundos a minutos) y reversible que producen los esteroides 5-reducidos al disminuir la excitabilidad del SNC (Kubli Garfias, 1984; Kubli Garfias, 1987) y del músculo uterino (Perusquía et al., 1990; Perusquía y Villalón, 1996), descartó la posibilidad de una interacción del esteroide con el genoma para ejercer sus efectos (mecanismo genómico).

Se ha postulado que en la acción relajante no genómica de los esteroides en el útero, participan algunos iones. Así, Batra (1973) estudió la captación de calcio por mitocondrias del miometrio humano tratado con estrógenos y observó que éstos inhibieron la captura de calcio mitocondrial dependiente de ATP, en tanto que la progesterona no la afectaba. Posteriormente, se demostró que esta hormona disminuye la fijación de calcio del miometrio (Batra y Bengtsson, 1978). Más tarde, se reportó que estos esteroides producen un efecto antagónico del calcio, al inhibir las contracciones inducidas por calcio en útero despolarizado de rata, reportándose

también que dicho efecto es revertido por la acción de ionóforos de calcio, lo cual sugirió que la relajación inducida por los esteroides es producida por la disminución del influjo de calcio extracelular, a través de un bloqueo de los canales de calcio operados por voltaje (Perusquía et al., 1990). Además, se descartó la posibilidad de que los esteroides relajen el músculo uterino a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos ó  $H_2$ -histaminérgicos (Perusquía et al., 1990).

Por otra parte, se ha descrito que en el útero de rata, los andrógenos y las progestinas 5-reducidas son capaces de inhibir las contracciones inducidas por la oxitocina (Perusquía y Campos, 1991), la serotonina (Perusquía et al., 1991a) y la acetilcolina (Perusquía et al., 1991b) y además, que las progestinas también pueden prevenir las contracciones provocadas por las prostaglandinas  $E_2$  y  $F_{2\alpha}$  (Perusquía y Kubli-Garfias, 1992). Lo cual sugirió que los esteroides también inducen una inactivación de los canales de calcio operados por receptor, proponiéndose que en el efecto relajante que inducen los esteroides sobre el músculo liso uterino, son bloqueados los canales de calcio operados por voltaje y los canales de calcio operados por receptor (Ver Fig. 6).

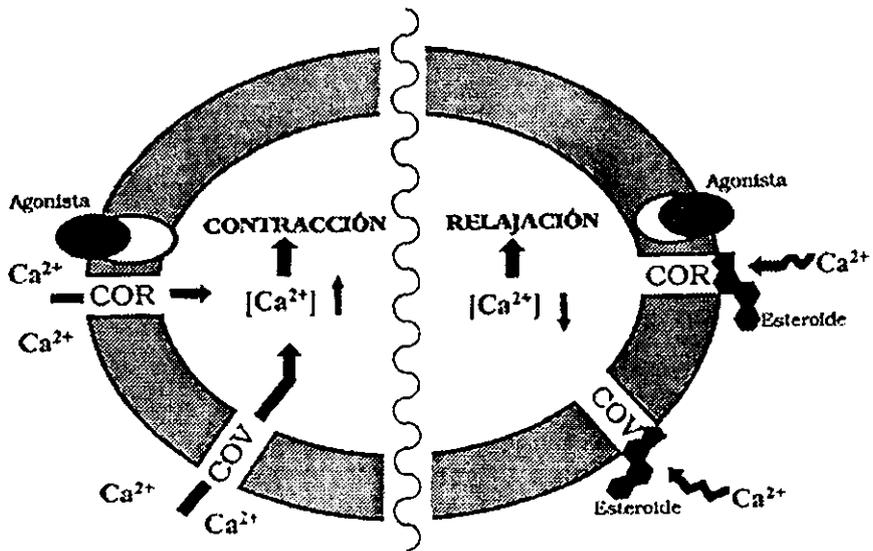


Figura 6. Esquema representativo de una célula muscular uterina, en el cual se muestra que la contracción es producida por el incremento de la concentración de calcio interno ( $[Ca^{2+}]$ ) a través de los canales operados por receptor (COR) y los canales operados por voltaje (COV). Así, la relajación inducida por los esteroides se hipotetiza como una disminución de la concentración interna de calcio, la cual es producida por el bloqueo directo de la entrada de calcio a través de los COR y los COV. Tomado de Juárez y Perusquía, 1997.

Por otra parte, en 1991 Putnam y colaboradores propusieron que el receptor  $GABA_A$  podría ser un mediador del efecto relajante uterino que inducen algunas progestinas. Sin embargo, reportes posteriores (Perusquía y Villalón, 1996) demostraron que antagonistas  $GABA_A$  (bicuculina y picrotoxina) son incapaces de bloquear la acción relajante de andrógenos y progestinas 5-reducidos, la cual sí es revertida por calcio, demostrando que los receptores  $GABA_A$ , no intervienen en el mecanismo de acción relajante de los esteroides.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los andrógenos disminuyen la actividad de tejidos excitables, como el Sistema Nervioso Central y el músculo liso uterino, mediante efectos no genómicos. Estas hormonas son sustancias lipídicas altamente hidrofóbicas, que sólo interactúan con el agua a partir de grupos hidrofílicos, generalmente hidroxilos y, en menor grado, carbonilos, localizados preferencialmente en el C<sub>3</sub> y en el C<sub>17</sub>. Por lo tanto, resulta interesante explorar experimentalmente, la capacidad que tienen los andrógenos para producir relajación uterina en presencia y ausencia de estos grupos funcionales.

### III. HIPÓTESIS

En virtud de que varios derivados de la progesterona, como es el caso de los andrógenos, bloquean el paso del calcio extracelular hacia el interior de la célula muscular, para producir su efecto relajante, es muy probable que sus grupos funcionales hidrofílicos actúen con la región hidrofílica de la parte proteica de la membrana, que pudiera ser un canal de calcio, a través de una interacción electrostática, es decir no covalente. Por lo tanto, si dichos grupos son removidos, se espera que el efecto de estos andrógenos se pierda.

## IV. OBJETIVOS

### a) Objetivo general

Establecer la importancia de los grupos funcionales carbonilo e hidroxilo en el efecto relajante uterino que inducen los  $5\alpha$ -androstano, para determinar su sitio de interacción con la membrana de la célula miometrial.

### b) Objetivos particulares

1. Obtener la curva concentración-respuesta de un andrógeno  $5\alpha$ -reducido natural (androstandiol), estableciendo sus concentraciones inhibitorias 16, 50 y 84.

2. Determinar la potencia útero-relajante que induce la androsterona, con respecto al androstandiol a la concentración equimolar de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) del androstandiol.

3. Comparar la potencia relajante que induce el androstandiol, la androsterona y cuatro moléculas  $5\alpha$ -reducidas con diferente grupo funcional en la reducción del  $C_3$ :  $5\alpha$ -androstan,  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -androstan- $3\beta$ -ol y  $5\alpha$ -androstan-3-ona, a la  $CI_{50}$  del androstandiol.

4. Establecer la importancia de los grupos funcionales unidos al C<sub>3</sub> y al C<sub>17</sub>, en la acción relajante uterina que inducen andrógenos 5 $\alpha$ -reducidos.

## VI. METODOLOGÍA

### 1. Modelo biológico

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) hembras de la cepa Wistar, con un peso aproximado de 180-220 g, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio, con un ciclo de luz/obscuridad de 12/12 horas, a una temperatura entre 20-22 °C, con alimento para rata Harlan (TEKLAD LM-485, 7012) y agua *ad libitum*.

Se seleccionaron ratas en fase de diestro mediante el muestreo diario del exudado vaginal, el cual se realizó introduciendo en la vagina una pipeta pasteur de punta roma con aproximadamente 0.5 ml de solución salina isotónica (NaCl al 0.9 %). La muestra se tomó depositando la solución en la vagina, y con ayuda de un bulbo de goma se retiraba inmediatamente, posteriormente se colocaba en un portaobjetos para ser observada en un microscopio óptico (Carl Zeiss modelo K-4D) a un aumento de 10x (10/0,22). La fase de diestro se determinó de acuerdo a la citología vaginal; caracterizada por abundancia de leucocitos y presencia de células basales. El diestro es la fase del ciclo estral con mayor actividad contráctil, debido a los bajos niveles de hormonas esteroides ováricas, que se presentan en esta fase del ciclo.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, para realizar la histerectomía, el útero se colocaba en una caja de petri con solución Ringer Krebs-Henseleit cuya composición (mM) fue la siguiente: NaHCO<sub>3</sub> (25.0), NaCl (119.0),

KCl (4.6),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.2),  $\text{MgSO}_4$  (1.2),  $\text{CaCl}_2$  (1.5) y Glucosa (12.0). La solución se ajustó a un pH de 7.4 mediante el burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ , a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . El útero se limpió del tejido adiposo y conjuntivo circundante, y ambos cuernos uterinos se cortaron de manera transversal en anillos de aproximadamente 1 cm de longitud.

## 2. Sistema de registro

Se empleó la técnica isométrica convencional para tejido aislado, los anillos uterinos se suspendieron en una cámara de incubación, que contenía 10 ml de solución Ringer Krebs-Henseleit. Cada anillo se sujetó por un extremo al piso de una cámara, y por el otro extremo a un transductor de fuerza (Grass modelo FTO3C), el cual detectó las señales mecánicas (contracciones) y las envió transformadas en señales eléctricas a un polígrafo (Grass 79) de cuatro canales, donde nuevamente se transformaron en señales mecánicas para ser registradas por el graficador del polígrafo. Los tejidos se mantuvieron oxigenados mediante un burbujeo constante de la mezcla gaseosa de 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$  con un sistema recirculador de agua, para mantener la temperatura a  $37^\circ\text{C}$ . La fuerza de tensión empleada para cada anillo fue de 10 mN (1 g de tensión), que corresponde a 2 cm de desplazamiento de la pajilla en el papel.

El polígrafo estaba acoplado a una computadora (Pentium de 200 MHZ), con un convertidor analógico digital, el cual capturó las señales biológicas que posteriormente fueron procesadas y analizadas por software especializado (PolyVIEW system data acquisition version 2.0, Astro-Med, Inc, West Warwick, RI., E.U.A.), (Fig. 7).

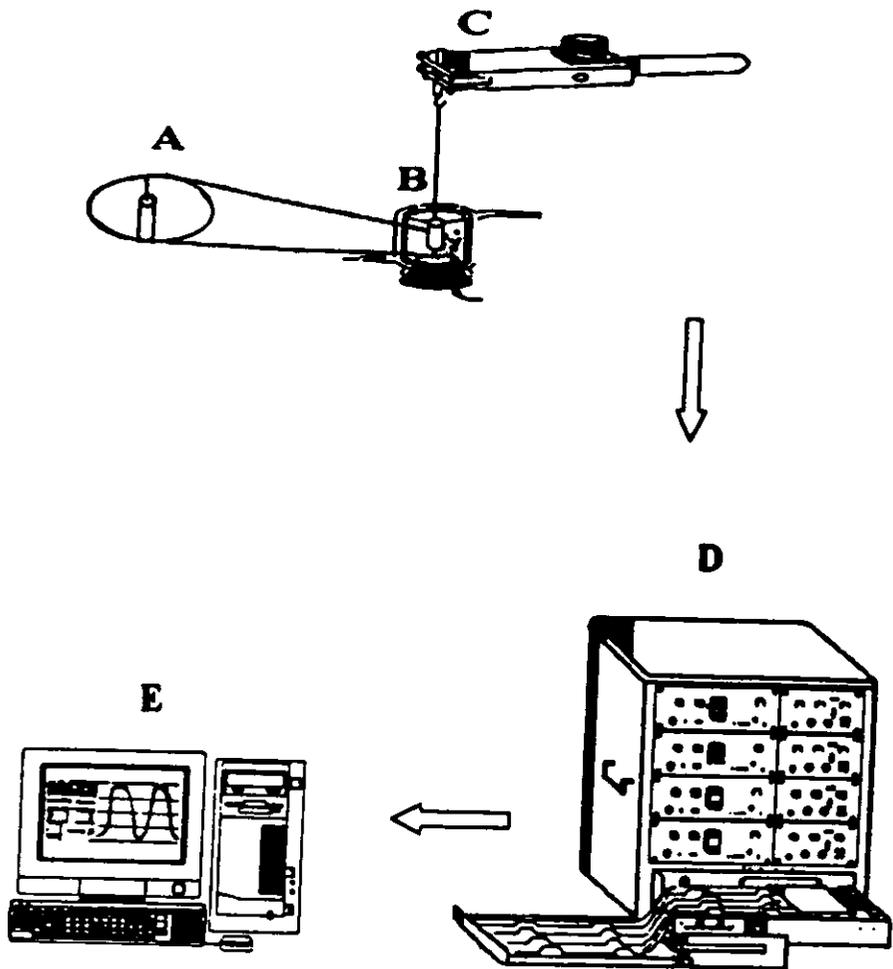


Figura 7. Sistema de registro isométrico convencional para tejido aislado. A) anillo uterino, B) cámara de incubación, C) Transductor, D) Polígrafo y E) Computadora.

### **3. Protocolo experimental**

#### **a) Curva concentración-respuesta del androstandiol.**

Una vez montado el tejido, la actividad espontánea uterina se estabilizó durante aproximadamente 30 minutos y posteriormente se consideraron 10 minutos como control, antes de adicionar el androstandiol (disuelto en un volumen final de etanol al 0.1% en 10 ml de solución Ringer Krebs-Henseleit) a diferentes concentraciones (1, 3, 10, 30, 100 y 300  $\mu\text{M}$ ) de manera no acumulativa, el efecto se registró durante 10 minutos. La prueba para cada concentración se repitió por lo menos 6 veces.

Con estos datos se construyó la curva concentración-respuesta del androstandiol y se determinaron las concentraciones inhibitorias (CI) 16, 50 y 84, según el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

#### **b) Comparación de la potencia relajante del androstandiol con la androsterona y otras moléculas 5 $\alpha$ -reducidas.**

En otros experimentos, después del montaje y estabilización del tejido, en igual forma se consideró un control de la actividad de 10 minutos e inmediatamente se adicionó androstandiol, androsterona, 5 $\alpha$ -androstan, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol y 5 $\alpha$ -androstan-3-ona, cada uno por separado,

a la  $CI_{50}$  del androstandiol, previamente determinada. El efecto se registró durante 10 minutos. En algunos casos se lavó el tejido con la solución Ringer Krebs-Henseleit con el fin de retirar el efecto del esteroide y observar si la actividad contráctil uterina se recuperaba.

Previamente se realizaron controles del vehículo (etanol) en el que se disolvieron los esteroides, para determinar si éste producía algún efecto sobre la contracción uterina espontánea de la rata.

### c) Análisis de los datos

El área bajo la curva de las contracciones se cuantificó con el programa de captura en la computadora. El efecto fue evaluado en términos del porcentaje de cambio de la actividad espontánea inducida por la hormona, con respecto al control considerado como el 100%. Cada valor fue el resultado  $n \geq 6 \pm$  la desviación estándar de la media (D.E.M). Probando la misma concentración, la relación de potencia de cada compuesto para inducir relajación uterina, fue calculada en relación al efecto producido por el androstandiol, aplicando la fórmula:

$$\text{Potencia} = \frac{\% \text{ de relajación inducido por el compuesto de prueba}}{\% \text{ de relajación inducido por el androstandiol}}$$

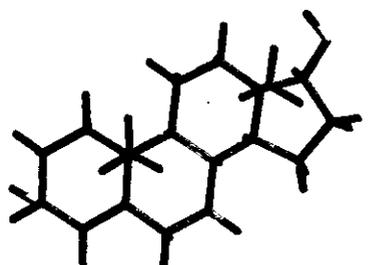
Asumiendo un valor de 1.00 para el androstandiol.

El efecto relajante de los 5 $\alpha$ -androstanos fue comparado entre sí y con respecto al vehículo utilizado (etanol), mediante la prueba de t de Student, tomando como significativos los valores de  $p < 0.05$ .

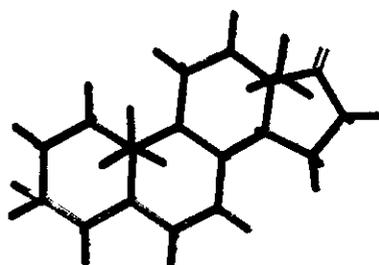
#### **4. Esteroides de prueba**

Con excepción de 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol, que se obtuvo de Steraloids, Inc. Wilton, NH., E.U.A, todos los compuestos se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St Louis MO., E.U.A: 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol (androstandiol), 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -17-ona (androsterona), 5 $\alpha$ -androstan (etioalocolano), 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol y 5 $\alpha$ -androstan-3-ona (Ver Fig. 8).

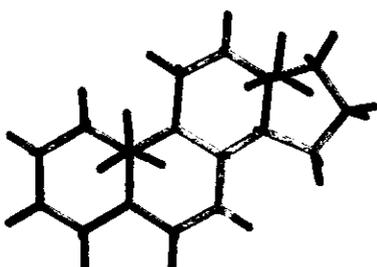
Todos los esteroides se disolvieron en alcohol etílico absoluto (etanol) de Merck-México, S.A., en un volumen final de 0.1% en 10 ml de solución Ringer Krebs-Henseleit (equivalente a la concentración final de 17.14 mM).



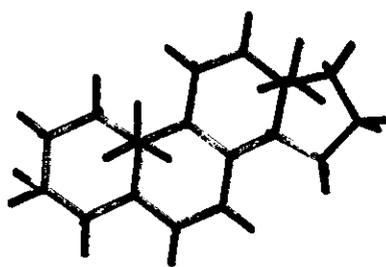
**5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol**  
(androstandiol)



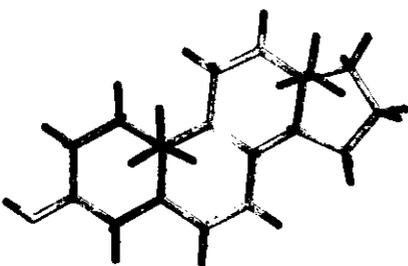
**5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -17-ona**  
(androsterona)



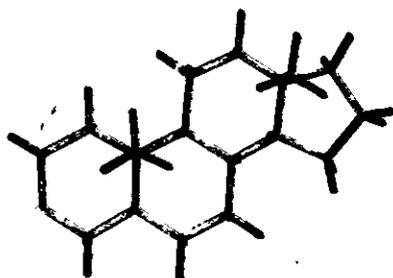
**5 $\alpha$ -androstan**



**5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol**



**5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol**



**5 $\alpha$ -androstan-3-ona**

Figura 8. Representación esquemática de la estructura química de los compuestos utilizados (vista frontal).

## VIII. RESULTADOS

La concentración a la cual se aplicó el vehículo (etanol, 17.14 mM) para disolver los esteroides, no modificó la contracción uterina espontánea de manera significativa  $p < 0.5$  (Fig. 9, 10 y Gráfica 2).

### a) Curva concentración - respuesta del androstandiol

El androstandiol produjo un efecto relajante inmediato (~ 1 minuto) sobre la contracción espontánea uterina; disminuyendo la amplitud y la frecuencia de la actividad contráctil (Fig. 9) en forma lineal dependiente de la concentración (Tabla 1 y Gráfica 1).

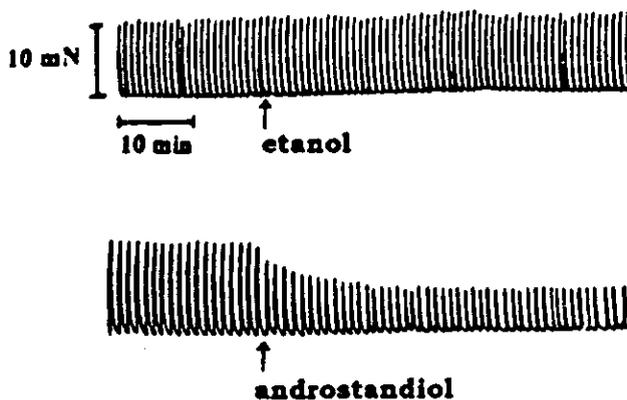
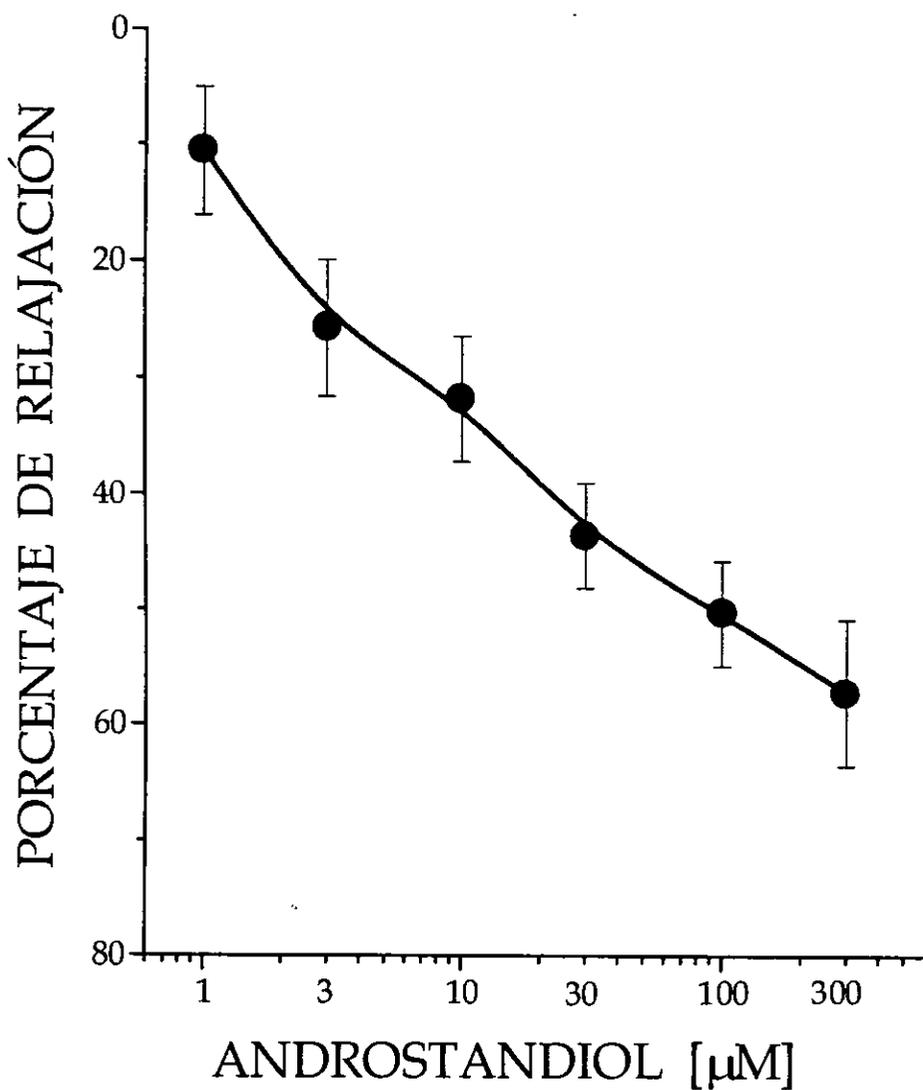


Fig. 9. Trazó típico de la actividad espontánea *in vitro* del útero de rata en diestro, en donde se muestra: el efecto no significativo del vehículo (etanol 17.14 mM) y el efecto útero-relajante del androstandiol (100  $\mu$ M).

**Tabla 1. Valores del porcentaje de relajación inducido por el androstandiol a diferentes concentraciones.**

CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{M}$ )	% DE RELAJACIÓN $n \geq 6 \pm \text{D.E.M.}$
1	$10.55 \pm 5.57$
3	$25.74 \pm 5.85$
10	$31.76 \pm 5.37$
30	$43.55 \pm 4.59$
100	$50.32 \pm 4.54$
300	$57.18 \pm 6.36$



Gráfica 1. Curva concentración-respuesta del androstandiol sobre la actividad espontánea uterina *in vitro* de la rata en diestro. Cada punto representa la media de  $n \geq 6 \pm$  D.E.M.

Por interpolación de la recta, ajustada por regresión lineal se obtuvieron los valores de la  $CI_{16}$  y la  $CI_{50}$ . El valor de la  $CI_{84}$  fue calculado por extrapolación de la misma recta, de acuerdo al método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Se calcularon también los límites de confianza inferior-superior y el valor de la pendiente (Tabla 2).

**Tabla 2. Concentraciones inhibitorias (CI), 16, 50 y 84 del androstandiol sobre la actividad contráctil uterina de la rata.**

$CI_{16}$	$CI_{50}$	$CI_{84}$	LIMITES INFERIOR-SUPERIOR DE LA $CI_{50}$	PENDIENTE
1.9 $\mu$ M	91 $\mu$ M	*3600 $\mu$ M	16.66-496.95	18.26

\*Valor teórico obtenido por extrapolación en la gráfica, según el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

**b) Comparación de la potencia relajante del androstandiol con la androsterona y otras moléculas 5 $\alpha$ -reducidas.**

La androsterona también indujo un agudo efecto relajante; por disminuir la amplitud y la frecuencia de las contracciones de manera inmediata. El efecto de la androsterona fue más potente al del androstandiol (Fig. 10). Se observó que 5 $\alpha$ -androstan, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol y 5 $\alpha$ -androstan-3-ona, son esteroides con muy baja potencia, que inducen una ligera disminución, poco apreciable, en la frecuencia y la amplitud de las contracciones (Fig. 10).

En algunos experimentos, donde el efecto se registró durante 90 minutos, se observó un aumento en el efecto relajante, el cual sin embargo pudiera estar sumado al deterioro de la actividad contráctil.

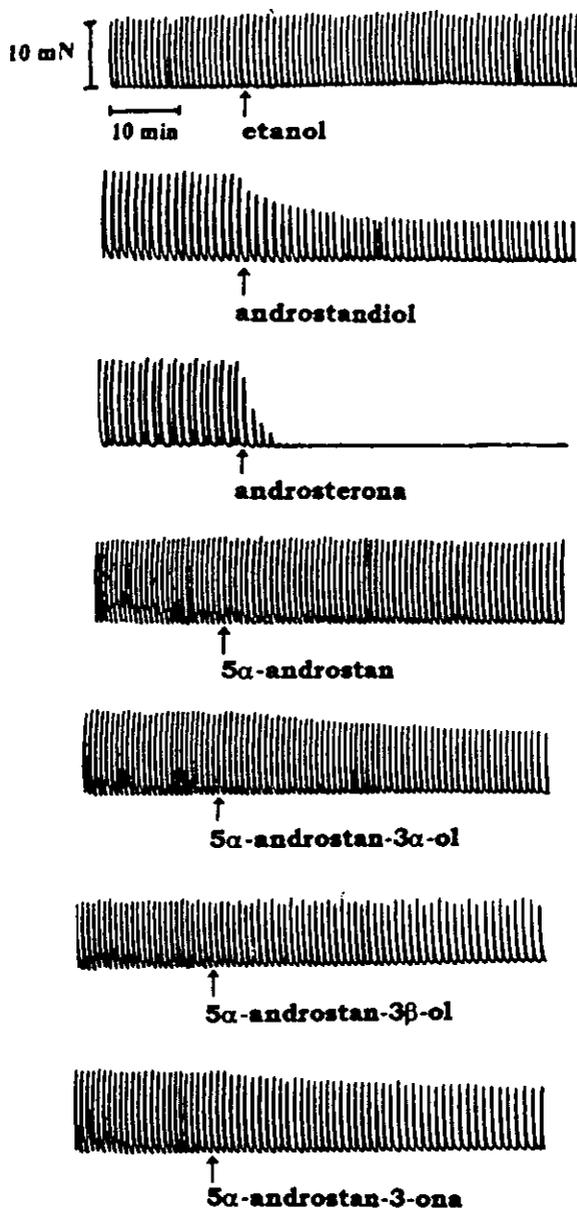


Figura 10. Registro de la actividad contráctil uterina de la rata en diestro, donde se observa el efecto de los diferentes esteroides probados a la concentración equimolar de 91  $\mu\text{M}$  ( $\text{CI}_{50}$  del androstandiol). En la parte superior se observa que el vehículo (etanol, 17.14 mM) no modifica la actividad contráctil.

Cuando se lavó el tejido para retirar a la androsterona y al androstandiol del medio, la actividad se recuperó parcialmente (Fig. 11). En el caso de  $5\alpha$ -androstan,  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol,  $5\alpha$ -androstan- $3\beta$ -ol y  $5\alpha$ -androstan-3-ona, no fue posible apreciar la recuperación, debido al ligero efecto que producen.

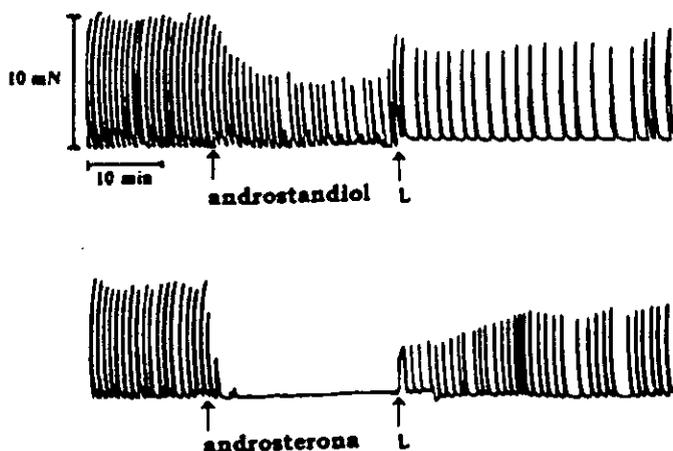


Figura 11. Efecto útero-relajante del androstandiol y la androsterona ( $91 \mu\text{M}$ ). Obsérvese que al realizar un lavado (L), la actividad contráctil es recuperada parcialmente.

Al comparar la potencia inhibitoria de los  $5\alpha$ -androstanos probados, se aprecia que la androsterona y el androstandiol son dramáticamente más potentes, observando la siguiente relación de potencia: androsterona > androstandiol >  $5\alpha$ -androstan-3-ona >  $5\alpha$ -androstan =  $5\alpha$ -androstan- $3\beta$ -ol =  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol. Sin embargo, el efecto de  $5\alpha$ -androstan,  $5\alpha$ -androstan- $3\beta$ -ol y  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol no

fue significativo ( $p > 0.05$ ) respecto al efecto producido por el vehículo (Tabla 3 y Gráfica 2).

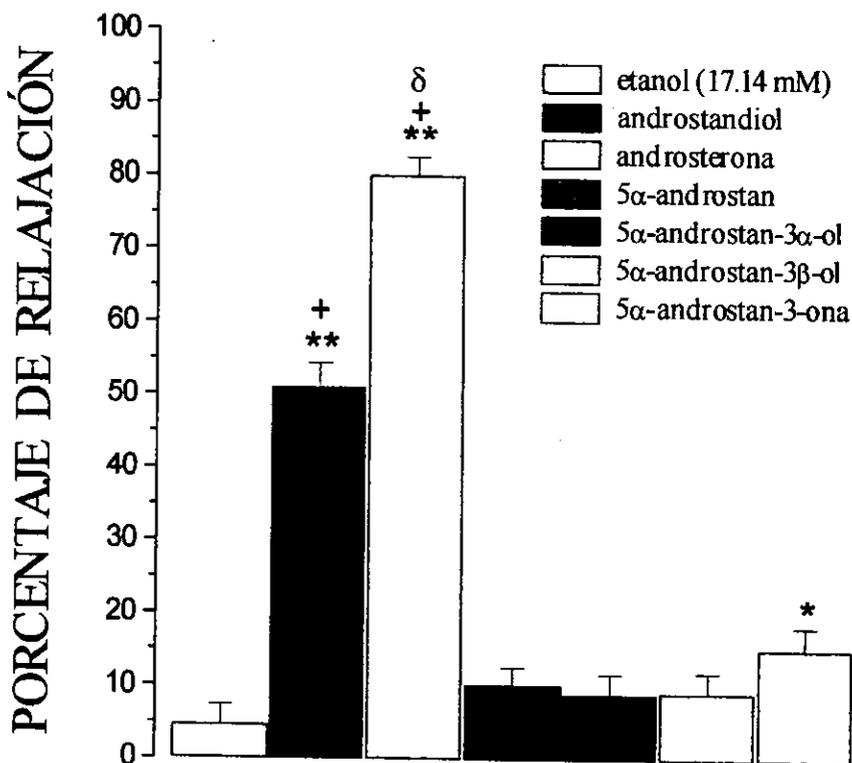
**Tabla 3. Relación de la potencia relajante de las moléculas 5 $\alpha$ -reducidas sobre la contracción uterina *in vitro* de la rata en diestro.**

ESTEROIDE	% DE RELAJACIÓN n = 6 $\pm$ D.E.M. (91 $\mu$ M)	POTENCIA*
androstandiol	51.28 $\pm$ 3.00	1.00
androsterona	80.04 $\pm$ 2.48	1.56
5 $\alpha$ -androstan	10.28 $\pm$ 2.36	0.20
5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol	8.92 $\pm$ 2.84	0.17
5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol	9.27 $\pm$ 2.77	0.18
5 $\alpha$ -androstan-3-ona	15.44 $\pm$ 2.79	0.30

\* La potencia fue evaluada por la formula:

$$\text{Potencia} = \frac{\% \text{ de relajación inducido por el compuesto de prueba}}{\% \text{ de relajación inducido por el androstandiol}}$$

Asumiendo un valor de 1.00 para el androstandiol



Gráfica 2. Comparación del efecto relajante inducido por los diferentes 5 $\alpha$ -androstano sobre la actividad contráctil uterina de la rata en diestro, a la concentración equimolar de 91  $\mu$ M. El efecto del vehículo no fue significativo ( $p > 0.5$ ). El efecto de 5 $\alpha$ -androstan, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol y 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol no fue significativo ( $p > 0.05$ ) con respecto al efecto producido por el vehículo. Diferencia significativa \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.00001$  al comparar el efecto de las hormonas *vs.* el vehículo (etanol). La androsterona y el androstandiol fueron significativamente (\* $p < 0.00001$ ) más potentes que los 5 $\alpha$ -androstano de prueba. La androsterona fue significativamente más potente ( $\delta$   $p < 0.00001$ ), que el androstandiol.

## VII. DISCUSIÓN

El presente trabajo confirma que la androsterona y el androstandiol producen un potente y agudo efecto relajante, rápido y reversible, sobre la contracción uterina de la rata (Kubli-Garfias et al., 1980), en el cual no interviene el genoma y por lo tanto, la síntesis de proteínas (Rainbow et al., 1980). Estas observaciones concuerdan con reportes anteriores, donde se clasifica este efecto como de tipo no genómico; por su corta latencia, corta duración y por ser un efecto que se revierte (Perusquía et al., 1990).

Por otra parte, se pudo determinar que los  $5\alpha$ -androstanos:  $5\alpha$ -androstan,  $5\alpha$ -androstan- $3\alpha$ -ol y  $5\alpha$ -androstan- $3\beta$ -ol, no desarrollan la acción no genómica en este tejido, dada su ineficacia para ejercer el efecto relajante, sin embargo  $5\alpha$ -androstan- $3$ -ona, fue capaz de inducir un efecto relajante ligero, quizá debido a la riqueza electrónica del grupo carbonilo en el  $C_3$ .

Los resultados muestran que la configuración  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$ , no es efectiva cuando el esteroide carece de un grupo funcional en posición 17, el cual podría ser un grupo 17-ceto como en el caso de la androsterona, o un grupo  $17\beta$ -hidroxi como en el caso del androstandiol, de tal suerte que éste grupo podría estar actuando como un elemento estabilizador que permite a la configuración  $3\alpha$ -hidroxi- $5\alpha$  ejercer su efecto farmacológico relajante (Fig. 12). Así pues, la ausencia de un grupo funcional en el  $C_{17}$ , resulta en la pérdida completa ó casi completa de la actividad biológica, por lo que se puede concluir que, aunque una molécula posea

un grupo *farmacofórico*, (parte de la molécula que induce una acción) como es el caso del grupo 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$ , esto no es suficiente para que se manifieste la acción biológica relajante, ya que la presencia de un elemento estabilizador es necesaria. También se observó que el grupo 17-ceto le confiere a la molécula una mayor potencia biológica, debido a su riqueza electrónica y a la inducción de un momento dipolar importante, así como la generación de un potencial electrostático muy grande. Todo lo anterior tiene sentido, ya que la riqueza electrónica del grupo funcional hidroxilo es menor que la del carbonilo, este grupo disminuye el momento dipolar y el tamaño del potencial electrostático, lo que correlaciona bien con la menor efectividad biológica del androstandiol en comparación con la androsterona. Asimismo, a medida que el esteroide se va haciendo más hidrofílico, como en el caso de los pregnandioles y los pregnantrioles, se va perdiendo su efecto relajante no genómico (Kubli-Garfias, 1987).

La otra conclusión importante es que el sistema de anillos A, B, C, y D sin grupos funcionales en el C<sub>3</sub> y en el C<sub>17</sub>, es incapaz de producir un efecto relajante, lo que sugiere una interacción del esteroide a través de sus grupos funcionales, con la región hidrofílica de la membrana, en la parte proteica, seguramente sobre algún canal iónico, donde los grupos hidrofílicos, carbonilo e hidroxilo, pueden interactuar de manera no covalente con regiones hidrofílicas de las proteínas.

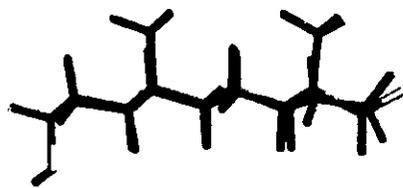
Lo anterior apoya la hipótesis de que el efecto relajante de los esteroides, tanto en el músculo liso uterino (Perusquía et al., 1990; Perusquía y Campos, 1991; Perusquía et al., 1991ab; Perusquía y Kubli-Garfias 1992; Perusquía y Villalón,

1996) como en el músculo vascular (Perusquía et al., 1996; Perusquía y Villalón, 1999), está mediado por una inactivación de los canales de calcio operados por voltaje y operados por receptor.

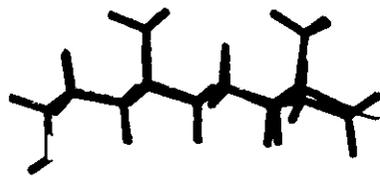
La determinación del farmacóforo de los esteroides para ejercer su efecto relajante, sería de gran utilidad en el diseño de fármacos que podrían ser empleados con fines terapéuticos en el área de la Ginecología, como en problemas de amenazas de aborto y partos prematuros. Asimismo, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y cardiovasculares, debido a las propiedades de los esteroides, para relajar también a estos músculos.

Dada la similitud de la relación Estructura química - Actividad biológica de los esteroides en el músculo liso y en el SNC, este estudio también podría dar la pauta para el desarrollo de fármacos con propiedades anestésicas, sedativas y anticonvulsivas.

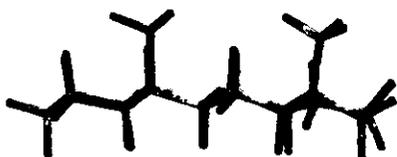
Por lo anterior, los presentes hallazgos constituyen un estudio preliminar de gran importancia para futuros estudios en el área Biomédica.



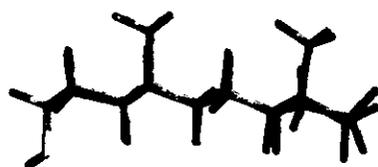
**5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol  
(androstandiol)**



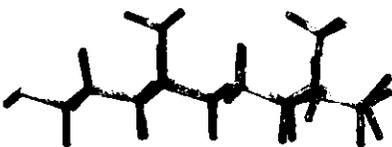
**5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -17-ona  
(androsterona)**



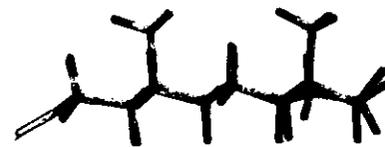
**5 $\alpha$ -androstan**



**5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol**



**5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol**



**5 $\alpha$ -androstan-3-ona**

Figura 12. Representación esquemática de los 5 $\alpha$ -androstanos (vista lateral).

## VIII. CONCLUSIONES

1) Con excepción de 5 $\alpha$ -androstan-3-ona, que presenta un ligero efecto relajante, los 5 $\alpha$ -androstano: 5 $\alpha$ -androstan, 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol y 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol, no presentan la propiedad de inducir un efecto relajante de tipo no genómico en el músculo liso uterino de rata.

2) La configuración 3 $\alpha$ -hidroxi-5 $\alpha$  no es efectiva cuando el esteroide carece de un grupo funcional carbonilo o hidroxilo en posición 17.

3) El esteroide ejerce su efecto relajante, a través de sus grupos funcionales hidrofílicos, interactuando de manera no covalente con las regiones hidrofílicas de la membrana.

## IX. REFERENCIAS

- ALLEN, W. AND CORNER, G. (1929). Physiology of the corpus luteum. III. Normal growth and implantation of embryos after very early ablation of the ovaries under the influence of extracts of corpus luteum. *Amer. J. Physiol.* 88, 340-346.
- BATRA, S. (1973). Effect of some estrogens and progesterone on calcium uptake release by myometrial mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 22, 803-809.
- BATRA, S. AND BENGTTSSON. (1978). Effects of diethylboestrol and ovarian steroids on the contractile responses and calcium movements in rat uterine smooth muscle. *J. Physiol.* 276, 329-342.
- BAULIEU, E. E. GODEAU, F. SCHORDERET, M. AND SCHORDERET-SLATHRINE, S. (1978). Steroids-induce meiotic division in *Xenopus oocytes* *sufase* and calcium. *Nature.Lond.* 275, 596-598.
- BHASIN, S. Androgens, effects in mammals. In: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 1. Knobil E. and Neill, J. D. Academic Press, Sn. Dgo. CA. U.S.A. 1998. Pags. 197-206.
- BOLTON, T.B. AND KITAMURA, K. (1983). Evidence that ionic channels associated with the muscarinic receptor of smooth muscle may admit calcium. *Br. J. Pharmac.* 78, 405-416.
- CSAPO, A. AND CORNER, G.W. (1952). The antagonistic effect of estrogen and progesterone on the staircase phenomenon in uterine muscle. *Endocrinology.* 51, 378-385.
- CSAPO, A. (1959). An introduction to the molecular physiology and regulation of the uterus. *Clin. Obstet Gynec.* 2, 275-283.
- CSAPO, A. AND WEIST, W. (1969). An examination of pregnancy. *Endocrinology.* 85, 735-746.
- DE LA PEÑA, A., LÓPEZ Y LÓPEZ, L., IBAÑEZ, R., RUBIO-PÓO, C. AND PERUSQUÍA, M. (1991). Comparative effect of prolame, a syntethic amino-estrogen, with estradiol and estrone on the contractility of the isolated rat myometrium. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34, 85-87.

DIAMOND, J.  $\beta$ -Adrenoceptors, Cyclic AMP, and Cyclic GMP in Control of Uterine Motility. In: Uterine Function Molecular and Cellular Aspects. Carnsten, M.E. and Miller, J.D. Plenum. Press. New York. 1990. Pags. 249-270.

GUYTON, A.C. Y HALL, J.E. Contracción y excitación del músculo liso. En: Tratado de Fisiología Medica. Interamericana-McGraw-Hill, México. 1997. Pags. 106-107.

HOFFMANN, U., MAASS, H. AND LISBOA, B.P. (1975). Metabolism of [4-<sup>14</sup>C] testosterone in the rat uterus in vitro. *Eur. J. Biochem.* 59, 305-312.

HOYLE, G. Smooth muscle and other vegetative muscles. In: Muscles and their neural control. Jhon Wiley and sons, E.U.A. 1983. Pags. 325-331.

JASSO-KAMEL, J. (1999). Estudio de la acción genómica y no genómica de 17 $\alpha$  y 17 $\beta$  estradiol en el útero de la rata. Tesis de Maestría. Campus Ixtacala, UNAM.

JUÁREZ, B. Y PERUSQUÍA, M. (1997). Modulación de la actividad contráctil uterina por hormonas esteroides sexuales. Revisión. *Ginec. Obst. Méx.* 65. 498-503.

KNAUS, H. (1926). Action of pituitary extract upon the pregnant uterus of the rabbit. *J. Physiol.* 61, 383-397.

KUBLI-GARFIAS, C., MEDRANO-CONDE, C., BEYER, C. AND BONDANI, A. (1979). In vitro inhibition of rat uterine contractility induced by 5- $\alpha$  and 5- $\beta$  progestins. *Steroids.* 34, 609-617.

KUBLI-GARFIAS, C., LÓPEZ-FIESCO, A., PACHECO-CANO, M.T., PONCE-MONTER, H. AND BONDANI, A. (1980). In vitro effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility. *Steroids.* 35, 633-641.

KUBLI-GARFIAS, C. HOYO-VADILLO, C., LOPEZ-NIETO, E. AND PONCE-MONTER, H. (1983a). Inhibitory of spontaneous contractions of the rat pregnant uterus by progesterone metabolites. *Proc West Pharmacol Soc.* 26, 115-118

KUBLI-GARFIAS, C., HOYO-VADILLO, C. AND 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.

KUBLI-GARFIAS, C. (1984). Physiological role of 5 $\alpha$ - and 5 $\beta$ -progesterone metabolites on the CNS. *Trends Pharmacol. Sci.* 5, 439-442.

**ESTA TERCIA NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

KUBLI-GARFIAS, C., MEDINA-JIMÉNEZ, M., GARCÍA-YAÑEZ, E., VAZQUEZ-ALVAREZ, A.M., PERUSQUÍA, M., GOMEZ-GARCÍA, N., ALMANZA, J., IBÁÑEZ, R. AND RODRÍGUEZ, R. (1987). Relaxant action of androgens, progestins and corticosteroids on the isolated ileum of the guinea pig. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 37, 357-364.

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

KUBLI-GARFIAS, C., VÁZQUEZ-RAMIREZ, R., MARTINEZ-USCANGA, D. AND BRAVO, J.F. (1995). Análisis del efecto de grupos funcionales carbonilo, hidroxilo y metilo sobre la estructura electrónica del gonano. *Fol. Chim. Theor. Lat.* 28, (3-4), 227-239.

KUBLI-GARFIAS, C., MENDIETA, J. AND VÁZQUEZ, R. (1996). Semiempirical assessment of changes on the electronic structure of androstene with the addition of carbonyl and hydroxyl groups. *J. Mol. Struct (Theochem).* 388,35-41.

KUBLI-GARFIAS, C., VÁZQUEZ, R. AND MENDIETA, J. (1998). Austin model 1 study of the effect of carbonyl and hydroxyl functional groups on the electronic structure of androstane. *J. Mol. Struct. (Theochem)* 428, 189-194.

KUMAR, D., GOODNO, J. AND BARNES, C. (1962). Studies in human myometrium during pregnancy. IV. In vitro progesterone oxytocin relationship. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 84, 1111-1115.

KUMAR, D., WAGATSUMA, T., SULLIVAN, W.J. AND BARNES, A.C. (1964). Studies on the mechanism of action of progesterone on the human myometrium. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 90, 1355-1359.

LITCHFIELD, J. T. AND WILCOXON, F. A. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-113.

LÖFGREN, M., HOLST, J. AND BÄCKSTROM, T. (1992). Effects in vitro of progesterone and two 5 $\alpha$ -reduced progestins: 5 $\alpha$ -pregnane 3,20-dione and 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\alpha$ -ol-20-one, on contracting human myometrium at term. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 71, 28-33.

MANCUSO, S., BENAGIANO, O., DELL ACQUA, S. AND DICZFALUSY, E. Androgen metabolism in the foeto-placental unit. Excerpta Medica. International Congress Series No. 184. Progress in Endocrinology. Proceedings of the Third International Congress of Endocrinology. México, D.F., 30 June-5 July, 1968.

MARSHALL, J. AND CSAPO, A. (1961). Hormonal and ionic influences on the membrane activity of the uterine smooth muscle. *Endocrinology*. 68, 1026-1035.

MARSHALL, J.M. (1970). Adrenergic innervation of the female reproductive tract: Anatomy, physiology and pharmacology. *Ergeb Physiol*. 62, 7-67.

MATSUI, M. AND KINUYAMA, Y. (1977). Comparative fate of testosterone and testosterone sulphate in female rats: C-19 0-2 and C-19=3 steroid metabolites in the bile. *J. Steroid. Biochem*. 8 (4), 323-327.

MATSUI, M. AND HAKAZAKI, M. (1977). Variations in biliary metabolites of androsterone in female rats. *J. Steroid. Biochem*. 8 (4), 319- 322.

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

MOORE, K.L. Anatomía con orientación clínica. Panamericana, México. 1993. Págs, 299-303.

NORBERG, K.A. AND FREDERICSSON, B. (1966). Cellular distribution of monoamines in the uterine and tubal walls of the rat. *Acta Physiol. Scand. (Suppl)*. 277, 68-149.

OTTESEN, B. AND FAHRENKRUG. Regulatory Peptides and Uterine Function In: Uterine Function Molecular and Cellular Aspects. Carnsten, M.E. and Miller, J.D. Plenum. Press. New York. 1990. Págs. 393-416.

PARKINGTON, H.C. AND COLEMAN, H.A. Hormonal Influences on contraction of uterine smooth muscle In: Smooth Muscle Excitation. Bolton T.B. and Tomita T. Academic Press. San Diego CA. 1996. Págs. 375-389.

PERUSQUÍA, M., HOYO-VADILLO, C. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1986). Biphasic effect of corticosteroids on the contraction of isolated rat uterus. *Arch. Invest. Med*. 35, 633-641.

PERUSQUÍA, M., GARCÍA-YAÑEZ, E., IBAÑEZ, R. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1990). Non-genomic mechanism of action of  $\Delta$ -4 and 5-reduced androgens and progestins on the contractility of the isolated rat myometrium. *Life Sci*. 47, 1547-1553

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

PERUSQUÍA, M., CAMPOS, G., CORONA, J.L. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1991a). Antagonism by 5-reduced steroids of the tonic and phasic contractions induced by serotonin in the isolated rat uterus. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34, 395-398.

PERUSQUÍA, M., CORONA, J.L. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1991b). Inhibitory effect of 5-reduced androgens and progestins on the uterine contraction induced by acetylcholine. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34, 89-92.

PERUSQUÍA, M. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1992). External calcium dependence of the uterine contraction induced by prostaglandins E<sub>2</sub> y F<sub>2</sub>α and its antagonism with natural progestins. *Prostaglandins* 43 (5), 445-455.

PERUSQUÍA, M., HERNÁNDEZ, R., MORALES, M., CAMPOS, M. AND VILLALÓN, C.M. (1996). Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen. Pharmacol.* 27, 181-185.

PERUSQUÍA, M. AND VILLALÓN, C.M. (1996). The relaxant effect of sex steroids in rat myometrium is independent of the gamma-amino butyric acid system. *Life Sci.* 58 (11), 913-926.

PERUSQUÍA, M., HERNÁNDEZ, R., JASSO-KAMEL, J. AND RODRÍGUEZ-RABAGO, M. (1997). Relaxing effect of progestins on spontaneous contractile activity of gravid human uterus. *Med. Sci. Res.* 25, 585-587.

PERUSQUÍA, M. AND VILLALÓN, C.M. (1999). Possible role of Ca<sup>2+</sup> channels in the vasodilating effect of 5β-dihydrotestosterone in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 371 (2-3), 173-182.

PERUSQUÍA, M. Chapter 33. Agents for altering uterine motility. In: Quick look: Pharmacology Review Book. Robert B. Raffa and Gerald H. Sterling. Fence Creek Publishing, LLC., USA., 1999.

PUTNAM, C.D., BRANN, D.W., KOLBEC, K, R.C. AND MAHESH, V.B. 1991. Inhibition of uterine contractility by Progesterone and progesterone metabolites: mediation por by progesterone and gamma amino butyric acid<sub>A</sub> receptor systems. *Biol. Reprod.* 45, 266-272.

RAINBOW, T.C., DAVIS, P.G. AND McEWEN, B.S. (1980). Anisomycin inhibits the activation of sexual behavior by estradiol and progesterone. *Brain Res.* 194, 548-555.

REYNOLDS, S.R.M. (1931). Studies on uterus: The influence of the ovary on the motility of the non-gravid uterus of the unanesthezided rabbit. *J. Physiol.* 97, 706-721.

ROBAIRE, B. Androgens. In: Encyclopedia of Reproduction. Vol. 1. Knobil E. and Neill, J.D. Academic Press, Sn. Dgo. CA. U.S.A. 1998. Pags. 180-188.

ROBERTS, E. (1995). Pregnenolone-from Selye to alzheimer and a model of the pregnenolone sulfate binding site on the GABA<sub>A</sub> receptor. *Biochem. Pharmacol.* 49 (1), 1-16.

ROBSON, J.M. (1937) Reactions of the uterine muscle and endometrium of the rabbit to testosterone. *Quart. J. Exp. Physiol.* 26, 355-363.

SCHOFIELD, B. (1955). The influence of the ovarian hormone on myometrial behaviour in the intact rabbit. *J. Physiol.* 129, 289-304.

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

SEYLE, H. (1941). Anesthetic effect of steroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 46, 116-121.

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

SOLOFF, M.S. Oxytocin Receptors in the Uterus. In: Uterine Function Molecular and Cellular Aspects. Carnsten, M.E. and Miller, J.D. Plenum. Press. New York. 1990. Pags. 373-392.

WILLMER, E.N. (1961). Steroids and cell surfaces. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 36, 368-398.