

20377

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

**"CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO RELAJANTE DE
ANDRÓGENOS SOBRE LA CONTRACCIÓN ESPONTÁNEA
DEL ÚTERO HUMANO GESTANTE A TÉRMINO"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

BIÓL: DAVID BARRERA HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. MERCEDES PERUSQUÍA NAVA



MÉXICO, D. F.

ABRIL - 2004

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 19 de enero del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Barrera Hernández David**, con número de cuenta 90383212, con la tesis titulada: **"Caracterización del efecto relajante de andrógenos sobre la contracción espontánea del útero humano gestante a término"**, bajo la dirección del(a) **Dra. María Mercedes Perusquía Nava**.

Presidente:	Dra. Gabriela Morali de la Brena
Vocal:	M. en C. Cándida Ma. Cristina Lemini Guzmán
Secretario:	Dra. Ma. Mercedes Perusquía Nava
Suplente:	Dr. Felipe Vadillo Ortega
Suplente:	Dra. Ana Elena Lemus Bravo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de marzo de 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

A la *Dra. Ma. Mercedes Perusquía Nava*, por la atención brindada, su tiempo y su amplio criterio a lo largo de este proyecto que representan una invaluable herencia académica para seguir adelante.

Al *Dr. Eduardo Calixto González*, por su disposición, sus observaciones y su enorme apoyo para finalizar correctamente la Tesis.

Al *M. en C. Jaime Jasso Kamel*, al *M. C. Hugo Bustos* y a la *M. C. Lorena González* por su valiosa participación en la obtención de las muestras necesarias para llevar a cabo la fase experimental.

A la *Biól. Erika Navarrete Monroy*, por su dedicación, colaboración y ayuda para la culminación de la Tesis, tanto en la parte técnica como académica.

Al *Dr. Marco Antonio José Valenzuela* y a la *Dra. Rebeca Aguirre Hernández*, por su asesoría en la parte estadística de los datos obtenidos en la Tesis.

Al *Biól. Ricardo Vázquez Ramírez*, por su participación en el diseño de las estructuras moleculares de los andrógenos y por compartir su amplia visión científica.

A *Irma Rodríguez García*, por ser parte indispensable del conocimiento técnico y por ser fundamental en el avance de cada Tesis generada en el laboratorio. Asimismo, por contagiar su inagotable fortaleza para seguir adelante.

A la *Biól. Erika Pérez Ortiz*, por la paciencia, el apoyo, los consejos, la disciplina y su incansable virtud por impulsar el término de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: *Moisés Antón Castillo, Mayra Silva Miranda, Rosalba Toledo Torres, Patricia E. López Bistrain, Joel García Díaz y Alejandro Santana* por el placer de conocerlos y constituir un extraordinario equipo de trabajo durante mi estancia.

A *Ana Ma. Segura Vizcarra*, por su increíble ayuda otorgada para continuar el escrito de la Tesis fuera del Instituto. Asimismo, por su incondicional amistad.

A la Biól. *Dorys Mata López* y la Biól. *Andrea Reyna Neyra*, por la atención y ayuda en la impresión final de la Tesis.

A los integrantes del Comité Tutorial: la M en C. *Cristina Lemini Guzmán* y al Dr. *Felipe Vadillo Ortega*, por sus sugerencias durante el proyecto de investigación semestre tras semestre como tutores y por su participación como miembros del jurado para la obtención del grado, incluyendo y agradeciendo también a la Dra. *Gabriela Morali de la Brena* y a la Dra. *Ana Elena Lemus Bravo* por la revisión final de esta tesis, enriqueciendo el contenido de la misma.

Al personal de Biomédicas: *Blanca Huerta, Azucena Ayala, Isabel Reyes, Elizabeth Lara, Guadalupe Ruíz, Norma Bravo, Leopoldo Mora y Roberto Rico*, así como, al personal del Posgrado en Ciencias Biológicas: Dra. *Tila Ma. Pérez, Lilia Espinosa* y *Maria de la Paz Cruickshank*, por ser parte crucial en el avance de cada estudiante e investigador que requiere de sus servicios, orientación y apoyo.

Con especial atención agradezco:

A la *Universidad Nacional Autónoma de México*, por ser la casa de estudios a quien debo mis mayores logros académicos.

Al *Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM*. Por el uso de sus instalaciones y facilitar la realización de un anhelo: esta Tesis.

A la *Facultad de Ciencias, UNAM*. Por ser más que una escuela, un hogar, que es un trampolín para enfrentar nuevos retos.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)*, por la beca que me otorgó con el número de registro 167224, como sustento para el desarrollo del proyecto.

DEDICATORIAS

A mis padres: *Daniel Barrera García y Martha Hernández Gabino*, a quienes respeto, admiro y quiero, siendo el motivo y el aliento de seguir aún ante las adversidades que se presentan en el camino.

A mi hermana Claudia, por ser un ejemplo de valor y fortaleza para seguir el tan duro camino de nuestro destino.

A mis hermanos: *Daniel y Miguel* porque se que cuento con ellos aún en las etapas más difíciles de la vida.

A mi abuelita *María de la Luz* y mis tíos *Miguel, José Luis e Isabel*, por su dedicación y entrega en cumplir cada meta que se proponen.

A mis sobrinos *Dennis, Ivan, Adan, Erika, Lupita y Christian*, por ser la alegría en casa de quienes aprende también uno.

A *Zenón Pérez y Hortencia Ortiz* por su cálida recepción en casa y a sus hijos: *Patricia, Beatriz, "Erika", Marisol y Alfonso*.

A *Eduardo Mucientes, Beatriz Pérez* y a *Ricardito (Bei)*, por su amistad y por ser muestra de alcanzar metas propuestas.

A mis amigos y compañeros: *Isabel Guzmán, Maricruz Anaya, Silvestre Vargas, Ricardo Bolaños, Patricia Aquino, Rosa Villanueva, Paulina Lezama, Rocío Muñoz, Sara Teresa Méndez, Cynthia Sámano, Mercedes González, Mónica Ramírez, Guadalupe Flores, Leticia y Juan Gómez*, porque han formado parte especial para ser mejor cada día, sin hacer menos a mis demás conocidos que por espacio no están mencionados.

Los datos de esta tesis fueron parcialmente presentados en:

XXVI "Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción".

Con el cartel titulado: "Comparación del efecto relajante de esteroides Δ 4,3-ceto sobre la contracción espontánea del útero humano a término". Barrera, D., Navarrete, E., Jasso, J. y Perusquía, M. Acapulco, Gro., del 23 al 26 de mayo del 2001.

VII Congreso de Carteles "Dr. Lino Díaz de León".

Con el cartel titulado: "Comparación del efecto relajante de esteroides Δ 4,3-ceto sobre la contracción espontánea del útero humano a término". Barrera, D., Navarrete, E., Jasso, J. y Perusquía, M. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM., 15 de junio del 2001.

XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.

Con el cartel titulado: "Modulación de la actividad contráctil del útero humano gestante por andrógenos". Barrera, D., Navarrete, E., Jasso J., Bustos, H., González, L y Perusquía, M. Ciudad de Colima, del 8 al 12 de septiembre del 2002.

LIII Congreso Mexicano de Ginecología y Obstetricia.

Participando como co-autor del trabajo: "Papel de testosterona sobre la quiescencia uterina durante la gestación: un potencial efecto tocolítico". Jaime-Jasso., David Barrera., Hugo Bustos y Mercedes Perusquía. Ciudad de Villahermosa, Tabasco., Octubre del 2002.

XXVIII "Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción".

Participando como co-autor del trabajo: "Papel de testosterona sobre la quiescencia uterina durante la gestación: un potencial efecto tocolítico". Jaime Jasso., David Barrera., Erika Navarrete y Mercedes Perusquía. Ciudad de Veracruz, del 15 al 17 de Mayo del 2003.

DISTINCIONES

Primer lugar del concurso de carteles en la:

XXVI "Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción".

"Comparación del efecto relajante de esteroides Δ 4,3-ceto sobre la contracción espontánea del útero humano a término". Barrera, D., Navarrete, E., Jasso, J. y Perusquía, M. Acapulco, Gro. Mayo 25 del 2001.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 <i>Perspectivas</i>	2
2.2 <i>Generalidades</i>	3
2.3 <i>Papel de las hormonas esteroides durante la gestación</i>	9
2.3.1 <i>Producción de andrógenos durante la gestación</i>	11
a) <i>Síntesis de andrógenos en el compartimento materno</i>	11
b) <i>Síntesis de andrógenos en la placenta</i>	13
c) <i>Síntesis de andrógenos en el compartimento fetal</i>	17
2.4 <i>Concentraciones séricas de andrógenos</i>	20
2.4.1 <i>Concentraciones séricas de andrógenos en el embarazo</i>	21
2.5 <i>Efectos biológicos de los andrógenos</i>	26
2.5.1 <i>Efecto de las hormonas esteroides sobre la contracción miometrial</i>	29
2.6 <i>Mecanismo de la acción relajante de las hormonas esteroides en el miometrio</i>	35
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
4. HIPÓTESIS	40
5. OBJETIVOS	41
5.1 <i>Objetivo General</i>	41
5.2 <i>Objetivos particulares</i>	41
6. MATERIAL Y MÉTODOS	43
6.1 <i>Obtención de la muestra y sistema de registro</i>	43
6.2 <i>Efecto de los andrógenos sobre la actividad espontánea del útero humano gestante a término</i>	46
6.3 <i>Efecto de los andrógenos sobre la contracción inducida con KCl (40 mM) del miometrio humano gestante a término</i>	47

6.4 Efecto de actinomicina D, cicloheximida y flutamida sobre la inhibición ejercida por testosterona, 5 α - y 5 β -DHT sobre la contracción inducida con KCl del útero grávido	48
6.5 Efecto de testosterona y 5 β -DHT sobre la actividad contráctil espontánea de útero humano no grávido	49
6.6 Procesamiento de datos	50
a) Análisis de potencia	51
6.7 Compuestos	53
7. RESULTADOS	54
7.1 Efecto de los andrógenos sobre la contracción espontánea del útero grávido	54
1) Efecto concentración dependiente	56
2) Concentraciones inhibitorias	61
3) Relación de potencia	62
7.2 Efecto de los andrógenos sobre la contracción inducida con KCl (40 mM) del útero grávido a término	64
7.3 Efecto de actinomicina D, cicloheximida y flutamida sobre la inhibición ejercida por testosterona, 5 α - y 5 β -DHT en la contracción inducida con KCl del útero grávido	68
7.4 Efecto de los andrógenos en la contracción espontánea del útero humano no grávido	71
8. DISCUSIÓN	75
8.1 General	75
8.2 Sensibilidad uterina al efecto relajante de los andrógenos	77
8.3 Eficacia	78
8.4 Estudios sobre el modo de acción de los andrógenos	83
8.5 Implicaciones fisiológicas	85
8.6 Perspectivas a futuro	88
9. CONCLUSIONES	90
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1. RESUMEN

Una de las acciones más relevantes de la progesterona en los mamíferos es mantener al útero quiescente durante el embarazo, favoreciendo la implantación y el desarrollo del producto a lo largo de la gestación. Evidencias recientes muestran que también algunas progestinas 5-reducidas, producto del metabolismo de la progesterona, son potentes inhibidores de la contracción uterina, algunas incluso con mayor potencia que la de progesterona. Referente a los andrógenos, existen algunas evidencias sobre su eficacia en útero de animales experimentales y ningún reporte sobre la regulación de la contractilidad uterina del humano. Dado que los andrógenos son secretados activamente durante el embarazo, el propósito del presente estudio fue determinar el efecto que pudieran ejercer algunos andrógenos [dehidroepiandrosterona (DHEA), testosterona, 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT), 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT), androsterona y androstandiol] sobre la respuesta contráctil de útero humano a término de la gestación, estableciendo la eficacia (potencia) entre cada uno de ellos. Asimismo, caracterizar la vía de acción del efecto (genómica o nogenómica). Se utilizaron muestras de útero con 38 a 40 semanas de gestación, de pacientes sometidas a operación cesárea y muestras de útero no gestante de pacientes sometidas a histerectomía. La actividad contráctil espontánea fue registrada mediante la técnica isométrica convencional para tejido aislado, sobre la cual se adicionaron diferentes concentraciones (3, 10, 30 y 100 μ M) de cada andrógeno en forma no acumulativa. Con el objeto de estudiar el posible mecanismo de la acción relajante, el efecto de los andrógenos fue también evaluado sobre contracciones inducidas por KCl 40 mM, tanto en presencia como en ausencia de 10 μ M de actinomicina D (inhibidor de la transcripción), 40 μ M de cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) o 10 μ M de flutamida (antiandrógeno). Los resultados mostraron que los andrógenos ensayados inducen una disminución de la actividad contráctil espontánea (relajación) del útero gestante a término en una forma dependiente de la concentración, con un orden de potencia de: 5 β -DHT >>> androsterona \geq DHEA \geq testosterona > 5 α -DHT >> androstandiol. El efecto relajante inducido por testosterona y 5 β -DHT también fue observado en el útero no grávido. La respuesta relajante fue rápida y reversible, tanto en contracciones espontáneas como en las inducidas por KCl, mostrando además que el efecto no fue bloqueado por los clásicos inhibidores de la vía genómica (actinomicina D, cicloheximida y flutamida). Estos datos muestran la participación de los andrógenos en la regulación de la actividad contráctil uterina durante la gestación, descartando categóricamente la intervención de la vía genómica en la relajación que ejercen y caracterizando al efecto como de tipo nogenómico. Por la diferente potencia de cada andrógeno se concluye que la 5 β -reducción en el anillo A de la molécula de testosterona es muy importante para optimizar la eficacia relajante en el miometrio humano.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Perspectivas

Es ampliamente aceptado que la progesterona provoca relajación de la contractilidad uterina y esto, es la base central de la quiescencia en el miometrio durante la gestación; jugando un papel preponderante en eventos reproductivos asociados con el establecimiento y mantenimiento del embarazo. Reportes recientes han descrito que algunos metabolitos 5-reducidos, derivados de la progesterona, son también inhibidores de la actividad contráctil uterina en animales (Revisado por Perusquía, 2001) y humanos (Thornton et al., 1999; Perusquía y Jasso-Kamel, 2001).

Además del efecto relajante inducido por progestinas, pocos estudios han examinado el potencial efecto relajante inducido por los esteroides sexuales masculinos (andrógenos) en el tejido miometrial, particularmente durante el embarazo. Es importante mencionar que las evidencias existentes sobre un efecto relajante producido por los andrógenos, han sido limitadas a estudios en animales experimentales y no hay evidencias disponibles sobre el efecto que puedan causar sobre el tejido miometrial humano.

Considerando lo anterior y tomando en cuenta el activo metabolismo de los andrógenos en la unidad fetoplacentaria, la presente Tesis incluye una revisión sobre la biosíntesis de los andrógenos, su metabolismo y concentraciones séricas durante el embarazo *i.e.*, en las tres entidades: madre, placenta y feto. Asimismo, se hace un

resumen sobre los efectos biológicos que se han reportado para los andrógenos, con particular interés sobre la contracción uterina.

Teniendo en cuenta que el papel de los andrógenos en la mujer ha sido pobremente entendido y sus efectos biológicos durante el embarazo no han quedado esclarecidos, el objetivo central del presente estudio fue investigar el posible efecto relajante de los andrógenos sobre la contractilidad uterina de la mujer, determinando sus diferencias estructurales para inducir cambios en este proceso y discutiendo el posible mecanismo de acción para regular la actividad contráctil uterina.

2.2 Generalidades

Las hormonas esteroides son lípidos sintetizados en diversos tejidos, que incluyen principalmente: el cerebro, las glándulas suprarrenales, el testículo, el ovario y la placenta (Rupprecht, et al., 1996; Tsutsui et al., 1999). En la hembra y el macho, las hormonas esteroides tienen una ruta de biosíntesis común, diferenciándose sólo cuantitativamente en su modo y sitio de producción, involucrando enzimas específicas. Las hormonas esteroides son sintetizadas a partir del colesterol; molécula de 27 átomos de carbono que mediante el rompimiento de su cadena lateral, por el citocromo P450_{scc} (side chain cleavage), origina al precursor básico de todas las hormonas esteroides, la pregnenolona (PREG). Este esteroide, PREG, de 21 átomos de carbono (Fig. 1) dará origen a los diferentes grupos: esteroides sexuales (progestinas, andrógenos y estrógenos), mineralcorticoides y glucocorticoides. Todos estos esteroides tienen en común la estructura molecular del

núcleo característico de todos los esteroides, llamado **ciclopentanoperhidrofenantreno**, el cual consta de cuatro anillos fusionados, denominados por las letras A, B, C y D.

Continuando con la ruta de la biosíntesis de esteroides, la PREG puede dar lugar a la progesterona, molécula con 21 átomos de carbono, mediante la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HSD), la cual provoca el cambio del grupo 3 β -hidroxilo a 3-cetona y cambia la isomerización del doble enlace Δ^5 a Δ^4 . Posteriormente, a partir de la progesterona se puede sintetizar al principal glucocorticoide, el cortisol; compuesto con grupos hidroxilos en el C11, C17 y C21 o bien, mediante la hidroxilación sólo del C11 y C21 de la progesterona dará lugar a la corticosterona, la cual sustituye el grupo metilo en el C18 por un grupo aldehído para originar al mineralcorticoide más potente, la aldosterona (Hall, 1986; Monder y White, 1993; Mellon, 1994).

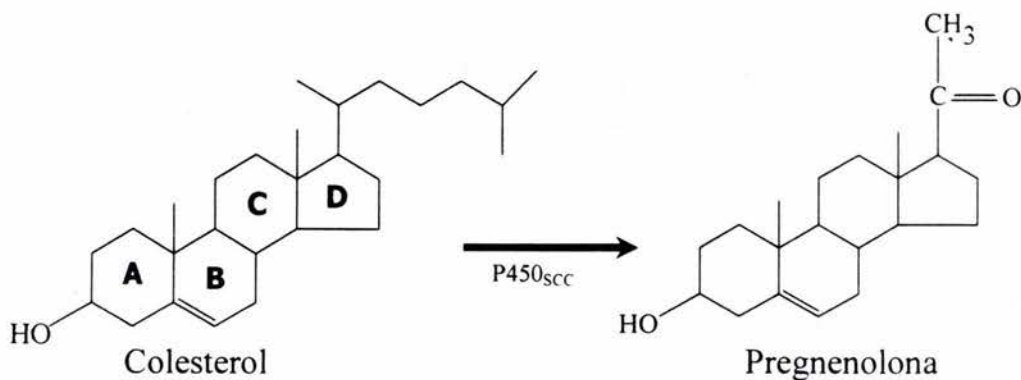


Figura 1. Principales precursores de las hormonas esteroides.

La PREG puede seguir otra vía para biotransformarse hacia andrógenos, esteroides con 19 átomos de carbono, para lo cual se requiere la presencia de la enzima 17α -hidroxilasa/17-20 liasa (P450 C-17), la cual cataliza la 17-hidroxilación y promueve el rompimiento de la unión 17-20 de PREG para la obtención de dehidroepiandrosterona (DHEA). Posteriormente, la 3β -HSD, que cataliza la conversión de los compuestos Δ^5 - 3β -hidroxilados, interviene para la formación de androstendiona a partir de DHEA (Mason, 1993; Payne et al., 1997; Pang, 1998) y subsecuentemente, la enzima 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD) cataliza la conversión de androstendiona hacia testosterona (Labrie et al., 1995; Mendoca et al., 1999; Takeyama et al., 2000). La androstendiona y la testosterona pueden ser aromatizadas en el anillo A, por la acción de la P450 aromatasa (P450-arom) y dar origen a los estrógenos, compuestos con 18 átomos de carbono, como estrona y estradiol sucesivamente (Stoffel-Wagner, 2001) (Fig. 2).

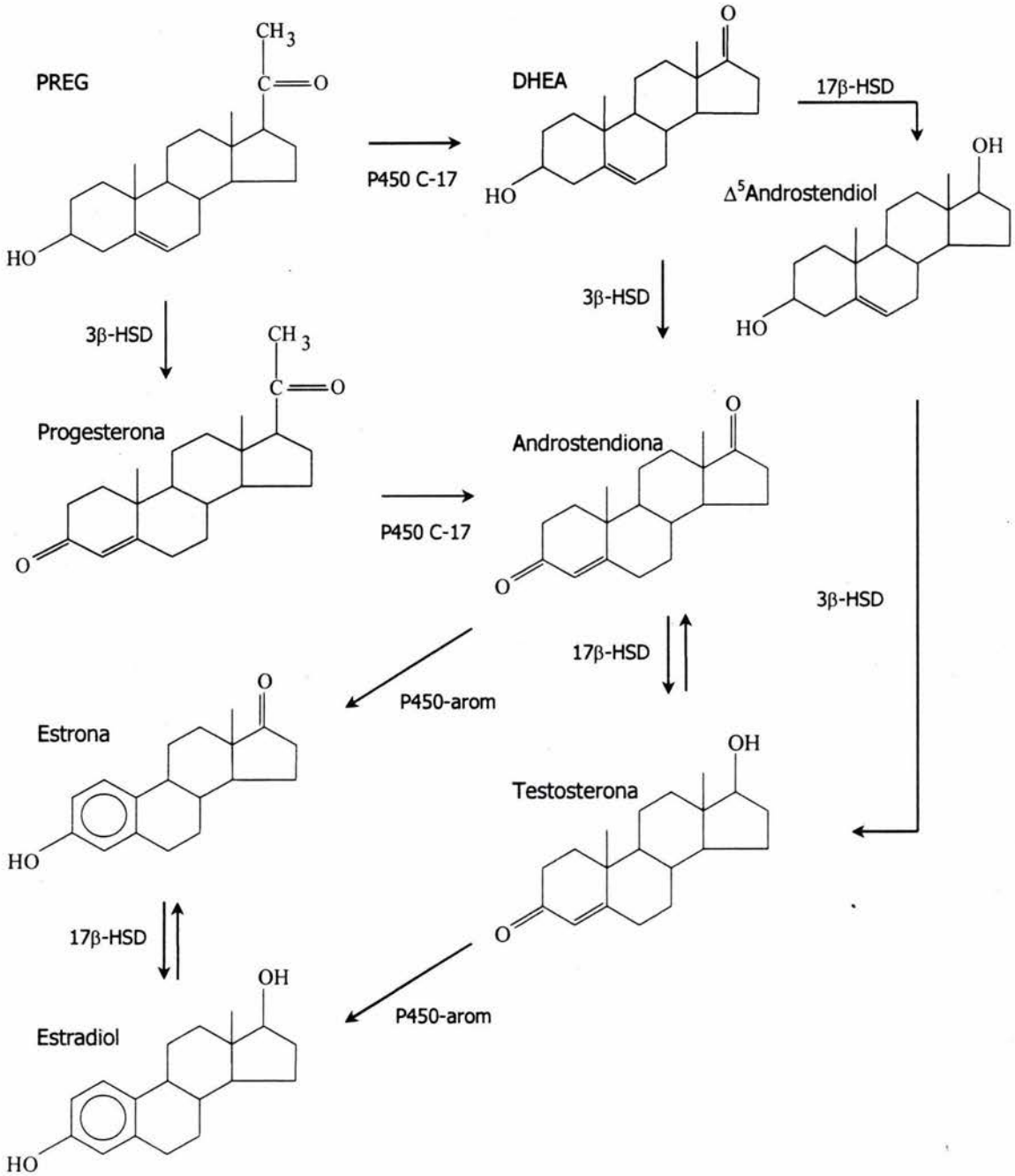


Figura 2. Ruta de biosíntesis hacia los principales esteroides sexuales. Enzimas: P450-C17 (17 α -hidroxilasa/17-20 liasa), 3 β -HSD (3 β -hidoxiesteroides deshidrogenasa/isomerasa), 17 β -HSD (17 β -hidoxiesteroides deshidrogenasa/ceto esteroide reductasa) y P450-arom (P450-aromatasa). Esquema modificado (Mellon, 1994; Burger, 2002).

Asimismo, las hormonas esteroideas que presentan la configuración $\Delta^{4,3}$ -cetona (progesterona y testosterona) pueden ser convertidas en los $5\alpha/5\beta$ dihidroderivados por acción de las enzimas respectivas, 5α - y 5β -reductasa. En base a esta quiralidad del carbono 5, se presentan las dos posibles conformaciones: $5\alpha/trans$ y $5\beta/cis$. Posteriormente, la 3α ó 3β hidroxilación en el carbono 3, dada por la acción de las enzimas 3α - y 3β -HSD, origina los tetrahidroderivados ($3\alpha,5\alpha$, $3\beta,5\alpha$, $3\alpha,5\beta$, y $3\beta,5\beta$) (Jez y Penning, 1998; Penning et al., 2000). Estas diferencias estructurales determinan las características de los diferentes androstanos (Fig. 3) y progestinas.

En tejidos blanco estas conversiones son significativas, como sucede en el metabolismo de testosterona, que por acción de la 5α -reductasa provoca la producción del potente andrógeno 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT; 17β -hidroxi- 5α -androstan-3-ona), el cual puede metabolizarse, por la acción de la 3α -HSD, hacia androstandiol (5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol) (Fig. 3). Las propiedades hormonales del androstandiol no han sido totalmente definidas, pero es el andrógeno que origina a la androsterona (3α -hidroxi- 5α -androstan-17-ona) (Mahendroo et al., 1996; Bruchofsky y Wilson, 1999). Es importante mencionar que la 5β -reductasa, que metabólicamente precede de las 3α -HSD, cataliza la reducción de todas las hormonas esteroideas que portan un grupo $\Delta^{4,3}$ -cetona y de ácidos biliares (Penning et al., 2001; 2003). Se ha reportado que en el hígado estas reacciones resultan en una eliminación de hormonas esteroideas para proteger de un exceso de hormonas circundantes. En forma particular, es importante notar que una vez sintetizados los andrógenos 5 -reducidos, estos no pueden retornar hacia compuestos Δ^4 ó Δ^5 , ni dar origen a los estrógenos (Mahendroo et al., 1997) (Fig. 3).

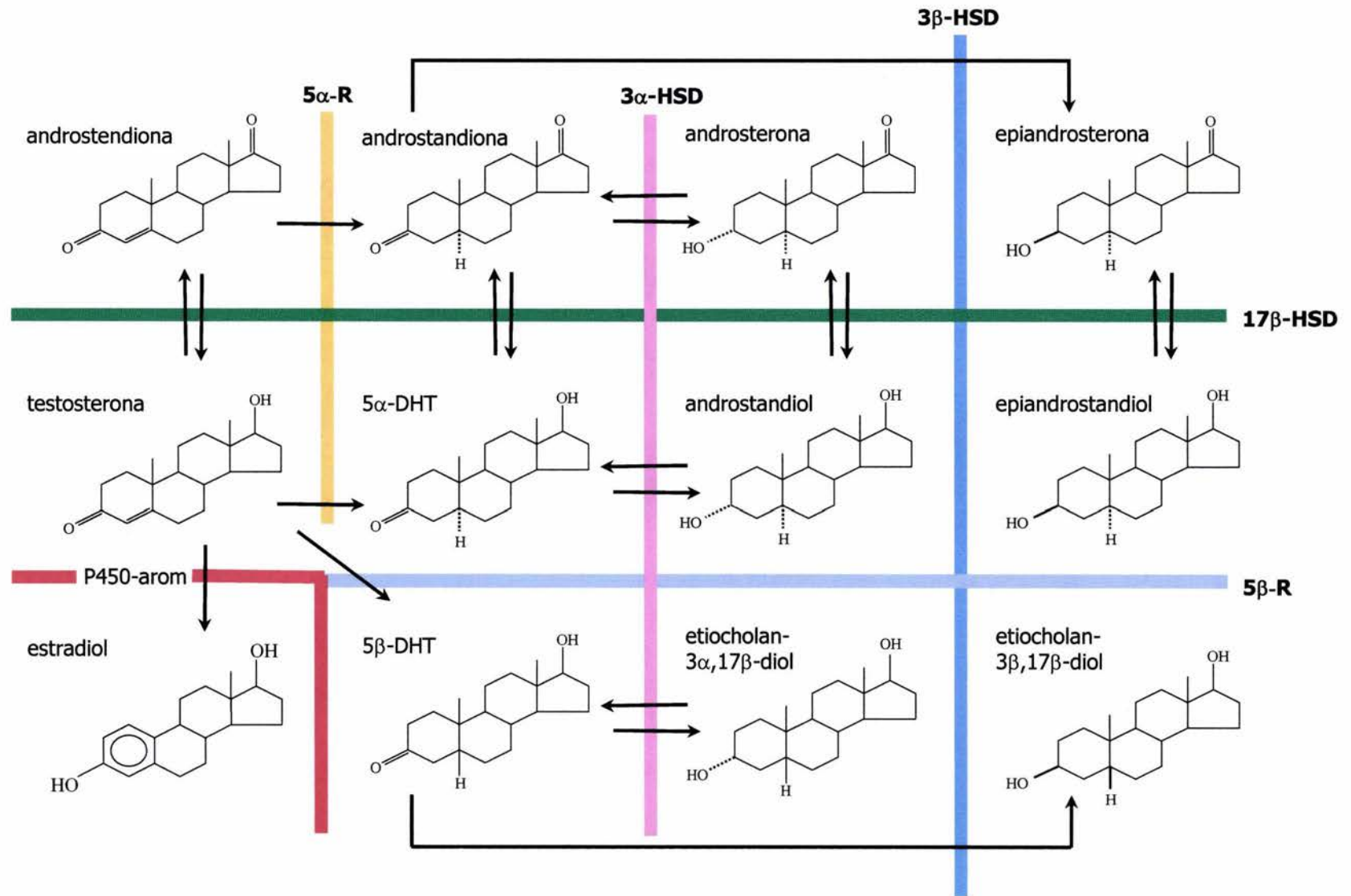


Figura 3. Vías de síntesis hacia andrógenos 5-reducidos. Enzimas: 5 α -reductasa, (5 α -R); 5 β -reductasa, (5 β -R), 3 α -Hidroxiesteroide deshidrogenasa, (3 α -HSD); 3 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa, (3 β -HSD); 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, (17 β -HSD); P450-aromatasa (P450-arom). Modificado de Mahendroo et al., 1996; 1997.

2.3 *Papel de las hormonas esteroideas durante la gestación*

Una característica notable del embarazo humano es el incremento abrupto en la producción de hormonas esteroideas y ciertas proteínas (Diczfalusy y Troen, 1961), las principales funciones de esta gran cantidad de hormonas no están claramente definidas, salvo con algunas excepciones. La elevada producción de hormonas polipeptídicas y esteroideas durante la gestación, directa e indirectamente, provoca adaptaciones homeostáticas y fisiológicas en prácticamente todos los aparatos o sistemas maternos (Taylor y Martin, 1998), siendo el útero un blanco de acción directa para estos compuestos.

Es bien conocido que la progesterona juega un papel preponderante durante el embarazo, por modular favorablemente la proliferación celular endometrial, su diferenciación y decidualización, creando así un ambiente rico en nutrimentos propicio para el proceso de la implantación (Albrecht y Pepe, 1990). También disminuye la formación de conexiones gap y estimula la actividad de la óxido nítrico sintetasa uterina, además de regular la producción de prostaglandinas, la expresión de los canales de calcio y receptores a oxitocina, los cuales se encuentran involucrados en la contracción uterina (Weiss, 2000). Asimismo, numerosas evidencias experimentales han mostrado que la progesterona es capaz de inhibir las contracciones uterinas durante el embarazo, manteniendo un ambiente quiescente para el correcto desarrollo del producto (Revisado por: Perusquía, 2001).

Por su parte, los estrógenos se encuentran implícitos, junto con la progesterona, en un constante balance para el control de la actividad uterina y se ha concluido que estos esteroideas pueden inducir relajación o excitación de la contractilidad uterina *in vitro* o

in vivo respectivamente (Perusquía, 2001). También se sabe que los estrógenos están involucrados en regular el incremento de la concentración de varios agentes uterotónicos, incluyendo a las prostaglandinas E_2 y $F_{2\alpha}$ (Olson et al., 1983; Siler-Khodr et al., 1996), serotonina y catecolaminas (Bulbring y Tomita, 1987), además de incrementar la concentración de receptores a oxitocina (Adachi y Oku, 1995). En particular, los estrógenos incrementan la concentración de α -adrenoceptores, lo cual resulta en una consecuente disminución de la sensibilidad al efecto relajante de agonistas β -adrenérgicos (Wray, 1993; Jackson y Dudley, 1998). Además, pueden inducir la síntesis de proteínas que constituyen canales iónicos en la membrana (Sanborn, 2000) y son esenciales para la comunicación intracelular, por participar en el incremento de síntesis de la conexina 43 y la formación de las conexiones gap en el miometrio (Petrocelli y Lye, 1993). Otras funciones atribuidas a los estrógenos durante la gestación incluyen la regulación del flujo sanguíneo útero-placental, el desarrollo de la vascularización placental y en general, la modulación del sistema cardiovascular materno (Pepe y Albrecht, 1995).

Referente a los esteroides sexuales masculinos, los andrógenos, se cuenta con muy escasas evidencias sobre su participación en procesos fisiológicos en la mujer durante el embarazo y no han sido explorados detalladamente, considerándolos sólo como metabolitos intermediarios para la síntesis de los estrógenos. Sin embargo, estudios *in vitro* muestran que son eficaces inhibidores de la actividad contráctil espontánea e inducida del útero aislado de animales de laboratorio (Perusquía, 2001). Sin embargo, es preciso revisar la producción de este grupo de esteroides durante la gestación.

2.3.1 Producción de andrógenos durante la gestación

Durante la gestación, la constante síntesis de esteroides es modulada a partir de la interdependencia que existe en la estrecha relación madre-placenta-feto, surgiendo el concepto de la llamada unidad feto-placentaria (Diczfalusy, 1969) y se establece una indispensable interrelación entre los tres compartimentos para la biosíntesis, traslado y excreción de estos compuestos. Con la finalidad de mostrar la producción de los andrógenos en cada una de estas entidades, se describe en forma particular a continuación:

a) Síntesis de andrógenos en el compartimento materno

De forma general, la biosíntesis de los esteroides en el compartimento materno se manifiesta por la producción inicial de progesterona en el ovario por la aportación del cuerpo lúteo y posteriormente por su síntesis en la placenta. Respecto a la producción de andrógenos, se ha aceptado que la obtención de DHEA y su ester sulfatado (DHEAS) puede darse por la aportación del compartimento materno a partir de las adrenales a la placenta. También se ha reportado que este precursor (DHEA) puede biotransformarse en tejidos específicos maternos hacia otros andrógenos.

Estudios realizados en rata, confirman la eficiente capacidad del tejido uterino para metabolizar andrógenos. Hoffmann et al., (1975) encontraron que la actividad de las enzimas 17β - 3α , 17β - 3β hidroxisteroide-oxido reductasa y la 5α -reductasa están involucradas en el metabolismo *in vitro* de la testosterona, estos autores encontraron que androstendiona, 5α -dihidrotestosterona, androstandiol y androstandiona son algunos

productos del metabolismo de la testosterona en el tejido uterino de rata. Además, se ha demostrado que la administración de DHEA en ratas intactas y ovariectomizadas incrementa la concentración sérica de DHEAS, testosterona, androstandiol, androsterona y otros andrógenos 3β hidroxilados, evidenciando la presencia de las enzimas requeridas para la conversión de andrógenos en diversos tejidos (Sourla et al., 1998). Por su parte, Matsui y Kinuyama (1977) y Matsui y Hakazaki (1977), estudiando el catabolismo biliar de la testosterona *in vivo*, determinaron la presencia de metabolitos 5α -reducidos como los principales productos sintetizados.

Varios trabajos sobre la presencia de andrógenos en el tejido uterino humano han descrito tal aseveración, encontrando que el miometrio es capaz de convertir androstendiona a 5α -androstendiona, testosterona, 5α -DHT, androsterona, androstandiol y en menor proporción la formación del compuesto 19-hidroxi-4-androstene-3,17-diona (Rose et al., 1978; Jasonni et al., 1982). Del mismo modo, el endometrio también tiene la capacidad de convertir androstendiona hacia testosterona, 5α -DHT, 5α -androstendiona y androsterona (Collins et al., 1969), mostrando también que el epitelio vaginal puede metabolizar a partir de androstendiona a los andrógenos: 5α -androstendiona, testosterona, 5α -DHT, androsterona y androstandiol, destacando la indudable presencia de las enzimas responsables para la expresión de andrógenos en el tejido reproductor de la mujer. Así, se ha considerado a las enzimas 5α -reductasa y 17β -HSD indispensables para estas conversiones (Stanczyk et al., 1990). Poco se conoce acerca de la producción de andrógenos 5β -reducidos en estos tejidos. Se ha encontrado la presencia de la progestina 5β -pregnandiona, que se produce a partir de progesterona en el endometrio (Bryson y

Sweat, 1967), considerando la reducción en posición 5β como una vía alterna del tejido uterino humano.

b) Síntesis de andrógenos en la placenta

Desde el punto de vista de la esteroidogénesis, la placenta se considera un órgano endocrino incompleto, ya que carece de algunos sistemas enzimáticos críticos para la biosíntesis hormonal *de novo*. La placenta *per se* es incapaz de realizar la biosíntesis de progesterona, debido a que no puede elaborar colesterol, el precursor obligado de todas las hormonas esteroideas (Telegdy et al., 1970; Simpson, 1979; Hall, 1986). Diversos estudios han concluido que la placenta utiliza principalmente el colesterol materno en forma de lipoproteínas de baja densidad (LDL) como sustrato para la producción de PREG y subsecuentemente la síntesis de progesterona, mientras que el aporte de colesterol fetal, aunque presente, es muy bajo (Jaffe y Peterson, 1966; Helling et al., 1970; Albrech y Pepe, 1990). En la mitocondria de la placenta, la PREG, es biosintetizada a través de una cadena de transporte compuesta por la adrenodoxina, la adrenodoxina reductasa y el citocromo P450_{scc} que rompe la cadena lateral del colesterol (Martínez et al., 2001; Loganath et al., 2002) y da origen a la progesterona por acción de la 3β -HSD (Lorence et al., 1990), ver figura 4.

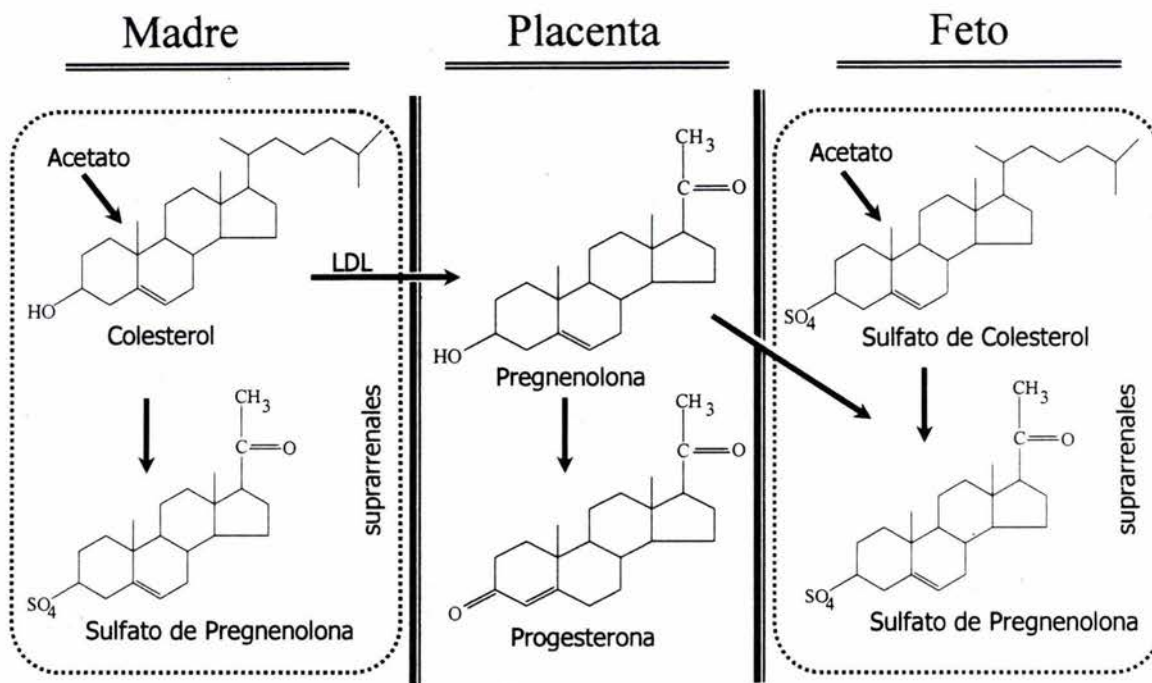


Figura 4. Ruta principal para la producción de progesterona en la unidad fetoplacentaria. Resaltando que la principal aportación del colesterol en forma de LDL (lipoproteínas de baja densidad) es dado por el compartimento materno (modificado de Gandy, 1977; Jaffe, 1999).

Con respecto a la producción de andrógenos, desde la década de 1960 se ha establecido que la placenta es incapaz de biosintetizar estos compuestos, por carecer de la P450 C-17 (17 α -hidroxilasa/17-20 liasa), que es la enzima requerida para romper la cadena lateral de la progesterona (Pion et al., 1965; Kitchin et al., 1967; Miller, 1998; Weiss, 2000), paso limitante que se presenta en la ruta de biosíntesis. Sin embargo, contrariamente a lo que se creía, un trabajo reciente reportó que la placenta tiene la capacidad de sintetizar DHEA a partir de PREG (Loganath et al., 2002), por la presencia de la enzima P450 C-17 dando lugar a la conversión de PREG hacia DHEA o de progesterona hacia testosterona; sin embargo, se ha determinado que la cantidad de esta enzima es

insuficiente y se ha considerado fundamental la participación del feto para la biosíntesis de andrógenos. Así, DHEAS en la placenta, obtenida del feto, pierde el grupo sulfato unido al carbono 3 de manera rápida y eficiente por la sulfatasa placentaria, enzima que está presente en la placenta con una extensa actividad (Taylor y Martin, 1998; Jaffe et al., 1999), liberando de esta forma a DHEAS y quedando DHEA en forma libre (no conjugada). Este es un paso crítico en la elaboración de otros andrógenos que se empiezan a biotransformar en la placenta, nuevamente por la acción de la 3β -HSD, formando así a la androstendiona y mediante la 17β -HSD se establece la constante interconversión hacia testosterona (Lamb et al., 1967) y su epímero la epitestosterona. Asimismo, el sulfato de 16α -hidroxi-dehidroepiandrosterona (16α -OH-DHEAS) (Fig. 5) es formado en las suprarrenales y en el hígado fetal y al pasar a la placenta se puede convertir hacia otros andrógenos hidroxilados en el carbono 16, originando 16α -OH-androstendiona y 16α -OH-testosterona o incluso pueden hidroxilarse en el carbono 7, produciendo una amplia gama de compuestos (Gandy, 1977; Hampl y Starka, 2000).

Finalmente, la placenta posee un sistema de aromatización sumamente activo que transforma rápidamente a testosterona, androstendiona y sus formas 16α -hidroxiladas en los correspondientes estrógenos (estrona, estradiol y estriol), debido a la gran cantidad de la enzima aromatasa (P450 arom) presente en este tejido (Siitteri y MacDonald, 1966; Dell'Acqua et al., 1967; Goodyer y Branchaud, 1981; Purohit y Oakey, 1989; Newby et al., 2000). A lo largo del embarazo, el exceso de esteroides "que ya no son útiles" pasan de la placenta al compartimento materno y entran a un proceso de conjugación (Fig. 5) con grupos sulfato, grupos glucurónicos o la mezcla de ambos para facilitar su excreción (Russell y Wilson, 1994).

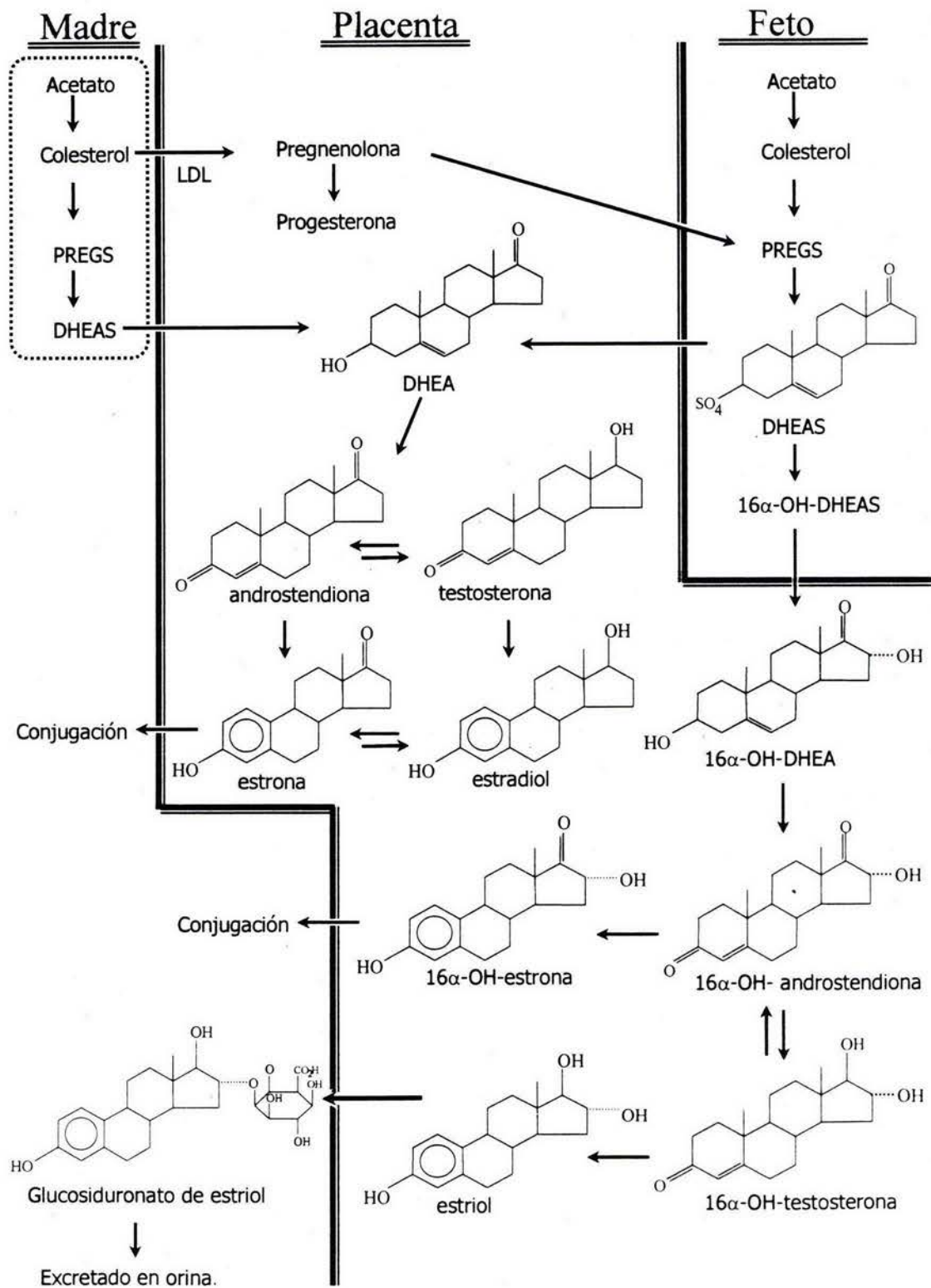


Figura 5. Ruta principal de síntesis de los andrógenos en la placenta, estableciendo la estrecha relación madre-placenta-feto, que involucra los procesos de bioconversión y conjugación para facilitar la excreción de metabolitos vía la orina en la madre (modificado de Beling, 1977; Newby et al., 2000).

c) Síntesis de andrógenos en el compartimento fetal

Respecto a la transformación de andrógenos en el feto, cuando este adquiere la capacidad de sintetizar esteroides, se involucra de una forma determinante para su producción. Los esteroides producidos *de novo* en el feto (Carr y Simpson, 1982), así como los aportados por la placenta entran en un proceso de sulfoconjugación de esteroides hidroxilados de manera ubicua y se desarrollan en distintos sitios que incluyen: el pulmón, el intestino, el hígado y la glándula suprarrenal. En esta última, la sulfurilación conduce a la formación de los distintos sulfatos de esteroides como el sulfato de colesterol y el sulfato de PREG (PREGS), esteroide que da origen al sulfato de DHEA (DHEAS), principal precursor de andrógenos y el más importante desde el punto de vista cuantitativo (Bolte et al., 1966; Jaffe et al., 1968; Pérez-Palacios et al., 1968; Burger, 2002), encontrando en menor cantidad 11 β -hidroxi-testosterona (Mancuso et al., 1968). En el hígado fetal, como se mencionó, DHEAS se hidroxila en el carbono 16, dando lugar a una importante cantidad de 16 α -OH-DHEAS (Bolté et al., 1964; 1966; Buster et al., 1974) o bien a partir de DHEA tener una sucesiva hidroxilación en el carbono 7 de la molécula, obteniendo 7 α - y 7 β -hidroxi-dehidroepiandrosterona (7 α -OH-DHEA ó 7 β -OH-DHEA) (Sulcova et al, 1968).

Los resultados de otros estudios, han demostrado que la testosterona producida en la placenta se transporta al hígado fetal para metabolizarse hacia andrógenos 5 β -reducidos como: 5 β -DHT (17 β -hidroxi-5 β -androstan-3-ona), 16 α -OH-5 β -androstadiol, 16 α -OH-eticolanolona, 16 α -OH-5 β -androstandiona y 16 α -OH-androstendiona (Fig. 6), proceso determinado por la gran actividad de la enzima 5 β -reductasa presente en el hígado (Charbonneau y The Van-Luu, 2001), mientras que en otros tejidos fetales que

comprenden: el pulmón y el tracto gastrointestinal, la conversión es hacia metabolitos 5α -reducidos como: 5α -androstandiona, androsterona, epiandrosterona y 5α -DHT (Benagiano et al., 1968; Mancuso et al., 1968). Por otra parte, se ha sugerido que el tejido hematopoyetico fetal podría ser capaz de convertir testosterona hacia algunos compuestos 5β -reducidos, donde se incluyen: 5β -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol, 5β -androstan- 17β -ol, 3α -ona, androstenediona y 5β -androstandiona (Parsons, 1970). Los hallazgos anteriores son de suma importancia, ya que muestran el activo proceso de conversión de los dihidro- y tetrahidro-derivados de testosterona en el compartimento fetal.

La presencia de todos los andrógenos, sugiere la posible participación de dichos compuestos en la regulación de eventos biológicos en la placenta o al integrarse nuevamente al compartimento materno o fetal podrían ejercer una acción en blancos específicos para la generación de nuevos eventos celulares o bien continuar con su ruta metabólica y entrar en un proceso de conversión más extensa que incluye: los procesos de oxido-reducción en el carbono 17 y de reducciones en los carbonos 3 y 5, generando una mayor variedad de metabolitos 5α - y 5β -reducidos en tejidos periféricos (Morato y Flores, 1990).

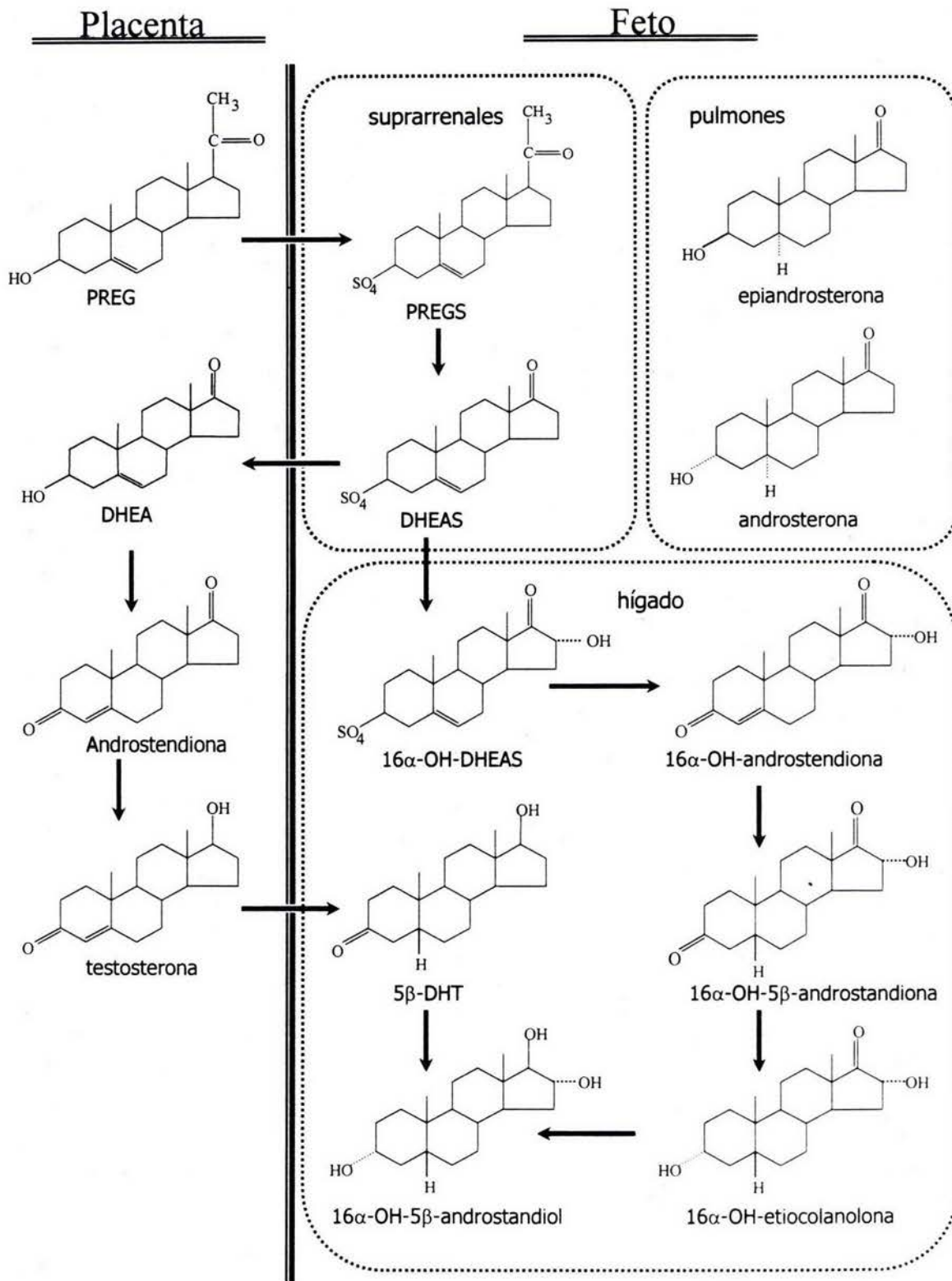


Figura 6. Ruta de biosíntesis de los principales andrógenos 5-reducidos en el compartimento fetal. Nótese la predominante 5 β -reducción en el hígado, mientras que la 5 α -reducción tiene lugar en otros tejidos fetales como el pulmón (modificado de Benagiano et al., 1968; Mancuso et al., 1968).

2.4 Concentraciones séricas de andrógenos

Es bien conocido que DHEA y su éster sulfato (DHEAS), son los esteroides más abundantes en la circulación humana. Aunque la producción de estos andrógenos es mayor en el hombre, en la mujer la secreción de DHEAS es producida en un rango de 3.5-20 mg/día durante la vida reproductiva y su concentración circulante se estima en un rango que varía entre 3-12 $\mu\text{mol/L}$ (1-4 $\mu\text{g/mL}$). Estas concentraciones no varían en forma significativa durante el ciclo menstrual. El rango de producción de DHEA en su forma no conjugada es de 6-8 mg/día con una concentración que varía entre 3-35 nmol/L (1-10 ng/mL) (Burger, 2002; Celec y Stárka, 2003). Tanto DHEA como DHEAS presentan un patrón característico de las concentraciones séricas relacionado con la edad, alcanzando el máximo entre la segunda y tercera década de la vida en ambos sexos, disminuyendo sus concentraciones hasta un 10 y 20 % de la concentración máxima durante la edad avanzada (Orentreich et al., 1984; Bélanger et al., 1994; Trivedi y Khaw, 2001; Rainey et al., 2002). Por su parte, la concentración sérica de testosterona libre y total en el hombre también presenta una progresiva disminución con la edad (Vermeulen, 1991; Tenover, 1994; Bélanger et al., 1994; Baulieu, 2002).

En forma notable, los reportes de las concentraciones séricas de testosterona varían entre los individuos evaluados en los distintos laboratorios. En la mujer, se ha demostrado que la concentración de testosterona se incrementa en la fase folicular, así como durante la fase lútea, presentando una variación durante el periodo diurno, alcanzando concentraciones máximas por la mañana (Davis y Tran, 2001; Davison y Davis, 2003). Esto determina que el índice de producción diaria se encuentra en el orden de

0.1-2.5 mg/día y la concentración sérica está en un rango entre 0.6-2.5 nmol/L (0.2-0.7 ng/mL) (Burger, 2002; Taieb et al., 2003), estableciendo de forma general, que en la mujer la concentración sérica de testosterona se mantiene constante a lo largo de su vida (Labrie et al., 1997a; Dorgan et al., 2002).

En cuanto a los metabolitos 5-reducidos, 5 α -DHT muestra una disminución en su concentración sérica del hombre entre la edad de 50-70 años y en la mujer se presenta una progresiva disminución entre los 20-30 y entre los 70-80 años de edad, bajando sus concentraciones de 0.9 nmol/mL (0.26 ng/mL) a 0.5 nmol/mL (0.14 ng/mL) (Labrie et al., 1997a). Por su parte, androsterona en el hombre y la mujer no muestra una clara variación con respecto a la edad, manteniendo valores muy cercanos en las diferentes etapas de su vida entre 2.5-3.5 nmol/L (0.72-1 ng/mL). Con respecto a androstandiol, se ha reportado que existe una notoria disminución en el hombre a partir de los 60 años y en la mujer no existe variación con 1.5-2 nmol/L (0.43-0.58 ng/mL) (Bélanger et al., 1994; Labrie et al., 1997a), siendo datos poco consistentes.

2.4.1 Concentraciones séricas de andrógenos en el embarazo

Durante la gestación las concentraciones séricas de progesterona se incrementan significativamente de una forma lineal conforme avanza el embarazo, alcanzando valores que oscilan entre 477-556 nmol/L (150-175 ng/mL) al término (Albrecht y Pepe, 1990; Taylor y Martin, 1998) (Fig. 7A). Respecto a los andrógenos no conjugados, sus concentraciones séricas se encuentran en un orden muy inferior al de la progesterona y sus concentraciones de expresión son variables (Fig. 7C). Sin embargo, las concentraciones

reportadas en la literatura han sido controversiales, dadas por las diferentes técnicas para cuantificar estos compuestos. La concentración sérica de los andrógenos en la madre durante el embarazo ha sido determinada sólo para DHEAS, DHEA, testosterona, androstendiona y 5α -DHT (Fig. 7B y 7C).

Respecto a la concentración sérica materna de DHEA, se ha reportado que oscila entre un valor promedio de 17.40 nmol/L (5.02 ng/mL) al inicio del embarazo, valor que disminuye sutilmente conforme avanza la gestación, alcanzando un valor final de 15.46 nmol/L (4.46 ng/mL) al término, lo cual indica un 12 % de disminución. En cambio, su éster sulfatado (DHEAS) presenta un valor sérico muy alto, de aproximadamente 2.6 μ mol/L (1.0 μ g/mL) al final del embarazo (Rivarola et al., 1968; Laatikainen et al., 1980; Mathur et al., 1980).

La concentración de androstendiona al inicio del embarazo se encuentra en un rango de 7.01 nmol/L (2.01 ng/mL), manteniendo su concentración sólo durante las primeras semanas, con un incremento a partir de la semana 13 y 16, aumentando un 39 % con una media de 11.45 nmol/L (3.28 ng/mL) (Mizuno et al., 1968; Troisi et al., 2003), con una variación no significativa hasta el término (Fig. 7C y 8).

En forma interesante, testosterona aumenta su concentración conforme avanza la gestación, estableciendo un aumento de 6.48 nmol/L (1.87 ng/mL) antes de la semana 28 hasta alcanzar una concentración de 14.42 nmol/L (4.16 ng/mL) al término (Bammann et al., 1980). Este aumento es del 56 % y es un valor muy cercano al reportado para su precursor inmediato la DHEA (Fig. 7C y 8). Sin embargo, en estudios recientes los

resultados han sido contrastantes, reportando un valor sérico al final del embarazo entre 4.36-6.03 nmol/L (1.26-1.84 ng/mL) (Dokras et al., 2003; Troisi et al., 2003), valores más altos que los de una mujer no embarazada, pero similares a los reportados antes de la semana 28 (Bammann et al., 1980).

Para 5α -DHT el comportamiento es distinto, ya que sólo durante el primer trimestre de gestación se presenta una ligera elevación en la concentración sérica, con un valor de 1.27 nmol/L (0.37 ng/mL), el cual disminuye paulatinamente después del primer trimestre hasta el final del embarazo a un valor de 0.61 nmol/L (0.18 ng/mL) (Fig. 7C y 8), rangos similares a los de una mujer no embarazada (Saez et al., 1972; Abraham, 1974; Buster et al, 1979).

Es importante mencionar que los valores séricos de 5β -DHT, androsterona, androstandiol y otros andrógenos no han sido determinados durante el embarazo.

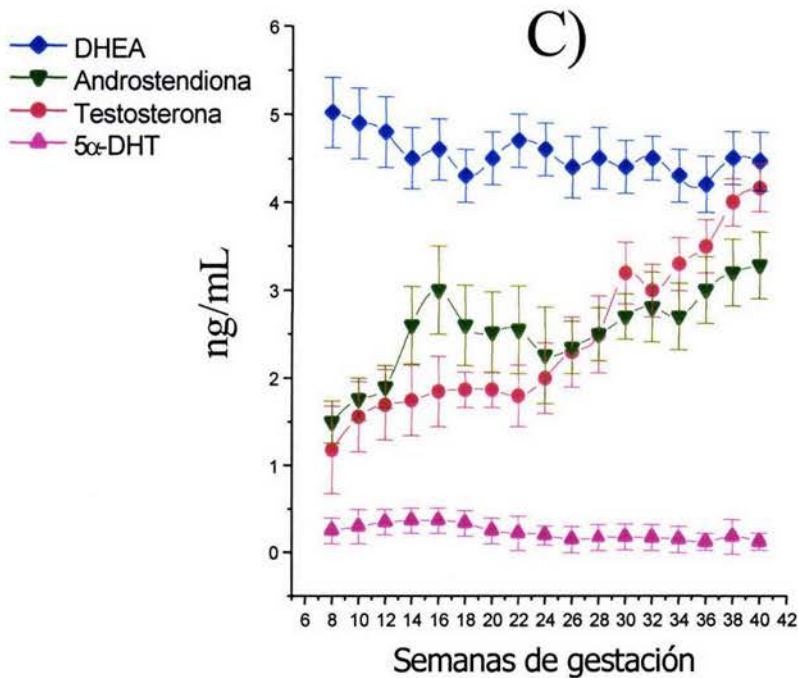
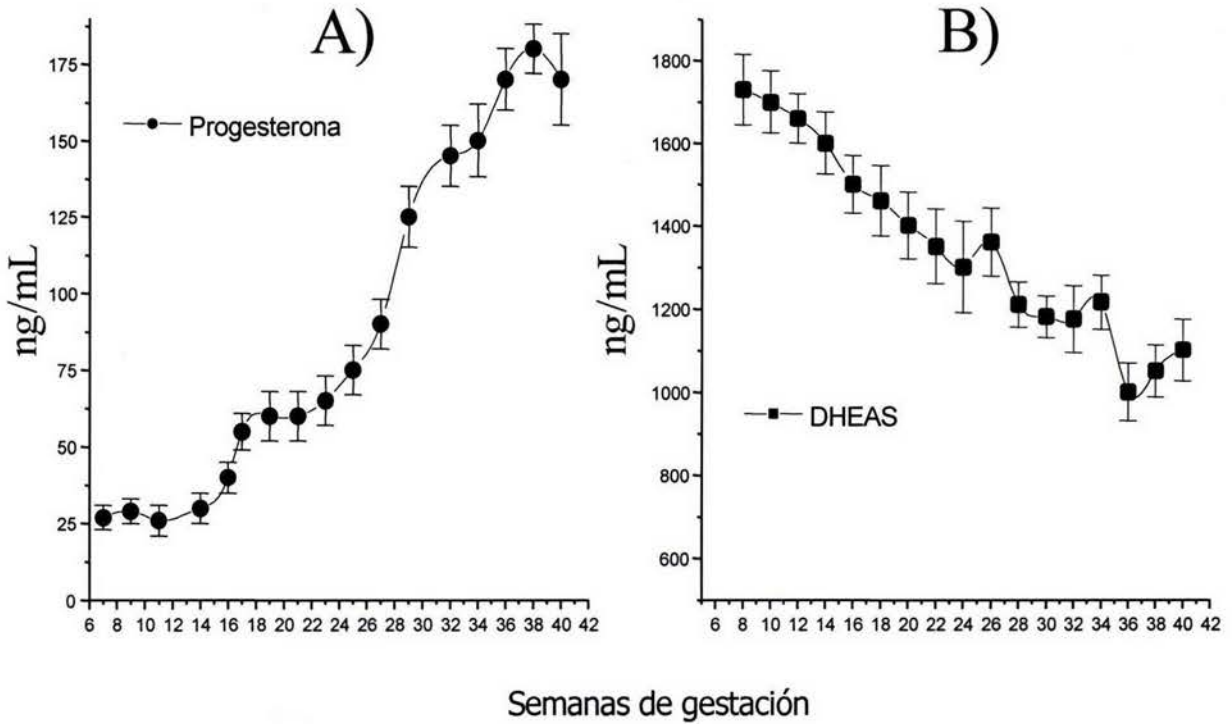


Figura 7. Comparación del nivel sérico de los esteroides durante el embarazo humano. A) progesterona (modificada de Albrech y Pepe, 1990), B) DHEAS (datos tomados de Buster et al., 1979) y C) andrógenos no conjugados (datos tomados de Mizuno et al., 1968; Buster et al., 1979; Laatikainen et al., 1980; Bammann et al., 1980; Troisi et al., 2003) cada punto representa la media $n \geq 19 \pm EEM$.

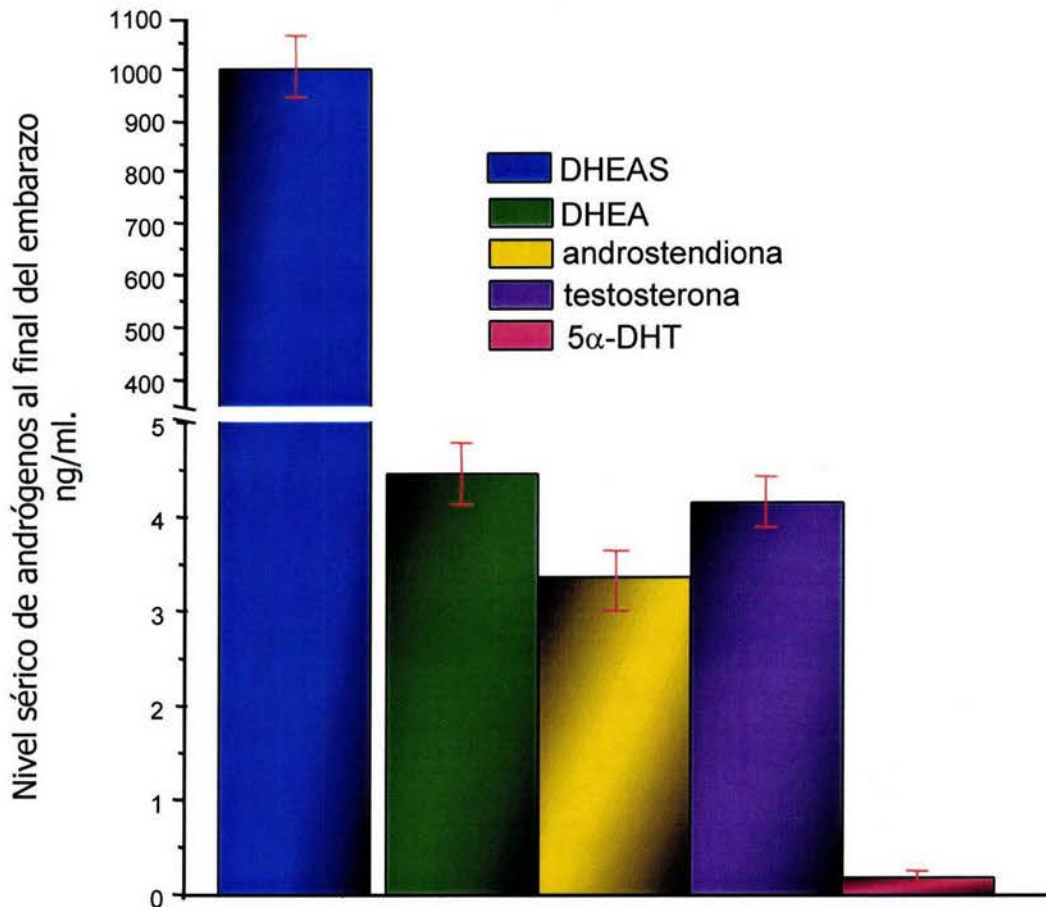


Figura 8. Comparación de los niveles séricos de los andrógenos en el embarazo humano a término mostrando un valor promedio $n \geq 19 \pm \text{EEM}$ (datos obtenidos de Saez et al., 1972; Laatikainen et al., 1980; Bammann et al., 1980; Troisi et al., 2003).

Algunos autores han reportado que no existe diferencia en los valores séricos maternos de DHEA, androstendiona y testosterona relacionada con el sexo de los fetos (Rivarola et al., 1968, Mizuno et al., 1968; Bammann et al., 1980). En contraste, otros estudios han revelado que el valor sérico fetal en ambos sexos tiene claras diferencias, indicando que el feto masculino presenta mayor cantidad total de andrógenos (11.1 ± 4.9 ng/mL) comparado con la concentración sérica producida por el feto femenino (8 ± 1.3 ng/mL). También, la concentración sérica evaluada en forma independiente para testosterona en fetos masculinos resultó más alto (3.70 ng/mL), que el de un feto femenino

(0.96 ± 0.26 ng/mL) y más alto que el valor en una mujer no embarazada (0.37 ± 0.26 ng/mL) (Diez D´Aux y Murphy, 1974; Troisi et al., 2003).

2.5 Efectos biológicos de los andrógenos

Se ha reportado que los andrógenos modulan las funciones biológicas de muchos tejidos y órganos que involucran de forma general: al hipotálamo, la glándula tiroides, la glándula adrenal, la glándula submaxilar, el riñón, el hígado y el corazón. Además, regulan el desarrollo, el crecimiento y el mantenimiento de las características sexuales secundarias (Traish et al., 2002). En hombres: están involucrados desde su diferenciación sexual y ayudan a la maduración y al funcionamiento correcto de la próstata, los testículos, el pene, el epidídimo y la vesícula seminal. En mujeres: los andrógenos, son esenciales para el desarrollo de las funciones reproductivas (ovulación) como precursores para la síntesis de los estrógenos, que modulan conjuntamente el desarrollo de las glándulas mamarias, del clítoris, de la vagina, del útero y de los ovarios (Simpson, 2002). Asimismo, los andrógenos están involucrados en otras funciones como son: la facilitación de la libidò y la potencia sexual, la densidad del hueso, la fuerza y masa muscular, la energía, la distribución del tejido adiposo y el bienestar fisiológico entre las bondades más descritas actualmente (Wilson, 1999; Bachmann et al., 2002; Notelovitz, 2002). La alteración en la biosíntesis o metabolismo de los andrógenos pueden traer consigo efectos no deseables en la función reproductiva sexual y en la salud general, afectando incluso el estado de ánimo del individuo (Miller, 2001; Dennerstein et al., 2002, Bancroft, 2002).

Referente al precursor de andrógenos, se ha reportado que la DHEA presenta beneficios exclusivos en animales de laboratorio y en humanos. Las evidencias han mostrado que la administración intravenosa de DHEA y su sulfato, facilitan el flujo sanguíneo durante el embarazo humano a término; regulado por un rápido incremento del óxido nítrico (Manabe et al., 1999). También ejerce una función inmunomoduladora en el embarazo por una potenciación directa sobre la activación de linfocitos (Suitters et al., 1997), mejorando el sistema inmune y siendo capaz de regular la inhibición sobre la expresión de RNA y DNA virales en los mamíferos (Henderson et al., 1992). Este esteroide también regula la maduración cervical inducida por el ácido hialurónico en conejos, por un proceso vía interleucina 8 y sus receptores (Belayet et al., 1999). Por otra parte, se ha reportado la disminución del riesgo de enfermedades oncogénicas (Schwartz et al., 1986; Li y Yan, 1993) y aterogénicas, mostrando también retardo en los procesos de envejecimiento y diabetes, favoreciendo procesos de aprendizaje y memoria con beneficio directo sobre el Alzheimer. Asimismo, existen evidencias de que DHEA es capaz de disminuir la obesidad en animales (Schwartz et al., 1981; MacEwen y Kurzman, 1991; Nestler et al., 1992; Schwartz y Pashko, 1995; Diamond et al., 1996; Byrne y Bradlow, 2001). Otro efecto biológico postulado para la DHEA es la inhibición de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Marks and Banks, 1960), revirtiendo la resistencia a la insulina, la cual es asociada con el tratamiento con glucocorticoides (Coleman et al., 1982). Estudios recientes sugieren que la terapia de reemplazo con DHEA podría tener efectos benéficos sobre el bienestar tanto fisiológico como psicológico en hombres y mujeres mayores. Un estudio realizado en mujeres postmenopáusicas con un tratamiento de 12 meses con terapia de reemplazo hormonal con DHEA muestra un incremento en la maduración del epitelio vaginal, con un efecto estimulante sobre el endometrio (Labrie et al., 1997b).

Un importante aspecto de la administración de DHEA es la rápida conversión hacia DHEAS, la cual puede ser convertida en tejidos periféricos nuevamente hacia DHEA y aumentar también la circulación de andrógenos y estrógenos en el metabolismo del individuo, reestableciendo así la disminución de los niveles de las hormonas que se presenta durante el envejecimiento (Morales et al., 1994; Field et al, 1994; Labrie et al., 1997c; Callies et al., 2000; Allolio y Artl, 2002).

Con respecto a testosterona, se ha establecido que interviene directamente en la diferenciación sexual del feto masculino, estimulando directamente la formación del epidídimo, de los vasos deferentes y la vesícula seminal a partir de los conductos de Wolf, mientras que 5α -DHT, sintetizada a partir de testosterona por la acción de la 5α -reductasa, es requerida para el desarrollo de la próstata y de los genitales externos que incluyen al pene y el escroto (Wilson et al., 1993), regulando también los cambios en la pubertad del fenotipo masculino (Rogol, 2002). En cambio, a su isómero 5β -DHT, no se le ha conferido ninguna propiedad androgénica (Kokotis y Liao, 1999). Por otra parte, algunos resultados han sido controversiales, como en los problemas cardiovasculares, debido a que se ha aceptado que el exceso de testosterona podría estar relacionado con enfermedades y problemas serios en la fisiología del individuo (Vermeulen, 1991; Tenover, 1997), con riesgos que involucran el desarrollo de ginecomastia, la producción de policitemia, retención de fluidos, apnea y la aceleración en el desarrollo de problemas prostáticos (Tenover, 1999).

En relación a otros derivados de la testosterona, se sabe que el androstandiol es aproximadamente 3 veces más potente que la androsterona en su actividad como esteroide

androgénico (Kirschner y Bardin, 1972; Walsh y Wilson, 1976; Moore et al., 1979; Mahendroo et al., 1996). El androstandiol ha sido cuantificado en el plasma de humano, rata, ratón y en otros mamíferos (Kinouchi y Horton, 1974), aunque resulta difícil ubicar su bioactividad, por su rápida conversión hacia otros andrógenos 5α -reducidos (Fig. 3). El androstandiol es considerado, por algunas líneas de investigación, como un andrógeno activo requerido para desencadenar el parto en ratones (Mahendroo et al., 1996), además, otros reportes muestran que es un metabolito de PREG, producido por el ovario antes y en el inicio de la pubertad en la rata, mostrando que en este tejido hay una constante conversión de androstandiol (5α -androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol) y su epímero 5α -androstan- $3\beta,17\beta$ -diol (Eckstein et al., 1970). El nivel sérico de este andrógeno, de origen ovárico, es del orden de 342-854 nmol/L (100-250 ng/ml) en ratas hembras inmaduras (Eckstein y Ravid, 1974; Eckstein, 1983) y es secretado activamente por los testículos de conejo (Ewing et al., 1975). Las evidencias anteriores determinan la presencia de este andrógeno, del cual se van conociendo poco a poco sus posibles efectos moduladores en el organismo.

2.5.1 Efecto de las hormonas esteroides sobre la contracción miométrial

La importancia de las hormonas esteroides, enfocada a la actividad contráctil uterina, fue mostrada desde 1903 (Fraenkel). En este experimento pionero, fue señalado que el cuerpo lúteo es indispensable para mantener el embarazo en conejas. Más tarde, se reportó que un extracto obtenido del cuerpo lúteo era capaz de inducir cambios progestacionales y mantener el embarazo en conejas castradas (Allen y Corner, 1929). Sin embargo, fue un año después del aislamiento y caracterización de la progesterona (Butenandt y Westphal, 1934), cuando se mostró que este esteroide producía un efecto inhibitorio en la actividad uterina *in vivo* de la coneja (Allen y Reynolds, 1935). Este hecho

dió lugar al nacimiento de la predominante conceptualización de que la progesterona es un mecanismo de "defensa" durante el embarazo y así el uso del nombre "esteroide progestacional" (progesterona) para describirlo, considerando a la progesterona como la hormona por excelencia para producir la quiescencia uterina necesaria para llevar a cabo la implantación y el mantenimiento del embarazo en los mamíferos, señalando que la caída de los niveles de esta hormona a término del embarazo desencadena el trabajo de parto (Bedford et al., 1972, Arkaravichien y Kendle, 1990; Astle et al., 2003a).

En la década de 1960, numerosas evidencias experimentales en animales, mostraron que la progesterona tiene un efecto relajante en el útero de la coneja (Csapo, 1961), sobre contracciones uterinas estimuladas eléctricamente en la rata preñada (Marshall y Csapo, 1961) y sobre contracciones inducidas por oxitocina en útero de rata no preñada (Barnafí y Croxatto, 1963). Varios años después se reporta que además de la progesterona, algunas progestinas 5-reducidas también ejercen un efecto relajante sobre las contracciones espontáneas del útero de la rata no preñada (Kubli-Garfias et al., 1979) y preñada (Kubli-Garfias et al., 1983a), mostrando mayor potencia relajante las progestinas 5 β -reducidas.

Trabajos realizados en el útero humano, muestran que la progesterona también induce un efecto relajante sobre las contracciones espontáneas e inducidas con oxitocina en tiras de miometrio humano *in vitro* (Kumar et al., 1962; Barnafí y Larraguibel, 1974). Posteriormente, se reporta el efecto de progesterona y dos progestinas 5 α -reducidas: 5 α -pregnan-3,20-diona y 3 α -hidroxi-5 α -pregnan-20-ona, sobre la actividad contráctil *in vitro* del miometrio humano gestante a término (Löfgren et al., 1992; Löfgren y Bäckstrom, 1994), observando que estos metabolitos inducen una disminución no significativa de las

contracciones espontáneas. En un análisis posterior se describió que las progestinas: 3β -hidroxi- 5β -pregnan-20-ona, 5β -pregnan-3,20-diona, 3α -hidroxi- 5β -pregnan-20-ona y 3α -hidroxi- 5α -pregnan-20-ona, inducen una relajación mayor a la inducida por progesterona, mientras que otras progestinas 5α -reducidas como: 5α -pregnan-3,20-diona y 3β -hidroxi- 5α -pregnan-20-ona fueron ineficaces o débiles inhibidores de la actividad contráctil del útero humano gestante a término (Perusquía et al., 1997; Perusquía y Jasso-Kamel, 2001). Este hallazgo interesante contrasta con el tenue efecto que se le había conferido a la 3α -hidroxi- 5α -pregnan-20-ona (Löfgren et al., 1992), siendo ésta la progestina más potente en el estudio de Perusquía y Jasso-Kamel (2001), debido quizá, a las diferentes condiciones experimentales usadas por ambos grupos. El grupo de Thornton (1999), también encontró que la 5β -pregnan-3,20-diona, induce inhibición de las contracciones espontáneas e inducidas por oxitocina del útero humano a término de la gestación.

Las evidencias sobre el efecto relajante de los andrógenos en la actividad uterina han sido limitadas a los estudios en animales de laboratorio (Perusquía, 2001). La descripción inicial fue publicada por Robson en 1937, reportando que la testosterona induce un efecto relajante sobre las contracciones del útero aislado de coneja. Posteriormente, se probó el efecto de testosterona sobre contracciones estimuladas con oxitocina en útero de rata, inhibiendo su actividad contráctil (Barnafí y Croxatto, 1963). Pero fue hasta la década de 1980, cuando se reporta el efecto relajante de varios andrógenos sobre la contractilidad espontánea del útero aislado de la rata (Kubli-Garfias et al., 1980), mostrando que los metabolitos 5α -reducidos: androsterona (3α -hidroxi- 5α -androstan-17-ona) y androstandiol (5α -androstan- 3α - 17β -diol), así como el andrógeno 5β -reducido, 5β -DHT (17β -hidroxi- 5β -

androstan-3-ona), son mejores inhibidores de la actividad contráctil, incluso con mayor potencia que sus precursores DHEA y testosterona (Tabla 1). Asimismo, se ha mostrado el efecto relajante de testosterona, 5 α -DHT, 5 β -DHT, androsterona y androstandiol sobre la contracción inducida con KCl en el útero de la rata (Sánchez-Aparicio et al., 1993; Gutiérrez et al, 1994; Perusquía y Villalón, 1996), así como el efecto relajante de testosterona, 5 β -DHT, androsterona y androstandiol sobre contracciones inducidas por otros agentes como: CaCl₂ (Perusquía et al., 1990), serotonina (Perusquía et al., 1991a), acetilcolina (Perusquía et al., 1991b) y oxitocina (Perusquía y Campos, 1991). El análisis de estos datos muestra que el andrógeno con mayor potencia relajante es 5 β -DHT (Tabla 1), seguido de la potencia observada para androsterona y androstandiol, siendo más eficaces que su precursor testosterona (Perusquía, 2003). En un estudio reciente se observó que el precursor de andrógenos, la DHEA ha mostrado ser un relajante eficaz de la contracción uterina de la rata y el humano (Perusquía y Calixto, 2003).

En otros experimentos realizados sobre la actividad contráctil espontánea del útero de rata se ha demostrado que algunos 5 α - y 5 β -androstano, que carecen de un grupo funcional en el carbono 17 y que presentan solamente grupos funcionales en el carbono 3 y 5 (5 α -androstan, 5 α -androstan-3 α -ol, 5 α -androstan-3 β -ol, 5 α -androstan-3-ona, 5 β -androstan, 5 β -androstan-3 α -ol, 5 β -androstan-3 β -ol y 5 β -androstan-3-ona), son débiles inhibidores de la contracción uterina (Navarrete, 1999; Barrera, 2000), estos estudios evidenciaron la necesidad de la interacción entre los diferentes grupos sustituyentes en los carbonos 3, 5 y 17, así como su orientación espacial *cis/trans* para determinar la potencia relajante de cada uno de estos compuestos, destacando que la 5 β -reducción del anillo A ó

la combinación 3α -hidroxi- 5α en el mismo anillo es necesaria para la obtención de un efecto relajante óptimo.

La relajación que producen los andrógenos no es privativa del músculo liso uterino, ya que se ha reportado que otros músculos lisos son también sensibles a su acción relajante, como el observado por testosterona, androsterona y androstandiol en el epidídimo y vesícula seminal de la rata (Kubli-Garfias et al., 1983b), por 5β -DHT, androsterona, androstandiol y testosterona en el íleon del tracto gastrointestinal del cobayo (Kubli-Garfias et al., 1987) y por DHEA, testosterona y 5α -DHT en el músculo liso vaginal en la coneja (Traish et al., 2002). Además, testosterona induce un efecto vasodilatador en diferentes lechos vasculares de varias especies (Revisado por: Perusquía, 2003; Jones et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Liu et al., 2003). También se ha destacado la aguda acción vasodilatadora que induce 5β -DHT en la aorta torácica de la rata (Perusquía et al., 1996; Perusquía y Villalón, 1999).

En la vasculatura humana, testosterona también ha mostrado ser un potente relajante (Adams et al., 1995; Rosano et al., 1999; Webb et al., 1999) y se ha observado que algunos metabolitos, como 5β -DHT, pueden ejercer un significativo efecto relajante, mayor al que produce testosterona en la arteria umbilical humana (Toledo et al., 2002; 2003). En forma relevante, DHEA ha resultado también tener una aguda potencia vasodilatadora en la aorta de rata y en la arteria umbilical humana (Perusquía y Calixto, 2003).

Los datos disponibles muestran que los androgenos, en general, son eficientes para relajar la musculatura lisa y en particular, 5 β -DHT es un compuesto con una fuerte propiedad relajante en diferentes tipos de músculo liso (Tabla 1; Perusquía, 2003).

Tabla 1. Comparación de la potencia relajante ejercida por diferentes andrógenos en varios tipos de músculo liso. Nótese la potencia del andrógeno 5 β -reducido (5 β -DHT) (Tomada y traducida de Perusquía, 2003).

Modelo Experimental	Orden de potencia	Referencia
Útero aislado de rata		
-Contractilidad espontánea	Androsterona > 5 β -DHT > androstandiol > epietiocolanolona > 5 β -androstanediona \geq T \geq 5 α -DHT = epiandrosterona \geq etiocolanolona \geq DHEA	Kubli-Garfias et al., 1980
-Contracción inducida con Ca ²⁺	5 β -DHT > androstandiol > androsterona > T	Perusquía et al., 1990
-Contracción inducida con KCl	5 β -DHT > androsterona = androstandiol \geq T	Perusquía y Villalón, 1996
-Contracción inducida con Ox	Androsterona > 5 β -DHT \geq androstandiol \geq T	Perusquía y Campos, 1991
-Contracción inducida con 5-HT	5 β -DHT > androsterona > androstandiol > T	Perusquía et al., 1991 a
-Contracción inducida con ACh	5 β -DHT > androsterona > androstandiol > T	Perusquía et al., 1991 b
Vesícula seminal y epidídimo de rata		
-Contracción inducida con BaCl ₂	Androsterona > androstandiol > T	Kubli-Garfias et al., 1983
Íleon aislado de cobayo		
-Contractilidad espontánea	5 β -DHT > androsterona > androstandiol > T	Kubli-Garfias et al., 1987
Aorta aislada de rata		
-Contracción inducida con NA	5 β -DHT > 5 α -DHT > T	Perusquía et al., 1996
Arteria coronaria aislada de rata		
-Contracción inducida con PGF _{2α}	T > progesterona > 17 β -estradiol > cortisol	English et al., 2001
Arteria pulmonar aislada de rata		
-Contracción inducida con PGF _{2α}	Progesterona > T > cortisol > 17 β -estradiol	English et al., 2001

Testosterona (T), Dihidrotestosterona (DHT), Dehidroepiandrosterona (DHEA), Serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT), Prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α}), Oxitocina (Ox), Acetilcolina (ACh), Noradrenalina (NA), Cloruro de Bario (BaCl₂), Cloruro de Potasio (KCl).

2.6 Mecanismo de la acción relajante de las hormonas esteroideas en el miometrio

El modelo clásico de acción de los esteroideos, involucra la unión de los esteroideos con su receptor y subsecuentemente la transcripción es iniciada con efectos positivos ó negativos sobre la expresión de genes blanco (Beato y Klung, 2000, Heinlein y Chang, 2002a). La considerable latencia de los efectos genómicos de los esteroideos es la consecuencia de pasos que se consumen a lo largo del tiempo (>30 minutos) para su acción, caracterizados por un retraso específico y una alta sensibilidad hacia los inhibidores de la transcripción (actinomicina D) y síntesis de proteínas (cicloheximida), así, como por su sensibilidad al bloqueo dado por antihormonas (Bygdeman et al., 2000).

En contraste a la acción genómica de los esteroideos, existen numerosos efectos que han sido catalogados como de tipo nogenómico (Falkenstein et al., 2000a, 2000b; Coleman y Smith., 2001; Lösel y Wehling, 2003), determinados por: 1) su rápido inicio de acción (de segundos a minutos), 2) su insensibilidad a inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas, 3) por no ser bloqueados por antagonistas y 4) por los efectos producidos aún sin tener acceso al núcleo (ligados covalentemente a macromoléculas impermeables a la membrana o en células que carecen de núcleo).

Ejemplos clásicos de los efectos nogenómicos de los esteroideos, fueron descritos inicialmente en el sistema nervioso central por Selye (1941; 1942), mostrando que los esteroideos son potentes anestésicos *in vivo*, manifestando su efecto de forma inmediata. Señalando más adelante, que inducen un efecto sedativo, hipnótico y anticonvulsivo (Phillips, 1975; Gyermek et al., 1968; Schumacher, 1990; Craig, 1987; McEwen, 1991), al disminuir la excitabilidad del sistema nervioso central (Kubli-Garfias, 1984) e induciendo

sincronización encefalográfica (Kubli-Garfias et al., 1982) y disminución en la actividad multiunitaria después de su administración (Kubli-Garfias, 1987).

Por otra parte, en otro tejido excitable como el músculo liso uterino, el efecto relajante reportado por progestinas y andrógenos también es considerado como de tipo nogenómico, por ser un efecto observado de forma inmediata, con una latencia de segundos a minutos, con acciones directas en la membrana y no mediadas por un receptor intracelular, ya que la actividad logra recuperarse cuando el esteroide se retira del tejido, determinando un efecto reversible (Perusquía et al., 1990; Perusquía y Villalón 1996) y no bloqueado por actinomicina D, cicloheximida (Sánchez-Aparicio et al., 1993; Gutiérrez et al., 1994) ó por antihormonas como flutamida (Sánchez-Aparicio et al., 1993) ó el RU-486 (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001), proponiendo que el efecto relajante inducido por progestinas y andrógenos sobre la actividad contráctil uterina de la rata, es independiente de los factores de transcripción y es un efecto membranal de tipo nogenómico (Perusquía, 2001).

Se ha propuesto que en el mecanismo de acción de los esteroides para inducir relajación uterina se encuentran involucrados algunos iones. Batra (1973) estudió la captación de calcio por mitocondrias en el miometrio humano tratado con estrógenos observando que éstos inhiben la captura de calcio mitocondrial dependiente de ATP mientras que la progesterona no la afectaba. Posteriormente, se mostró que esta hormona disminuye la fijación de calcio del miometrio (Batra y Bengtsson, 1978).

Evidencias posteriores propusieron que en el mecanismo de acción que los esteroides utilizan para inducir relajación uterina, se encuentra involucrada una disminución de la entrada de calcio extracelular al interior de la célula muscular, por un posible bloqueo de los canales de calcio operados por voltaje (Perusquía et al., 1990). Estos datos están basados en que, tanto las progestinas como los andrógenos logran inhibir la contracción inducida por calcio en el útero despolarizado de la rata, aunado a que dicho efecto es revertido por la adición de ionóforos de calcio (A-23187 y X-537A), estableciendo un efecto calcio-antagónico (Perusquía et al., 1990). Por otra parte, se ha reportado que los esteroides pueden inhibir las contracciones uterinas de rata inducidas por oxitocina (Perusquía y Campos, 1991), serotonina (Perusquía et al., 1991a) y acetilcolina (Perusquía et al., 1991b), además de prevenir las contracciones provocadas por las prostaglandinas E_2 y $F_{2\alpha}$ (Perusquía y Kubli-Garfias, 1992). Por lo tanto, estos datos sugirieron que también los esteroides se encuentran involucrados en la inactivación de los canales de calcio operados por receptor (Revisado por: Perusquía, 2001). Evidencias directas, usando la técnica de "patch-clamp" en células uterinas de rata preñada muestran que los estrógenos pueden inhibir las corrientes de los canales de calcio (Yamamoto, 1995).

De manera colateral, algunas evidencias han mostrado que otro tipo de canales iónicos pueden estar también involucrados en la regulación de la contracción uterina por hormonas esteroides. Se ha reportado que 17β -estradiol podría inhibir la actividad de canales de potasio en células de miometrio gestante humano, mientras que progesterona presenta un efecto opuesto (Knock et al., 2001; Jones et al., 2003), lo cual está relacionado con la evidencia de que los estrógenos controlan la expresión de los canales de potasio dependientes de voltaje en el músculo liso uterino (Boyle et al., 1987).

Sin embargo, la acción nongenómica de los esteroides también puede involucrar típicamente una rápida inducción de cascadas de transducción de señales y de segundos mensajeros convencionales, que incluyen la modulación del calcio libre intracelular a través de un receptor acoplado a proteínas G, como ha sido reportado para progesterona (Burger et al., 1999). Asimismo, los esteroides también podrían regular la activación de la proteína cinasa A (PKA), de la proteína cinasa C (PKC) y de la proteína activadora mitógena cinasa (MAPK) (Sanborn, 2001; Zervou, et al., 2002), provocando cambios de la excitabilidad celular que involucran la modificación de la expresión de canales iónicos por las vías de segundos mensajeros. Por otra parte, se desconoce la existencia de receptores membranales para los andrógenos (Heinlein y Chang, 2002b), aunque se ha reportado la identificación de una entidad membranal que podría ser un receptor a estrógenos en células uterinas (Pietras y Szego, 1975), lo cual, podría explicar la acción de estrógenos sobre sus receptores, únicamente en la membrana ó bien, involucrar la participación de segundos mensajeros que preceden y complementan las acciones transcripcionales del receptor nuclear a estrógenos (Pietras et al., 2001; Levin, 2002).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que testosterona y algunos de sus derivados son capaces de inducir un efecto inhibitorio de la contracción uterina de animales de laboratorio (Robson, 1937; Barnafí y Croxatto, 1963; Kubli-Garfias et al., 1980; Perusquía et al., 1990; Perusquía y Campos, 1991; Perusquía et al., 1991ab; Sánchez-Aparicio et al., 1993; Gutiérrez et al., 1994; Perusquía y Villalón, 1996; Perusquía, 2001; Perusquía y Calixto, 2003). Sin embargo, no existen evidencias disponibles de la posible participación de los andrógenos sobre la actividad contráctil del útero humano. En forma notable, se ha reportado un metabolismo activo de los andrógenos durante el embarazo humano. Por lo cual, resulta interesante estudiar el posible papel fisiológico que juegan los andrógenos para modular el delicado balance de la contractilidad uterina humana, sobre todo durante la gestación. Además, debido a que no hay referencia de su papel regulador sobre la contractilidad uterina humana, tampoco se ha realizado la caracterización del tipo de acción que ejercen, por lo que resulta interesante su abordaje.

Por tal motivo, la meta del presente trabajo fue estudiar el efecto de diferentes andrógenos sobre la contractilidad uterina humana *in vitro*, discutiendo su posible modo de acción.

4. HIPÓTESIS

1.- Tomando en cuenta que en el humano, los esteroides $\Delta^{4,3}$ -cetona se metabolizan hacia compuestos 5α - y 5β -reducidos y considerando la marcada acción inhibitoria que inducen este tipo de esteroides sobre la actividad contráctil uterina de la rata, se espera observar un efecto relajante, inducido especialmente por los andrógenos con configuración 5β /cis, sobre la actividad contráctil del miometrio humano gestante a término y no gestante.

2.- Con base en los reportes existentes de que los andrógenos y las progestinas ejercen un efecto relajante de tipo no genómico en el útero de la rata y que las progestinas 5-reducidas inducen también una acción no genómica relajante en el útero humano; se espera que el potencial efecto inhibitorio de los andrógenos, sobre la contractilidad uterina humana, no sea bloqueado por antiandrógenos e inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas, caracterizando un efecto relajante independiente de la clásica vía de acción genómica de los andrógenos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Contribuir al conocimiento de la fisiología de la actividad contráctil uterina humana durante la gestación y determinar la participación de los esteroides sexuales masculinos. Así, el presente trabajo pretende estudiar el efecto de los andrógenos, Δ 5-3 β -hidroxi, Δ 4,3-cetona y 5-reducidos sobre la contractilidad uterina humana *in vitro* y caracterizar su tipo de acción.

5.2 Objetivos Particulares

- 1) Evaluar el potencial efecto relajante de andrógenos: Δ 5-3 β -hidroxi (DHEA), Δ 4,3-cetona (testosterona) y 5-reducidos (5 α -DHT, 5 β -DHT, androsterona y androstandiol) sobre la actividad contráctil espontánea del miometrio humano gestante a término, determinando su comportamiento a diferentes concentraciones.
- 2) Establecer una relación de potencia y proponer una correlación entre la estructura química y la actividad biológica de las hormonas utilizadas en el estudio.
- 3) Comparar la sensibilidad de la contracción del útero humano grávido y no grávido al efecto de testosterona y del andrógeno que resulte con mayor potencia. Asimismo, se analizará la sensibilidad de las contracciones espontáneas e inducidas por potasio (40 mM) al efecto de los andrógenos.

4) Observar si la acción de los esteroides sobre la contractilidad uterina es bloqueada mediante el uso de un antiandrógeno (flutamida), o por inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida) y de la transcripción (actinomicina D), con la finalidad de determinar si el genoma está involucrado en el efecto relajante que provocan los andrógenos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de la Mujer de la Secretaría de Salud (ver anexo). Las muestras uterinas fueron obtenidas, previo consentimiento informado, de pacientes sometidas a operación cesárea por indicación, con anestesia epidural y con los siguientes criterios de inclusión: edad entre 20-34 años, embarazo normal a término (38 a 40 semanas de gestación), sin cirugía uterina previa, integridad de membranas corioamnióticas, sin aplicación previa de medicamentos útero-relajantes o útero-tónicos y sin manifestaciones clínicas de trabajo de parto.

6.1 Obtención de la muestra y sistema de registro

El tamaño de cada biopsia fue de aproximadamente 3.0 X 3.0 X 2.0 cm, tomada de un corte transversal realizado en la región del segmento durante el procedimiento quirúrgico. Una vez cortada la muestra, se colocó inmediatamente en solución Hartmann (Baxter de México) a 4°C, para ser transportada del hospital (ABC, Dalinde, Metropolitano y del HGZ-98, Los Venados) al laboratorio de Endocrinología de la Reproducción del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Una vez en el laboratorio se le realizó un recambio de la solución Hartmann (con la finalidad de eliminar el exceso de sangre) y se mantuvo en refrigeración (4°C) durante 24 y 48 hrs antes del experimento. Posteriormente, la muestra fue colocada en una caja de Petri de doble pared que contenía solución Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): NaHCO₃ 25, NaCl 119, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.5 y glucosa 12. El Ringer fue mantenido a 37°C con ayuda de un

recirculador de agua y con pH de 7.4, ajustado mediante un burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5% CO₂ en 95% O₂.

La capa muscular (miometrio), se disecó con ayuda de material de microcirugía y fue dividido en varios segmentos de 1.0 X 0.5 X 0.5 cm cada uno, cortados a lo largo de las fibras musculares longitudinales. Para registrar la actividad contráctil de los segmentos miometriales se empleó el sistema de registro isométrico convencional para tejido aislado (Fig. 9). Cada segmento se colocó en una cámara de incubación que contenía 10 ml de la solución Krebs-Henseleit, con burbujeo de la mezcla gaseosa O₂-CO₂ y manteniendo la temperatura a 37°C mediante un baño recirculador (Haake, D1). Los segmentos fueron sujetos, en forma vertical, con hilo de seda (000); por un extremo al piso de la cámara y por el otro a un transductor de tensión (Grass Instruments, modelo FTO3C), el cual detectó las señales mecánicas del tejido transformándolas en señales eléctricas que fueron enviadas a un polígrafo (Grass Instruments, modelo 79) de 4 canales, registrando la actividad de forma simultánea con una computadora (Pentium III de 1.13A GHz) mediante el sistema de captura analógico digital polyVIEW (versión 2.1, ADM-20002 de Astro-Med Inc. RI., U.S.A.). Los tejidos fueron sometidos a una fuerza de tensión de 10 mN (1 g), lo que corresponde a 2 centímetros de desplazamiento de la pajilla. Bajo estas condiciones, los tejidos fueron mantenidos en un período de estabilización de 60 a 90 minutos, registrando la actividad contráctil espontánea miometrial.

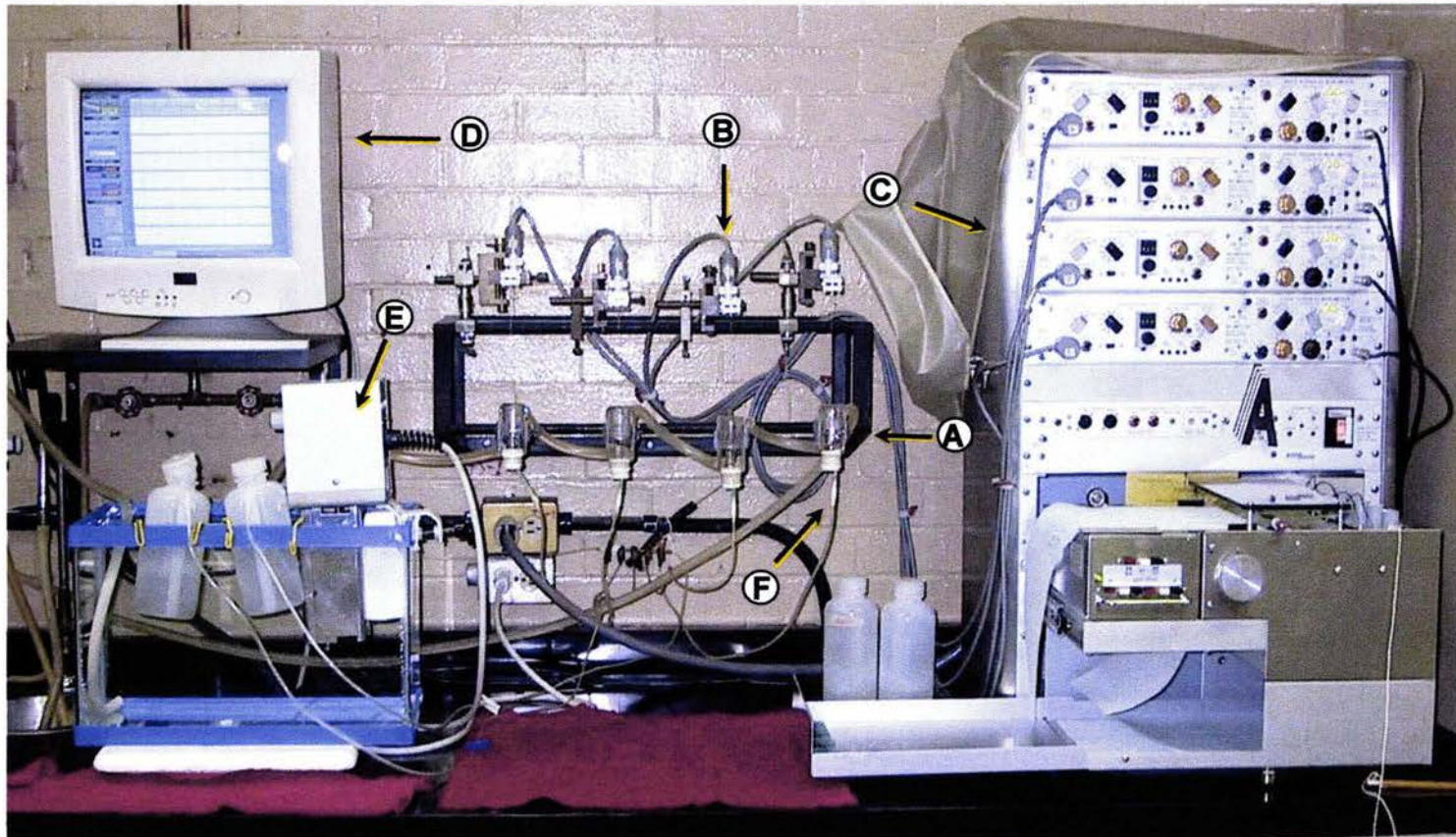


Figura 9. Sistema de registro isométrico convencional para tejido aislado: A) Cámara de incubación donde se encuentra sujetado el segmento uterino, B) Transductor de tensión, C) Polígrafo de cuatro canales, D) Computadora con el convertidor analógico digital, polyVIEW, E) Baño recirculador de agua que mantiene la temperatura de las cámaras a 37°C y F) Conductos aéreos que mantienen un burbujeo constante de mezcla gaseosa.

6.2 Efecto de los andrógenos sobre la actividad espontánea del útero humano gestante a término

Después del período de estabilización de la actividad contráctil espontánea, de muestras provenientes de pacientes gestantes a término, se eligieron sólo las preparaciones que presentaron un patrón de frecuencia menor a 7 min/contracción y se procedió a tomar un registro de 30 minutos, que fue considerado como valor control (100%). Inmediatamente, se adicionó cada andrógeno de prueba, a diferentes concentraciones (3, 10, 30 y 100 μM) aplicadas a un volumen final de 0.1% de etanol absoluto. Sólo testosterona fue probada en el rango de concentración de 3 a 300 μM . Cada andrógeno fue evaluado por separado y las concentraciones fueron adicionadas de manera no acumulativa, es decir; cada concentración en muestras de diferentes pacientes donde la "n" significa el número de pacientes. El efecto de los diferentes andrógenos a cada concentración fue registrado también durante 30 minutos, comparado con el control y expresado en términos de porcentaje. Después, el tejido fue lavado mediante tres recambios de la solución Ringer contenida en la cámara de incubación, para observar la recuperación y viabilidad del tejido. En forma colateral y bajo las mismas condiciones experimentales, se realizaron las pruebas con etanol absoluto, vehículo en el cual se disolvieron los andrógenos. Los efectos fueron repetidos por lo menos 6 veces y con los datos se construyó la curva concentración-respuesta para cada andrógeno, obteniendo el valor de las concentraciones inhibitorias (CI) 16, 50 y 84, de acuerdo al método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

6.3 Efecto de los andrógenos sobre la contracción inducida con KCl (40 mM) del miometrio humano gestante a término

En otras preparaciones uterinas gestantes y después del período de estabilización, se procedió a inducir una despolarización del tejido con solución Ringer de potasio alto (KCl 40 mM); esta solución se obtuvo por sustitución equimolecular del NaCl (84 mM) por KCl (40 mM). La contracción tónica sostenida inducida con KCl fue mantenida durante 60 minutos (respuesta control) y posteriormente, el tejido fue repolarizado, lavándolo con un recambio de la solución Krebs-Henseleit en su composición original. Después de este tratamiento el tejido permaneció en reposo por 30 minutos, para posteriormente inducir una segunda contracción con KCl, la cual fue registrada durante 40 minutos e inmediatamente se adicionó cada uno de los andrógenos propuestos para este estudio. Cada andrógeno fue adicionado a la concentración de 100 μ M, a esta concentración, se observó la relajación máxima (R_{max}) sobre la contracción espontánea. Cada uno de los compuestos fue probado en tejidos diferentes y la respuesta fue observada durante 30 minutos. Finalmente, se repolarizó el tejido mediante un lavado con solución Ringer normal y después de 30 minutos se verificó la recuperación de la contracción, induciendo nuevamente la contracción con KCl (segunda respuesta control).

6.4 Efecto de actinomicina D, cicloheximida y flutamida sobre la inhibición ejercida por testosterona, 5 α - y 5 β -DHT sobre la contracción inducida con KCl del útero grávido

El siguiente protocolo fue diseñado con la intención de dilucidar si la respuesta que inducen los andrógenos sobre la actividad contráctil es a través del modelo clásico de la acción genómica de los esteroides. Se utilizaron muestras de útero gestante y posterior a un periodo de estabilización, se indujo una contracción tónica sostenida con solución de potasio alto (KCl 40 mM), se registraron los primeros 10 minutos de la contracción inducida e inmediatamente se incubó por 30 minutos, antes de la adición de los andrógenos testosterona, 5 α -DHT y 5 β -DHT, con el inhibidor de la transcripción (actinomicina D, 10 μ M), el inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida, 40 μ M) o el antiandrógeno (flutamida 10 μ M), cada uno por separado en muestras diferentes. Posteriormente, se adicionó al andrógeno de prueba a la concentración que induce la R_{max} (100 μ M), cuantificando la respuesta 30 minutos después de la aplicación. Después, el tejido se repolarizó mediante un lavado con solución Ringer en su composición original y 30 minutos posteriores se indujo nuevamente la contracción con KCl, para observar la recuperación y viabilidad del tejido. El porcentaje de relajación inducida por el andrógeno fue comparado con el porcentaje de relajación que inducen en presencia de los diferentes inhibidores y el antagonista. Previamente, se realizó la prueba del efecto que pudiera ejercer el vehículo de los inhibidores y los andrógenos sobre el tono de la contracción inducida.

6.5 Efecto de testosterona y 5 β -DHT sobre la actividad contráctil espontánea de útero humano no grávido

Paralelamente, se obtuvieron muestras de útero no gestante (previo consentimiento del comité de ética), obtenidas de pacientes sometidas a histerectomía por indicación, con patologías y en edad reproductiva. Las muestras fueron mantenidas bajo las mismas condiciones experimentales que las de útero gestante para su obtención y traslado. Se cortaron segmentos de aproximadamente 1.0 X 0.5 cm para ser montados en las cámaras de incubación.

Testosterona y el andrógeno que mostró la mayor potencia relajante en el útero grávido, 5 β -DHT, se probaron por separado, sobre la actividad contráctil de las tiras miométriales no gestantes. Así, posterior al período de estabilización, se registró la actividad contráctil espontánea de las tiras miométriales durante un período de 30 minutos, el cual fue considerado como control (100%) e inmediatamente se adicionaron, en forma independiente, las diferentes concentraciones de testosterona ó 5 β -DHT (3, 10, 30 y 100 μ M) en diferentes muestras. El efecto fue registrado durante 30 minutos para ser comparado con el control en términos de porcentaje de relajación. La evaluación del efecto de los andrógenos fue repetido por lo menos 6 veces para cada concentración. Finalmente el tejido fue lavado para observar la recuperación y viabilidad del tejido. La curva concentración-respuesta de estos dos andrógenos fue comparada con sus curvas obtenidas sobre la contracción espontánea del útero grávido.

6.6 Procesamiento de los datos

La evaluación de la actividad contráctil espontánea, fue realizada en los mismos intervalos de tiempo (30 minutos); tanto para el control como para el efecto. La evaluación de la contracción inducida con KCl, fue realizada 20 minutos después de la adición del esteroide, el efecto fue evaluado durante un período de 10 minutos y comparado con el control el cual fue considerado como la amplitud de la contracción 10 minutos antes de la adición del compuesto de prueba. Los valores fueron reportados en términos de porcentaje de relajación, cuantificando el área bajo la curva de las contracciones. Así, la señal mecánica (contracciones) de los tejidos fue capturada por una computadora (Pentium III de 1.13A GHz) acoplada al polígrafo y los datos fueron analizados y procesados mediante un programa de captura analógico-digital (sistema polyVIEW, versión 2.1, ADM-20002 de Astro-Med Inc. RI., U.S.A.). El valor obtenido del efecto de cada concentración fue la media de $n \geq 6 \pm$ el error estándar de la media (EEM) para cada andrógeno. Con los datos obtenidos se contruyó la curva concentración-respuesta; obteniendo el valor de las concentraciones inhibitorias (CI) 16, 50 y 84, determinando los límites de confianza y el valor de la pendiente de la recta de acuerdo al método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

El efecto relajante producido por cada concentración de testosterona y sus metabolitos 5-reducidos sobre la contracción espontánea del útero humano gestante a término, fue comparado con respecto al efecto producido por la misma concentración de DHEA, por ser el precursor de todos los andrógenos. Las comparaciones fueron realizados mediante la prueba estadística de "t de *Student*" no pareada (por ser muestras independientes), entre: 1) la R_{max} producida sobre la contracción espontánea e inducida

con KCl, 2) la R_{\max} de testosterona, 5α -DHT y 5β -DHT sobre la contractura inducida por potasio en ausencia y presencia de actinomicina D, cicloheximida o flutamida, 3) el efecto de cada concentración de testosterona y 5β -DHT sobre la actividad espontánea del útero grávido y el no grávido. Siendo valores significativos cuando la $p < 0.05$. El procesamiento de los datos fue analizado y graficado utilizando el programa estadístico Origin 7. SR2 (versión, 7.0383 [B383]).

Con el propósito de comparar el comportamiento de la curva de cada andrógeno sobre la actividad espontánea del útero grávido, se realizó la prueba de análisis de varianza con dos vías (two-way-ANOVA de sus siglas en inglés), determinando cuales andrógenos no presentan una media en común. Así, se comparó la curva concentración-respuesta de DHEA con la de los demás andrógenos de prueba y se evaluó el comportamiento global, con un valor significativamente diferente cuando la $p < 0.05$. Esta prueba también se aplicó para comparar la curva de testosterona y 5β -DHT entre los datos obtenidos en los dos estados endocrinos, grávido y no grávido.

a) Análisis de potencia

La potencia relajante producida por los distintos andrógenos, sobre la actividad espontánea del útero humano gestante a término, se calculó en relación al valor de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de cada andrógeno, para establecer una relación de potencia asignando un valor de 1.00 para DHEA.

La potencia fue calculada usando la fórmula: CI_{50} de DHEA/ CI_{50} del andrógeno de prueba.

Con el objeto de observar si la relación de potencia obtenida para los andrógenos sobre la contracción espontánea difiere de la mostrada sobre la contracción inducida con KCl, se obtuvo la relación de potencia ejercida por cada andrógeno sobre la contracción inducida por KCl, utilizando el valor de la R_{max} (a la concentración de 100 μ M), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Potencia} = \frac{\% \text{ de la } R_{max} \text{ del andrógeno de prueba}}{\% \text{ de la } R_{max} \text{ de DHEA}}$$

Asignando un valor de 1.00, para DHEA.

6.7 Compuestos

Los compuestos utilizados en este estudio fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. St. Louis MO. USA:

Andrógenos:

Dehidroepiandrosterona (DHEA; 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona).

Testosterona (17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona).

5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT; 17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona).

5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT; 17 β -hidroxi-5 β -androstan-3-ona).

Androsterona (3 α -hidroxi-5 α -androstan-17-ona).

Androstandiol (5 α -androstan-3 α -17 β -diol).

Inhibidores:

Actinomicina D (diactinomicina) inhibidor de la transcripción.

Cicloheximida (3-[2-(3, 5-dimetil-2-oxociclohexil-2-hidroxi)etil]-glutaimida) inhibidor de la síntesis de proteínas.

Flutamida (2-Metil-N-(4-nitro-3-[trifluorometil]-fenil) propanamida) antiandrógeno.

Todos los compuestos fueron disueltos en etanol absoluto (Merck, México, S.A.), adicionando un volumen final de 0.1% en el baño de incubación (equivalente a la concentración final de 17.14 mM). Actinomicina D, fue conservada en un frasco ámbar por ser un compuesto fotosensible y de fácil degradación.

7. RESULTADOS

Las observaciones de este estudio indican que los andrógenos: $\Delta 5$ - 3β -hidroxi, $\Delta 4,3$ -cetona y los 5-reducidos son capaces de modificar la actividad contráctil del útero humano gestante y no gestante por producir relajación miométrial con diferente grado de eficacia, dependiendo de su configuración estructural.

7.1 Efecto de los andrógenos sobre la contracción espontánea del útero grávido.

El volumen del vehículo utilizado (etanol, 0.1%) en el que se disolvieron los andrógenos no modificó de forma significativa ($P > 0.05$) la contractilidad espontánea del útero humano gestante a término (1.76 ± 0.38 % de inhibición). En contraste, los andrógenos probados mostraron un agudo y rápido efecto relajante sobre la contractilidad espontánea del miometrio humano gestante a término, significativamente diferente ($p < 0.05$) con respecto a la actividad inicial (control) y al vehículo. La relajación inducida por cada andrógeno fue observada inmediatamente después de la aplicación (~ 1 minuto) como una disminución en la amplitud y la frecuencia de las contracciones espontáneas, con características particulares para cada uno de ellos (Fig. 10).

La adición de las diferentes concentraciones evidenció una clara relación lineal entre la concentración y la respuesta producida por cada andrógeno, es decir; a mayor concentración mayor efecto relajante (Tabla 2, Fig. 11, 12). Sin embargo, después del tiempo establecido (30 minutos) para evaluar este efecto, en la mayoría de los casos se continuó registrando la actividad espontánea en presencia de cada andrógeno y se

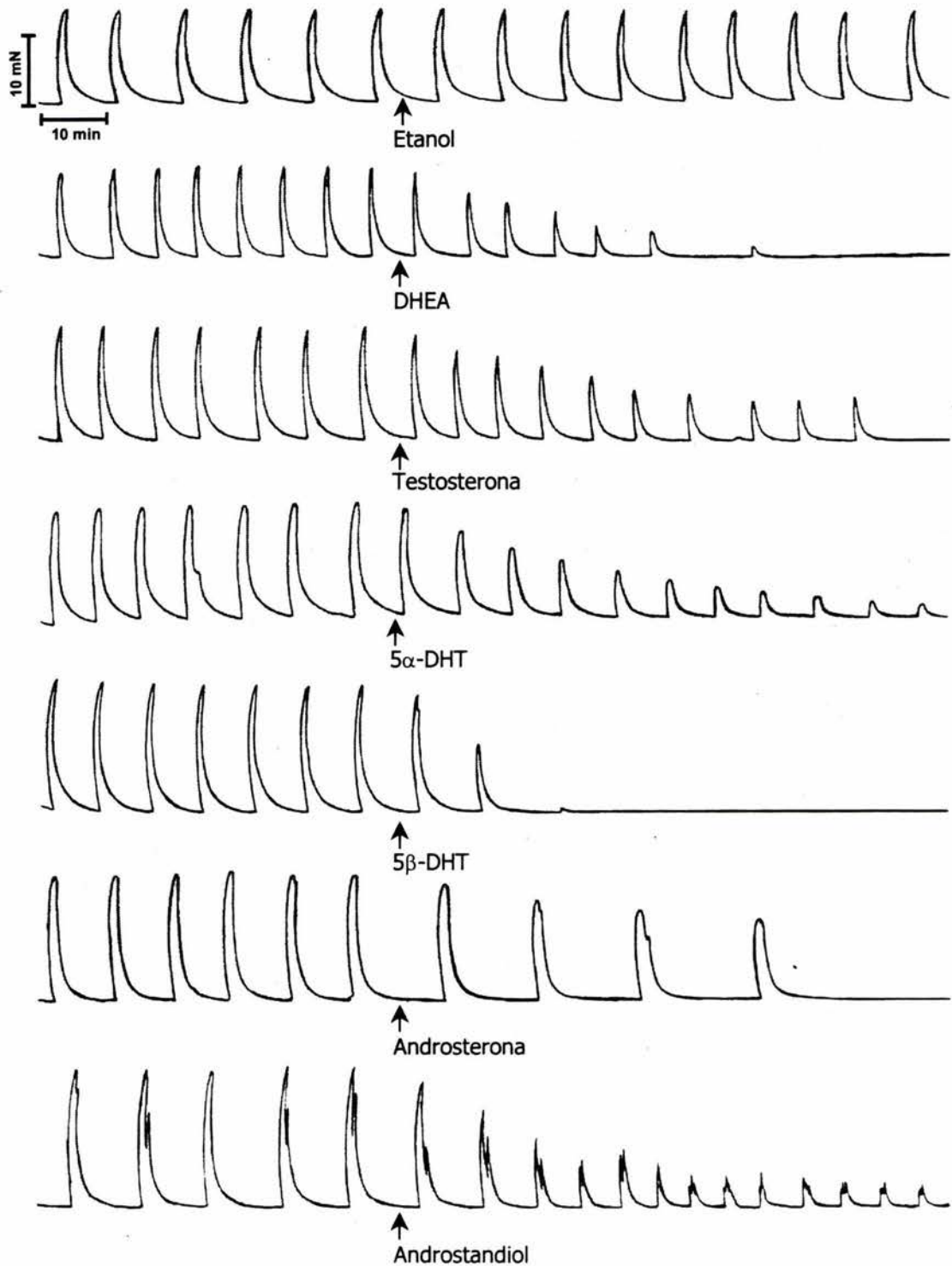


Figura 10. Registros típicos de la actividad contráctil *in vitro* del útero humano gestante a término. Se puede observar que el vehículo (etanol) al mismo volumen en que se administraron los andrógenos (0.1%), no modifica la actividad contráctil uterina. Se observa el efecto inhibitorio rápido (~1 minuto) inducido por la adición de los diferentes andrógenos a la concentración de 100 μ M. La flecha indica el momento de la adición de cada andrógeno.

observó que la actividad contráctil sigue disminuyendo en forma paulatina a lo largo del tiempo.

La eficacia de cada andrógeno para inducir relajación de la actividad espontánea fue diferente cuando cada andrógeno fue aplicado a la concentración de 100 μM (Fig. 10), lo cual se puede corroborar en el análisis de potencia (Ver inciso 3).

Tabla 2. Porcentaje de relajación producido por los diferentes andrógenos sobre la contracción espontánea del útero humano gestante a término.

Esteroides	Porcentaje de relajación $n = 6 \pm \text{EEM}$			
	3 μM	10 μM	30 μM	100 μM
DHEA	9.75 \pm 0.89	17.56 \pm 1.38	37.30 \pm 2.32	50.49 \pm 2.55
Testosterona	14.44 \pm 2.40	15.80 \pm 1.67	21.95 \pm 2.48*	50.80 \pm 2.14
5 α -DHT	9.54 \pm 1.57	26.15 \pm 1.54*	29.77 \pm 1.68*	42.43 \pm 1.00
5 β -DHT	13.62 \pm 1.45	24.78 \pm 1.30*	40.72 \pm 1.98	83.52 \pm 1.26**
androsterona	9.73 \pm 1.79	16.46 \pm 1.49	39.19 \pm 2.05	50.54 \pm 2.50
androstandiol	10.05 \pm 1.52	22.50 \pm 1.11	26.25 \pm 0.70**	34.32 \pm 1.75**

Diferencia significativa: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ al comparar el efecto de los andrógenos contra DHEA.

1) Efecto concentración dependiente

Testosterona, mostró claramente un efecto dependiente de la concentración en

una forma lineal (Tabla 2, Fig. 11). Sin embargo, entre las concentraciones iniciales de 3 y 10 μM , se presenta sólo un efecto tenue, acentuándose de forma notable entre las concentraciones de 30 a 100 μM . Debido a que el efecto de testosterona a 100 μM osciló en el rango de 50 % de relajación y con la finalidad de verificar el comportamiento lineal de este compuesto, se decidió probar una concentración máxima de 300 μM , sólo para éste andrógeno por ser el precursor $\Delta 4$ de todos los andrógenos. Así, la testosterona produce un claro efecto dependiente de la concentración (Fig. 11).

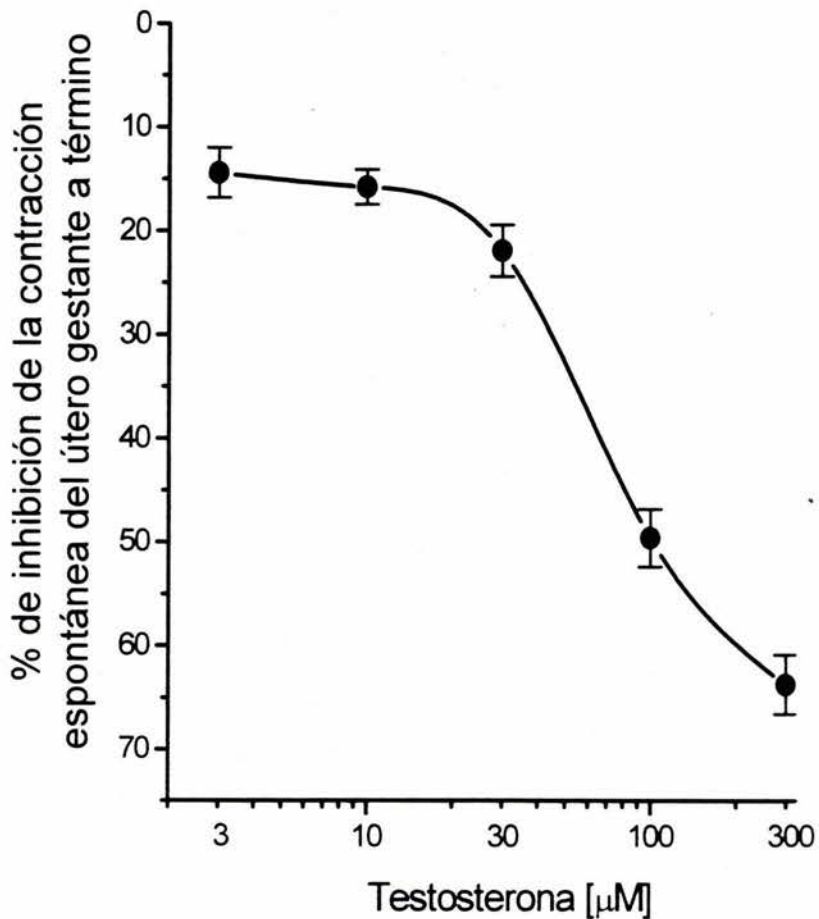


Figura 11. Curva concentración-respuesta del efecto relajante de testosterona sobre la actividad contráctil espontánea del útero humano gestante. Cada punto representa la media $n = 6 \pm \text{EEM}$.

Al igual que testosterona, los restantes andrógenos también produjeron relajación dependiente de la concentración (Fig. 12) iniciando de 1-2 minutos posteriores a su adición (Fig. 10). Resulta interesante destacar que la curva concentración respuesta de testosterona, muestra gran similitud a la de DHEA (el precursor $\Delta 5$ - 3β -hidroxi de los andrógenos), mostrando una diferencia significativa ($p < 0.05$) sólo en la concentración de 30 μM . Asimismo, al analizar el efecto inhibitorio inducido por androsterona, a las diferentes concentraciones probadas, se observó que tiene un efecto relajante prácticamente idéntico al efecto provocado por DHEA (Tabla 2, Fig. 12).

Por su parte, 5α -DHT (el dihidroderivado 5α de testosterona), al compararlo con DHEA mostró un efecto relajante mayor sólo a la concentración de 10 μM y un efecto menor a la concentración de 30 y 100 μM , con una diferencia significativa ($p < 0.05$) a las concentraciones de 10 y 30 μM .

El efecto inducido por androstandiol (el $3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroderivado de testosterona) fue peculiar, mostrando que afecta la actividad contráctil inhibiendo directamente la amplitud (la fuerza de contracción) en los primeros minutos después de su aplicación, pero incrementa la frecuencia de la actividad espontánea conforme avanza el tiempo (Fig. 10), dando como resultado un valor porcentual inferior a las concentraciones de 30 y 100 μM (Tabla 2 y Fig. 12).

Finalmente, 5β -DHT (el dihidroderivado 5β de testosterona), mostró un agudo efecto relajante sobre la actividad contráctil a las diferentes concentraciones probadas.

La R_{\max} de este derivado 5β -reducido fue observada como una importante inhibición tanto de la amplitud como de la frecuencia de las contracciones, en un lapso de aproximadamente 8 minutos después de su adición, presentando el mayor porcentaje de inhibición de todos los andrógenos estudiados.

El análisis estadístico de los datos mostró diferencias en el comportamiento de la curva concentración-respuesta de cada andrógeno. La prueba estadística de ANOVA de dos vías, comprobó que sólo androstandiol ($p < 0.05$) y 5β -DHT ($p < 0.005$), manifiestan una marcada diferencia significativa con respecto a DHEA, por lo tanto no hay diferencia significativa en el comportamiento de las curvas de DHEA, testosterona, 5α -DHT y androsterona (Fig. 12).

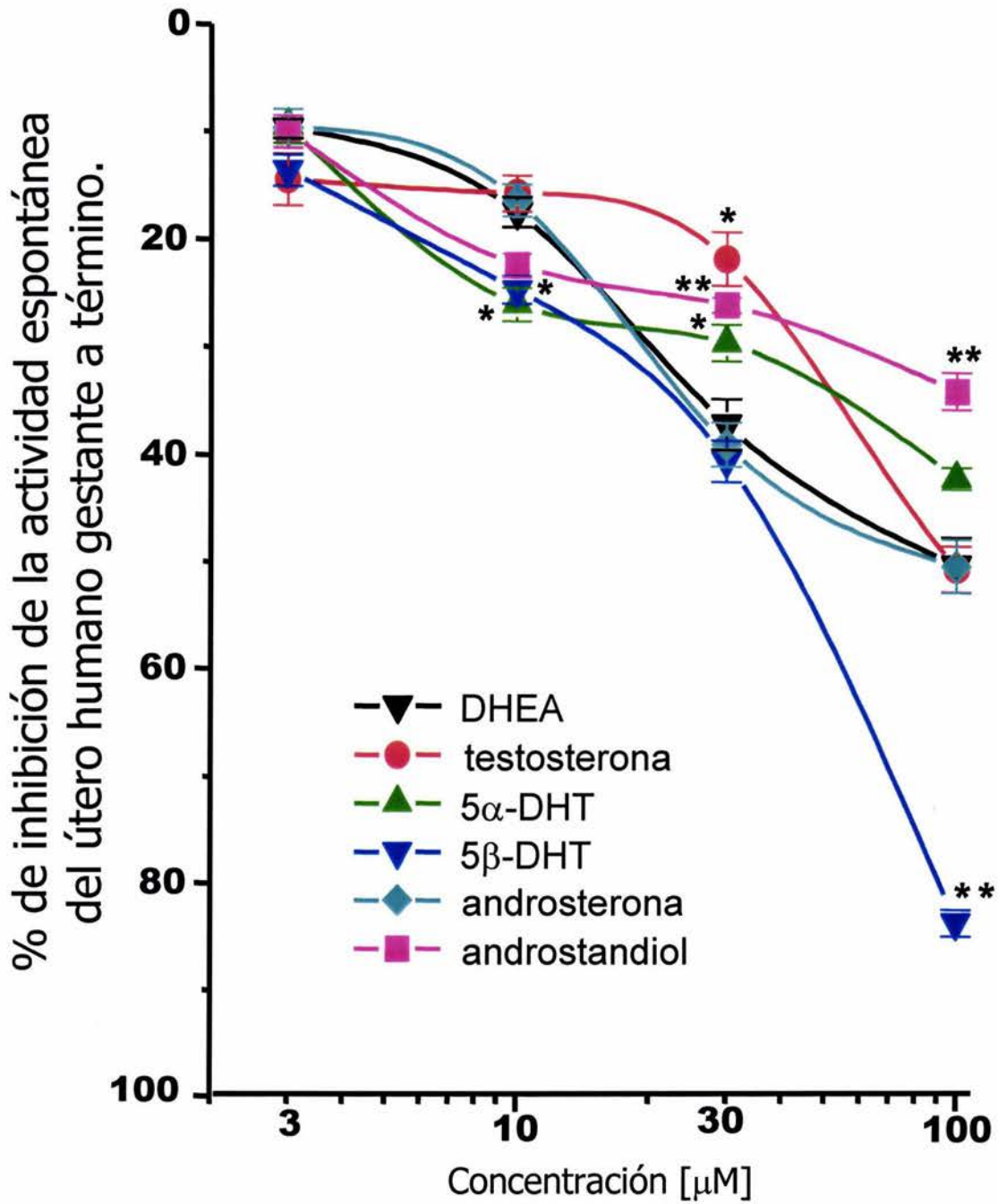


Figura 12. Curvas concentración-respuesta del efecto inhibitorio de los andrógenos sobre la contracción espontánea del útero humano gestante a término. Diferencia significativa al comparar el efecto de los andrógenos vs. DHEA; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. Cada punto representa la media de $n = 6 \pm \text{E.E.M.}$

2) Concentraciones inhibitorias

Con los datos graficados (Fig. 12) se obtuvo la pendiente de la recta de cada curva y se determinaron las concentraciones inhibitorias (CI) 16, 50 y 84, calculando los límites de confianza para las CI₅₀ (CI₅₀= concentración a la cual el andrógeno induce el 50% de relajación de la actividad contráctil uterina), mediante el método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Este análisis también permitió observar la diferencia de la potencia relajante de cada compuesto, donde la pendiente de la recta y el valor de la CI₅₀ evidencian el ligero efecto de androstandiol y el agudo efecto de 5β-DHT (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias (CI) del efecto relajante, probados sobre la contracción espontánea del útero humano gestante.

Esteroides	CI ₁₆	CI ₅₀	CI ₈₄	Límites de confianza de la CI ₅₀ inferior-superior	Pendiente de la recta
DHEA	6.25 μM	94.05 μM	1.41 mM*	20.30-435.63	28.05
testosterona	8.19 μM	108.64 μM	1.43 mM*	29.40-400.66	26.71
5α-DHT	5.28 μM	209.20 μM*	8.28 mM*	26.12-1675.12	20.34
5β-DHT	5.50 μM	26.60 μM	0.128 mM*	10.91-64.81	44.72
androsterona	6.40 μM	86.73 μM	1.17 mM*	19.86-378.65	28.66
androstandiol	5.99 μM	848.02 μM*	119.87 mM*	51.56-13945	15.21

* Valor teórico obtenido por la extrapolación de la recta.

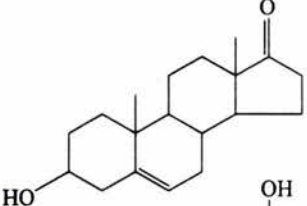
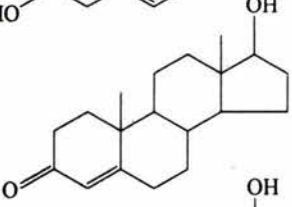
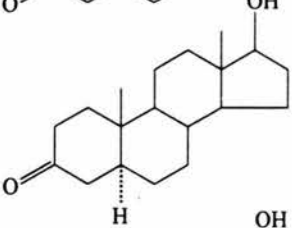
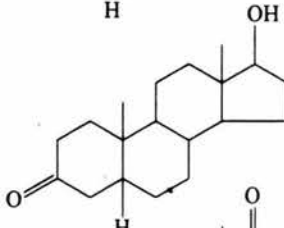
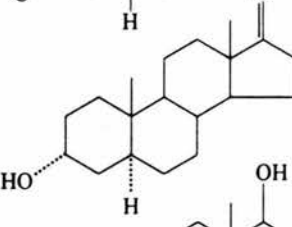
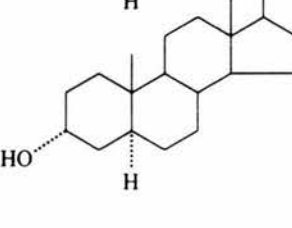
3) Relación de potencia

Los datos obtenidos (Tabla 4) mostraron que 5β -DHT es el andrógeno más potente para producir el efecto relajante en útero humano gestante a término, siendo 3.5 veces más potente que su precursor DHEA. Testosterona y androsterona mostraron una potencia similar que la DHEA; sin embargo, 5α -DHT y androstandiol resultaron ser 0.55 y 0.99 veces menos potentes respectivamente que DHEA, resultando el androstandiol el andrógeno más débil para ejercer el efecto relajante (Tabla 4). Con estos valores se muestra la siguiente relación de potencia entre cada andrógeno para producir relajación:

5β -DHT >>> androsterona \geq DHEA \geq testosterona > 5α -DHT >> androstandiol.

El análisis de la potencia se correlaciona con los datos obtenidos en las pendientes de la recta de la curva concentración-respuesta de cada andrógeno mostrado (Tabla 3).

Tabla 4. Comparación de la potencia calculada a partir de la CI_{50} de los andrógenos de prueba para inducir el efecto relajante en el miometrio humano gestante a término.

Andrógeno	CI_{50}	Potencia ^a	Estructura
DHEA	94.05 μ M	1.00	
Testosterona	108.64 μ M*	0.86	
5 α -DHT	209.20 μ M*	0.45	
5 β -DHT	26.60 μ M	3.53	
Androsterona	86.73 μ M	1.08	
Androstandiol	848.02 μ M*	0.11	

^a Relación de potencia respecto a DHEA, asumiendo un valor de 1.00 para DHEA.

* Valores teóricos obtenidos por extrapolación de la recta.

7.2 Efecto de los andrógenos sobre la contracción inducida con KCl (40 mM) del útero grávido a término

Se estudió la sensibilidad de la contracción espontánea y la producida por potasio alto al efecto de los andrógenos en el útero gestante a término. Así, en otras preparaciones, los andrógenos fueron probados sobre la contracción tónica sostenida inducida por solución Ringer de potasio alto (40 mM). El vehículo utilizado (etanol 0.1%) para disolver los andrógenos produjo 1.88 ± 0.89 % de relajación del tono de la contracción de potasio, lo cual muestra que no modificó, durante 40 minutos, de forma significativa ($p > 0.05$) el tono de la contracción (Fig. 13). Mientras que los diferentes andrógenos, probados a 100 μ M, produjeron pérdida del tono de la contractura de potasio, inmediatamente a su adición, mostrando que inducen relajación de la contracción de potasio. En forma interesante, 5 β -DHT inhibió de manera contundente el tono de la contracción, iniciando su efecto en menos de 1 minuto y resultando ser también el andrógeno más eficaz (Fig. 13). La contracción de potasio se reestablece cuando el andrógeno es retirado del tejido por medio del lavado, lo cual indica la reversión del efecto (Fig.14).

El porcentaje de relajación inducido por los diferentes andrógenos a 100 μ M mostró que la contracción de potasio fue significativamente más sensible ($p < 0.05$) a la acción de DHEA, androsterona y androstandiol (Tabla 5). Mientras el efecto relajante provocado por testosterona, 5 α -DHT y 5 β -DHT no difiere al que inducen sobre la contracción espontánea. La relación de potencia para el efecto relajante de los

andrógenos sobre la contracción inducida con KCl (40 mM) difiere a la espontánea sólo para algunos andrógenos:

$5\beta\text{-DHT} \gg \text{DHEA} \geq \text{androsterona} > \text{androstandiol} \geq \text{testosterona} \geq 5\alpha\text{-DHT}$.

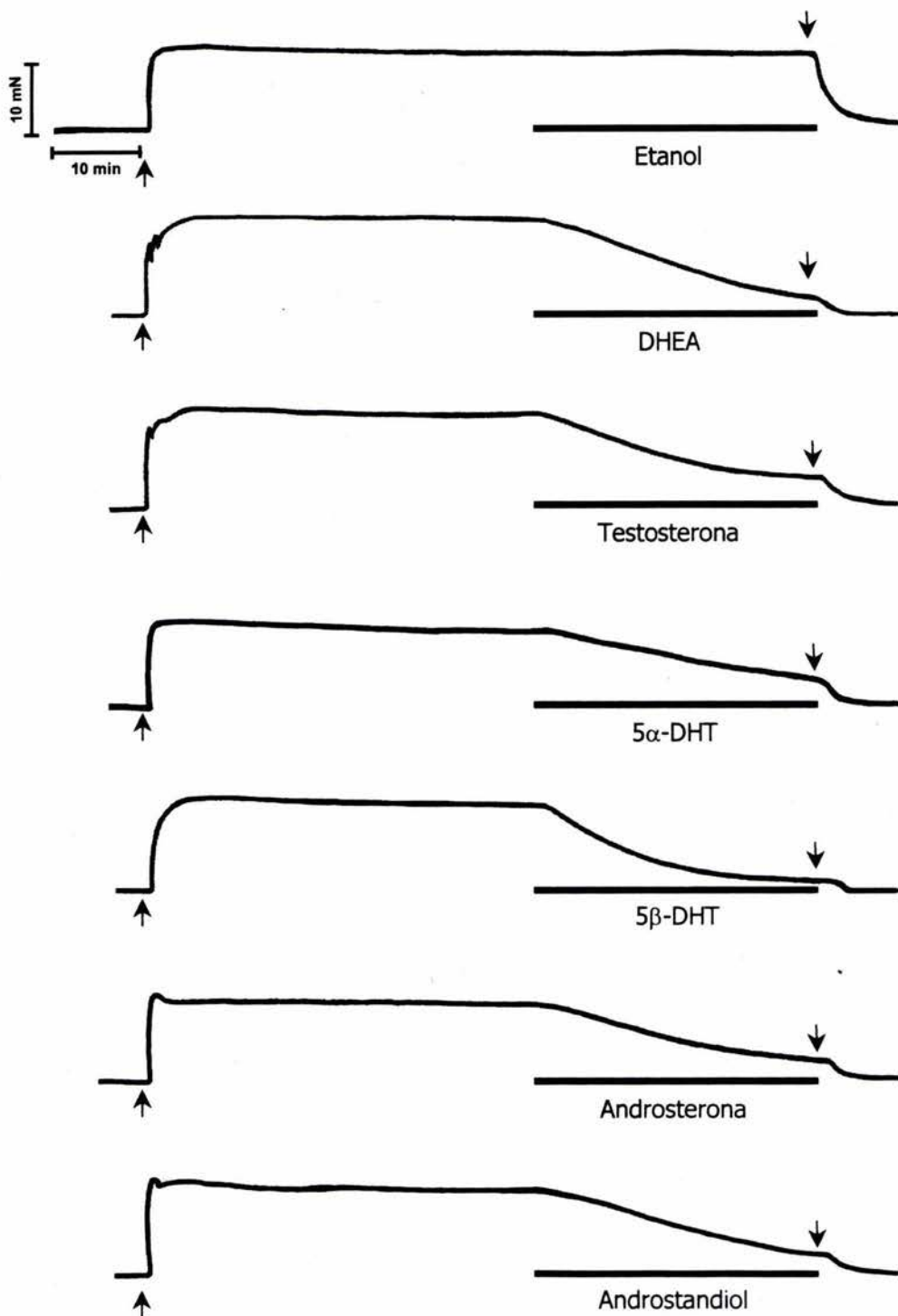


Figura 13. Registros que muestran la contracción inducida por solución despolarizante (\uparrow) de potasio 40 mM, en útero humano gestante a término, observando que el vehículo etanol (0.1%) en el que fueron administrados los andrógenos no modifica el tono de la contracción. En contraste, los diferentes andrógenos a la concentración de 100 μ M, provocan una aguda disminución del tono de la contracción. La barra horizontal muestra el tiempo de incubación de cada andrógeno. El lavado (\downarrow) es el cambio de la solución despolarizante por Ringer en su composición original.

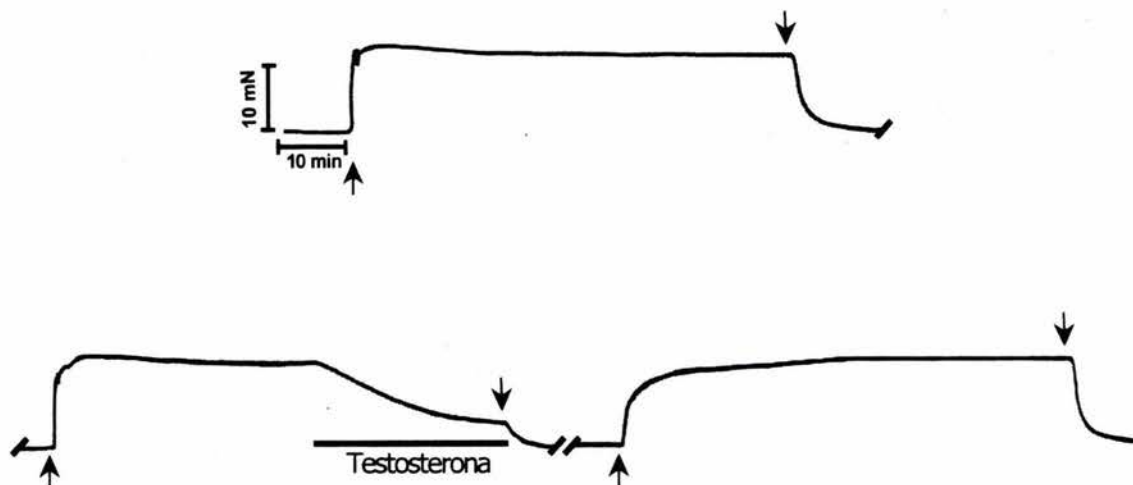


Figura 14. Registro que muestra la contracción inducida por solución despolarizante (\uparrow) de potasio 40 mM, en útero humano gestante a término. Panel superior; el tono de la contracción se mantiene durante el tiempo establecido para el tratamiento (control). Sin embargo, el tono se ve disminuido cuando se adiciona testosterona 100 μ M, panel inferior izquierdo. Notesé, la recuperación del tejido una vez retirada la hormona después del lavado (\downarrow), panel inferior derecho. La barra horizontal muestra el tiempo de incubación de testosterona. El lavado es el cambio de la solución de potasio por Ringer en su composición original.

Tabla 5. Porcentaje de relajación producido por los diferentes andrógenos sobre la contracción inducida con KCl 40 mM y la contracción espontánea del útero humano gestante a término.

Esteroides (100 μ M)	Porcentaje de relajación n = 6 \pm EEM	
	Contracción Espontánea	Contracción inducida por KCl 40 mM
DHEA	50.49 \pm 2.55	68.37 \pm 1.97**
Testosterona	50.80 \pm 2.14	47.93 \pm 1.53
5 α -DHT	42.43 \pm 1.00	47.70 \pm 1.37
5 β -DHT	83.52 \pm 1.26	84.72 \pm 2.23
androsterona	50.54 \pm 2.50	64.17 \pm 1.83*
androstandiol	34.32 \pm 1.75	54.39 \pm 1.95**

Diferencias significativas *p<0.05, **p<0.005 entre los dos tipos de contracciones.

7.3 Efecto de actinomicina D, cicloheximida y flutamida sobre la inhibición ejercida por testosterona, 5 α - y 5 β -DHT en la contracción inducida con KCl del útero grávido

Los resultados obtenidos muestran que el vehículo del antiandrógeno o de los inhibidores de la transcripción y de la síntesis de proteínas más la adición del vehículo del andrógeno (etanol 0.1 % para cada compuesto), no modificó significativamente ($p > 0.05$) el tono de la contracción inducida por KCl (Fig. 15) presentando 2.2 ± 1.23 % de inhibición. Asimismo, se observó que la incubación de cada tratamiento no modifica significativamente la R_{max} inducida por testosterona (precursor $\Delta 4,3$ -cetona), 5 α -DHT (andrógeno más afín al receptor) ó 5 β -DHT (andrógeno más potente), cada uno probado a la concentración de 100 μ M (Fig. 16), mostrando así, la incapacidad de actinomicina D, cicloheximida o flutamida para bloquear el efecto relajante producido por los andrógenos con respecto al efecto producido sin tratamiento. Se verificó la viabilidad y recuperación total de la contracción de KCl al retirar los compuestos mediante un lavado con Ringer normal.

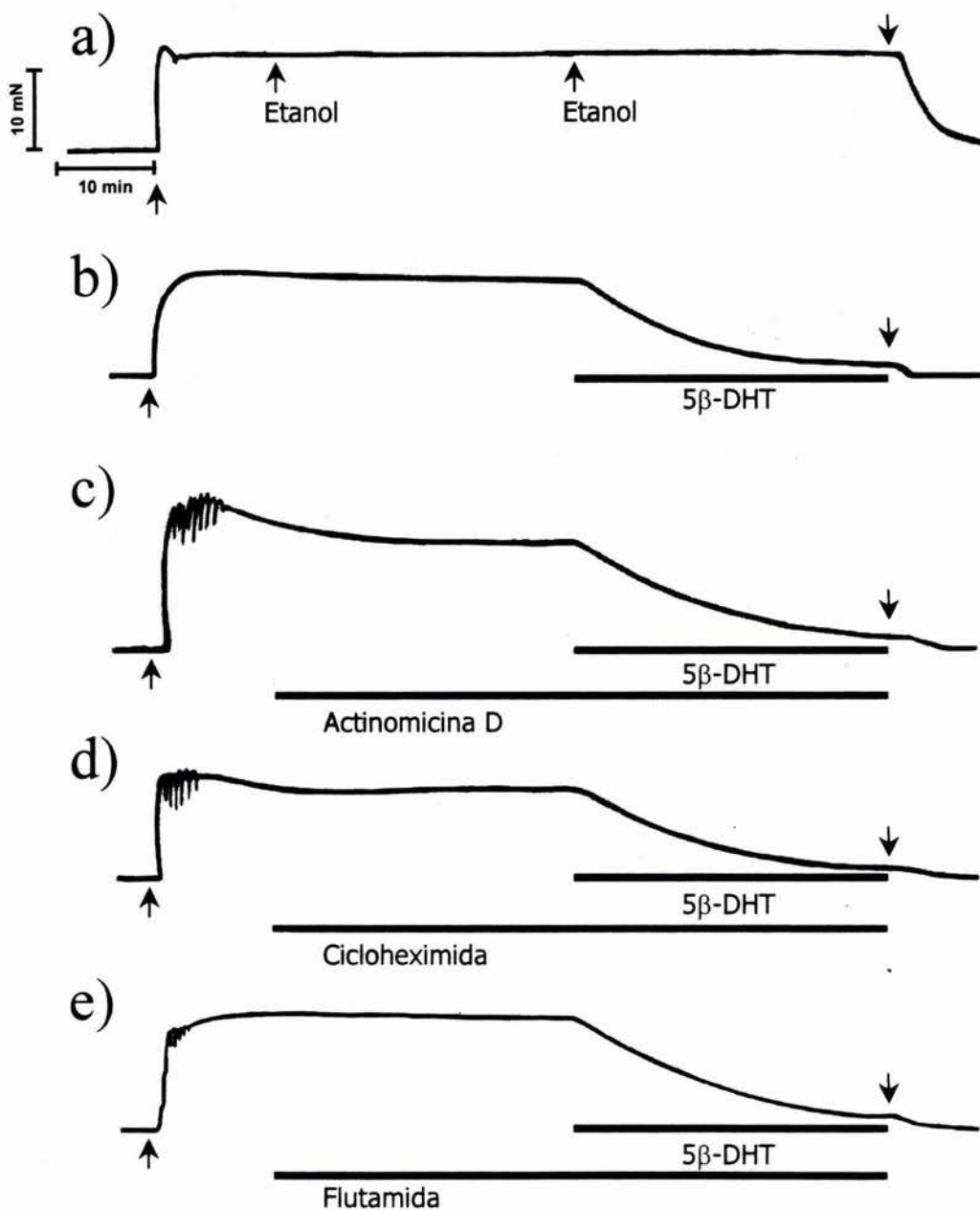


Figura 15. Registros que muestran la contracción inducida por solución despolarizante (↑) de potasio 40 mM, en útero humano gestante a término, observando que el vehículo etanol (0.1%) en el que fueron administrados los fármacos y el andrógeno de prueba, no modifica el tono de la contracción (a). En contraste, el tono se ve disminuido en presencia de 5β-DHT 100 μM (b). Nótese que el efecto del andrógeno no es bloqueado en presencia de actinomicina D, 10 μM (c), cicloheximida, 40 μM (d) o flutamida, 10 μM (e). La barra horizontal muestra el tiempo de incubación de cada compuesto. El lavado (↓) es el cambio de la solución despolarizante por Ringer en su composición original.

Esteroides (100 μ M)	Porcentaje de relajación n = 6 \pm EEM			
	sin tratamiento	actinomicina D	cicloheximida	flutamida
testosterona	47.93 \pm 1.53	47.42 \pm 1.18	48.53 \pm 1.98	50.62 \pm 1.66
5 α -DHT	47.70 \pm 1.37	41.69 \pm 1.41	44.99 \pm 1.57	44.19 \pm 1.27
5 β -DHT	84.72 \pm 2.23	78.95 \pm 1.81	84.97 \pm 1.33	80.70 \pm 2.27

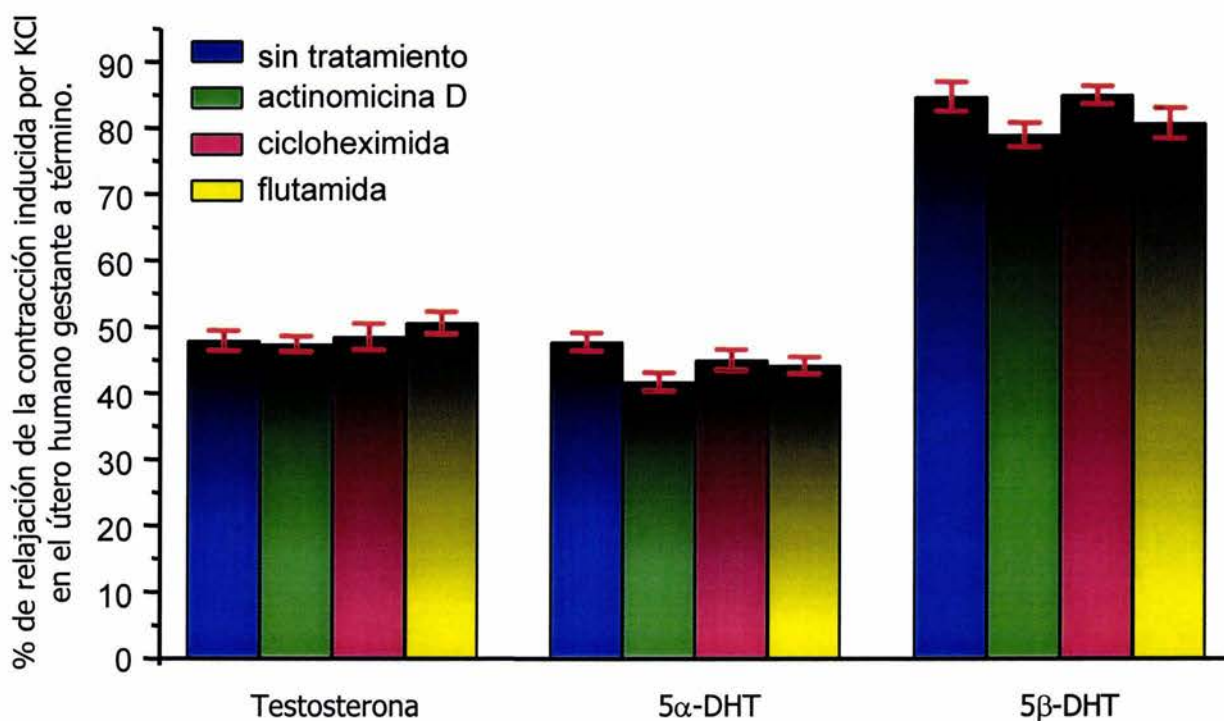


Figura 16. Comparación del efecto relajante de testosterona, 5 α -DHT y 5 β -DHT, a la concentración equimolecular de 100 μ M, sobre la contracción inducida por solución despolarizante de potasio 40 mM, en presencia de actinomicina D (10 μ M), cicloheximida (40 μ M) y flutamida (10 μ M). Mostrando que el efecto relajante de cada andrógeno no fue modificado por los distintos tratamientos. Cada barra representa la media de n = 6 \pm EEM.

7.4 Efecto de los andrógenos sobre la contracción espontánea del útero humano no grávido.

Considerando que el efecto relajante de DHEA y testosterona sobre la actividad contráctil espontánea de útero gestante es muy parecido y tomando en cuenta que testosterona comparte la configuración $\Delta 4,3$ -cetona como progesterona (el principal esteroide durante el embarazo), en otros experimentos, se probó testosterona y 5β -DHT (el andrógeno más potente) sobre la actividad contráctil espontánea de útero no grávido.

El volumen del vehículo utilizado (etanol, 0.1%), no modificó de forma significativa ($P > 0.05$) la contractilidad espontánea del útero humano no grávido (1.16 ± 0.44 % de inhibición). Las pruebas realizadas con testosterona sobre las contracciones espontáneas de útero no grávido muestran un efecto relajante y reversible (Fig. 17), el cual fue dependiente de la concentración. La comparación del efecto provocado por testosterona en el útero gestante y no gestante (Tabla 6) indicó que sólo a la concentración de $30 \mu\text{M}$, el efecto relajante fue significativamente mayor ($p < 0.05$) al observado en útero gestante; sin embargo, el comportamiento de las dos curvas no difiere significativamente ($p > 0.5$) una con respecto a la otra (Fig. 18).

Las pruebas realizadas con 5β -DHT en el útero no grávido pone en evidencia su agudo efecto relajante (Fig. 17), que se incrementa de manera significativa de una forma lineal dependiente de la concentración. 5β -DHT también fue significativamente más potente que testosterona en este estado endocrino. El efecto a bajas concentraciones (3 y $10 \mu\text{M}$) muestran una gran similitud entre los dos estados

endocrinos (grávido vs. no grávido), mientras que la diferencia se aprecia a altas concentraciones (30 y 100 μM); siendo significativamente menor ($p < 0.05$) a 30 μM y mayor a 100 μM en el útero grávido (Tabla 6 y Fig. 18). Sin embargo, el análisis de las curvas mostró que no hay diferencia significativa entre los dos estados endocrinos.

Estos hallazgos resaltan el efecto inhibitorio rápido y reversible (Fig. 17) de testosterona y 5 β -DHT sobre la actividad contráctil del músculo liso miometrial humano gestante y no gestante, marcando a 5 β -DHT como un agudo inductor de la relajación miometrial.

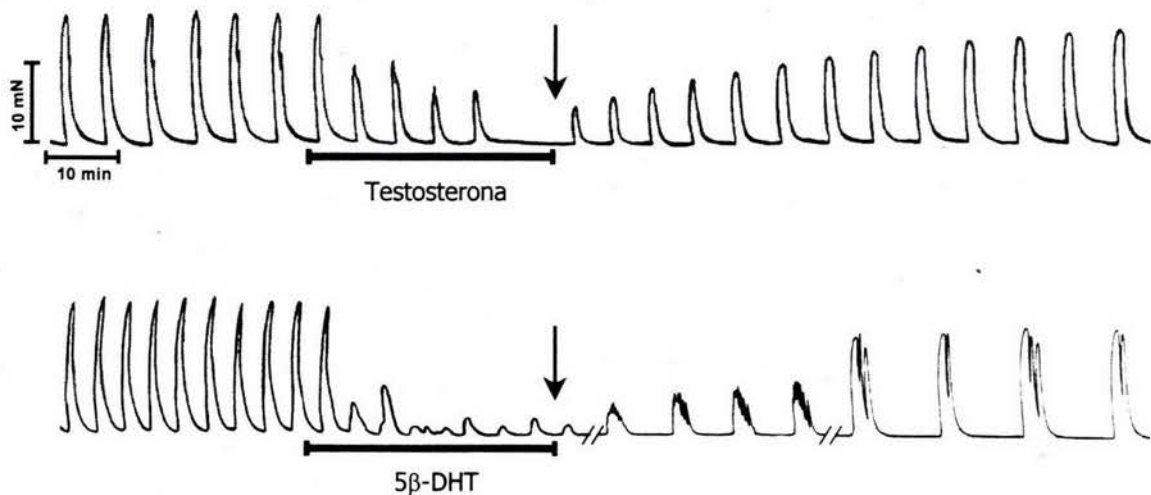


Figura 17. Registros típicos de la actividad contráctil espontánea del útero humano no gestante, que muestran el efecto relajante de testosterona y 5 β -DHT, a la concentración equimolecular de 100 μM . La barra negra representa el tiempo de incubación del andrógeno. Obsérvese que la actividad se recupera al retirar al esteroide del tejido, mediante un lavado (\downarrow).

La reversión del efecto relajante también se observó para cada andrógeno de prueba a sus diferentes concentraciones. Mostrando que la recuperación es variable para cada andrógeno. Así, el efecto relajante provocado por testosterona se revierte de forma inmediata y la actividad es reiniciada después del lavado en aproximadamente 5 minutos, comenzando a retomar su fuerza de contracción (amplitud) paulatinamente, alcanzando una amplitud similar a la inicial entre los 40 a 50 minutos. Mientras el fuerte efecto relajante de 5 β -DHT; la dramática pérdida en la amplitud y la frecuencia de las contracciones uterinas, es revertido en mayor tiempo, iniciando la recuperación 40 minutos después del lavado y la amplitud de las contracciones es similar a la inicial hasta después de aproximadamente 3 ó 4 horas (Fig.17).

Tabla 6. Comparación del porcentaje de relajación producido por testosterona y 5 β -DHT sobre la contracción espontánea del útero humano grávido vs. no grávido.

Concentración	Porcentaje de relajación n = 6 \pm EEM			
	<u>Testosterona</u>		<u>5β-DHT</u>	
	Grávido	No-Grávido	Grávido	No-Grávido
3 μ M	14.44 \pm 2.40	9.13 \pm 1.42	13.62 \pm 1.45	14.29 \pm 2.28
10 μ M	15.80 \pm 1.67	13.71 \pm 1.29	24.78 \pm 1.30	24.40 \pm 2.42
30 μ M	21.95 \pm 2.48	29.01 \pm 1.11*	40.72 \pm 1.98	52.00 \pm 2.24*
100 μ M	50.80 \pm 2.14	49.78 \pm 1.45	83.52 \pm 1.26	76.28 \pm 1.34*
300 μ M	63.74 \pm 2.84	60.80 \pm 1.46		

Diferencia significativa *p<0.05 a las mismas concentraciones en los dos estados endocrinos.

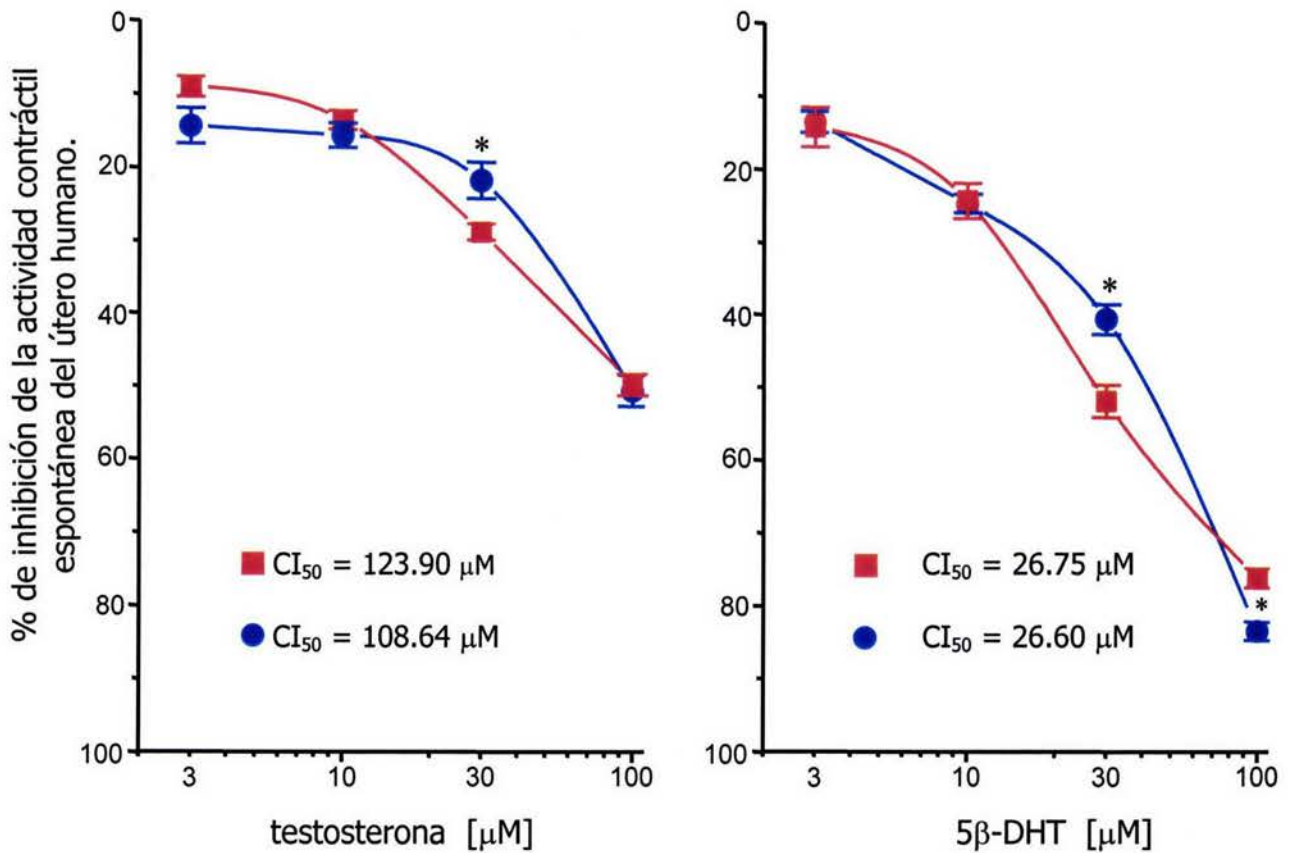


Figura 18. Curvas concentración-respuesta del efecto provocado por testosterona (izquierda) y 5β-DHT (derecha), sobre la contracción del útero humano no gestante (■) y gestante a término (●). Diferencia significativa * $p < 0.05$ a concentraciones iguales. El análisis de ANOVA de dos vías determinó que no existen diferencias significativas entre las curvas en ambos estados endocrinos. Cada punto representa la media de $n = 6 \pm E.E.M.$

8. DISCUSIÓN

8.1 General

El presente estudio evidencia que las hormonas esteroides sexuales masculinas, andrógenos: $\Delta 5-3\beta$ -hidroxi, $\Delta 4,3$ -cetona y 5-reducidos, son compuestos **útero activos**, por producir un claro efecto relajante al disminuir la contracción uterina en el humano. Los compuestos estudiados provocaron inhibición de la actividad contráctil espontánea miometrial; tanto en la mujer no preñada como a término de la gestación, siendo también eficaces para disminuir la contracción estimulada por potasio. Los datos mostraron que la diferencia estructural de cada andrógeno presenta variación en la potencia para producir relajación uterina.

El efecto relajante en el músculo liso uterino inducido por diferentes andrógenos ha sido explorado en animales experimentales (Robson, 1937; Barnafí y Croxatto, 1963; Kubli-Garfias et al., 1980; Perusquía et al., 1990; Perusquía y Campos, 1991; Perusquía et al., 1991ab; Sánchez-Aparicio et al., 1993; Gutiérrez et al., 1994; Perusquía y Villalón, 1996; Perusquía, 2001; Perusquía y Calixto, 2003). Asimismo, se ha mostrado la capacidad de los andrógenos para producir relajación en otros tipos de músculo liso, como el epidídimo y vesícula seminal de la rata (Kubli-Garfias et al., 1983b), el íleon de cobayo (Kubli-Garfias et al., 1987), la vagina de coneja (Traish et al., 2002) y diferentes vasos sanguíneos de varias especies (Revisado por: Perusquía, 2003; Jones et al., 2003; Suzuki et al., 2003; Liu et al., 2003). De manera interesante, los presentes hallazgos

muestran, por primera vez, que la actividad contráctil miometrial del humano es también sensible a la acción relajante de los andrógenos.

Es ampliamente reconocido que la progesterona juega un papel importante en el mantenimiento del embarazo de los mamíferos, ejerciendo un efecto relajante directamente en el músculo uterino. También se ha reportado que algunas progestinas 5-reducidas, producto de su metabolismo, son importantes inductores de la relajación miometrial en la rata (Kubli-Garfias et al., 1979; 1983a; Perusquía et al., 1990; Perusquía, 2001) y en la mujer (Lögfren et al., 1992; Lögfren y Bäckstrom, 1994; Perusquía et al., 1997; Thornton et al., 1999; Perusquía y Jasso-Kamel, 2001). Estos antecedentes apoyan la hipótesis de que otros compuestos con estructura esteroidal y con la misma configuración ($\Delta^4,3$ -cetona y la reducción en C5 y C3) como es el caso de los andrógenos, sean potenciales inhibidores de la contracción uterina. Así, el presente estudio comprueba la respuesta relajante que inducen los andrógenos, atribuyendo a las progestinas y a los andrógenos, producidos en la unidad fetoplacentaria, una acción biológica por regular la contracción miometrial.

El efecto relajante fue observado inmediatamente después (~ 1 min) de la adición del andrógeno, éste efecto fue reversible cuando el andrógeno se retiró del tejido (lavado). Con esta observación se propone que el efecto relajante inducido por estos andrógenos pudiera ser dado por un mecanismo (membranal) de tipo nogenómico, independiente de la vía clásica de la modulación de la transcripción nuclear por hormonas esteroides. Esta sugerencia es fuertemente apoyada por los datos que muestran que el efecto relajante de los andrógenos no fue modificado por el antagonista

del receptor a andrógenos (flutamida) o por los inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas. Tal evidencia permite caracterizar al efecto relajante de los andrógenos en el útero humano como una acción no genómica y descarta categóricamente la vía de acción genómica, como ha sido señalado para el efecto relajante uterino que producen las progestinas (Perusquía et al., 1990; Perusquía y Jasso-Kamel, 2001; Perusquía, 2001).

8.2 Sensibilidad uterina al efecto relajante de los andrógenos

Los resultados mostraron que la efectividad relajante de testosterona y 5 β -DHT fue la misma en útero no gestante y gestante a término; es decir, que la sensibilidad del útero humano al efecto relajante de estos andrógenos es igual en ambos estados endocrinos, lo cual implica que el embarazo no es un factor determinante para la acción relajante de estos dos esteroides. Sin embargo, previamente reportamos que el útero humano no grávido es más sensible a la relajación inducida por 30 μ M de progesterona (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001), una situación que podría ser particular para esta progestina. Un hecho sobresaliente es que con excepción de androstandiol, el valor de la CI₅₀ de cada uno de los restantes andrógenos resultó menor que el previamente reportado para progesterona (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001), mostrando que el útero humano gestante a término es más sensible a la respuesta antiuterotónica de los esteroides sexuales masculinos. En forma colateral, se observó que la contracción inducida por potasio resultó más sensible al efecto relajante de DHEA, androsterona y androstandiol, lo cual podría indicar un diferente modo de acción para estos esteroides.

Por otro lado, se realizó la comparación de la potencia relajante que inducen los andrógenos (con el valor CI_{50}) en el útero humano con el previamente reportado en el útero de rata (Kubli-Garfias et al., 1980), resultando más sensible el útero de rata a la respuesta relajante de 5α -DHT, androsterona y androstandiol. Esta discrepancia podría ser debida a la diferencia entre especies, dado que las progestinas también mostraron menor potencia en el útero humano que en el de rata (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001). En este contexto, algunos bloqueadores de la entrada de calcio presentan una potencia reducida en el útero humano cuando se compara con el útero de la rata (Ducsay, 1990), mostrando una menor sensibilidad del útero humano al efecto de agentes relajantes.

8.3 Eficacia

Este análisis muestra que los andrógenos $\Delta 5$ - 3β -hidroxi (DHEA) y $\Delta 4,3$ -cetona (testosterona), además de ser un sustrato de andrógenos y estrógenos respectivamente, presentan una actividad biológica importante por inducir relajación uterina y se les atribuye un papel de verdaderas hormonas. Estas dos hormonas resultaron ser equipotenciales para inducir relajación, concluyendo que la conversión de DHEA hacia testosterona, donde el doble enlace en C5-6 del anillo B que se isomeriza a C4-5 en el anillo A, no afecta la eficacia relajante de la molécula. En forma notable se muestra que los dihidro- y tetrahidro-derivados de testosterona no pierden la propiedad relajante, pero su potencia varía. Así, los resultados indican que existe una clara relación entre la estructura molecular del andrógeno y la eficacia relajante.

Las observaciones mostraron que la potencia ejercida por cada androstano depende del cambio conformacional que sufre el $\Delta 4,3$ -cetoandr geno, cuando es reducido en C5. Así, la configuración $\alpha/trans$ en C5, que muestra 5α -DHT, es menos potente que DHEA y testosterona, siendo en general uno de los andrógenos menos efectivos. En marcado contraste, el isómero $5\beta/cis$ (5β -DHT), resultó ser, al menos, 3.5 veces más potente que sus precursores, superando sobresalientemente la eficacia relajante de todos los andrógenos probados y que el grupo de progestinas 5-reducidas previamente reportadas (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001), destacando la importancia de 5β -DHT para ejercer una aguda relajación miometrial. Este dato concuerda con la alta potencia relajante que este compuesto ejerce sobre las contracciones inducidas por oxitocina, acetilcolina, serotonina, calcio y potasio en útero aislado de la rata (Perusquía y Campos, 1991; Perusquía et al., 1991ab; Perusquía et al., 1990; Perusquía y Villalón, 1996), en músculo liso intestinal (Kubli-Garfias et al., 1987) y vascular (Perusquía et al., 1996; Perusquía y Villalón, 1999; Perusquía, 2003). Sin embargo, la orientación $\alpha/trans$ en C5 provocó una drástica disminución de la potencia relajante uterina en el presente modelo experimental, este hecho se correlaciona con el tenue efecto relajante que el andrógeno 5α -DHT produce también en el útero (Kubli-Garfia et al., 1980) y la aorta de rata (Perusquía et al., 1996), así como en la arteria umbilical humana (datos no publicados). Es importante considerar que 5α -DHT es un potente andrógeno, con fuerte afinidad al receptor intracelular de andrógenos, mientras su isómero 5β -reducido no se une a estos receptores y carece totalmente de propiedades androgénicas; no obstante, es una hormona efectiva para inducir relajación en el músculo liso, siendo una respuesta no mediada a través del clásico receptor intracelular de andrógenos. Estos hallazgos

permiten concluir que la 5α -reducción es importante para la actividad genómica, mientras que la 5β -reducción lo es para la acción nogenómica.

De la subsecuente 3α -hidroxilación de 5α -DHT, resulta una molécula que recupera la eficacia relajante, dado por el hecho de que la configuración $3\alpha,5\alpha$ de androsterona mostró ser equipotencial a DHEA, aunque menos eficaz que 5β -DHT. También se observó que la falta del grupo cetona en la configuración $3\alpha,5\alpha$, como es el caso de androstandiol, podría restarle potencia relajante. Trabajos previos han mostrado que los andrógenos con configuración $3\alpha,5\alpha$ (androsterona y androstandiol) pueden ser tan potentes o más que su precursor testosterona para inhibir la contracción uterina e intestinal de animales experimentales (Revisado por: Perusquía, 2003). Así, los $3\alpha,5\alpha$ -androstanos son importantes moduladores de la contracción muscular.

En conexión con estos datos, cabe resaltar que otros esteroides, también con configuración $3\alpha,5\alpha$, como $3\alpha,5\alpha$ -tetrahidroprogesterona, pueden producir un fuerte efecto relajante; mayor al inducido por progesterona en el útero grávido de humano (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001) y la progestina sintética $3\alpha,5\alpha$ -noretisterona es más efectiva que noretisterona para inducir vasodilatación en la aorta de rata (Perusquía et al., 2003). En estos estudios, también los 5α -dihidroderivados (5α -pregnandiona y 5α -noretisterona) resultaron ser tenues inhibidores de la contracción muscular. En general, es claro que la reducción 5β y $3\alpha,5\alpha$ de los $\Delta 4,3$ -cetoesteroides es necesaria para producir compuestos reguladores de la actividad muscular.

La simple interpretación de lo anterior ha sido discutida previamente (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001; Perusquía, 2001; Perusquía, 2003; Perusquía et al., 2003). Así, las configuraciones estructurales de los esteroides mencionados presentan diferente conformación espacial: la 5β -reducción produce una marcada angulación del anillo A con respecto al sistema de anillos B-C-D de la molécula esteroideal; mientras que la 5α -reducción da una conformación lineal a los cuatro anillos, similar a la configuración $\Delta^{4,3}$ -cetona (Fig. 19). Es inevitable especular que los compuestos 5β -reducidos pudieran presentar mayor superficie de anclaje (unión) a la superficie de la membrana celular (ver Fig. 19) y con esto poseer una mayor interacción con las proteínas membranales para producir cambio en la excitabilidad de la célula muscular.

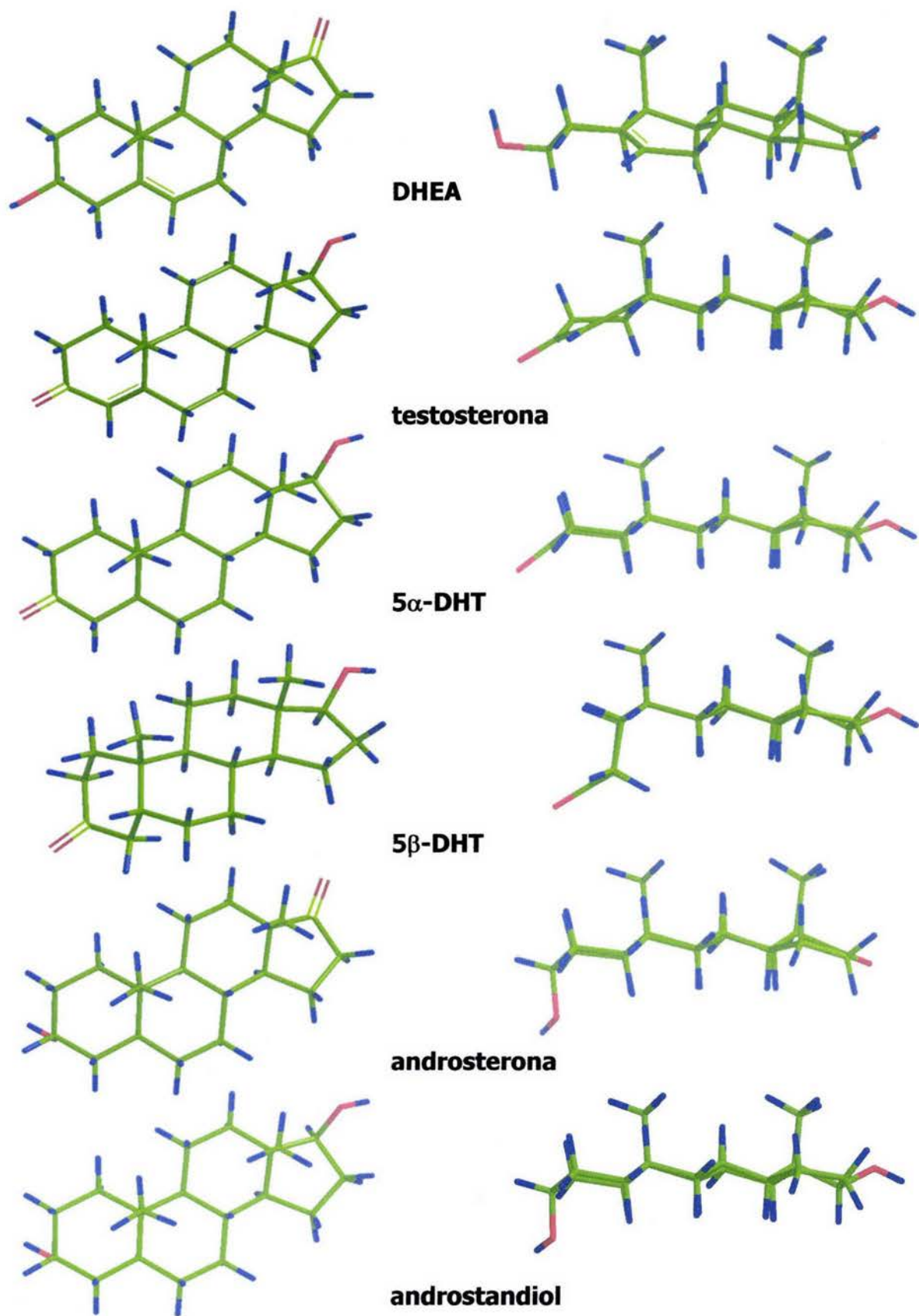


Figura 19. Representación estructural de las moléculas estudiadas. Mostrando su estereoquímica en vista frontal (izquierda) y lateral (derecha).

8.4 Estudios sobre el modo de acción de los andrógenos

Como previamente se discutió, la propiedad útero relajante de los andrógenos puede ser explicada por una acción nogenómica. Sin embargo, no se ha explorado el mecanismo de acción que los andrógenos utilizan para inhibir las contracciones uterinas en la mujer.

En el presente trabajo se observó que la contracción inducida por potasio resultó más sensible al efecto relajante de DHEA, androsterona y androstandiol; estas observaciones indican que la acción de estos andrógenos podría ser consecuencia del bloqueo de la entrada de calcio extracelular por inactivación de los canales de calcio operados por voltaje en la célula miometrial. Esta sugerencia es apoyada por estudios en útero aislado de rata, que muestran que los esteroides $\Delta 4,3$ -cetona y 5-reducidos, andrógenos y progestinas, relajan la contracción estimulada por potasio (Perusquía et al., 1990; Perusquía y Villalón, 1996; Hidalgo et al., 1996) y la contracción inducida por calcio en tejido despolarizado (Perusquía et al., 1990). Además, el efecto relajante de los esteroides sobre la contractilidad uterina de la rata es revertido por calcio o ionóforos selectivos a este ión (Perusquía et al., 1990; Perusquía y Villalón, 1996; Perusquía, 2001). Estos trabajos sugirieron que los esteroides disponen de una propiedad calcio antagónica y su respuesta relajante podría ser mediada por la inactivación de los canales de calcio operados por voltaje. Esta hipótesis ha sido sustentada por evidencias directas con la técnica de *patch clamp*, evaluando las corrientes de calcio en célula única, revelando que estradiol interfiere en la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje de células miometriales de rata preñada (Yamamoto, 1995).

En forma colateral, se ha reportado que andrógenos y progestinas son capaces de inhibir las contracciones estimuladas por oxitocina, prostaglandinas, acetilcolina o serotonina en el útero de rata (Revisado por: Perusquía, 2001); este hallazgo pone de manifiesto que los canales de calcio operados por receptor, también pueden ser inactivados por andrógenos y progestinas. También otros estudios han mostrado que estriol, estradiol y progesterona inhiben más pronunciadamente los canales de calcio operados por receptor que los canales dependientes de voltaje en miometrio y arteria uterinas humanas (Kostrzewska et al., 1993). Así, con estos antecedentes se pudo vislumbrar que los esteroides podrían estar actuando en la inactivación de los canales de calcio operados por voltaje y/o receptor; impidiendo el paso de calcio extracelular, una hipótesis que también ha sido postulada para el efecto vasodilatador de andrógenos (Perusquía et al., 1996; Perusquía y Villalón, 1999; Perusquía, 2003)

Referente a que testosterona y sus dihidroderivados no modificaron su eficacia relajante sobre contracción espontánea o inducida por potasio, se especula que estos compuestos pudieran inhibir la entrada de calcio por: i) bloquear canales operados por voltaje y por receptor en igual proporción, i.e., sin selectividad por los dos tipos de canales de calcio; ii) utilizar además, otros sitios de acción. Con respecto a esta última sugerencia y considerando que las corrientes de los canales de potasio son importantes moduladores del potencial de membrana y la excitabilidad del músculo liso, se ha publicado que la incubación por 24 h con estradiol y/o progesterona en cultivo primario de miometrio humano gestante a término, provocó inhibición de la actividad de los canales de potasio por estradiol, mientras progesterona presenta un efecto opuesto

(activación), explicando así el respectivo papel procontráctil y proquiescente de estradiol y progesterona en el útero humano durante la gestación (Knock et al., 2001).

También se ha propuesto la posibilidad de que algunos esteroides relajantes de la contractilidad uterina (5 β -pregnan-3,20-diona) podrían unirse a los receptores a oxitocina y contrarrestar el efecto estimulante de esta hormona; sin embargo, este dato aún no ha sido explorado a profundidad (Astle et al., 2003b). Cabe también considerar que cadenas de transducción de señales y segundos mensajeros podrían estar involucrados en la acción relajante de los esteroides. A este respecto, se ha reportado que progesterona puede modular el calcio libre intracelular a través de un receptor acoplado a la proteína G (Burger et al., 1999). Asimismo, se ha publicado que algunos esteroides podrían también regular la activación de la proteína cinasa A (PKA), C (PKC) y la activadora mitógena (MAPK), provocando modificación en la expresión de canales iónicos que involucran cambios en la excitabilidad celular por vías de segundos mensajeros (Sanborn, 2001; Zervou et al., 2002). Sin embargo, todas estas propuestas no han definido aún un mecanismo preciso de acción y es necesario realizar futuros estudios para definir el mecanismo nogenómico de la acción utero-relajante de los esteroides.

8.5 Implicaciones fisiológicas

Debido a la relajación uterina que inducen los andrógenos, se propone que los esteroides sexuales masculinos poseen un efecto progestacional, el cual podría sinergizar y/o potenciar el conocido efecto quiescente de progesterona, manteniendo la

implantación y el desarrollo del embrión hasta el término. También, podría considerarse que la disminución en la producción de andrógenos durante el embarazo, podría ser causa de abortos o partos prematuros.

Por las evidencias mostradas, es preciso la identificación exhaustiva de todos los metabolitos de testosterona; 5α - y 5β -reducidos, en el tejido uterino durante el embarazo, debido a la importante modulación que tienen al inhibir la contracción muscular uterina. De forma particular, metabolitos 5β -reducidos, elaborados *de novo* por acción enzimática o bien, aquellos andrógenos que han sido obtenidos a través de la unidad feto-placentaria, han demostrado ser metabolitos activos y no de desecho común. Así, el fuerte efecto relajante que mostró 5β -DHT fue muy superior al efecto reportado para progesterona (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001), a concentraciones equimoleculares, remarcando que no son necesarias altas concentraciones séricas de este compuesto para ejercer la función relajante requerida durante la gestación.

El aumento en el contenido sérico de androstendiona y testosterona en la mujer durante la gestación es notable, lo que sugiere una probable relación con el mantenimiento del embarazo. La concentración sérica que presenta DHEA es considerada constante con una tenue disminución, no significativa, a lo largo de la gestación (Laatikainen et al., 1980; Mathur et al., 1980). Posiblemente este precursor mantiene un estado de inactivación uterina conforme se desarrolla el producto siendo también el sustrato para la producción de otros andrógenos. El incremento de la secreción de testosterona durante el embarazo (Bammann et al., 1980; Dokras et al., 2003), probablemente actúa disminuyendo la contractilidad del miometrio conforme al

desarrollo del feto, ayudando al estado de quiescencia miometrial junto con progestinas, debido a que este andrógeno incrementa su concentración sérica de forma lineal sólo durante la gestación (Labrie, et al., 1997a; Dorgan et al., 2002).

En cuanto a los metabolitos de testosterona, se ha reportado sólo la concentración sérica para 5α -DHT durante la gestación (Saez et al., 1972), andrógeno que presenta un incremento sérico durante el primer trimestre, quizá modulando, sinérgicamente con otros esteroides, el proceso de implantación, el desarrollo de la placenta y favorecer la relajación del útero en etapas iniciales de la gestación, sustentado por la evidencia de que esta hormona presentó una potencia relajante similar a la reportada previamente para progesterona (Perusquía y Jasso-Kamel, 2001). La síntesis y el traslado de otros andrógenos, 5α - y 5β -reducidos, durante el embarazo ha sido discutido por algunos autores, estableciendo su posible participación con el tejido uterino desde el inicio hasta el final del embarazo (Diczfalusy et al., 1969; Charbonneau y The Van-Luu, 2001).

Es inevitable mencionar que la propiedad antiuterotónica de estos esteroides podría ser utilizada en la terapéutica, como tocolíticos en la prevención de abortos y partos prematuros. Admitidamente, se requiere de estudios clínicos para validar su potencial terapéutico en este territorio, debido a que podrían producir virilización de los fetos femeninos. Sin embargo, los presentes datos pueden dar la pauta para el diseño de nuevos fármacos relajantes de las contracciones uterinas.

Finalmente, es necesario discutir que las concentraciones probadas de cada andrógeno en este trabajo son mucho mayores a la concentración sérica reportada en la madre a término del embarazo; sin embargo, las dosis terapéuticas administradas, al menos de testosterona y DHEA, en uso clínico son en rangos micromolares (5-200 mg/día).

8.6 Perspectivas a futuro

Los presentes hallazgos han mostrado un poderoso efecto relajante provocado por los andrógenos sobre la contracción miométrial de la mujer, señalando que para ejercer esta respuesta, uno de los principales mecanismos de acción podría ser la disminución de la entrada de calcio extracelular, por inactivación de los canales de calcio operados por voltaje y/o receptor en los miocitos uterinos. Los datos de esta Tesis dieron la pauta para esclarecer esta hipótesis y será necesario realizar como primer paso, la medición de la concentración intracelular de calcio ante el estímulo de una despolarización en presencia y ausencia de un andrógeno en células disociadas de miometrio humano, usando la técnica de fluorescencia. Estos datos permitirán determinar el posible bloqueo de los canales de calcio operados por voltaje y la subsecuente disminución de la concentración intracelular de calcio.

También, será inevitable comprobar, en forma más directa, la posible disminución de las corrientes de calcio y/o activación de las corrientes de potasio, que los andrógenos pudieran estar regulando en células miométriales humanas en cultivo,

utilizando como herramienta electrofisiológica la técnica de *patch-clamp* para llevar a cabo estas evaluaciones.

En forma paralela también será necesario determinar si la cascada de segundos mensajeros podría estar involucrada en el proceso útero relajante de los andrógenos.

Por otro lado, es urgente conocer la biotransformación completa de los andrógenos durante el embarazo, particularmente la evidencia de la conversión de testosterona hacia 5β -DHT, en el tejido uterino. Asimismo, medir las concentraciones séricas de este y otros andrógenos durante el embarazo, dado por el hallazgo de poseer una actividad biológica como la reportada en la presente Tesis.

9. CONCLUSIONES

Los esteroides sexuales masculinos (andrógenos), son importantes inhibidores de la actividad contráctil del miometrio humano gestante a término y no gestante. Además, la evidente relajación producida por DHEA y testosterona los enmarcan como compuestos útero activos y no sólo como sustrato para la producción de otros esteroides.

Se considera que el efecto relajante producido por los andrógenos podría estar en un constante sinergismo o potenciación con progesterona y otras progestinas.

El andrógeno de mayor eficacia fue 5 β -DHT, así se sugiere que la 5 β -reducción de la molécula esteroideal, optimiza la inhibición de la actividad contráctil miometrial. Asimismo, la configuración 3 α ,5 α , (androsterona y androstandiol) es más efectiva cuando existe un grupo cetona.

El efecto relajante de los andrógenos, es considerado, como de tipo nogenómico, por la acción inmediata, la reversión del efecto y la incapacidad de los inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas o del antiandrógeno para bloquear la acción relajante.

Los andrógenos podrían ejercer su acción directamente sobre proteínas membranales (receptores y/o canales iónicos) a través de sus grupos funcionales y en consecuencia, provocar el efecto relajante. En forma particular, esta Tesis sugiere que los andrógenos podrían modificar la permeabilidad de la membrana, disminuyendo la concentración de calcio intracelular.



**DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA
HOSPITAL DE LA MUJER**

Prolongación de Díaz Mirón No. 374
Col. Sto. Tomás C.P. 11340 México, D.F.
Delegación Miguel Hidalgo Tels.: 341-19-09 341-11-00

397

México, D.F., A 30 de Mayo de 1997.

C. DR. ARMANDO JUAREZ BENGUA.
P r e s e n t e .-

En relación a su solicitud, me permito comunicarle que a través del Comité de Ética de este Hospital y el Departamento de Enseñanza, previo análisis a su protocolo de Investigación denominada "ACCION DE ESTEROIDES DELTA 4 - 3- CETO Y 5 - REDUCIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DEL MIOMETRIO Y LA ARTERIA UMBILICAL", - bajo la supervisión de la Dra. Mercedes Perusquia Nava, Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad Nacional Autónoma de México, ha sido aprobado para llevarse a cabo con las pacientes de esta Institución.

Sin otro particular, hago propia la ocasión para enviarle un -- afectuoso y cordial saludo.

ATENTAMENTE,

DR. LUIS ENRIQUE BATRES MACIEL
JEFE DEL DEPARTAMENTO.

S. S. A.
"HOSPITAL DE LA MUJER"
DEPTO. DE ENSEÑANZA MEDICA

LEBM/asr.

Anexo, que muestra la aprobación del comité de ética para la realización del proyecto.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABRAHAM, G. E. (1974). Ovarian and adrenal contribution to peripheral androgens during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39:340-346.

ADACHI, S. AND OKU, M. (1995). The regulation of oxytocin receptor expression in human myometrial monolayer culture. *J. Smooth Muscle. Res.* 31:175-187.

ADAMS, M. R., WILLIAMS, J. K. AND KAPLAN, J. R. (1995). Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:562-570.

ALBRECHT, E. D. AND PEPE, G. J. (1990). Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr. Rev.* 11 (1):124-150.

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. *Am. J. Physiol.* 88:340-346.

ALLEN, W. AND REYNOLDS, S. (1935). Physiology of the corpus luteum. X. The comparative actions of crystalline progesterone and crude progesterone on uterine motility in unanesthetized rabbits. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 30:309-318.

ALLOLIO, B. AND ARLT, W. (2002). DHEA treatment: myth or reality?. *Trends. Endocrinol. Metab.* 13 (7):288-294.

ARKARAVICHIAN, W. AND KENDLE, K. E. (1990). Critical progesterone requirement for maintenance of pregnancy in ovariectomized rats. *J. Reprod. Fertil.* 90:63-70.

ASTLE, S., SLATER, D. M. AND THORNTON, S. (2003a). The involvement of progesterone in the onset of human labour. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 108 (2):177-181.

ASTLE, S., KHAN, R. N. AND THORNTON, S. (2003b). The effects of a progesterone metabolite, 5 β -dihydroprogesterone, on oxytocin receptor binding in human myometrial membranes. *BJOG.* 110:589-592.

BACHMANN, G., BANCROFT, J., BRAUNSTEIN, G., BURGER, H., DAVIS, S., DENNERSTEIN, L., GOLDSTEIN, I., GUAY, A., LEIBLUM, S., LOBO, R., NOTELOVITZ, ROSEN, R., SARREL, P., SHERWIN, B., SIMON, J., SIMPSON, E., SHIFREN, J., SPARK, R. AND TRASH, A. (2002). Female androgen insufficiency: The Princeton consensus statement on definition, classification, and assessment. *Fertil. Steril.* 77 (4):660-664.

BAMMANN, B. L., COULAM, C. B. AND JIANG, NAI-SIANG. (1980). Total and free testosterone during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 137:293-298.

BANCROFT, J. (2002). Sexual effects of androgens in women: some theoretical considerations. *Fertil. Steril.* 77 (4) Suppl. 4:S55-S59.

BARNAFI, L. AND CROXATTO, H. (1963). The *in vitro* effect of progesterone and estrogens on the oxytocin response of rat uterus. *Acta Physiol. Lat. Am.* 13:26-29.

BARNAFI, L. AND LARRAGUIBEL, R. (1974). The *in vitro* effect of progesterone and oestrogens on the spontaneous and oxytocin-induced activity of the human myometrium. *Acta Endocrinol.* 76:172-177.

BARRERA, 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.

BATRA, S. (1973). Effect of some estrogens and progesterone on calcium uptake calcium release by myometrial mitochondria. *Biochem. Pharmacol.* 22:803-809.

BATRA, S. AND BENGTSSON, B. (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. (2002). Androgens and aging men. *Mol. Cell. Endocrinol.* 198:41-49.

BEATO, M. AND KLUNG, J. (2000). Steroid hormone receptors. An update. *Hum. Reprod. Update.* 6:225-236.

BEDFORD, C. A., CHALIS, J. R. G., HARRISON, F. A. AND HEAP, R. B. (1972). The role of oestrogens and progesterone in the onset of parturition in various species. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 16:1-23.

BÉLANGER, A., CANDAS, B., DUPONT, A., CUSAN, L., DIAMOND, P., GOMEZ, J. AND 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.

BELAYET, H. M., KANAYAMA, N., KHATUN, S., TOKUNAGA, N., SUGIMURA, M., YAMASHITA, M., KOBAYASHI, T. AND TERAQ, T. (1999). Dehydroepiandrostrone sulphate promotes hyaluronic acid-induced cervical ripening in rabbits. *Hum. Reprod.* 14:1361-1367.

BELING, C. (1977). Estrogens. In: Fuchs F, Klopper A (eds): *Endocrinology of Pregnancy*. New York, Harper & Row. 76-98.

BENAGIANO, G., MANCUSO, S., MANCUSO, F. P., WIQVIST, N. AND DICZFALUSY, E. (1968). Studies on the metabolism of C-19 steroids in the human foeto-placental unit. *Acta Endocrinol.* 57:187-207.

BOLTÉ, E., MANCUSO, S., ERIKSSON, G., WIQVIST, N. AND DICZFALUSY, E. (1964). Studies on the aromatisation of neutral steroids in pregnant women. III Overall aromatisation of dehydroepiandrosterone sulphate circulating in the foetal and maternal compartments. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 45:535-576.

BOLTÉ, E., WIQUIST, N. AND DICZFALUSY, E. (1966). Metabolism of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate by the Human Foetus at midpregnancy. *Acta Endocrinol.* 52:583-597.

BOYLE, M. B., MACLUSKY, N. J., NAFTOLIN, F. AND KACZMARCK, L. K. (1987). Hormonal regulation of K⁺-channel messenger RNA in rat myometrium during oestrus cycle and in pregnancy. *Nature* 330:373-375.

BRUCHOVSKY, N. AND WILSON, J. D. (1999). Discovery of the role of dihydrotestosterone in androgen action. *Steroids* 64:753-759.

BRYSON, M. J. AND SWEAT, M. L. (1967). Metabolism of progesterone in human proliferative endometrium. *Endocrinology* 81:729-734.

BULBRING, E. AND TOMITA, T. (1987). Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 39:49-96.

BURGER, K., FAHRENHOLZ, F. AND GIMPL, G. (1999). Non-genomic effects of progesterone on the signaling function of G protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* 464:25-29.

BURGER, H. (2002). Androgen Production in Women. *Fertil. Steril.* 77 (4) Suppl. 4:S3-S5.

BUSTER, J. E., ABRAHAM, G. E., KYLE, F. W. AND MARSHALL, J. R. (1974). Serum steroid levels following a large intravenous dose of a steroid sulfate precursor during the second trimester of human pregnancy. I. Dehydroepiandrosterone Sulfate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38:1031-1037.

BUSTER, J. E., CHANG, R. J., PRESTON, D. L., ELASHOFF, R. M., COUSINS, L. M., ABRAHAM, G. E., HOBEL, C. J. AND MARSHALL, J. R. (1979). Interrelationships of circulating maternal steroid concentrations in the third trimester pregnancies. II. C₁₈ and C₁₉ steroids: estradiol, estriol, dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, Δ^5 -androstenediol, Δ^4 -androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 48:139-142.

BUTENANDT, A. AND WESTPHAL, U. (1934). Zur Isolierung und charakterisierung des corpus luteum. *Hormons. Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 67:1440-1442.

BYGDEMAN, M., DANIELSSON, K. G., MARIONS, L. AND SWAHN, MARJA-LIISA. (2000). Pregnancy termination. *Steroids* 65:801-805.

BYRNE, J. J. AND BRADLOW, H. L. (2001). DHEA-PC slows the progression of type 2 diabetes (non-insulin-dependent diabetes mellitus) in the ZDF/Gmi-fa/fa rat. *Diabetes Technol. Ther.* 3:211-219.

- CALLIES, F., ARLT, W., SIEKMANN, L., HÜBLER, D., BIDLINGMAIER, F. AND ALLOLIO B. (2000). Influence of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) on urinary steroid metabolites in males and females. *Steroids* 65 (2):98-102.
- CARR, B. R. AND SIMPSON, E. R. (1982). Cholesterol synthesis in human fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55:447-452.
- CELEC, P. AND STARKA, L. (2003). Dehydroepiandrosterone – Is the fountain of youth drying out?. *Physiol. Res.* 52:397-407.
- COLEMAN, D. L., LETTER, E. H. AND SCHWIZER, R. W. (1982). Therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetic mice. *Diabetes.* 31:830-833.
- COLEMAN, K. M. AND SMITH C. L. (2001). Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front. Biosci.* 1 (6):D1379-D1391.
- COLLINS, W. P., MANSFIELD, M. D., BRIDGES, C. E. AND SOMMERVILLE, I. F. (1969). Studies on steroid metabolism in human endometrial tissue. *Biochem. J.* 113 (2):399-405.
- CRAIG, C. R. (1987). Anticonvulsant activity of steroids: separability of anticonvulsant from hormonal effects. *J. Pharmac. Exp. Ther.* 153:337-343.
- CSAPO, A. (1961). Defence mechanism of pregnancy. *Ciba Founs. Study Group 9* ("Progesterone and the Defence Mechanism of Pregnancy"). 3-27.
- CHARBONNEAU, A. AND THE VAN-LUU (2001). Genomic organization of a human 5 β -reductase and its pseudogene and substrate selectivity of the expressed enzyme. *Biochim Biophys Acta.* 1517:228-235.
- DAVIS, S. R. AND TRAN, J. (2001). Testosterone influences libido and well being in women. *Trends. Endocrinol. Metab.* 12 (1):33-37.
- DAVISON, S. L. AND DAVIS, S. S. (2003). Androgens in women. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 85:363-366.
- DELL'ACQUA, S., MANCUSO, S., ERIKSSON, G., RUSE, J. L., SOLOMON, S. AND DICZFALUSY, E. (1967). Studies on the aromatisation of neutral steroids in pregnant women. VI. Aromatisation of 16 α -hydroxylated C-19 steroids by midterm placentas perfused *in situ*. *Acta Endocrinol.* 55:401-414.
- DENNERSTEIN, L., RONDOLPH, J., TAFFE, J., DUDLEY, E. AND BURGER, H. (2002). Hormones, mood, sexuality, and the menopausal transition. *Fertil. Steril.* 77 (4) Suppl. 4:S42-S48.

DIAMOND, P., CUSAN, L., GOMEZ, J. L., BÉLANGER, A. AND LABRIE, F. (1996). Metabolic effects of 12 month percutaneous DHEA replacement therapy in postmenopausal women. *J. Endocrinol.* 150:S43-S50.

DICZFALUSY, E., (1969). Steroid metabolism in the foeto-placental unit. *Excerpta. Med. Int. Congr. Ser.* 183:65-109.

DICZFALUSY, E. AND TROEN, P. (1961). Endocrine functions of the human placenta. *Vitam. Horm.* 19:229-234.

DIEZ D'AUX, R. C. AND MURPHY, B. E. P. (1974). Androgens in the human fetus. *J. Steroid. Biochem.* 5:207-210.

DOKRAS, A., SPACZYNSKI, R. Z., BEHRMAN, H. R., AND DULEBA, A. J. (2003). Testosterone levels in pregnant women correlate with the insulin response during the glucose tolerance test. *Fertil. Steril.* 79 (3):492-496.

DORGAN, J. F., FEARS, T. R., MCMAHON, R. P., FRIEDMAN, L. A., PATTERSON, B. H. AND GREENHUT, S. F. (2002). Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids* 67:151-158.

DUCSAY, C. A. (1990). Calcium channels: role in myometrial contractility and pharmacological applications of calcium entry blockers. In: Carsten, M. E., Miller, J. D., (eds). *Uterine Function, Molecular and Cellular Aspect.* New York, Plenum Press. 169-194.

ECKSTEIN, B., MECHOULAM, R. AND BURSTEIN, S. H. (1970) Identification of 5α -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol as a principal metabolite of pregnenolone in rat ovary at onset of puberty. *Nature* 228 (274):866-868.

ECKSTEIN, B. AND RAVID, R. (1974). On the mechanism of the onset of puberty: identification and pattern of 5α -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol and its 3α epimer in peripheral blood of immature female rats. *Endocrinology* 94 (1):224-229.

ECKSTEIN, B. (1983) Blood concentrations and biological effects of androstanediols at the onset of puberty in the female rat. *J. Steroid. Biochem.* 19 (1C):883-886.

ENGLISH, K. M., JONES, R. D., JONES, T. H., MORICE, A. H. AND CHNNER, K. S. (2001). Gender differences in the vasomotor effects of different steroid hormones in rat pulmonary and coronary arteries. *Horm. Metab. Res.* 33:645-652.

EWING, L., BROWN, B., LIBY, D. C. AND JARDINE, I. (1975). Testosterone and 5α -reduced androgens secretion by rabbit testes-epididymides perfused *in vitro*. *Endocrinology* 96 (3):610-617.

FALKENSTEIN, E., TILLMANN, H. C., CHRIST, M., FEURING, M. AND WEHLING, M. (2000a). Multiple actions of steroid hormones - A focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 52 (4):513-555.

FALKENSTEIN, E., NORMAN, A. W. AND WEHLING, M. (2000b). Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action (s) J. Clin. Endocr. Metab. 85 (5):2072-2075.

FIELD, A. E., COLDITZ, G. A., WILLET, W. C., LONGCOPE, C. AND McKINLAY, J. B. (1994). The relation of smoking, age, relative weight, and dietary intake to serum adrenal steroids, sex hormones, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men. J. Clin. Endocrinol. Metab. 79:1310-1316.

FRAENKEL, L. (1903). Die Function des Corpus Luteum. Arch. Gynaek. 68:438-545.

GANDY, H. M. (1977). Androgens. In: Fuchs F, Klopper A (eds): Endocrinology of Pregnancy. New York, Harper & Row. 123-156.

GOODYER, C. G. AND BRANCHAUD, C. L. (1981). Regulation of hormone production in the human fetoplacental unit. Ciba. Found. Symp. 86:89-123.

GUTIÉRREZ, M., MARTÍNEZ, V., CANTABRANA, B. AND HIDALGO, A. (1994). Genomic and no-genomic effects of steroidal drugs on smooth muscle contraction in vitro. Life Sci. 55 (6):437-443.

GYERMEK, L., IRIARTE, J. AND CRABBE, P. (1968). Steroid CCCY: structure-activity relationships of some steroidal hypnotic agents. J. Med. Chem. 11:117-125.

HALL, P. F. (1986). Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. Steroids 48:131-196.

HAMPL, R. AND STARKA, L. (2000). Minireview:16 α -Hydroxylated metabolites of dehydroepiandrosterone and their biological significance. Endocr. Regul. 24:161-163.

HEINLEIN, C. A. AND CHANG, C. (2002a). Androgen receptor (AR) coregulators: An overview. Endocr. Rev. 23 (2):175-200.

HEINLEIN, C. A. AND CHANG, C. (2002b). The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. Mol. Endocrinol. 16 (10):2181-2187.

HELLIG, H., GATTEREAU, D., LEFEBVRE, Y. AND BOLTE, E. (1970). Steroid production from plasma cholesterol. I. Conversion of plasma cholesterol to placental progesterone in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. 30:624-632.

HENDERSON, E., YANG, J. Y. AND SCHWARTZ, A. (1992). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and synthetic DHEA analogs are modest inhibitors of HIV-I III B replication AIDS. Res. Hum. Retro. Viruses. 8:625-631.

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

- JACKSON, M. AND DUDLEY, D. J. (1998). Endocrine assays to predict preterm delivery. *Clin. Perinat.* 4:837-857.
- JAFFE, R. B. AND PETERSON, E. P. (1966). In vivo steroid biogenesis and metabolism in the human term placenta. 2. In situ placental perfusion with cholesterol-7 α -³H. *Steroids* 8 (5):695-710.
- JAFFE, R. B., PERÉZ-PALACIOS, G., LAMONT, K. G. AND GIVNER, M. L. (1968). *De novo* steroid sulfate biosynthesis. *J. Clin. Endocr. Metab.* 16:71-76.
- JAFFE, R. B. (1999). Regulación neuroendocrinometabólica del embarazo. En: *Endocrinología de la Reproducción*. Yen, S., Jaffe, R., Barbieri, R. (eds). Editorial Médica Panamericana. 800-836.
- JASONNI, V. M., BONAVIDA, M., LODI, S., PRETI, S., BULLETTI, C. AND FLAMIGNI, C. (1982). Androstenedione metabolism in human uterine tissues: endometrium, myometrium and leiomyoma. *J. Steroid. Biochem.* 17:547-551.
- JEZ, J. M. AND PENNING, T. M. (1998). Engineering steroid 5 β -reductase activity into rat liver 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemistry.* 37:9695-9703.
- JONES, R. D., PUGH, P. J., JONES, T. H. AND CHANNER, K. S. (2003). The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br. J. Pharmacol.* 138:733-744.
- KINOUCHI, T. AND HORTON, R. (1974). 3 α -androstenediol in humans peripheral plasma. *J. Clin. Endocrinol.* 38:262-268.
- KIRSCHNER, M. A. AND BARDIN, C. W. (1972). Androgen producción and metabolism in normal and virilized women. *Metabolism.* 21 (7): 667-688.
- KITCHIN, J. D., PION, R. J. AND CONRAD, R. H. (1967). Metabolism of progesterone by the term human placenta perfused *in situ*. *Steroids* 9:263-270.
- KNOCK, G. A., TRIBE, R. M., HASSONI, A. A. AND AARONSON, P. I. (2001). Modulation of potassium current characteristics in human myometrial smooth muscle by 17 β -estradiol and progesterone. *Biol. Reprod.* 64:1526-1534.
- KOKOTIS, J. M. AND LIAO, S. (1999). Molecular action of androgen in the normal and neoplastic prostate. *Vitam. Horm.* 55:219-307.
- KOSTRZEWSKA, A., LAUDANSKI, T. AND BATRA, S. (1993). Effect of ovarian steroids and diethylstilbestrol on the contractile responses of the human myometrium and intramyometrial arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 233 (1):127-134.
- KUBLI-GARFIAS, C., MEDRANO-CONDE, C., BEYER, C. AND BONDANI, A. (1979). *In vitro* inhibition of rat uterine contractility induced by 5 α and 5 β 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., CANCHOLA, E., ARAUZ-CONTRERAS, J. AND FERIA VELAZCO, A. (1982). Depressant effect of androgens on the cat brain electrical activity and its antagonism by ruthenium red. *Neuroscience* 7:2777-2782.

KUBLI-GARFIAS, C., HOYO-VADILLO, C., LÓPEZ-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 α -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 α - and 5 β -progesterone metabolites on the CNS. *Trends. Pharmacol. Sci.* 5:439-442.

KUBLI-GARFIAS, C., MEDINA-JIMÉNEZ, M., GARCÍA-YAÑEZ, E., VÁZQUEZ-ALVAREZ, A. M., PERUSQUÍA, M., GÓMEZ-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.

KUMAR, D. (1962). *In vitro* inhibitory effect of progesterone on extrauterine human smooth muscle. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 84:1300-1304.

LAATIKAINEN, T., PELKONEN, J., APTER, D. AND RANTA, T. (1980). Fetal and maternal serum levels of steroid sulfates, unconjugated steroids and prolactin at term pregnancy and in early spontaneous labor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50 (3):489-494.

LABRIE, Y., DUROCHER, F., LACHANCE, Y., TURGEON, C., SIMARD, J., LABRIE, C. AND LABRIE, F. (1995). The human type II 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene encodes two alternatively-spliced messenger RNA species. *DNA Cell. Biol.* 14:849-861.

LABRIE, F., BÉLANGER, A., CUSAN, L., GOMEZ, J. L. AND CANDAS, B. (1997a). Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (8):2396-2402.

LABRIE, F., DIAMOND, P., CUSAN, L., GOMEZ, J. L. AND BÉLANGER, A. (1997b). Effect of 12 month DHEA replacement therapy on bone, vagina, and endometrium in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:3498-3505.

LABRIE, F., BÉLANGER, A., CUSAN, L. AND CANDAS, B. (1997c). Physiological changes in Dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82 (8):2403-2409.

LAMB, E., MANCUSO, S., DELL'ACQUA, S., WIQVIST, N. AND DICZFALUSY, E. (1967). Studies on the metabolism of C-19 steroids in the human foeto-placental unit. I. Neutral metabolites formed from dehydroepiandrosterone sulphate by the placenta at midpregnancy. *Acta Endocr. (Kbh)*. 55:263-277.

LEVIN, E. R. (2002). Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 67:471-475.

LI, S. AND YAN, X. (1993). Prevention by dehydroepiandrosterone of the development of mammary carcinoma induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) in the rat. *Breast. Cancer Res. Treatm.* 29:203-217.

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

LIU, P. Y., DEATH, A. K. AND HANDELSMAN, D. J. (2003). Androgens and cardiovascular disease. *Endocr. Rev.* 24:313-340.

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

LÖFGREN, M. AND BÄCKSTROM, T. (1994). Continuous progesterone exposure associated with high contraction frequency in human term myometrial strips. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 73:186-191.

LOGANATH, A., PEH, K. L. AND WONG, P. C. (2002). Evidence for the biosynthesis of DHEA from Cholesterol by first-trimester human placental tissue: Source of Androgens. *Horm. Metab. Res.* 34:116-120.

LORENCE, W. C., MURRY, B. A., TRANT J. M. AND MASON, J. I. (1990). Human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5-4 isomerase from placenta: Expression in nonsteroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/ isomerization of C21 and C19 steroids. *Endocrinology* 126:2493-2498.

LÖSEL, R. AND WEHLING, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature* 4:46-56.

McEWEN E. G. AND KURZMAN, I. D. (1991). Obesity in the dog: role of the adrenal steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *J. Nutr.* 121:S51-S55.

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

MAHENDROO, M. S., CALA, K. M. AND RUSSELL, D. W. (1996). 5 α -Reduced androgens play a key role in Murine parturition. *Mol. Endocrinol.* 10:380-392.

- MAHENDROO, M. S., CALA, K. M., LANDRUM, CH. P. AND RUSSELL, D. W. (1997). Fetal death in mice lacking 5 α -Reductase type 1 caused by estrogen excess. *Mol. Endocrinol.* 11 (7):917-927.
- MANABE, A., HATA, T., YANAGIHARA, T., HASHIMOTO, M., YAMADA, Y. AND IRIKOMAS, S. (1999). Nitric oxide synthesis is increased after dehydroepiandrosterone sulphate administration in term in term human pregnancy. *Hum. Reprod.* 14:2116-2119.
- MANCUSO, S., BENAGIANO, G., DELL'ACQUA, S., SHAPIRO, M., WIQVIST, N. AND DICZFALUSY, E. (1968). Studies on the metabolism of C-19 steroids in the human foeto-placental unit. 4. Aromatisation and hydroxylation products formed by previable foetuses perfused with androstenedione and testosterone. *Acta Endocrinol.* 57:208-227.
- MARKS, P. A. AND BANKS, J. A. (1960). Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 46:447-452.
- MARSHALL, J. AND CSAPO, A. (1961). Hormonal and ionic influences on the membrane activity of uterine smooth muscle. *Endocrinology* 68:1026-1035.
- MARTÍNEZ, F., ESPINOSA-GARCÍA, M. A. T., GARCÍA, C., MALDONADO, G., MILÁN, R., URIBE, A. AND FLORES-HERRERA, O. (2001). Metabolismo energético y esteroideogénico de la placenta humana. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 44 (5):201-206.
- MASON, J. I. (1993). The 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene family of enzymes. *Trends Endocrinol. Metab.* 4:199-202.
- MATHUR, R. S., LANDGREBE, S., MOODY, L. O., POWELL, S. AND WILLIAMSON, H. O. (1980). Plasma steroid concentrations in maternal and umbilical circulation after spontaneous onset of Labor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:1235-1238.
- MATSUI, M. AND HAKAZAKI, M. (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 KINUYAMA, Y. (1977). Variations in biliary metabolites of androsterona in female rats. *J. Steroid. Biochem.* 8 (4):319-322.
- MELLON, S. H. (1994). Neurosteroids: biochemistry, modes of action, and clinical relevance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78 (5):1003-1008.
- MENDOCA, B. B., ARNHOLD, I. J. P., BLOISE, W., ANDERSSON, S., RUSSELL, D. W. AND WILSON, J. D. (1999). 17 β -hidroxysteroid dehidrogenase 3 deficiency in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (2):802-804.
- MILLER, W. L. (1998). Steroid hormone biosynthesis and actions in the materno-feto-placental unit. *Clin. Perinatol.* 25:799-817.

- MILLER, K. K. (2001). Androgen deficiency in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:2395-2401.
- MIZUNO, M., LOBOTSKY, J., LLOYD, C. W., KOBAYASHI, T. AND MURASAWA, Y. (1968). Plasma androstenedione and testosterone during pregnancy and in the newborn. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 28:1133-1142.
- MONDER, C. AND WHITE, P. C. (1993). 11 β -hidroxysteroid dehydrogenase. *Vitam. Horm.* 47:187-271.
- MOORE, R. J., GAZAK, J. M., QUEBBEMAN, J. F. AND WILSON, J. D. (1979). Concentration of dihydrotestosterone and 3 α -androstane diol in naturally occurring and androgen-induced prostatic hyperplasia in the dog. *J. Clin. Invest.* 64 (4):1003-1010.
- MORALES, A. J., NOLAN, J. J., NELSON, J. C. AND YEN, S. S. C. (1994). Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78:1360-1367.
- MORATO, C. T. Y FLORES, L. F. (1990). Testículo. En: *Fundamentos de endocrinología*. Malacara, J.M., Viveros, M. G. (eds). Salvat., México, D. F. 311-362.
- NAVARRETE, 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.
- NESTLER, J. E., CLORE, J. N. AND BLACKWARD, W. G. (1992). Dehydroepiandrosterone: the "missing link" between hyperinsulinemia and atherosclerosis. *FASEB. J.* 6:3073-3075.
- NEWBY, D., AITKEN, D. A., HOWATSON, A. G. AND CONNOR, J. M. (2000). Placental synthesis of oestriol in Down's syndrome pregnancies. *Placenta* 21:263-267.
- NOTELOVITZ, M. (2002). Androgen effects on bone and muscle. *Fertil. Steril.* 77 (4) Suppl 4:S34-S40.
- OLSON, D. M., SKINNER, K. AND CHALLIS, J. R. (1983). Estradiol-17 β and 2-hydroxyestradiol-17 β -induced differential production of prostaglandins by cells dispersed from human intrauterine tissues at parturition. *Prostaglandins* 25:639-651.
- ORENTREICH, N. (1984). Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 59:551-555.
- PANG, S. (1998). The molecular and clinical spectrum of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase deficiency disorder. *Trends Endocrinol. Metab.* 9 (2):82-86.
- PARSONS, I. C. (1970). The metabolism of testosterone by early chick embryonic blastoderm. *Steroids* 16 (1):59-65.

PAYNE, A. H., ABBASZADE, I. G., CLARKE, T. R., BAIN, P. A. AND PARK, CHANG-HYUN, J. (1997). The multiple murine 3β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms: structure, function, and tissue and developmentally specific expression. *Steroids* 62:169-175.

PENNING, T. M., BURCZYNSKY, M. E., JEZ, J. M., HUNG, CHIEN-FUT., LIN HSEUH-KUNG, MA H., MOORE, M., PALACKAL, N. AND RATNAM, K. (2000). Human 3α -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem. J.* 351:67-77.

PENNING, T. M., MA, H. AND JEZ, J. M. (2001). Engineering steroid hormone specificity into aldo-keto reductases. *Chem-Biol. Interact.* 130-132:659-671.

PENNING, T. M., YI J., HEREDIA, V. V. AND LEWIS, M. (2003). Structure-function relationships in 3α -hydroxysteroid dehydrogenases: a comparison of the rat and human isoforms. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 85:247-255.

PEPE, G. J. AND ALBRECHT, E. D. (1995). Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocrine. Rev.* 16 (5):608-648.

PÉREZ-PALACIOS, G., PÉREZ, A. E. AND JAFFE R. B. (1968). Conversion of Pregnenolone- 7α ,- $3H$ -sulfate to other Δ^5 - 3β -hydroxysteroid sulfates by the human fetal adrenal *in vitro*. *J. Clin. Endocr.* 28:19-25.

PERUSQUÍA, M., GARCÍA-YAÑEZ, E., IBÁÑEZ, R. AND 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.* 47:1547-1553.

PERUSQUÍA, M. AND CAMPOS, G. (1991). Inhibitory effect of androgens and progestins on the contraction induced by oxytocin in the rat myometrium. *Med. Şci. 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_2 and $F_{2\alpha}$ and its antagonism with natural progestins. *Prostaglandins* 43 (5):445-455.

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., MORALES, M. A., CAMPOS, M. G. 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., HERNÁNDEZ, R., JASSO-KAMEL, J. AND RODRÍGUEZ-RÁBAGO, 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 Ca²⁺ channels in the vasodilating effect of 5 β -dihydrotestosterone in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 371 (2-3):173-182.

PERUSQUÍA, M. (2001). Nongenomic action of steroids in myometrial contractility. *Endocrine* 15 (1):63-72.

PERUSQUÍA, M. AND JASSO-KAMEL. (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. (2003). Androgen-induced vasorelaxation: a potential vascular protective effect. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 111:55-59.

PERUSQUÍA, M., VILLALÓN, C. M., NAVARRETE, E, GARCIA, G. A., PEREZ-PALACIOS, G. AND LEMUS, A. E. (2003). Vasodilating effect of norethisterone and its 5 α -metabolites: a novel nongenomic action. *Eur. J. pharmacol.* 15; 475 (1-3):161-169.

PERUSQUIA, M. AND CALIXTO, E. (2003). Nongenomic action of dehydroepiandrosterone on vascular tone and uterine contractility. In: *Recent Research Development in Life Sciences.* A. Gayathri (ed). Research Signpost, India. 1:143-152.

PETROCELLI, T. AND LYE, S. J. (1993). Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology* 133:284-290.

PHILLIPS, G. H. (1975). Structure-activity relationships in steroidal anaesthetics. *J. Steroid. Biochem.* 6:607-613.

PIETRAS, R. J. AND SZEGO, C. M. (1975). Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature* 253:357-359.

PIETRAS, R. J., NEMERE, I. AND SZEGO, C. M. (2001). Steroid hormone receptors in target cell membranes. *Endocrine* 14 (3):417-427.

PION, R., JAFFE, R., ERIKSSON, G., WIQVIST, N. AND DICZFALUSY, E. (1965). Studies on the metabolism of C-21 steroids in the human foetoplacental unit. I. Formation of α,β -unsaturated 3-ketones in midterm placentas perfused *in situ* with pregnenolone and 17 α -hydroxy-pregnenolone. *Acta Endocr. (Kbh)* 48:234-238.

- PORSOVA-DUTOIT, I., SULCOVA, J. AND STARKA, L. (2000). Do DHEA/DHEAS play a protective role in coronary heart disease?. *Physiol. Res.* 49 Suppl 1:S43-S56.
- PUROHIT, A. AND OAKEY, R. E. (1989). Evidence for separate sites for aromatisation of androstenedione in human placental microsomes. *J. Steroid. Biochem.* 33 (3):439-448.
- RAINEY, W. E., CARR, B. R., SASANO, H., SUZUKI, T. AND MASON, J. I. (2002). Dissecting human adrenal androgen production. *Trends Endocrinol. Metab.* 13 (6):234-239.
- RIVAROLA, M. A., FOREST, M. G. AND MIGEON, C. J. (1968). Testosterone, androstenedione and dehydroepiandrosterone in plasma during pregnancy and at delivery: concentration and protein binding. *J. Clin. Endocr.* 28:34-40.
- ROBSON, J. M. (1937). Reactions of the uterine muscle and endometrium of the rabbit to testosterone. *Quart. J. Exp. Physiol.* 26:355-363.
- ROGOL, A. D. (2002). Androgens and puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* 198:25-29.
- ROSANO, G. M. C., LEONARDO, F., PAGNOTTA, P., PELLICCIA, F., PANINA, G., CERQUETANI, E., DELLA MONICA, P., BONFIGLI, B., VOLPE, M. AND CHIERCHIA, S. (1999). Acute anti-ischemic effects of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation* 99:1666-1670.
- ROSE, L. I., REDDY, V. V. AND BIONDI, R. (1978). Reduction of testosterone to 5 α -dihydrotestosterone by human and rat uterine tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 46 (5):766-769.
- ROSHAN, S., NADER, S. AND ORLANDER, P. (1999). Review: Ageing and hormones. *Eur. J. Clin. Invest.* 29 (3):210-213.
- RUPPRECHT, R., HAUSER, CH. A., TRAPP, T. AND HOLSBOER, F. (1996). Neurosteroids: Molecular mechanisms of action and psychopharmacological significance. *J. Steroid. Biochem. Biol.* 56 (1-6):163-168.
- RUSSELL, D. W. AND WILSON, J. D. (1994). Steroid 5 α -reductase two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 63:25-61.
- SAEZ, J. M., FOREST, M. G., MORERA, A. M. AND BERTRAND, J. (1972). Metabolic clearance rate and blood production rate of testosterone and dihydrotestosterone in normal subjects during pregnancy and in hyperthyroidism. *J. Clin. Invest.* 51:1226-1234.
- SANBORN, B. M. (2000). Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 7:4-11.
- SANBORN, B. M. (2001). Hormones and calcium: mechanisms controlling uterine smooth muscle contractile activity. *Exp. Physiol.* 86 (2):223-237.

SÁNCHEZ-APARICIO, J. A., GUTIERREZ, M., HIDALGO, A. AND CANTABRANA, B. (1993). Effects of androgens on isolated rat uterus. *Life Sci.* 53 (3):269-274.

SCHWARTZ, A. G., HARD, G. C., PASHKO, L. L., ABOU, G. M. AND ANDSWERN, D. (1981). Dehydroepiandrosterone: An anti-obesity and anti-carcinogenic agent. *Nutr. Cancer.* 3:46-53.

SCHWARTZ, A. G., PASHKO, L. AND WHITCOMB, J. M. (1986). Inhibition of tumor development by dehydroepiandrosterone and related steroids. *Toxicol. Pathol.* 14:357-362.

SCHWARTZ, A. G. AND PASHKO, L. L. (1995). Mechanism of cancer preventive action of DHEA. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Ann. NY. Acad. Sci.* 180-186.

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

SELYE, H. (1941). Anaesthetic effect of steroids hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 46:116-121.

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

SIITERI, P. K. AND MACDONALD, P. C. (1966). Placental estrogen biosynthesis during human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 26:751-761.

SILER-KHODR, T. M., KANG, I. S. AND KOONG, M. K. (1996). Dose-related action of estradiol on placental prostanoid production. *Prostaglandins* 51:387-401.

SIMPSON, E. R. (1979). Cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450, and the control of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 13:213-218.

SIMPSON, E. R. (2002). Aromatization of androgens in women: current concepts and findings. *Fertil. Steril.* 77 (4) Suppl. 4:S6-S10.

SOURLA, A., FLAMAND, M., BÉLANGER, A. AND LABRIE, F. (1998). Effect of dehydroepiandrosterone on vaginal and uterine histomorphology in the rat. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 66 (3):137-149.

STANCZYK, F. Z., MATTERI, R. K., KAUFMAN, F. R., GENTZSCHEIN, E. AND LOBO, R. A. (1990). Androstenedione is an important precursor of dihydrotestosterone in the genital skin of women and is metabolized via 5 α -androstenedione. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 37 (1):129-132.

STOFFEL-WAGNER, B. (2001). Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur. J. Endocrinol.* 145:669-679.

SUITTERS, A. J., SHAW, S., WALES, M. R., PORTER, J. R., LEONARD, J., WOODGER, R., BRAND, H., BODMER, M. AND FOULKES, R. (1997). Immune enhancing effects of dehydroepiandrosterone sulphate and the role of steroid sulphatase. *Immunology*. 91:314-321.

SULCOVA, J., CAPKOVA, A. AND STARKA, L. (1968). 7-hydroxylation of dehydroepiandrosterone in human foetal liver, adrenals and chorion *in vitro*. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. 59 (1):1-9.

SUZUKI, T., NAKAMURA, Y., MORIYA, T. AND SASANO, H. (2003). Effects of steroid hormones on vascular functions. *Microsc. Res. Tech.* 1; 60 (1):76-84.

TAIEB, J., MATHIAN, B., MILLOT, F., PARICOT, M. C., MATHIEU, E., QUEYREL, N., LACROIX, I., SOMMA-DELPERO. AND BOUDOU, P. (2003). Testosterone measured by 10 immunoassays and by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry in sera from 116 men, women, and children. *Clin. Chem.* 49 (8):1381-1395.

TAKEYAMA, J., SUSUKI, T., HIRASAWA, G., MURAMATSU, Y., NAGURA, H., IINUMA, K., NAKAMURA, J., KIMURA, KEN-ICHI., YOSHIHAMA, M., HARADA, N., ANDERSSON, S. AND SASANO, H. (2000). 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 expression in the human fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85:410-416.

TAYLOR, R. N. AND MARTIN, M. C. (1998). Endocrinología del embarazo. En: *Endocrinología básica y clínica*. Greenspan, F. S., Gardner, D. G. (eds). *El Manual Moderno*. 623-653.

TELEGDY, G., WEEKS, J. W., LERNER, U., STAKEMANN, G. AND DICZFALUSY, E. (1970). Acetate and cholesterol metabolism in the human foeto-placental unit at midgestation. 1. Synthesis of cholesterol. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. 63:91-97.

TENOVER J. S. (1994). Review. Androgen administration to aging men. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 23 (4):877-892.

TENOVER J. L. (1997). Testosterone and the aging male. *J. Androl.* 18 (2):103-106.

TENOVER, J. L. (1999). Testosterone replacement therapy in older adult men. *International J. Androl.* 22:300-306.

THORNTON, S., TERZIDOU, V., CLARK, A. AND BLANKS, A. (1999). Progesterone metabolite and spontaneous myometrial contractions *in vitro*. *Lancet*. 353:1327-1329.

TOLEDO, R., NAVARRETE, E. Y PERUSQUÍA, M. (2002). Modulación del tono vascular producido por los andrógenos y progestinas en la arteria umbilical humana. Presentado en: XXVII Reunion anual de la AIBIR. Sección de carteles pp. 244.

TOLEDO, R., NAVARRETE, E., GONZÁLEZ, L. Y PERUSQUÍA, M. (2003). Caracterización del efecto vasodilatador de progestinas y andrógenos en la arteria umbilical humana *in vitro*. Presentado en: XVIII Reunion anual de la AIBIR. Sección de carteles pp. 217.

TRAISH, A. M., KIM, N., MIN, K., MUNARRIZ, R. AND GOLDSTEIN, IRWIN. (2002). Role of androgens in female genital sexual arousal: receptor expression structure, and function. *Fertil. Steril.* 77 (4) Suppl. 4:S11-S18.

TRIVEDI, D. P. AND KHAW, K. T. (2001). Dehydroepiandrosterone sulfate and mortality in elderly men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (9):4171-4177.

TROISI, R., POTISCHMAN, N., ROBERTS, J. M., HARGER, G., MARKOVIC, N., COLE, B., LYKINS, D., SIITERI, P. AND HOOVER, R. N. (2003). Correlation of serum hormone concentrations in maternal and umbilical cord samples. *Cancer Epidemiology, Biomarkers. Prev.* 12:452-456.

TSUTSUI, K., UKENA, K., TAKASE, M., KOHCHI, CH. AND LEA, R. W. (1999). Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 124:121-129.

VERMEULEN, A. (1991). Clinical review 24: Androgens in the aging male. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73:221-224.

WALSH P. C. AND WILSON, J. D. (1976). The induction of prostatic hypertrophy in the dog with androstanediol. *J. Clin. Invest.* 57 (4):1093-1097.

WEBB, C., MCNEIL, J., HAYWARD, C. S., ZEIGLER, D. AND COLLINS, P. (1999). Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation* 100:1690-1696.

WEISS, G. (2000). Endocrinology of Parturition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85 (12): 4421-4425.

WILSON, J. D., GRIFFIN, J. E. AND RUSSELL, D. W. (1993). Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocr. Rev.* 14 (5):577-593.

WILSON, J. D. (1999). The role of androgens in male gender role behavior. *Endocr. Rev.* 20:726-737.

WRAY, S. (1993). Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol)* 264:C1-C18.

YAMAMOTO, T. (1995). Effects of estrogens on Ca channels in miometrial cells isolated from pregnant rats. *Am. J. Physiol.* 268:C64-C69.

ZERVOU, S., KARTERIS, E., HILLHOUSE, E. W. AND OLD, R. W. (2002). Steroid mediate the expression of cytoplasmic and membrane-linked components in human myometrial cells. *8 (7):597-605.*