

00524
4



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**"CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ANTIUTEROTÓNICO
DE PREGNENOLONA Y DEHIDROEPIANDROSTERONA
EN EL ÚTERO AISLADO DE RATA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

MOISÉS ANTÓN CASTILLO



**MÉXICO, D. F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2003

A



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.

H. JURADO ASIGNADO:

Presidente: Eduardo Cumming Gonzalez

Vocal: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Secretario: Dra. Mercedes Perusquía Nava

1er. Suplente: M. en C. Alejandro Ortiz Osornio

2º. Suplente: Oscar Armando Pérez Méndez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:



Dra. Mercedes Perusquía Nava

SUSTENTANTE:



Moisés Antón Castillo

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mercedes Perusquía Nava, por asesorarme en la realización del presente trabajo, por sus atinados consejos académicos y personales; que me hicieron crecer como persona al sembrar en mi disciplina. Gracias por haberme dado su tiempo y paciencia.

A Irma Rodríguez García. Por su orientación, atención, disposición, ayuda técnica en la fase experimental y sobre todo por sus consejos e invaluable amistad.

A la Biól. Erika Navarrete Monroy, por su enseñanza, paciencia y tiempo brindado durante más de 2 años de mi estancia en el laboratorio. Gracias por brindar amistad y ayuda.

Al Biól. David Barrera Hernández, por compartir sus conocimientos en el área, por el tiempo y ayuda prestada en la realización de éste trabajo, por su amistad y por muchas cosas más, mil gracias. Que los futuros proyectos se logren de la mejor manera posible.

A todos los integrantes del laboratorio: Rosalba Toledo Torres, Patricia E. López Bistrain, Lorena González Hernández, Joel García Díaz y al señor Alejandro Santana, quienes hicieron de mi permanencia en el laboratorio un momento muy agradable.

A mi amigo Miguel Chávez por su amistad y por el apoyo en la obtención de la figura 4 y 5, incluidas en el presente trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por permitir el uso de su infraestructura en la realización del presente trabajo, financiado parcialmente por DGAPA en su programa PAPIIT, No. de proyecto: IN221102.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por haberme brindado la mejor formación en el área química, dándome la oportunidad de formar parte de la comunidad universitaria.

C

DEDICATORIAS

Dedico con mucho cariño esta tesis a mi tío José Luis, por haberme acercado a este mundo fascinante que es la química. Por todo su apoyo incondicional durante toda la carrera.

A mi padre Guillermo Antón por su apoyo y comprensión.

A mi abuela Martha Yancor por llevarme por buen camino.

A mi hermana Liliana. Que sigas adelante en tu carrera, sabiendo que cuentas conmigo para lo que necesites. Te quiero.

A mi tío Sergio y a mi tía Lourdes, por estar siempre cerca de mí, apoyándome, aconsejándome en todo. Los quiero mucho.

A Rocío Muñoz Salas, por su amor, apoyo, comprensión y amistad desde el momento en que me conoció. Eres parte indispensable en mi vida. Te amo.

A mis amigos; Eduardo y Miroslava, José Luis y su familia, quienes me han dado el regalo más grande que se pueda poseer: la amistad. Gracias por considerarme su amigo.

A mi amigo de toda la carrera Samuel García, por ser un apoyo incondicional durante el difícil camino recorrido en la carrera. Gracias por tu amistad.

A mis amigos de la Facultad, Miguel, Miriam, Ana, Janet (que los conozco desde la prepa), Ernesto; Deisy, Sheila, Larissa; Jorge, Javier, Eduardo, Mario, Miriam Adriana, Ely, Elizabeth, Diana Sánchez, Diana Colín, Samia, Rafael, Fernando y Lety.

A Dios, gracias por permitirme llegar hasta el día de hoy.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Generalidades	2
1.2 Biosíntesis de hormonas esteroides	3
1.3 Niveles plasmáticos de PREG y DHEA en el organismo	8
1.4 Efectos biológicos de PREG y DHEA	10
1.5 Mecanismo de acción genómico y nongenómico de hormonas esteroides	14
1.5.1 Acción genómica	14
1.5.2 Acción nongenómica	14
1.6 Actividad contráctil del músculo liso uterino	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 Modelo animal	21
5.2 Preparación del tejido uterino y sistema de registro	23
5.3 Protocolo experimental	25
i. Curva concentración-respuesta de PREG y DHEA	25
ii. Relación de potencia	26
iii. Caracterización del efecto relajante de PREG y DHEA	26
5.4 Cuantificación de los datos	27
5.5 Compuestos utilizados	28

6. RESULTADOS

6.1 Curva concentración-respuesta de PREG y DHEA	29
6.2 Relación de potencia	34
6.3 Caracterización del efecto inhibitor de la actividad contráctil	35

7. DISCUSIÓN

7.1 General	38
7.2 Potencia relajante	39
7.3 Descripción estructura química-actividad relajante	41
7.4 Caracterización de la acción relajante	43
7.5 Papel fisiológico	44

8. CONCLUSIONES	46
------------------------	-----------

9. BIBLIOGRAFÍA	47
------------------------	-----------

F

RESUMEN

La progesterona es necesaria para el mantenimiento del embarazo y una de sus principales funciones es la quiescencia uterina al inducir relajación. También se ha reportado que la testosterona produce relajación uterina; con potencia similar a la de progesterona y que algunos derivados 5-reducidos, producto del metabolismo de progesterona y testosterona, presentan mayor potencia relajante que su precursor $\Delta 4,3$ -ceto. Sin embargo, poco se sabe sobre el potencial efecto relajante que podrían tener los precursores 3β -hidroxi- $\Delta 5$ de progestinas (pregnenolona, PREG) y de andrógenos (dehidroepiandrosterona, DHEA) sobre la contractilidad uterina. Así, el objetivo fue determinar la acción de estos precursores sobre el miometrio aislado de rata en diestro, utilizando la técnica isométrica convencional para tejido aislado. Se realizaron las curvas concentración-respuesta del efecto de PREG y DHEA, comparando su potencia con la inducida por progesterona. Asimismo, se determinó si el efecto es mediado por la vía clásica de la acción de esteroides. Para lo cual, el efecto de PREG y DHEA fue evaluado en presencia de los inhibidores de la transcripción (actinomicina D) y de la síntesis de proteínas (cicloheximida). Los resultados obtenidos mostraron que PREG y DHEA son capaces de disminuir la amplitud de la contracción espontánea uterina. DHEA mostró un agudo efecto relajante dependiente de la concentración. En contraste, PREG mostró un tenue, pero significativo ($p < 0.05$) efecto relajante, no dependiente de la concentración. La relación de potencia para inducir relajación uterina fue: Progesterona \geq DHEA $\gg \gg \gg$ PREG. El efecto relajante de ambas hormonas fue inmediato (~ 1 min), reversible y no fue modificado por la presencia de actinomicina D y cicloheximida. DHEA es una molécula capaz de inducir relajación uterina con potencia igual a progesterona. Así, PREG necesita de la oxidación en el C3 y la pérdida del C20 y C21 (progesterona y DHEA, respectivamente), para optimizar su efecto relajante sobre la contracción uterina.

1.1 Generalidades

Los esteroides son un grupo de lípidos basados en un esqueleto de cuatro anillos de carbono fusionados; denominado sistema ciclopentanoperhidrofenantreno y estos compuestos son derivados del colesterol. En los mamíferos existen cinco grupos importantes: progestinas, glucocorticoides y mineralocorticoides con 21 átomos de carbono, andrógenos con 19 y estrógenos con 18 (Fig. 1). La corteza adrenal puede producir los cinco tipos de esteroides, pero es mayor la cantidad secretada de andrógenos (que pueden ser anabólicos), glucocorticoides (que estimulan la gluconeogénesis) y mineralocorticoides (los cuales regulan el balance de Na^+/K^+ en el plasma). Las gónadas y la placenta son las principales fuentes de andrógenos y estrógenos; estos órganos no secretan corticosteroides. La conversión de esteroides puede tomar lugar periféricamente, en los tejidos. Por ejemplo, en mujeres posmenopáusicas, el estrógeno más abundante; la estrona, es producido en el tejido adiposo por la aromatización de los andrógenos liberados de las glándulas adrenales (Cook y Beastall, 1987).

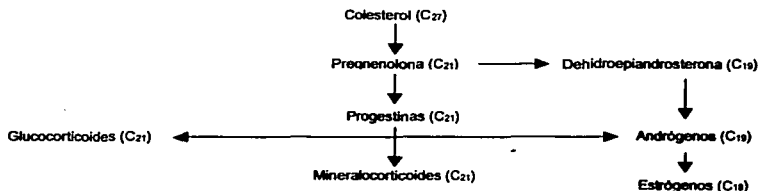


Fig. 1: Representación general de la biosíntesis de las hormonas esteroides.

1.2 Biosíntesis de hormonas esteroides

La síntesis de hormonas esteroides en la corteza adrenal, las gónadas y la placenta, considerados tejidos endocrinos "clásicos", resulta de una serie de pasos enzimáticos que involucra a las enzimas denominadas P450 y no P450. La expresión de las diferentes enzimas dicta cuales esteroides serán sintetizados. Así, los pasos iniciales en la síntesis de todos los esteroides es común para todos los tejidos esteroidogénicos (Fig. 2).

Muchas de las enzimas esteroidogénicas son miembros del grupo P450 de las oxidasas (Nebert y González, 1987; Miller, 1988). Todas estas enzimas tienen un peso molecular de 50 KDa. La síntesis adrenal, gonadal y placentar de todas las hormonas esteroides, originadas a partir del colesterol, involucra seis subtipos de citocromos P450.

El primer paso en la síntesis de todas las hormonas esteroides es la conversión de colesterol a pregnenolona (PREG). Esta reacción es catalizada por la enzima mitocondrial del colesterol "*side-chain cleavage*", P450_{scc}. La PREG, puede así, tener dos conversiones: 17 α hidroxilación hacia 17 α -hidroxipregnenolona o puede ser convertida a progesterona a través de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), ver Fig. 2. Esta enzima tiene dos distintas actividades enzimáticas: 3 β -dehidrogenación e isomerización del doble enlace de C5-6 en el anillo B (esteroides Δ 5) a C4-5 en el anillo A (esteroides Δ 4) (Thomas, et al., 1989; Luu-The, et al., 1989; Lorence, et al., 1990). Progesterona es el sustrato para la síntesis de las progestinas

naturales, las cuales son progestinas reducidas en el C5 (dihidroderivados) y en el C5 y C3 (tetrahidroderivados). De ahí la gran importancia de PREG en la biosíntesis de hormonas esteroideas; por ser el precursor básico para la producción de todas las hormonas esteroideas, incluyendo los esteroideos sexuales, los glucocorticoides y los mineralocorticoides (ver Fig. 2).

En la síntesis de mineralocorticoides, la etapa inicial es la síntesis de la aldosterona, el principal mineralocorticoide, la biotransformación consiste en la hidroxilación del C21 de la progesterona, reacción catalizada por el complejo enzimático citocromo P450 21-hidroxilasa. La 11-desoxicorticosterona resultante se hidroxila en C11 mediante el citocromo P450 11 β -hidroxilasa. El grupo metilo angular C18, se oxida por acción de la enzima aldosterona sintasa a aldehído, produciéndose la aldosterona, éstas reacciones se muestran en la Fig. 2.

La síntesis de andrógenos se lleva a cabo en las glándulas androgénicas clásicas y en el cerebro (Tsuetsui, et al., 1999; Matsunaga, et al., 2002). Comienza con la hidroxilación de la progesterona en C17 para formar la 17 α -hidroxiprogesterona, ésta reacción es mediada por el citocromo P450c17. La cadena lateral en C20 y C21, se escinde para liberar la androstendiona. La testosterona, se forma por reducción del grupo 17-ceto de la androstendiona mediante la presencia de 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), una enzima clave para la formación de andrógenos (Matsunaga, et al., 2002) ver Fig. 2. Cabe destacar que para la síntesis de andrógenos por medio de la vía $\Delta 5$, es necesaria la presencia del principal precursor de esta ruta, la dehidroepiandrosterona (DHEA). La testosterona, así como la androstendiona y DHEA

se metabolizan en tejidos periféricos mediante procesos de oxidación-reducción, dando lugar a metabolitos 5α - y 5β -reducidos (Fig. 2), así como por procesos de reducción en el grupo ceto para dar origen a esteroides 3α - y 3β -hidroxilados.

Los estrógenos se sintetizan a partir de los andrógenos (ver Fig. 2) por pérdida del grupo metilo angular C19 y por la aromatización del anillo A, esta reacción es catalizada por el citocromo P450 aromatasa. La estrona es un derivado de la androstendiona (Cook y Beastall, 1987), mientras que el estradiol, se forma a partir de la testosterona.

Como se ha mencionado, PREG y DHEA son precursores importantes de la biosíntesis de hormonas esteroideas, ambos compuestos tienen en común un doble enlace en C5 ($\Delta 5$) y difieren en su número de carbonos; PREG ($\Delta 5$ -pregnen- 3β -ol-20-ona) con 21 átomos de carbono (Fig. 3a); DHEA ($\Delta 5$ -androstene- 3β -ol-17-ona) formada por 19 átomos de carbono (Fig. 3b). La síntesis de PREG se lleva a cabo en las mitocondrias de varios órganos y tejidos que producen hormonas esteroideas y los órganos más comunes son: las glándulas adrenales, el hígado, la piel y las gónadas (testículos y ovarios). Aunque también otros tejidos, como el cerebro y la retina, tienen la capacidad de producir PREG (Guarneri, et al., 1994). La importancia particular de la PREG radica en ser el precursor básico que origina a DHEA, la cual es convertida hacia andrógenos y estrógenos.

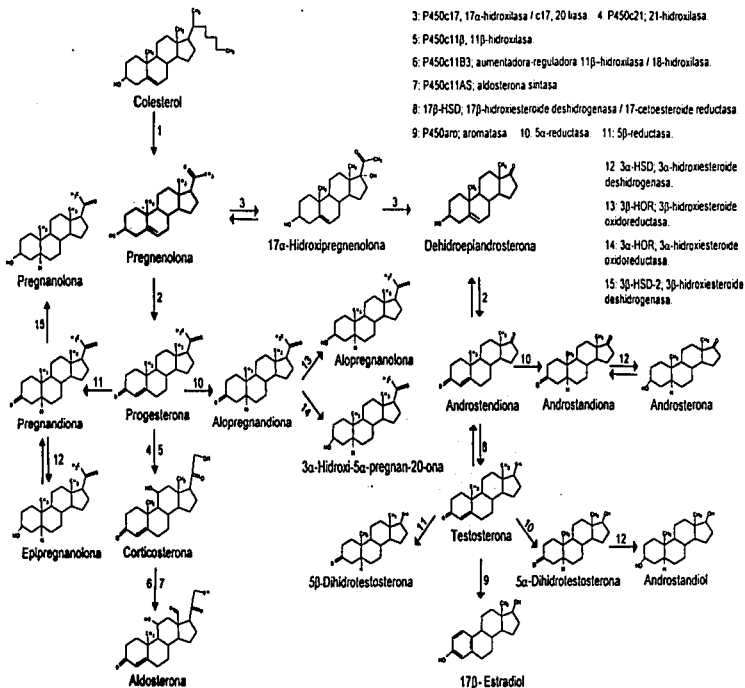


Fig. 2: Biosíntesis de hormonas esteroides. La conversión de colesterol a pregnenolona ocurre en la mitocondria, mientras que el resto de las reacciones ocurren en el compartimiento microsomal. Las enzimas involucradas en las conversiones están numeradas en las reacciones y se identifican en el recuadro de la figura.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

Desde la década de los 40's, la PREG ha sido usada experimentalmente y en terapéutica; cuando se encontró que incrementaba la productividad, reducía el estrés y podría ser un excelente antiinflamatorio, sustentando su uso en el tratamiento de artritis reumatoide y alergias (Guth, et al., 1994; Roberts, 1995).

DHEA y su éster sulfatado (DHEAS) se secretan en respuesta a adrenocorticotropina (ACTH) (Stocco, 2001). La DHEA también se produce en las gónadas, es un intermediario indispensable en la síntesis de esteroides sexuales masculinos y femeninos y es la hormona más abundante en el torrente sanguíneo junto con su éster sulfatado. DHEA se encuentra libre en el plasma sanguíneo y se une ligeramente a la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG), mientras que DHEAS se une a la albúmina y forma un reservorio en circulación (Longcope, 1996). Mucho se ha publicado respecto a los efectos potenciales de DHEA sobre varios sistemas. A pesar de la identificación de DHEA y DHEAS hace más de 50 años, existe aún una considerable controversia sobre el papel fisiológico de ambas hormonas. Se ha postulado que DHEA tiene efectos anti-envejecimiento y que la variación en sus niveles séricos puede ser vista como un posible marcador del envejecimiento fisiológico (Rudman, et al., 1990; Morales, et al., 1994).

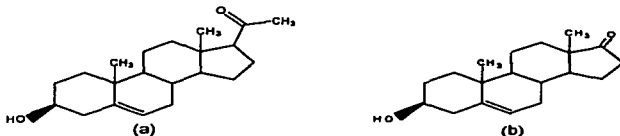


Fig. 3: Estructura química de pregnenolona (a) y dehidroepiandrosterona (b).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3 Niveles plasmáticos de PREG y DHEA en el organismo

Los niveles endógenos de PREG declinan con la edad, de una manera similar que los niveles de DHEA (Labrie, et al., 1997). Se ha reportado que el estrés, la depresión, el hipotiroidismo y la exposición a toxinas son factores que se encuentran asociados a una disminución en la producción de PREG y DHEA (Kroboth, et al., 1999; Fabian, et al., 2001). Sin embargo, los niveles normales de PREG, a diferentes edades para cada sexo en el humano, no han sido claramente establecidos como para DHEA.

De esta manera, estudios realizados para la determinación plasmática de PREG, bajo varias condiciones fisiológicas, muestran que en sujetos del sexo masculino, púberes y adultos, los valores plasmáticos están en el mismo rango de concentración: 4.9 y 2.7 nM, respectivamente (Abraham, et al., 1973). La concentración de PREG en recién nacidos es muy elevada, aproximadamente de 57 nM (Abraham, et al., 1973; Mathur, et al., 1980). Así, los niveles disminuyen significativamente a partir de los 20 hasta los 80 años de 5.5 a 1.2 nM aproximadamente, es decir, un 78% (Belanger, et al., 1994; Labrie, et al., 1997). El comportamiento de los niveles de PREG en las mujeres es similar al de los hombres; PREG disminuye de 3.8 a 2.0 nM; es decir, un 45% a partir de los 20 hasta los 80 años (Labrie, et al., 1997). Por el contrario se reporta que, de los 20 hasta los 80 años los niveles de PREG en el hombre disminuyen de 3.0 hasta 1.3 nM y en mujeres de 3.9 hasta 1.2 nM, (Hill, et al., 1999); encontrando que los picos de concentración son más bajos en hombres que en mujeres.

Como se ha mencionado los esteroides adrenales DHEA y DHEAS, son los esteroides más abundantes que circulan en el plasma humano y su concentración plasmática disminuye con la edad. DHEA está presente en el recién nacido en concentraciones elevadas, entre 9.0 y 16 nM (Abraham, et al., 1973; Mathur, et al., 1980), pero es muy poca la cantidad de DHEA que se produce a partir de los 6 meses de vida, lo cual se revierte al inicio de la pubertad, donde los niveles aumentan continuamente, presentando el pico máximo en la segunda década de la vida. Después de los 30 años hay una disminución progresiva en los niveles de DHEA y DHEAS en hombres y mujeres; la disminución es aproximadamente de 7% por década en hombres (Orentreich, et al., 1984; Belanger, et al., 1994). Sin embargo, la tasa de disminución en los niveles de DHEA es diferente en ambos sexos: 80.1% en hombres y del 69.7% en mujeres, entre el periodo de edad de los 20 y 80 años, por ejemplo: DHEA disminuye de 22.7 a 4.5 nM en hombres y de 23.8 a 7.2 nM en mujeres (Labrie, et al., 1997). Se estima que alrededor de los 70 años de edad, sólo se produce un cuarto de la cantidad producida en la juventud y a los 90 años, tal vez un décimo, tanto en hombres como en mujeres (Ravaglia, et al., 1996).

El embarazo representa un estado endocrino especial, donde los niveles hormonales son de gran importancia. La concentración de PREG aumenta considerablemente durante el embarazo, alcanzando una concentración plasmática entre 35.7 y 57.3 nM al final de la gestación (Mathur, et al., 1980; Murphy, et al., 2001; Riepe, et al., 2002). Mientras los niveles de DHEA no aumentan significativamente, así no existe cambio en la concentración de DHEA al inicio y al final del embarazo, manteniéndose una concentración entre 15 y 25.6 nM, dependiendo si hubo o no trabajo de parto (Buster, et al., 1979; Mathur, et al., 1980).

Un caso de interés particular en los niveles de DHEA y PREG, lo representa las concentraciones de estos esteroides en el cerebro humano, donde los valores de PREG son mayores que los de DHEA (Lanthier y Patwardhan, 1986); 74 y 6.5 veces más, respectivamente, que los niveles en plasma (Lacroix, et al., 1987). Las altas concentraciones de PREG, son atribuidas a la existencia de una vía biosintética independiente de las glándulas endocrinas periféricas, así como también a la acumulación progresiva de esteroides durante toda la vida.

1.4 Efectos biológicos de PREG y DHEA

En la década de 1940, los investigadores empezaron a experimentar con el uso de PREG, concluyendo que esta hormona podía ser una ayuda en el tratamiento del estrés, incrementando la energía en quienes estaban fatigados (Roberts, 1995). Sin embargo, al mismo tiempo se descubrió la cortisona, quién le robó atención al uso terapéutico de la PREG.

Se han estudiado muchos efectos de PREG, principalmente sobre el sistema nervioso. PREG, DHEA y sus ésteres sulfatados, han sido considerados como neuroesteroides. Estudios en ratas indican efectos sobre la memoria (Isaacson, et al., 1995). En hombres saludables de entre 20 y 30 años, la administración de PREG mejoró la calidad del sueño y disminuyó el insomnio (Steiger, et al., 1993). En un estudio de la respuesta al estrés en ratas, se observó un aumento en la ansiedad después de la administración de PREG; sugiriendo un efecto benéfico durante un periodo estresante (Melchior y Ritzmann, 1994). Aunque existen numerosos datos que

describen efectos de aumento en la memoria por la administración de PREG o su éster sulfatado en roedores adultos de ambos sexos (Flood, et al., 1992; Isaacson, et al., 1995; Vallée, et al., 2001), la relevancia fisiológica de estos efectos está abierta a discusión. En un modelo de daño a la médula espinal de rata, la administración de PREG, junto con un antiinflamatorio y un modulador inmune, resultó en una mejoría estadísticamente significativa en la función motora, en relación a los controles (Guth, et al., 1994). También se ha reportado que en individuos con depresión frecuente o con una historia de depresión, los niveles de PREG fueron significativamente más bajos que en personas saludables (George, et al., 1994).

Con respecto a los efectos de PREG sobre el miometrio, hay pocos reportes en la literatura. Un estudio indica que el sulfato de PREG incrementa las contracciones de útero de conejo (Majewska y Vaupel, 1991), mientras que otro estudio muestra que PREG y sus derivados 20α y 20β -hidroxi-PREG ejercen un efecto relajante dependiente de la concentración sobre las contracciones uterinas inducidas por potasio (KCl) en ratas (Hidalgo, et al., 1996).

Referente a DHEA y a pesar de la abundancia de esta hormona en el organismo, su papel fisiológico aún no ha sido establecido. Su efecto estrogénico o androgénico reportado por algunos investigadores, depende del balance homeostático en la secreción de hormonas sexuales. DHEA tiene un efecto androgénico y estrogénico en el tejido miometrial y en las células de cáncer de mama (Ebeling y Koivisto, 1994), además estos autores proponen que DHEA funciona tanto como un estrógeno como un andrógeno. Así, la diferencia en sus efectos depende de la concentración hormonal en el medio. En la mujer premenopáusica hay una alta concentración de estrógenos que

contrarrestan el efecto androgénico de DHEA; sin embargo, en la mujer posmenopáusica, al disminuir la concentración de estrógenos, la DHEA revierte su efecto y funciona como un estrógeno evitando el efecto del nuevo medio hormonal de predominio androgénico y tendría como consecuencia la protección de la patología cardiovascular. La administración de DHEA se ha visto como un posible tratamiento para la enfermedad de Alzheimer (donde las concentraciones plasmáticas de DHEA y DHEAS, son marcadamente disminuidas), ya que tiene un posible efecto reductor del deterioro cognitivo, además del aumento en los procesos de memoria y el aprendizaje (Kroboth, et al., 1999; Vallée, et al., 2001).

Algunos trabajos ponen de manifiesto el papel protector de DHEA en otras patologías: DHEA reduce el desarrollo de aterosclerosis acelerada en trasplantes de corazón (Eich, et al., 1993) y estimula la producción de citocinas (*IL-2*) en ratones (Daynes, et al., 1990) provocando un aumento de la respuesta inmune (Kroboth, et al., 1999). Se ha propuesto que al igual que otros neuroesteroides, DHEAS actúa directamente sobre la membrana incrementando los efectos del glutamato y reduciendo los efectos del GABA (Majewska, 1992). Se han detectado niveles bajos de DHEA y DHEAS en diversos fluidos del cuerpo (sangre, fluido sinovial y frotis salivares) de pacientes de ambos sexos con artritis reumatoide, sugiriendo la posibilidad de un papel patogénico por los niveles disminuidos de los andrógenos inmuno-supresivos (Cutolo, et al., 2002). Otro efecto conferido es el antiestresante, debido a que DHEA revierte las patologías asociadas al estrés inducido por la inmovilización de ratas macho, así DHEA disminuye la peroxidación lipídica en hígado y corazón (Hu, et al., 2000). Mientras que la administración oral de DHEA en ratas obesas reduce la ingesta de alimento y por lo tanto el peso corporal, produciendo un efecto anti-obesidad (Abadie, et al., 1993). Otras

patologías donde se reporta niveles plasmáticos disminuidos de DHEA son: la anorexia nervosa, la etapa final de la enfermedad renal, la diabetes mellitus no insulino-dependiente y en el lupus eritematoso sistémico.

Respecto al efecto de DHEA sobre músculo liso vascular y miometrial, existen muy escasos estudios. DHEA evita la hipertensión inducida por dexametasona en ratas, de manera dosis-dependiente (Shafagoj, et al., 1992), lo cual sugiere un efecto vasodilatador por parte de DHEA. Posteriormente, se demostró que en el hurón, DHEA revierte la vasoconstricción pulmonar aguda producida por hipoxia y que también revierte el efecto de KCl sobre la vasculatura pulmonar, además de incrementar la actividad de canales de K^+ operados por Ca^{2+} (Farrukh, et al., 1998). DHEA también ejerce vasodilatación en aorta torácica aislada de rata, de manera dependiente de la concentración (Silva, 2002). También, DHEAS fue postulado como una hormona vasoactiva, por ejercer vasodilatación en anillos aórticos y arteriales de rata (Barbagallo, et al., 1995). Respecto a su efecto en músculo liso no vascular, Ishida, et al., (1972) reportaron un fuerte efecto inhibitorio por DHEA sobre las contracciones inducidas por diferentes agentes contráctiles en preparaciones aisladas de ileum de cobayo y útero de rata. Posteriormente, otro estudio realizado sobre contracciones espontáneas uterinas de rata mostró que la administración *in vitro* de DHEA provoca un débil efecto inhibitorio de la respuesta contráctil, en comparación con el efecto que provocaron andrógenos con configuración 3α -hidroxi- 5α en el anillo A, androsterona y androstandiol, pero con una potencia similar a la inducida por testosterona (Kubli-Garfias, et al., 1980). Sin embargo, estas evidencias han quedado marginadas y no existe información reciente disponible sobre la posible regulación fisiológica que DHEA pudiera tener sobre el fenómeno de la contractilidad del músculo liso.

1.5 Mecanismo de acción genómico y nogenómico de hormonas esteroides

Los efectos de las hormonas esteroides que son mediados por la modulación de la expresión de genes ocurren en un tiempo prolongado de horas o varios días (acción genómica). Otras respuestas de las hormonas esteroides son mucho más rápidas y toman lugar en segundos o minutos (acción nogenómica).

1.5.1 Acción genómica

De acuerdo al modelo clásico de la acción de hormonas esteroides, la molécula esteroidal entra a la célula por difusión pasiva a través de la membrana lipídica o asistida por proteínas transportadoras; el esteroide se une al receptor específico de esteroides que se localiza principalmente en el citosol. La unión hormona-receptor induce un cambio conformacional en la proteína receptora, el cual es acompañado de una disociación de proteínas accesorias, de ese modo adquiere la capacidad de unirse a sustancias aniónicas como el DNA. En el núcleo, el complejo hormona receptor se une al DNA y modula la transcripción de genes. La longitud del tiempo entre la entrada del esteroide y la acumulación de cantidades significativas de proteínas recién formadas es del orden de horas y la vía completa es sensible a inhibidores particulares, tales como actinomicina D o cicloheximida (Revisado por Lösel y Wehling, 2003).

1.5.2 Acción nogenómica

En 1942, Hans Selye notó que algunos esteroides inducían efectos (tales como la anestesia) en sólo minutos después de su aplicación. Así, el reporte de Selye fue el

primero en detallar una acción nogenómica para las hormonas esteroides. Estudios *in vitro* sobre la modulación del intercambio de iones Na^+ por aldosterona en eritrocitos de perro contribuyeron con más evidencias para la acción nogenómica de esteroides (Revisado por Lösel y Wehling, 2003). Muchos esteroides inducen fenómenos que ocurren rápidamente, por ejemplo; la reacción acrosoma, la cual es inducida por progesterona y toma lugar segundos después de que el espermatozoide entra en contacto con este esteroide (Revisado por Lösel y Wehling, 2003). Otro ejemplo es la rápida disminución de la contractilidad uterina producida por testosterona, progesterona y algunos de sus metabolitos 5-reducidos (Revisado por Perusquía, 2001). Las acciones nogenómicas con frecuencia involucran la generación de segundos mensajeros intracelulares y varias cascadas de transducción de señales, tales como flujo de iones (frecuentemente calcio), modulación de AMP cíclico y vías de proteínas cinasas. Además, los efectos de las acciones nogenómicas no son debilitados por inhibidores de la transcripción, tal como actinomicina D, siendo también insensibles a cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas.

1.6 Actividad contráctil del músculo liso uterino

La regulación de la contracción miométrial es de primordial importancia para el mantenimiento del embarazo y para desencadenar el trabajo de parto. Las células del músculo liso dependen en gran medida del aumento de la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) para contraerse, este fenómeno puede ser causado por estimulación nerviosa de las fibras musculares, estimulación hormonal o por cambios en el ambiente químico de la fibra. En la célula miométrial, como en otras células de

músculo liso, existe una gran cantidad de la proteína calmodulina (16.7 kDa), la cual reacciona con cuatro iones de calcio, formando el complejo 4Ca^{2+} -calmodulina. Cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es aumentada, este complejo activa a la enzima miosina cadena ligera cinasa (MLCK) (Revisado por Savineau y Marthan, 1997). La MLCK fosforila a la cadena ligera reguladora de 20 kDa (LC_{20}), la fosforilación de la LC_{20} permite que miosina ATPasa sea activada por actina, causando así la contracción (Revisado por Savineau y Marthan, 1997). Por el contrario, la relajación del músculo liso se produce cuando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ disminuye a un nivel crítico, provocando la inactivación de la MLCK por disociación del complejo calcio-calmodulina, lo cual permite que la enzima miosina cadena ligera fosfatasa (MLCP), que se localiza en el citoplasma, separe el fosfato de la cadena ligera reguladora. Esta enzima se une a miosina y su actividad no es dependiente del calcio (Revisado por Savineau y Marthan, 1997; Guyton y Hall, 2000). La desfosforilación de la MLCP es regulada negativamente por las proteínas G; rhoA, rho asociada cinasa (ROK) y la proteína cinasa C (PKC) y regulada positivamente por GMPc (Sanborn, 2001).

Los fármacos pueden provocar cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de la célula de músculo liso uterino, por promover o inhibir el influjo o el eflujo de calcio. Así, los agonistas unidos a su receptor específico pueden iniciar: (1) una contracción al aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por activación de canales de calcio operados por voltaje (VOC) o por receptor (ROC) y por la liberación de calcio del retículo sarcoplasmático (SR) por medio de 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3); o (2) una relajación por disminuir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por inactivación de los VOC o ROC; por secuestro intracelular de calcio o por el aumento del eflujo de calcio del citoplasma.

Agentes contráctiles del músculo liso, tales como acetilcolina, oxitocina y prostaglandinas aumentan la concentración intracelular de calcio. Por lo tanto, las prostaglandinas, PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ u oxitocina disminuyen la recaptura de calcio dependiente de ATP; de manera interesante, PGE_2 puede también liberar calcio. Una gran variedad de agentes, tales como bloqueadores de la entrada de calcio y/o hormonas esteroides, son capaces de bloquear el influjo de calcio. También se asume que el aumento del segundo mensajero, AMPc, es el mediador de los efectos relajantes de una variedad de agentes tales como los agonistas β -adrenérgicos (Revisado por Perusquía, 1999).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la ruta metabólica del colesterol hacia hormonas esteroideas, compuestos 3β -hidroxi- $\Delta 5$, tales como pregnenolona (PREG) y dehidroepiandrosterona (DHEA); así como sus ésteres sulfatados, son formados en células endocrinas. Hasta hace poco tiempo, estos dos compuestos habían sido reconocidos solamente como productos/substratos de las sucesivas reacciones químicas que dan origen a la estructura de hormonas activas. Sin embargo, en la actualidad estas dos hormonas parecen jugar un importante papel fisiológico, por tener actividades farmacológicas propias; e.g., en el sistema nervioso central, ejerciendo disminución de la excitabilidad.

Los productos del metabolismo de estos dos precursores, regulan una amplia gama de efectos biológicos, entre los que se encuentra la importante modulación de la actividad contráctil uterina. Así, numerosas evidencias experimentales han mostrado que la producción de metabolitos, que pueden ser más o menos activos que los precursores $\Delta 4$ -3ceto (progesterona y testosterona) y los derivados 5-reducidos, podría ser importante en la regulación de los efectos endocrinos de los esteroideos en la reproducción. Por lo que resulta interesante estudiar el potencial efecto modulador de los precursores 3β -hidroxi- $\Delta 5$ (PREG y DHEA) sobre la contractilidad uterina.

3. HIPÓTESIS

Con base en la estructura esterooidal común que presentan los precursores 3 β -hidroxi- Δ 5, con esteroides sexuales de acción relajante conocida, se espera que PREG y DHEA produzcan también relajación uterina. Sin embargo, se propone que la potencia relajante de PREG y DHEA sea semejante a la de progestinas y andrógenos respectivamente; debido a la similitud estructural que presenta PREG con progestinas y DHEA con andrógenos.

Por la caracterización del efecto quiescente de la progesterona como una acción de tipo nogenómico, se espera que el efecto de los precursores 3 β -hidroxi- Δ 5, sea también una acción independiente de la regulación genómica.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar el efecto antiuterotónico de los precursores de esteroides: pregnenolona (PREG) y dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la actividad contráctil del miometrio aislado de rata en diestro.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. - Construir la curva concentración-respuesta de PREG y DHEA, estableciendo las concentraciones inhibitorias 16, 50 y 84 para cada hormona.
2. - Comparar la potencia útero relajante de PREG y DHEA con la conocida acción inhibitoria ejercida por progesterona sobre la actividad contráctil uterina.
3. - Determinar si la respuesta inducida por PREG y DHEA es a través de la clásica vía de acción de hormonas esteroides (genómica); observando el efecto de éstas hormonas en presencia de inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Modelo animal

Para este estudio se utilizaron ratas hembras vírgenes adultas, de la cepa Wistar de 180-220 g de peso corporal, las cuales se mantuvieron en grupos de 15 animales; 5 ratas por caja, en condiciones de bioterio: temperatura de 20-22°C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas luz/12 horas oscuridad y con acceso al agua y al alimento Harlan (TEKLAD LM 485 Mouse/rat diet 7012) para rata *ad libitum*.

Después de dos ciclos estrales consecutivos, las ratas fueron elegidas en fase de diestro. Esta fase fue determinada por citología; tomando un exudado vaginal diariamente a cada rata con ayuda de una pipeta Pasteur con punta roma que contenía: 0.5 ml de solución salina isotónica al 0.9%, la cual fue depositada en la vagina y retirada inmediatamente mediante un bulbo succionador de goma (Fig. 4). El contenido fue colocado en un portaobjetos de vidrio y analizado en fresco bajo un microscopio óptico (Carl Zeiss junior, modelo K-4D) a un aumento de 10x.

La citología vaginal de la fase de diestro fue determinada por la presencia de abundantes leucocitos y muy escasas células basales. Todas las ratas fueron utilizadas en este estado endocrino, que es caracterizado por niveles bajos de hormonas sexuales, presentando también una alta actividad contráctil miometrial.



Fig. 4: Toma de frotis vaginal.

Los animales elegidos en diestro fueron sacrificados por dislocación cervical y posteriormente, se procedió a realizar la histerectomía con material de microcirugía. El útero fue colocado en una caja petri de doble pared, conectada a un baño recirculador de agua (Haake D1), para mantener la temperatura a 37°C de la solución Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición en mM: NaHCO_3 25.0, NaCl 119.0, KCl 4.6, KH_2PO_4 1.2, MgSO_4 1.2, CaCl_2 1.5, Glucosa 12.0, con burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5% CO_2 y 95% O_2 para estabilizar el pH a 7.4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2 Preparación del tejido uterino y sistema de registro

Bajo estas condiciones, el útero fue separado de los ovarios y limpiado de tejido adiposo y conectivo circundante. Cada cuerno uterino fue cortado transversalmente en anillos de aproximadamente 1 cm de longitud y cada uno fue sujetado en forma vertical, usando hilo de seda (000), para fijar uno de sus extremos a la base de una cámara de incubación y el otro a un gancho pendiente a un transductor de tensión (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A., modelo FT03C). La cámara de incubación contenía 10 ml de solución Ringer Krebs-Henseleit, mantenida a 37°C por medio del baño recirculador y burbujeada continuamente con la mezcla gaseosa para mantener un pH de 7.4 constante.

La actividad contráctil espontánea del útero fue registrada mediante la técnica isométrica para tejido aislado. Así, cada uno de los tejidos, sujetados a diferentes transductores que a su vez fueron conectados a un polígrafo (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A., modelo 79) de 4 canales, para registrar la señal mecánica de la contracción en el gráficator del polígrafo (ver Fig. 5). Por su parte, el polígrafo fue acoplado a una computadora (Pentium III a 1.13 GHz), con un convertidor analógico digital (polyVIEW, versión 2.1, ADM-20002 de Astro-Med Inc. RI., U.S.A.) para capturar y analizar la señal en tiempo real.

En las condiciones antes mencionadas, los tejidos fueron sometidos a una fuerza de tensión de 10 mN (1.0 g de tensión = 2 cm de desplazamiento de la pajilla). Después de mantener dicha tensión, durante un periodo aproximado de 10-20 minutos, la línea basal fue ajustada, dejando que la actividad contráctil uterina se estabilizara a las condiciones *in vitro* durante un período de por lo menos 30 minutos.

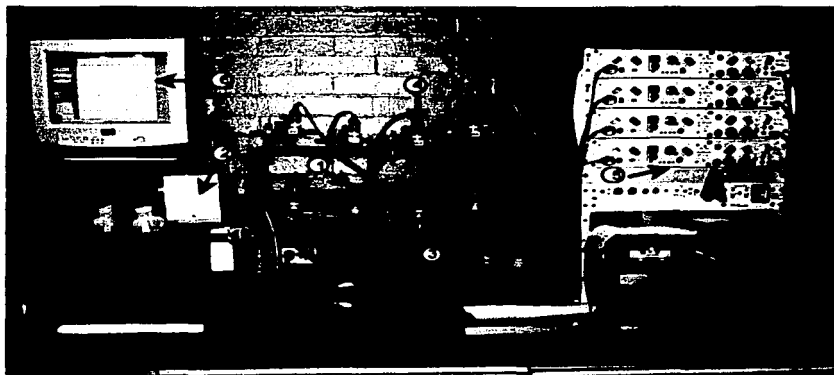


Fig. 5: Sistema de registro isométrico para tejido aislado, mostrando: 1) las cámaras de incubación donde se mantiene al tejido, 2) baño recirculador de agua que alimenta a las cámaras de incubación para mantener una temperatura constante de 37°C, 3) suministro de aeración de la mezcla gaseosa, 4) transductor de tensión, 5) polígrafo y 6) computadora, con convertidor analógico-digital, acoplada al polígrafo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3 Protocolo experimental

i. Curva concentración-respuesta de PREG y DHEA

Después de la estabilización de la contracción espontánea del útero, se registraron 10 minutos de actividad, que fue considerada como control (100% de actividad contráctil). Inmediatamente, se adicionó cada una de las dos hormonas de prueba, PREG y/o DHEA, aplicando cada hormona por separado y a diferentes concentraciones (2, 20 y 200 μM) de manera no acumulativa; *i. e.*, cada concentración en diferente muestra proveniente de diferentes animales. El efecto fue registrado también durante 10 minutos y comparado con el control (100%) en términos de porcentaje de inhibición de la actividad contráctil. Después de registrar el efecto (10 min), la hormona fue retirada del tejido mediante recambio de la solución Ringer (lavado), para observar la recuperación de la actividad contráctil espontánea y la viabilidad del útero. Cada ensayo se repitió por lo menos 6 veces ($n \geq 6$), para cada concentración de las dos hormonas. Previamente se realizó el control del efecto del vehículo (etanol 0.1%) en el cual se disolvió y administró el esteroide, usando el mismo protocolo experimental.

Con los datos obtenidos se elaboró la curva concentración-respuesta de cada hormona, de acuerdo al método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Se obtuvo el valor de la concentración inhibitoria media (CI_{50} : concentración de la hormona a la cual se produce el 50% de inhibición de la actividad contráctil espontánea del útero de rata), los límites de confianza y el valor de la pendiente de la recta.

ii. Relación de potencia

Con el objeto de comparar la potencia relajante de PREG y DHEA con la que ejerce la progesterona (hormona que juega un papel muy importante en el mantenimiento del embarazo, por su acción útero-relajante) sobre la actividad contráctil uterina, se realizó un análisis de potencia a la CI_{50} de las hormonas en estudio, comparando con la CI_{50} de progesterona, reportada previamente (Kubli-Garfias, et al., 1979).

La potencia fue calculada por la siguiente fórmula:

$$POTENCIA = \frac{CI_{50} \text{ de progesterona}}{CI_{50} \text{ de la hormona de prueba}}$$

Dando un valor de 1.00 a progesterona.

iii. Caracterización del efecto

Con el propósito de determinar si la respuesta que inducen las hormonas es a través del modelo clásico de la acción de hormonas esteroides, se desarrolló el siguiente protocolo:

Después de la estabilización de la contracción espontánea del útero, se registraron 10 minutos de actividad y posteriormente se incubó al tejido por 30 minutos, con un inhibidor de la transcripción (actinomicina D 10 μM) o con un inhibidor de la

síntesis de proteínas (cicloheximida 40 μM), antes de la adición de la hormona a la concentración máxima de 200 μM y la respuesta fue cuantificada durante 10 min. Así, se hicieron las comparaciones entre el efecto de la hormona con y sin tratamiento. Previamente se realizó la prueba del potencial efecto que pudiera ejercer el vehículo de los inhibidores y la hormona sobre la actividad contráctil uterina.

5.4 Cuantificación de los datos

El efecto producido por las hormonas o el vehículo sobre la actividad espontánea del útero, se determinó cuantificando el área bajo la curva de las contracciones, mediante el programa de captura polyVIEW (versión 2.1, ADM-20002 de Astro-Med Inc. RI., U.S.A.). El efecto de cada compuesto fue determinado en términos de porcentaje de inhibición de la actividad contráctil uterina, mediante el procedimiento antes descrito.

Cada concentración analizada fue la media de $n \geq 6 \pm$ desviación estándar de la media (DEM) para cada compuesto. Se utilizó la prueba de *t* de "student" no pareada para la comparación del efecto de las diferentes concentraciones de cada esteroide y del efecto del vehículo. También con esta prueba, se realizó la comparación estadística de los resultados del efecto máximo (E_{max}) de la hormona (200 μM) en presencia de cicloheximida o actinomicina D. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. Finalmente, para comparar las curvas concentración-respuesta se utilizó la prueba estadística ANADEV.

5.5 Compuestos utilizados

Todos los compuestos fueron adquiridos de Sigma Chemical Co., St. Louis MO., U.S.A.: Δ^5 -pregnen-3 β -ol-20-ona (pregnenolona, PREG), Δ^5 -androsten-3 β -ol-17-ona (dehidroepiandrosterona, DHEA), actinomicina D (diactinomicina) y cicloheximida (3-[2-(3,5-dimetil-2-oxociclohexil-2-hidroxietil)]-glutarimida). Todos los compuestos fueron disueltos en etanol absoluto (Merck-México, S.A.), adicionando a cada cámara de incubación un volumen final de 0.1% en 10 ml de la solución Ringer Krebs-Henseleit, que corresponde a 17.14 mM. Cabe aclarar que para el caso de PREG 200 μ M, el volumen final del vehículo fue 0.2% en 10 ml de la solución fisiológica. Actinomicina D se conservó en oscuridad, en un frasco color ámbar, por ser fotosensible.

6. RESULTADOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.1 Curva concentración-respuesta de PREG y DHEA

La contracción uterina espontánea no fue modificada significativamente ($p > 0.05$) por la adición del vehículo (etanol 0.1% para todas las concentraciones usadas y 0.2% para 200 μM de PREG). Sin embargo, ambas hormonas (PREG y DHEA) inducen una disminución en la amplitud de la contracción espontánea uterina. Cabe destacar que el efecto relajante de DHEA fue inmediato (~ 1 min) y reversible, después de retirar a la hormona del tejido (Fig. 6).

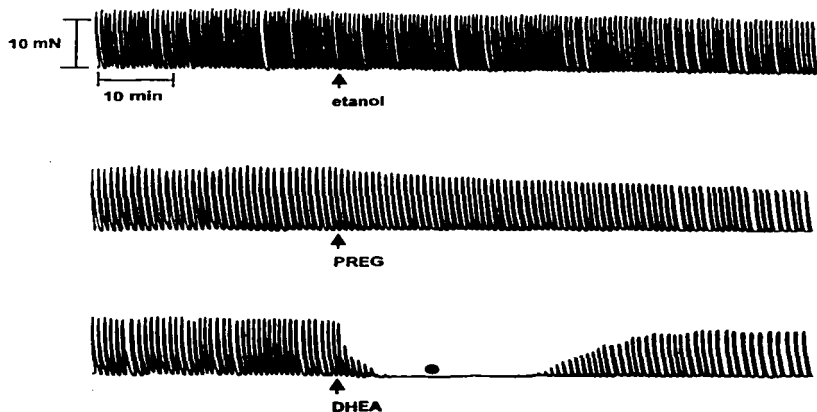


Fig. 6: Registros típicos de la actividad contráctil uterina *in vitro* de la rata en diestro, en donde se muestra: el efecto no significativo del vehículo (etanol 0.1%) y el efecto útero relajante de pregnenolona (PREG) y dehidroepiandrosterona (DHEA) a 200 μM . La flecha indica el momento de la adición del compuesto y el círculo cerrado representa el recambio de la solución (lavado). Nótese que al retirar DHEA del tejido, la actividad contráctil uterina es recuperada.

DHEA mostró un agudo efecto relajante inmediato sobre la contracción espontánea uterina (Fig. 6), el cual depende de la concentración (Tabla I y Fig. 7). En contraste, PREG mostró un tenue, pero significativo ($p < 0.05$) efecto relajante (Fig. 6), observado por disminución de la amplitud de la contracción espontánea uterina. En la Fig. 8 se observa la comparación entre el efecto de ambos esteroides (PREG y DHEA), donde se muestra que la relajación producida por PREG no fue dependiente de la concentración, mientras el efecto de DHEA es lineal en relación a la concentración, siendo DHEA marcadamente más potente que PREG para inducir relajación uterina (Tabla I y Fig. 8).

Tabla I. Valores del porcentaje de relajación inducido por PREG y DHEA sobre la contracción espontánea del útero de rata en diestro.

Concentración (μM)	% de relajación $n = 6 \pm \text{DEM}$	
	PREG	DHEA
2	14.34 \pm 3.36	14.63 \pm 2.35
20	20.73 \pm 2.81	38.54 \pm 5.44
200	25.05 \pm 2.79	80.74 \pm 2.43

El efecto relajante de las diferentes concentraciones de PREG y DHEA fue significativamente diferente ($p < 0.05$) entre todas las concentraciones probadas y respecto al efecto del vehículo (etanol). El efecto de PREG y DHEA a 2 μM no fue significativamente diferente ($p > 0.05$).

TESIS CON
FOLIA DE GRUPO

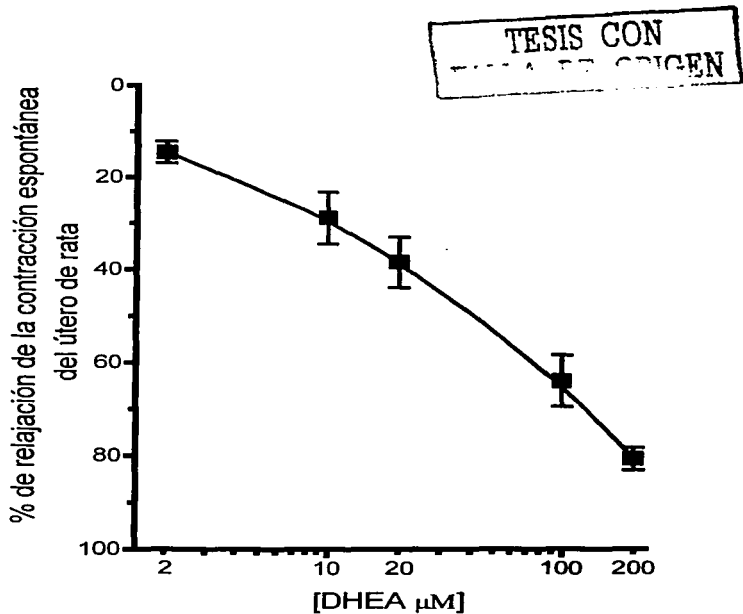


Fig. 7: Curva concentración-respuesta de DHEA sobre la contracción espontánea del útero aislado de rata en diestro. Cada símbolo representa la media ($n = 6$, \pm DEM con excepción de 10 y 100 μM , $n = 2$ y $n = 3$, respectivamente).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

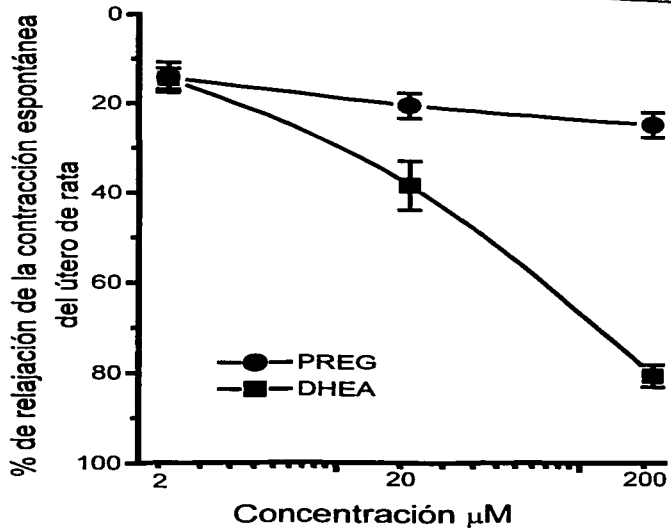


Fig. 8: Curva concentración-respuesta de PREG y DHEA sobre la contracción espontánea del útero aislado de rata en diestro. Cada símbolo representa la media ($n = 6$) \pm DEM. Valor significativamente diferente (* $p < 0,0001$ y ** $p < 0,00001$) al comparar entre la misma concentración. El comportamiento de ambas curvas fue significativamente diferente ($p < 0,00005$).

Por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949) se calculó la pendiente de la recta de cada curva y se determinaron las concentraciones inhibitorias (CI) 16, 50 y 84, con los límites de confianza para la CI₅₀ (Tabla II).

Tabla II. Concentraciones inhibitorias (CI) 16, 50 y 84 de PREG y DHEA sobre la contracción espontánea del útero de rata en diestro.

HORMONA	CI ₁₆ (μM)	CI ₅₀ (μM)	CI ₈₄ (μM)	LIMITES INFERIOR-SUPERIOR DE LA CI ₅₀	PENDIENTE DE LA RECTA
PREG	3.52	7.86 X 10 ⁶ *	1.75 X 10 ¹³ *	563.18 - 1.09 X 10 ¹¹	5.35
DHEA	2.72	29.05	310.36*	6.23 - 135.45	33.05

*Valores teóricos, obtenidos por extrapolación de la recta.

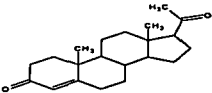
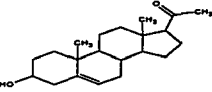
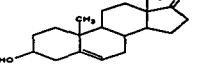
6.2 Relación de potencia

Al comparar la potencia inhibitoria de PREG y DHEA con respecto a progesterona, se aprecia que PREG fue marcadamente menos potente que progesterona para inducir relajación uterina en la rata. En contraste, DHEA mostró una potencia igual o ligeramente mayor a la ejercida por progesterona (Tabla III). Así, se observa que la relación de potencia para inducir relajación uterina es:

Progesterona \geq DHEA \gggg PREG.

Los valores de la CI_{50} de progesterona y DHEA son prácticamente iguales (Tabla III) y se puede decir que estas dos hormonas son equipotenciales para relajar el útero de rata.

Tabla III. Relación de la potencia relajante de progesterona y sus precursores sobre la contracción espontánea del útero de rata en diestro.

COMPUESTO	CI_{50}	POTENCIA*	ESTRUCTURA
PROGESTERONA	25.44 μ M	1.00	
PREG	7.86 M	0.000003	
DHEA	29.05 μ M	0.87	

*La potencia fue evaluada por la fórmula: CI_{50} de progesterona / CI_{50} de la hormona de prueba, asumiendo un valor de 1.00 para progesterona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.3 Caracterización del efecto inhibidor de la actividad contráctil

El vehículo de los inhibidores de la transcripción o de la síntesis de proteínas más la adición del vehículo de la hormona (etanol 0.1% para cada compuesto), no modificó significativamente la actividad contráctil uterina ($p > 0.05$), como puede observarse en la Fig. 9A. Asimismo, el marcado efecto relajante de DHEA a la máxima concentración probada (200 μM), no fue modificado significativamente por el pretratamiento con 10 μM de actinomicina D ($p > 0.5$) o 40 μM de cicloheximida ($p > 0.1$), (Fig. 9 BC y 10). También se observó una recuperación de la actividad contráctil uterina después de retirar los compuestos del tejido (Fig. 9 BC).

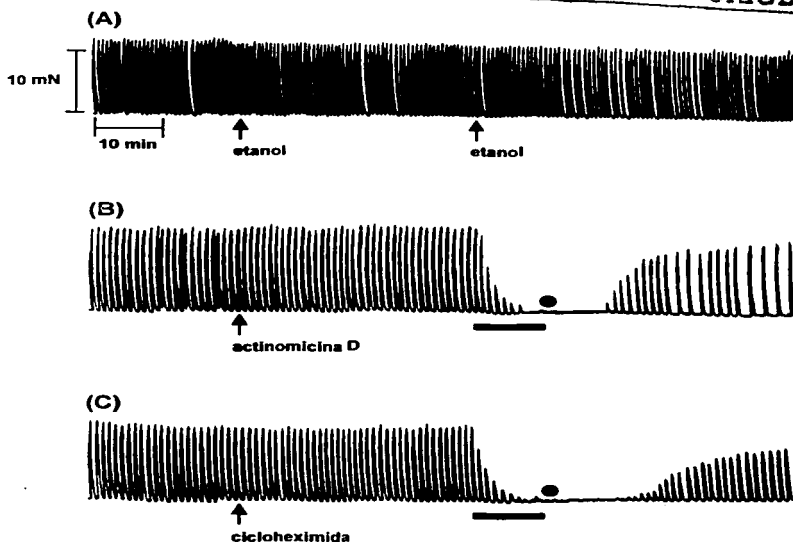


Fig. 9: Registros típicos de la actividad contráctil espontánea del útero aislado de rata en diestro. A) La actividad contráctil uterina no fue modificada significativamente ($p > 0.05$) por el vehículo utilizado para el inhibidor y la hormona (etanol 0.1% para cada caso). La relajación inducida por DHEA (200 μM) no fue bloqueada por B) el inhibidor de la transcripción (actinomicina D 10 μM) o por C) el inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida 40 μM). La barra negra representa el tiempo de incubación de DHEA, el círculo cerrado representa el recambio de la solución (lavado). Nótese que la actividad contráctil uterina es recuperada cuando DHEA y los compuestos de cada tratamiento son retirados del tejido.

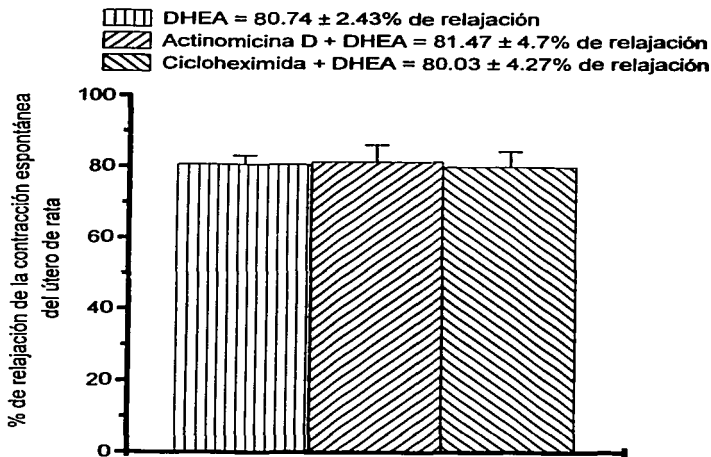


Fig. 10: Comparación del efecto de DHEA a la concentración máxima probada ($200 \mu\text{M}$) sobre la contracción espontánea de útero de rata en diestro, en presencia de inhibidores de la transcripción (actinomicina D $10 \mu\text{M}$) y de la síntesis de proteínas (cicloheximida $40 \mu\text{M}$). El efecto relajante de DHEA no fue significativamente diferente con respecto al pretratamiento con actinomicina D ($p > 0.5$) o con respecto a cicloheximida ($p > 0.1$). Cada barra representa la media $n = 6 \pm \text{DEM}$.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

7. DISCUSIÓN

7.1 General

Los resultados del presente estudio muestran que PREG y DHEA son capaces de disminuir la actividad contráctil uterina de la rata, evidenciando que estos esteroides son compuestos útero activos, por producir relajación uterina. Este hecho revela que los precursores 3β -hidroxi- Δ^5 , tales como PREG y DHEA, no tienen únicamente el papel de producto/sustrato de las sucesivas reacciones que dan origen a la estructura de hormonas esteroides con actividad biológica, sino que PREG y DHEA son verdaderas hormonas con actividad propia; i) por regular la contracción uterina, como ha sido demostrado en este estudio, ii) por ser neuromoduladores de la excitabilidad neuronal y iii) por ser compuestos vasoactivos. Estas dos últimas respuestas han sido consideradas como acciones membranales independientes de los receptores intracelulares de esteroides (Majewska, 1992; Baulieu, 1997; Farrukh et al., 1998; Silva, 2002).

La relajación uterina producida por PREG y DHEA se pudo observar inmediatamente después de su adición, cabe también señalar que en este estudio se observó una recuperación de la actividad contráctil espontánea del útero, después de retirar a la hormona del tejido (lavado), mostrando que el efecto útero-relajante es reversible. La respuesta observada entre ambas hormonas mostró diferente comportamiento: 1) El efecto relajante de PREG fue tenue pero significativo, entre 14 y 25% de relajación (a todas las concentraciones probadas), éste efecto relajante fue evidente por la disminución de la amplitud de la contracción; sin embargo, el efecto no

mostró un claro comportamiento lineal dependiente de la concentración. 2) En contraste, DHEA fue capaz de inducir un agudo efecto relajante, que fue claramente dependiente de la concentración. Por lo tanto, el análisis de estos datos manifiestan una marcada diferencia de la potencia de ambas hormonas para inducir relajación uterina.

Es importante considerar, que el efecto de relajación uterina que ejercen PREG y DHEA concuerda con el efecto relajante reportado para sus derivados, como son: progesterona, testosterona y sus metabolitos 5-reducidos sobre la actividad contráctil del miometrio de la rata (Kubli-Garfias, et al., 1979; Kubli-Garfias, et al., 1980; Perusquía, et al., 1990; Perusquía, 2001; Sánchez, et al., 1993; Gutiérrez, et al., 1994) y de humano (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001). Referente a los antecedentes de estas hormonas; PREG y DHEA, como útero moduladores, sólo existe un estudio con DHEA (Kubli-Garfias, et al., 1980) que reporta un tenue efecto relajante, mientras que para PREG, existen dos trabajos; uno con su éster sulfatado, donde en útero de coneja aumenta la actividad contráctil (Majewska y Vaupel, 1991), el otro en útero de rata, donde PREG presenta un efecto antiuterotónico sobre la contracción de potasio (Hidalgo, et al., 1996). Esta controversia indica que hay diferencia entre especies para la acción de la hormona sobre la actividad contráctil uterina.

7.2 Potencia relajante

La potencia relajante de PREG y DHEA fue comparada con la potencia reportada para progesterona en el mismo modelo experimental (Kubli-Garfias, et al., 1979),

observando que DHEA es equipotencial a testosterona. En este estudio encontramos que DHEA es también equipotencial a progesterona, mientras que PREG resultó ser 0.000003 veces menos potente que progesterona. Es importante mencionar que la propiedad quiescente sobre el útero se le ha conferido al producto del metabolismo de PREG, la progesterona (Perusquía, 2001). Sin embargo, algunos de los metabolitos 5-reducidos de progesterona y los compuestos derivados de DHEA, como los andrógenos, pueden inducir un efecto relajante uterino, incluso mayor que el del precursor $\Delta 4,3$ -ceto (progesterona o testosterona) (Kubli-Garfías, et al., 1979; Kubli-Garfías, et al., 1980; Perusquía, et al., 1990; Perusquía, 2001; Perusquía y Jasso-Kamel, 2001). De tal manera, el efecto de los compuestos estudiados podría ser potenciado o sinergizado con el de otros compuestos producto de su metabolismo. En el caso particular del tenue efecto producido por PREG, podría deberse a que el papel principal de PREG sería el de servir como sustrato para originar compuestos de mayor potencia como progestinas 5β -reducidas (Perusquía, 2001). Con respecto a DHEA, es importante destacar que su potencia relajante resultó mucho mayor a la reportada por Kubli-Garfías (1980) y este estudio no consideró a DHEA como una molécula potente para inducir relajación uterina.

La comparación de la potencia de DHEA con el estudio previo (Kubli-Garfías, et al., 1980) y el presente trabajo fue analizada en relación a la sensibilidad uterina a DHEA ($CI_{50} = 107.5 \mu M$ vs $CI_{50} = 29.05 \mu M$, respectivamente), la diferencia podría ser debida a las distintas condiciones experimentales entre ambos estudios; el estudio de Kubli-Garfías et al (1980) utilizó ratas de la cepa Sprague-Dawley, la histerectomía se realizó mediante anestesia con éter, se empleó diferente Ringer (Tris), el vehículo

donde se disolvieron los esteroides fue propilen glicol (0.05 ml) y las concentraciones probadas fueron agregadas de manera acumulativa.

La sensibilidad de la contracción espontánea uterina a PREG de los presentes datos ($CI_{50} = 7.86 \times 10^6 \mu\text{M}$) resultó ser 284,782 veces menos potente con respecto a la sensibilidad de la contracción inducida por KCl ($CI_{50} = 27.6 \mu\text{M}$), reportado en un trabajo previo (Hidalgo, et al., 1996). Esta discrepancia podría también ser debida a las diferencias experimentales entre ambos trabajos; Hidalgo y colaboradores utilizaron ratas estrogenizadas con benzoato de estradiol, decapitadas un día después de la inyección, emplearon diferente Ringer (Solución Jalón a 32°C), el vehículo donde se disolvieron los esteroides fue dimetil-sulfóxido (DMSO), la contracción uterina fue inducida por KCl y las concentraciones probadas fueron agregadas de manera acumulativa. Además, la mayor sensibilidad de la contracción inducida por KCl al efecto de la hormona, sugiere una especificidad en el sitio de acción.

7.3 Descripción estructural química-actividad relajante

La diferente eficacia del efecto relajante producido por PREG y DHEA, puede ser debida a la diferencia estructural que presentan ambas moléculas. La pérdida de los carbonos 20 y 21, con la subsecuente formación de un grupo ceto en C17; para formar DHEA (Fig. 10) aumenta la potencia relajante, *i e.*, en la molécula con estructura $\Delta 5$ es necesario la existencia del grupo ceto en C17. PREG y DHEA son iguales estructuralmente en los anillos A, B y C, por lo que se propone que el anillo D pueda ser

la parte activa de la molécula (farmacóforo). Mientras, la conversión hacia progesterona, donde el doble enlace en C5-6 en el anillo B se isomeriza a C4-5 en el anillo A, que además provoca un cambio conformacional; donde el sistema A-B-C-D de la molécula es orientado en forma más plana, aumentando la potencia relajante de la molécula (Fig. 11).

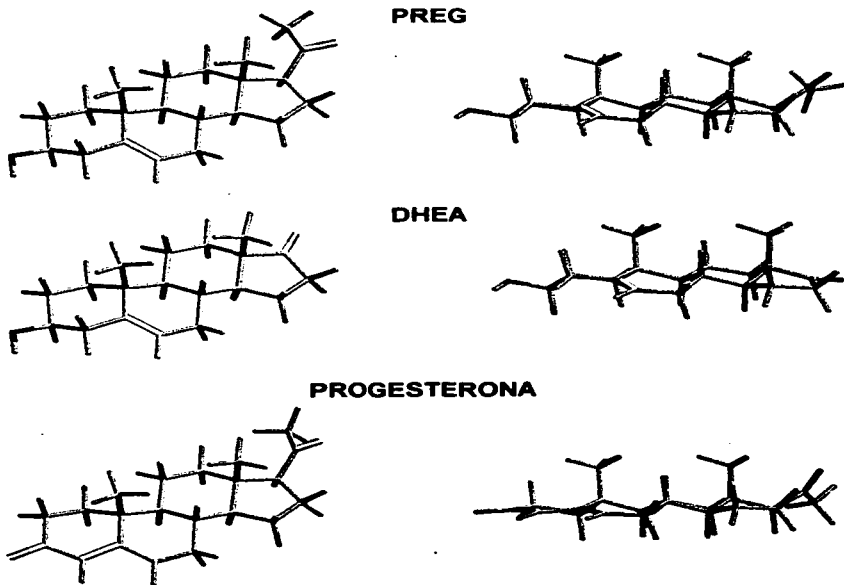


Fig. 11: Representación tridimensional de la orientación espacial de las moléculas en estudio. Vista frontal a la izquierda y lateral a la derecha.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cabe destacar que el grupo ceto en C17 de DHEA es de gran importancia para inducir relajación uterina. Este hallazgo concuerda con trabajos previos que han mostrado que una serie de $5\alpha/\beta$ -androstanoes sin los grupos funcionales ceto e hidroxilo en C17, no tuvieron efecto relajante significativo sobre la actividad contráctil uterina (Navarrete, 1999; Barrera, 2000). Asimismo, es importante mencionar que las subsecuentes modificaciones de DHEA hacia andrógenos o de progesterona hacia progestinas, pueden dar compuestos más activos, cuando son reducidos en C5 e hidroxilados en C3 (Kubli-Garfias, et al., 1979; Kubli-Garfias, et al., 1980; Perusquía, et al., 1990; Perusquía y Campos, 1991; Perusquía, et al., 1991a; Perusquía, et al., 1991b; Perusquía y Kubli-Garfias, 1992; Perusquía y Villalón, 1996; Perusquía, 2001; Perusquía y Jasso-Kamel, 2001).

7.4 Caracterización de la acción relajante

La rápida acción relajante inducida por PREG y DHEA (segundos a minutos) más la reversión del efecto (la actividad contráctil es recuperada al retirar el esteroide del tejido) después del lavado, indica que esta acción no puede ser mediada por la clásica vía de acción de hormonas esteroides, donde se requiere de una duración mucho más prolongada para modificar la síntesis de proteínas. Para sustentar esta propuesta, en este estudio se observó que la relajación producida por esteroides 3β -hidroxi- $\Delta 5$ persiste aún en presencia de los inhibidores de la síntesis de proteínas y de la transcripción. Este hallazgo sugiere que el efecto de PREG y DHEA no es mediado genómicamente y que puede ser categorizado como una acción membranal, de tipo no

genómico, como ha sido reportado para varios de sus derivados (Perusquia, 2001). Además, se ha documentado que han fallado los intentos para aislar y caracterizar un receptor específico intracelular para DHEA (Kalimi y Regelson, 1988; Meikle, et al., 1992; Kawai, et al., 1995; Okabe, et al., 1995; Liu y Dillon, 2002).

El modo exacto de acción nongenómica que los esteroides inducen en la célula miometrial para provocar relajación no es claro. Los escasos datos sobre el efecto de los esteroides adrenales sobre la contracción uterina han señalado que PREG y sus análogos hidroxilados en C20 tienen una acción calcio antagonista, proponiendo que la relajación uterina producida por PREG puede darse por inhibir el influjo de calcio y no se descarta la posibilidad de que intervengan otros mecanismos que inhiban el influjo de calcio (Hidalgo, et al., 1996). Otras evidencias experimentales han sugerido que, el sulfato de PREG puede potenciar las contracciones uterinas en la coneja por suprimir la función de receptores GABA_A (Majewska y Vaupel, 1991).

7.5 Papel fisiológico

Los presentes datos mostraron que PREG y DHEA producen *per se* un efecto relajante sobre la actividad contráctil uterina, que podría ser potenciado o sinergizado con el efecto inducido por la amplia variedad de hormonas esteroides en el tejido, incluyendo compuestos $\Delta 4,3$ -ceto y 5-reducidos. Los niveles plasmáticos de ambas hormonas son ascendentes hasta los 30 años de edad, considerando a éste periodo como la edad reproductiva óptima en las mujeres. A pesar de que los niveles plasmáticos de DHEA durante el embarazo son menores (entre 15 y 25.6 nM) (Buster,

et al., 1979; Mathur, et al., 1980) a los de PREG (entre 35.7 y 57.3) (Mathur, et al., 1980; Murphy, et al., 2001; Riepe, et al., 2002) y a los de progesterona (635.9 nM) (Luisi, et al., 2000; Murphy, et al., 2001), se podría proponer a DHEA como una hormona de interés terapéutico, ya que podría favorecer el efecto relajante durante el embarazo, dado a que el efecto producido por DHEA es mimetizado con el de progesterona, para evitar las contracciones uterinas, logrando así el mantenimiento del embarazo. Estas evidencias proponen a DHEA como un fármaco con propiedades tocolíticas para prevenir abortos y partos prematuros, con utilidad en las áreas médicas de la ginecología y la obstetricia.

Por otra parte, el conocimiento de la relación estructura química-efecto relajante de los esteroides: $\Delta 5$, $\Delta 4$ y 5-reducidos sobre la actividad contráctil uterina, es la base para el desarrollo de nuevos fármacos antiuterotónicos.

8. CONCLUSIONES

- 1. DHEA mostró un agudo efecto relajante, dependiente de la concentración, mientras PREG produce un tenue, pero significativo efecto relajante que no fue dependiente de la concentración.**
- 2. PREG y DHEA son compuestos moduladores de la contracción miometrial, por producir relajación, mostrando que son verdaderas hormonas y no sólo son precursores para la formación de hormonas esteroides.**
- 3. La diferente potencia relajante entre PREG y DHEA, posiblemente se deba a la diferencia estructural de ambas moléculas; la estructura $\Delta 4$ de progesterona y su conformación plana en el anillo A, es importante para ejercer una buena actividad relajante, en la estructura $\Delta 5$ es necesario que exista un grupo ceto en C17, además de la pérdida de C20 y C21, para obtener una mayor actividad relajante.**
- 4. El efecto relajante inducido por PREG y DHEA en el útero no es a través de la clásica vía de acción de hormonas esteroides; es decir, es un efecto de tipo no genómico.**
- 5. DHEA es una hormona con propiedades tocolíticas y con potencial terapéutico.**

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abadie, J.M., Wright, B., Correa, G., Browne, E.S., Porter, J.R., Svec, F., 1993. Effect of dehydroepiandrosterone on neurotransmitter levels and appetite regulation of the obese Zucker rat. *Diabetes* 42, 662-669.
- Abraham, G.E., Buster, J.E., Kyle, F.W., Corrales, P.C., Teller, R.C., 1973. Radioimmunoassay of plasma pregnenolone, 17-Hydroxypregnenolone and dehydroepiandrosterone under various physiological conditions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37, 140-144.
- Barbagallo, M., Shan, J., Pang, P.K.T., Resnick, L.M., 1995. Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on cellular calcium responsiveness and vascular contractility. *Hypertension* 26, 1065-1069.
- Barrera, H.D., 2000. Participación de los grupos funcionales, carbonilo e hidroxilo de los 5 β -androstanos en la acción relajante de la actividad contráctil uterina de la rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Baulieu, E.E., 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent. Prog. Horm. Res.* 52, 1-32.
- Belanger, A., Candas, B., Dupont, A., Cusan, L., Diamond, P., Gomez, J.L., Labrie F., 1994. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1086-1090.
- Buster, J.E., Chang, R.F., Preston, D.L., Elashoff, R.M., Cousins, L.M., Abraham, G.E., Hobel, C.J., Marshall, J.R., 1979. Interrelationships of circulating maternal steroid concentrations in third trimester pregnancies. II. C₁₈ and C₁₉ steroids: estradiol, estril, dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, Δ^5 -androstenediol, Δ^4 -androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48, 139-142.
- Cook, B., Beastall, G.H., 1987. Measurement of steroid hormone concentrations in blood, urine and tissues. In: steroid hormones a practical approach. B. Green and R. E. Leake Eds. IRL Press Limited, Oxford, England, 1-65.
- Cutolo, M., Seriolo, B., Villaggio, B., Pizzorni, C., Cravittio, C., Sulli, A., 2002. Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966, 131-142.
- Daynes, R.A., Dudley, D.J., Araneo, B., 1990. A. regulation of murine lymphokine production *in vivo* II. dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *Eur. J. Immunol.* 20, 793-802.
- Ebeling, P., Koivisto, V.A., 1994. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. *Lancet* 343, 1479-1481.

Eich, D.M., Nestler, J.E., Johnson, D.E., Dworkin, G.H., Ko, D., Wechsler, A.S., Hess M.I., 1993. Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with dehydroepiandrosterone in the heterotopic rabbit model of cardiac transplantation. *Circulation* 87 (1); 261-269.

Fabian, T.J., Dew, M.A., Pollock, B.G., Reynolds III, CH.F., Mulsant, B.H., Butters, M.A., Zmudam, D., Linares, A.M., Trottni, M., Kroboth, P.D., 2001. Endogenous concentrations of DHEA and DHEA-S decrease with remission of depression in older adults. *Biol. Psychiatry* 50, 767-774.

Farrukh, J.S., Peng, W., Orlinska, U., Hoidal, J.R. 1998. Effect of dehydroepiandrostenone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca^{2+} -activated K^{+} -channel opener. *Am. J. Physiol.* 274, L186-L195.

Flood, J.F., Morley, J.E., Roberts, E. 1992. Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 1567-1571.

George, M.S., Guidotti, A., Rubinow, D., Pan, B., Mikalaukas, K., Post, R.M., 1994. CSF Neuroactive steroids in affective disorders: pregnenolone, progesterone, and DBI. *Biol. Psychiatry* 35, 775-780.

Guarneri, P., Guarneri, R., Cascio, C., Pavasant, P., Piccoli, F., Papadopoulos, V., 1994. Neurosteroidogenesis in rat retinas. *J. Neurochem.* 63, 86-96.

Guth, LL., Zhang, Z., Roberts, E., 1994. Key role for pregnenolone in combination therapy that promotes recovery after spinal cord injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 12308-12312.

Gutiérrez, M., Martínez, B., Cantabrana, B., Hidalgo, A., 1994. Genomic and non-genomic effects of steroidal drugs on smooth muscle contraction *in vitro*. *Life Sci.* 55 (6); 437-443.

Guyton, A.C., Hall, J.E., 2000. Contraction and excitation of smooth muscle. In: *Textbook of medical physiology*, 10th edition. Saunders company, U.S.A., 87-94.

Hidalgo, A., Suzano, R.C., Revuelta, M.P., Sánchez-Díaz, C., Baamonde, A., Cantabrana, B., 1996. Calcium and depolarization-dependent effect of pregnenolone derivatives on uterine smooth muscle. *Gen. Pharmac.* 27 (5), 879-885.

Hill, M., Lukac, D., Lapcik, O., Sulcova, J., Hampf, R., Pouzar, V., Starka, L., 1999. Age relationships and sex differences in serum levels of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in healthy subjects. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37 (4), 439-447.

Hu, Y., Cardounel, A., Gursoy, E., Anderson, P., Kalimi, M., 2000. Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone. *Biochem. Pharmacol.* 59 (7), 753-762.

Isaacson, R.L., Varner, J.A., Baars, J.-M., De Wied, D., 1995. The effects of pregnenolone sulfate and ethylestrenol on retention of a passive avoidance task. *Brain Res.* 689, 79-84.

Ishida, Y., Oshima, H., Aibara, S., Ohmoto, M. 1972. Inhibitory actions of steroids hormones on isolated smooth muscles. *J. Pharm. Soc. Jap.* 92, 1175-1179.

Kalimi, M., Regelson, W. 1988. Physicochemical characterization of [3H] DHEA binding in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156 (1), 22-29.

Kawai, S., Yahata, N., Nishida, S., Nagai, K., Mizushima, Y. 1995. Dehydroepiandrosterone inhibits B16 mouse melanoma cell growth by induction of differentiation. *Anticancer Res.* 15 (2), 427-431.

Kroboth, P.D., Salek, F.S., Pittenger, A.L., Fabian, T.J., Frye, R.F., 1999. DHEA and DHEA-S: a review. *J. Clin. Pharmacol.* 39, 327-348.

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

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

Labrie, F., Bélanger, A., Cusan, L., Gomez, J.L., Candas, B., 1997. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2396-2402.

Lacroix, C., Fiet, J., Benais, J.P., Gueux, B., Bonete, R., Villette, J.M., Gourmel, B., Dreux, C., 1987. Simultaneous radioimmunoassay of progesterone, androst-4-enedione, pregnenolone, dehydroepiandrosterone and 17-hydroxyprogesterone in specific regions of human brain. *J. Steroid. Biochem.* 28 (3), 317-325.

Lanthier, A., Patwardhan, V.V., 1986. Sex steroids and 5-en-3 β -hydroxysteroids in specific regions of the human brain and cranial nerves. *J. Steroid. Biochem.* 25 (3), 445-449.

Litchfield, J.T., Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-113.

Liu, D., Dillon, J.S., 2002. Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to G $\alpha_{2,3}$. *J. Biol. Chem.* 277 (24), 21379-21388.

Longcope, C., 1996. Dehydroepiandrosterone metabolism. *J. Endocrinol.* 150 suppl., S125-S127.

- Lorence, W.C., Murry, B.A., Trant, J.M., Mason, J.I., 1990. Human β -hydroxysteroid dehydrogenase / $\Delta^{5\rightarrow4}$ isomerase from placenta: expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation / isomerization of C21 and C19 steroids. *Endocrinology* 126 (5), 2493-2498.
- Lösel, R., Wehling, M., 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4, 46-56
- Luisi, S., Petraglia, F., Benedetto, C., Nappi, R.E., Bernardi, F., Fadalti, M., Reis, F.M., Luisi, M., Genazzani, A.R., 2000. Serum allopregnanolone levels in pregnant women: changes during pregnancy, at delivery, and in hypertensive patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (7), 2429-2433.
- Luu-The, V., Lachance, Y., Labrie, C., Leblanc, G., Thomas, J.L., Strickler, R.C., Labrie, F., 1989. Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human β -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *Mol. Endocrinol.* 3 (8), 1310-1312.
- Majewska, M.D., Vaupel, D.B., 1991. Steroid control of uterine motility via γ -aminobutyric acid_A receptors in the rabbit: a novel mechanism? *J. Endocr.* 131, 427-434.
- Majewska, M.D., 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA_A receptor. mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.* 38, 379-395.
- Mathur, R.S., Landgrebe, S., Moody, L.O., Powell, S., Williamson, H.O., 1980. Plasma steroid concentrations in maternal and umbilical circulation after spontaneous onset of labor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51 (6), 1235-1238.
- Matsunaga, M., Ukena, K., Tsutsui, K., 2002. Androgen biosynthesis in the quail brain. *Brain Res.* 948, 180-185.
- Meikle, A.W., Dorchuck, R.W., Araneo, B.A., Stringham, J.D., Evans, T.G., Spruance, S.L., Daynes, R.A., 1992. The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42, 293-304.
- Melchior, C.L., Ritzmann, R.F., 1994. Pregnenolone and pregnenolone sulfate, alone and with ethanol, in mice on the plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 48 (4), 893-897.
- Miller, W.L., 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.* 9 (3), 295-318.
- Morales, A.J., Nolan J.J., Nelson, J.C., Yen, S.S.C., 1994. Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (6), 1360-1367.

Murphy, B.E.P., Steinberg, S.I., Hu, F.-Y., Allison, C.M., 2001. Neuroactive ring A-reduced metabolites of progesterone in human plasma during pregnancy: elevated levels of 5 α -dihydroprogesterone in depressed patients during the latter half of pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (12), 5981-5987.

Navarrete, M.E., 1999. Importancia de los grupos funcionales carbonilo e hidroxilo en la relajación uterina inducida por 5 α -androstano en la rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.

Nebert, D. W., Gonzalez, F.J., 1987. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 945-993.

Okabe, T., Haji, M., Takayanagi, R., Adachi, M., Imasaki, K., Kurimoto, F., Watanabe, T., Nawata, H. 1995. Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80 (10), 2993-2996.

Orentreich, N., Brind, J.L., Rizer, R.L., Vogelman, J.H., 1984. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59 (3), 551-555.

Perusquía, M., García-Yañez, E., Ibáñez, R., Kubli-Garfias, C., 1990. Non-genomic mechanism of action of Δ -4 and 5-reduced androgens and progestins on the contractility of the isolated rat myometrium. *Life Sci.* 47 (17), 1547- 1553.

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

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

Perusquía, M., Campos, G., Corona, J.L., Kubli-Garfias, C., 1991b. 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., Kubli-Garfias, C., 1992. External calcium dependence of the uterine contraction induced by prostaglandins E2 and F2 α and its antagonism with natural progestins. *Prostaglandins* 43, 445-455.

Perusquía, M., 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., 1999. Agents for altering uterine motility. In: *Quik look Pharmacology; part III: peripheral systems pharmacology.* Fence Creek Publishing, Madison, Connecticut, U.S.A., 78-79.

Perusquía, M., Jasso-Kamel, J., 2001. Influence of 5 α - and 5 β -reduced progestins on the contractility of isolated human myometrium at term. *Life Sci.* 68, 2933-2944.

Perusquia, M., 2001. Nongenomic action of steroids in myometrial contractility. *Endocrine*. 15, 63-72.

Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Boschi, F., Bernardi, M., Pratelli, L., Pizzoferrato, A., Gasbarrini, G., 1996. The relationship of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) to endocrine-metabolic parameters and functional status in the oldest-old. results from an italian study on healthy free-living over-ninety-year-olds. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (3), 1173-1178.

Riepe, F.G., Mahler, P., Sippell, W.G., Partsch, C.-J., 2002. Longitudinal study of plasma pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in full-term and preterm neonates at birth and during the early neonatal period. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87 (9), 4301-4306.

Roberts, E., 1995. Pregnenolone-from Selye to Alzheimer and a model of the pregnenolone sulfate binding site on the GABA_A receptor. *Biochem. Pharmacol.* 49 (1), 1-16.

Rudman, D., Shetty, K.R., Mattson, D.E., 1990. Plasma dehydroepiandrosterone sulfate in nursing home men. *J. Am. Geriatr. Soc.* 38, 421-427.

Sanborn, B.M., 2001. Hormones and calcium: mechanisms controlling uterine smooth muscle contractile activity. *Exp. Physiol.* 86.2, 223-237.

Sanchez Aparicio, J.A., Gutierrez, M., Hidalgo, A., Cantabrana, B., 1993. Effects of androgens on isolated rat uterus. *Life Sci.* 53 (3), 269-274.

Savineau, J.P., Marthan, R., 1997. Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 11, 289-299.

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

Shafagoj, Y., Opoku, J., Qureshi, D., Regelson, W., Kalimi, M., 1992. Dehydroepiandrosterone prevents dexamethasone-dehydred hypertension in rats. *Am. J. Physiol.* 263, E210-E213.

Silva, M.M., 2002. Acción vasodilatadora de dehidroepiandrosterona en la aorta aislada de rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.

Steiger, A., Trachsel, L., Guldner, J., Hemmeter, U., Rothe, B., Rupprecht, R., Vedder, H., Holsboer, F., 1993. Neurosteroid pregnenolone induces sleep-EEG changes in man compatible with inverse agonistic GABA_A-receptor modulation. *Brain Res.* 615, 267-274.

Stocco, D.M., 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 193-213.

Thomas, J.L., Myers, R.P., Strickler, R.C., 1989. Human placental 3β -hydroxy-5-ene-steroid dehydrogenase and steroid 5 \rightarrow 4-ene-isomerase: purification from mitochondria and kinetic profiles, biophysical characterization of the purified mitochondrial and microsomal enzymes. *J. Steroid. Biochem.* 33 (2), 209-217.

Tsutsui, K., Ukena, K., Takase, M., Kohchi, CH., Lea, R.W., 1999. Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 124, 121-129.

Vallée, M., Mayo, W., Le Moal, M., 2001. Role of pregnenolone, dehydroepiandrosterone and their sulfate esters on learning and memory in cognitive aging. *Brain Res. Rev.* 37, 301-312.