

Tesis de Posgrado

Influencia de antiinflamatorios esteroides sobre la motilidad de la musculatura lisa del aparato reproductor femenino : Interrelaciones con la síntesis de prostaglandinas

Bonacossa, Amalia

1980

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Bonacossa, Amalia. (1980). Influencia de antiinflamatorios esteroides sobre la motilidad de la musculatura lisa del aparato reproductor femenino : Interrelaciones con la síntesis de prostaglandinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1669_Bonacossa.pdf

Cita tipo Chicago:

Bonacossa, Amalia. "Influencia de antiinflamatorios esteroides sobre la motilidad de la musculatura lisa del aparato reproductor femenino : Interrelaciones con la síntesis de prostaglandinas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1669_Bonacossa.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

TESIS DOCTORAL

Influencia de
Antiinflamatorios esteroides sobre la motilidad de la musculatura
lisa del aparato reproductor femenino. Interrelaciones con la síntesis
de prostaglandinas.

Autor: Lic. Amalia Bonacossa

Directora de tesis: Dra. Martha A. F. de Gimeno

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
(UBA)

- . 1980 . -

Tesis.
1669
ej. 3.

La investigación es una
aventura y una maravilla: una aventura
para quien gusta de explorar; una
maravilla para quien gusta de observar.

A mi familia.

A mi segunda familia.

AGRADECIMIENTOS

A Carlos E. Valenti, por haber sido como fue.

Al CONICET, por otorgarme las becas que me permitieron entrar en contacto con la investigación.

Al CEFAPRIN, que me proporcionó los medios necesarios para llevar a cabo esta tesis.

A la Dra. Martha A. F. de Gimeno, por su permanente guía y ayuda al dirigirme en la elaboración de la misma.

A los Dres. Leonor y Enri Borda, por sus consejos y apoyo.

A todos mis compañeros de la División Farmacología de la Reproducción, quienes de una u otra manera me ayudaron a realizarla.

INDICE

CAPITULO I. INTRODUCCION.

1.- Utero de rata.

1.1.- Características del útero de rata.....	1
1.1.1.- Anatomía.....	1
1.1.2.- Histología.....	2
1.1.3.- Fisiología.....	4
1.2.- Efecto de la castración y restitución hormonal.....	6
1.2.1.- Aspectos bioquímicos.....	6
1.2.2.- Aspectos funcionales.....	8

2.- Prostaglandinas.

2.1.- Introducción.....	10
2.2.- Estructura química.....	11
2.3.- Síntesis.....	14
2.4.- Metabolismo.....	18
2.5.- Actividad fisiológica de las prostaglandinas.....	20
2.5.1.- Receptores para prostaglandinas.....	20
2.5.2.- Actividad biológica de las prostaglandinas.....	20
2.5.2.1.- Prostaglandinas como mensajeros intracelulares.....	21
2.5.2.2.- Prostaglandinas como hormonas locales.....	22
2.5.2.3.- Prostaglandinas como hormonas clásicas.....	22
2.5.3.- Influencia de las prostaglandinas sobre la actividad espontánea del músculo liso.....	23
2.5.3.1.- Sistema cardiovascular.....	23
2.5.3.2.- Sistema digestivo.....	24
2.5.3.3.- Sistema reproductor femenino.....	24
2.5.4.- Principales mecanismos reguladores de la transmisión adrenérgica e influencia de las prostaglandinas.....	25

3.- Glucocorticoides.

3.1.- Introducción.....	27
3.2.- Estructura química.....	27
3.3.- Síntesis.....	31

3.3.1.- Unión proteica de hormonas adrenocorticales.....	35
3.4.- Mecanismo de acción de los glucocorticoides.....	36
3.4.1.- Acción sobre la membrana celular.....	36
3.4.2.- Receptores para glucocorticoides.....	36
3.4.3.- Glucocorticoides y AMP _c	37
3.5.- Metabolismo de los glucocorticoides.....	37
3.6.- Efectos biológicos de los glucocorticoides.....	39
3.6.1.- Generalidades.....	39
3.6.2.- Relación con las prostaglandinas.....	40

CAPITULO II. MATERIAL Y METODOS.

1.- Animal utilizado.....	44
2.- Preparación tisular.....	44
3.- Instrumental y equipos utilizados.....	45
4.- Composición de la solución de perfusión tisular.....	47
5.- Procedimiento experimental.....	47
6.- Dosaje de prostaglandinas.....	49
7.- Compuestos químicos utilizados.....	50
8.- Método estadístico.....	52

CAPITULO III. RESULTADOS.

1.- <u>Características contráctiles, y respuestas fisiológicas y farmacológicas del útero aislado de rata ovariectomizada de 20 días.</u>	
1.1.- Actividad espontánea.....	53
1.2.- Influencia del solvente sobre la actividad espontánea del útero.....	53
1.2.1.- Efecto del etanol.....	
1.3.- Influencia de los corticoides sobre la actividad espontánea del útero.....	56
1.3.1.- Efecto de corticosterona.....	56
1.3.2.- Efecto de hidrocortisone.....	58
1.4.- Influencia de los ácidos grasos sobre la actividad espontánea	

del útero.....	58
1.4.1.- Efecto de ácido araquidónico y araquidonato de sodio.	61
1.4.2.- Efecto de ácido linoleico.....	61
1.4.3.- Efecto de ácido γ -linolénico.....	65
1.5.- Influencia de la corticosterona sobre la actividad espontánea del útero preincubado con ácidos grasos.....	65
1.5.1.- Efecto de ácido araquidónico y araquidonato de sodio.	65
1.5.2.- Efecto de ácido linoleico.....	66
1.5.3.- Efecto de ácido δ -linolénico.....	66
1.6.- Modificaciones inducidas por el bloqueo β -adrenérgico en la actividad espontánea del útero.....	71
1.6.1.- Efecto de Sotalol.....	71
1.6.2.- Efecto de la corticosterona sobre la actividad espontánea del útero preincubado con Sotalol.....	71
1.7.- Influencia de los inhibidores de síntesis de prostaglandinas sobre la actividad espontánea del útero.....	75
1.7.1.- Efecto de indometacina y ácido acetil salicílico.....	75
1.8.- Influencia de prostaglandinas y sus metabolitos en el desarrollo de tensión contráctil por el útero.....	77
1.8.1.- Efecto de PGE ₂ , PGF _{2α} , PGD ₂ y PGI ₂	77
1.8.2.- Efecto de los metabolitos de las PGF _{2α} y PGI ₂	77
2.- <u>Relación entre la actividad espontánea del útero aislado de rata ovariectomizada de 20 días y la liberación de prostaglandinas al medio de incubación.</u>	
2.1.- Influencia de la corticosterona.....	80

CAPITULO IV.

Discusión.....	82
----------------	----

CAPITULO V.

Conclusiones.....	99
Resumen.....	101
Summary.....	103
Referencias bibliográficas.....	105

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.- Utero de rata.

1.1.- Características del útero de rata.

1.1.1.- Anatomía.

En los mamíferos se han identificado diferentes tipos de útero: el bipartito, que se encuentra en ciertos carnívoros; el simplex, característico de los primates; el bicorne, presente en la mayoría de los insectívoros y primates; y el duplex, encontrado en los roedores (140).

Neil y Rand (140) ubican el útero de rata dentro de esta última categoría. Por su parte, Grassé (80) lo considera una subclase de útero bicorne.

El aparato reproductor de la rata se caracteriza por presentar trompas y úteros dobles. Los dos cuernos uterinos desembocan por sendos conductos cervicales (cuellos) en el extremo superior de la vagina, que es única. Cada trompa u oviducto relaciona el cuerno uterino con el ovario (80,92,140)

En el útero de rata el componente nervioso simpático está representado por fibras nerviosas post-sinápticas del plexo hipogástrico, y el componente parasimpático por las provenientes del plexo sacro. Los dos plexos convergen en la región paracervical del útero, formando el ganglio de Frankenhauer (113, 139).

Por estudios histoquímicos se ha determinado que en el útero hay 2 clases de fibras nerviosas: colinérgicas (43) y adrenérgicas (104), encontrándose ambos tipos alrededor de los vasos sanguíneos y en pleno miometrio. Adam y Schenk (3) encontraron mayor inervación colinérgica en el cervix que en el cuerpo uterino de rata, mientras que la inervación adrenérgica fue localizada en los plexos nerviosos perivasculares, muy escasa en los plexos extravasculares, y preferencialmente en la región cervical.

1.1.2.- Histología.

El útero es un órgano hueco, constituido por 3 capas de tejido diferente: la externa o serosa; la media, muscular, denominada miometrio; y la interna, conocida como mucosa o endometrio (86).

La serosa es en realidad la cubierta peritoneal del órgano. Está formada por una sola capa de células mesoteliales sostenidas por tejido conectivo. A cada lado del órgano se continúa con el peritoneo del ligamento ancho (86).

La capa media o miometrio está constituida por músculo liso. El músculo liso está formado por células musculares denominadas fibras. Las fibras musculares lisas son de forma alargada, con extremos afilados, y en su citoplasma se encuentran 2 elementos principales: las miofibrillas y el sarcoplasma (86). Las miofibrillas son estructuras filiformes que se disponen longitudinalmente en la fibra. Estas miofibrillas están incluidas en el constituyente más líquido del citoplasma, denominado sarcoplasma y sólo se observan con microscopio electrónico (86).

En la parte más ancha de la fibra muscular, en posición algo excéntrica, se encuentra el núcleo.

En el miometrio se distingue una capa longitudinal externa de músculo liso, y una circular interna. Entre ambas se presenta un tejido conectivo laxo, muy irrigado, con vasos sanguíneos y linfáticos.

La concentración de actomiosina en el músculo liso uterino de rata y coneja es mucho más baja que en el músculo esquelético de estos mismos animales. Así, el músculo uterino de coneja contiene 6 a 10 mg de actomiosina por gramo de peso húmedo, comparativamente menor que los 70 mg descritos en el músculo esquelético del mismo animal (141).

El endometrio está formado por epitelio cilíndrico simple, y un corion o lámina propia que contiene glándulas tubulares, más o menos ramificadas, cuyos conductos se abren en la luz uterina (86).

El ciclo estral de la rata se caracteriza por tener 4 días, durante los cuales se producen variaciones de los niveles hormonales (142). Estos son acompañados por cambios histológicos paralelos en el endometrio y la

vagina.

Durante el proestro y estro (días 1 y 2) los vasos uterinos están congestionados; los cuernos se presentan distendidos por líquido; el epitelio endometrial es cilíndrico bajo con membrana basal diferenciada; las mitosis son numerosas; las glándulas funcionan activamente y sus conductos están distendidos. En el metaestro (día 3) (fase de regresión), el diámetro de los cuernos se reduce; el epitelio toma aspecto de pseudoestratificado, con límites celulares poco visibles, y masivamente infiltrado de leucocitos; la membrana basal desaparece; las glándulas uterinas entran en reposo. Durante el diestro (día 4) (fase de reposo), la luz uterina es estrecha, el epitelio es cúbico simple, no hay membrana basal y está infiltrado de leucocitos (80).

La vagina está constituida por una mucosa que consta de un epitelio pavimentoso estratificado, sin glándulas, y una lámina propia formada esencialmente por fibras conjuntivas, rica en capilares. La pared vaginal está formada por fibras musculares lisas, en disposición circular y longitudinal, mezcladas con tejido conjuntivo y fibras elásticas.

Durante el ciclo estrol, el epitelio vaginal sufre modificaciones. Es así que en el proestro, el epitelio prolifera; presenta una membrana basal y una docena de capas epiteliales; las superficiales aún no están queratinizadas; el epitelio está desprovisto de leucocitos. En el estro el epitelio vaginal es espeso; las capas superficiales están queratinizadas y se descaman abundantemente en la luz vaginal; las mitosis son frecuentes en la capa germinativa. Al comenzar el metaestro se detiene la proliferación celular en las capas germinativas. La parte superficial queratinizada se descamó por completo. Durante la segunda parte del metaestro, el epitelio vaginal es invadido en forma masiva por leucocitos. Las capas superficiales caen en la luz vaginal y el espesor del epitelio se reduce considerablemente, volviendo a la condición de reposo o diestro. En esta etapa las paredes de la vagina son delgadas; el epitelio es estratificado, con 3 a 6 hileras de células. Las capas superficiales no están queratinizadas y se las encuentra infiltradas de leucocitos. No hay mitosis (80).

Long y Evans (29) caracterizaron las distintas fases del ciclo estral de acuerdo al tipo de células presentes en el extendido vaginal. Así, en el proestro o día 1, el extendido vaginal sólo consta de células epiteliales no queratinizadas. En el estro, día 2, que corresponde a la ovulación, se observan células epiteliales queratinizadas. En el metaestro, día 3, el extendido presenta células epiteliales queratinizadas, no-queratinizadas y leucocitos. En el diestro o día 4, se observan células epiteliales no-queratinizadas y leucocitos.

1.1.3.- Fisiología.

Fue Bozler quien en 1941 clasificó los músculos lisos viscerales, según sus propiedades electrofisiológicas, en 2 categorías. De acuerdo a su dependencia de la inervación extrínseca y a su habilidad para responder de manera "todo o nada" a distintos estímulos (27) denominó "unitarios" a los que se caracterizan por poseer actividad espontánea que se inicia en determinadas zonas del tejido, que se llamó "marcapaso"; y "multiunitarios" a los que no poseen contracciones espontáneas y sólo son activados por el nervio motor extrínseco, caracterizados además porque sus fibras parecen estar organizadas en unidades motoras (54, 55).

El miometrio pertenece a la primer categoría, y en ella las contracciones no son necesariamente iniciadas por el impulso nervioso, pero pueden ser coordinadas y reguladas por mediación nerviosa. Otra propiedad de estos músculos lisos es su habilidad para responder al estiramiento, desarrollando una importante tensión activa (29, 36).

Los estudios de Bozler señalan que las contracciones rítmicas y espontáneas del músculo liso se inician y mantienen por medio de descargas periódicas (potenciales de acción) que nacen en las mismas células musculares (26, 28, 102).

La frecuencia, amplitud y duración de las contracciones están gobernadas por la frecuencia con que se descargan dichos potenciales de acción, por la duración de la serie de los potenciales de acción originados en la célula muscular y por el número total de células estimuladas y sincrónicamente activas. La descarga rítmica de los potenciales de acción per-

siste tanto en presencia de agentes bloqueantes nerviosos como con bloqueantes ganglionares, lo que sugiere que es de naturaleza miogénica (25, 99).

A diferencia del cardíaco, el marcapaso uterino no está restringido a una zona específica del músculo, sino que se origina aparentemente en todo el tejido. Todas las células del útero son capaces de tener actividad de marcapaso, pero sólo pueden generar potenciales de acción aquéllas cuya excitabilidad es elevada (132).

La transmisión intercelular del potencial de acción originado dentro del área marcapaso es eléctrica, y depende de la presencia de uniones estrechas entre las células musculares lisas (86).

El umbral de estimulación eléctrico para la generación de potenciales de acción en el miometrio fue directamente relacionado con la contractilidad. Caspo (44) determinó que los estrógenos disminuían el umbral del potencial de acción del sarcolema, en tanto que la progesterona lo aumentaba. Además, el miometrio dominado por progesterona y el preñado estaban hiperpolarizados comparados con el dominado por estrógenos (35, 117, 183). Se determinó una mayor densidad de regiones marcapaso en el útero estrogeneizado que en el dominado por progesterona (46, 132).

Distintos autores observaron que la inyección de estrógenos producía un aumento de actividad contráctil espontánea del útero de rata ovariectomizada (12). Del mismo modo, la fístula uterina de conejo en estro presentaba una marcada actividad motora, a diferencia de las castradas, en las que la actividad era irregular y débil (159).

Sin embargo, Gimeno y col. demostraron que la actividad contráctil espontánea del útero de rata en estro tenía una actividad menor que la observada en las ovariectomizadas (71,73). De igual modo, la inyección de dosis altas de 17β -estradiol a ratas castradas producía una significativa disminución de la actividad contráctil, y se consideró la posibilidad de alguna interrelación entre las prostaglandinas y las hormonas sexuales, ya que se la encontró en extractos de cuernos uterinos de ratas ovariectomizadas pero no en las inyectadas o en estro natural (127). Más tarde, frente a nuevos análisis de prostaglandinas uterinas, se pensó en una mayor influencia de las PGE respecto de las PGF en el control de la

actividad uterina (78).

1.2.- Efecto de la castración y restitución hormonal.

1.2.1.- Aspectos bioquímicos.

Se ha visto que 4 a 6 horas luego de una única inyección de estradiol a ratas adultas ovariectomizadas se produce un aumento en el contenido de agua del útero y un segundo incremento a las 20 horas de la misma. El peso uterino total resulta ser el mismo en las dos circunstancias, pero se atribuye el primer aumento a una imbibición acuosa pura, en tanto que el de las 20 horas se asocia con una elevación significativa de sustancia protoplasmática, existiendo evidencias de proliferación celular (182).

Mueller y col. (137) mostraron que el contenido de RNA del útero de rata cae a niveles muy bajos luego de la ovariectomía, y éstos son rápidamente restaurados con estradiol.

Se ha observado que por efecto de la ovariectomía disminuye el contenido de actomiosina, llegando a valores mínimos 2 semanas después de la castración. Así también, la actividad ATPásica está notablemente disminuida (45).

Las determinaciones llevadas a cabo por Khayyal y col.(110) mostraron que el útero de ratón y rata muestra variaciones cíclicas en el consumo de oxígeno por unidad de peso, permaneciendo uniforme durante gran parte del ciclo pero aumentando al doble en la última parte del diestro.

Por el contrario, en el caso de animales ovariectomizados, los valores del consumo de oxígeno no presentaron variaciones cíclicas y fueron comparables a los obtenidos durante el estro y diestro temprano.

Kerly (108) observó que la estrona inyectada a ratas castradas producía un neto aumento del consumo de oxígeno a las 36 horas. Carroll, por su parte (39), demostró que la inyección de estradiol aumentaba prácticamente al doble el consumo de oxígeno del útero de ratas castradas.

La inyección de estrógenos a ratas ovariectomizadas estimula el depósito de glucógeno uterino, mientras que la progesterona carecía de tal influencia (23). Se ha estudiado igualmente la variación que sufre el glucógeno del útero de rata entre los 5 y 9 días después de la castración,

así como los efectos de la inyección de 2,5 μ g de estradiol (196). Se vio en estas condiciones que a las 16 horas de practicada la inyección de estrógenos el glucógeno uterino aumentaba un 224 %. Otros autores (21) observaron que la administración de 1 μ g de estradiol en ratas con 6 a 9 días de castración provocaba un aumento de glucógeno uterino 2 a 10 horas luego de la inyección, llegando a un estado de equilibrio entre las 10 y 24 horas, luego de la cual la concentración de glucógeno disminuiría.

Estudios del miometrio aislado de la rata (193) señalan que la utilización de glucosa, que es baja en las ratas castradas, aumenta de 2 a 3 veces después de la administración de estrógenos.

Investigaciones sobre el transporte de glucosa en útero de ratas con 7 a 30 días de castración, utilizando 3-O-metil glucosa comprobaron que la inyección de estrógenos aumentaba el transporte de glucosa hacia el útero entre las 2 y 4 horas que siguen a la inyección, mientras que a las 12 horas de la misma se obtuvieron valores semejantes a los controles.

Con respecto a las influencias hormonales sobre el metabolismo lipídico del músculo uterino, Alden demostró en 1947 (6) que la grasa osmiofílica en el endometrio de la rata presentaba una variación cíclica, la cual estaba relacionada con el ciclo ovárico. Es así que encontró cantidades mínimas de grasa durante el proestro, mientras que las concentraciones más elevadas aparecían en el metaestro. Comprobó también que el tratamiento de animales ovariectomizados con estrógenos y progesterona modificaba la grasa uterina, lo cual indicaba que estas hormonas son responsables principales de los cambios observados en los animales cíclicos (6).

Posteriormente, Davis y Alden (50) observaron, en úteros de ratas vírgenes, que la concentración de grasas neutras era mayor en la fase luteal del ciclo que en la folicular, y que la concentración de grasas neutras en función del peso uterino era mayor en el diestro. Haciendo determinaciones en úteros de ratas con 2 semanas de castración observaron una duplicación de la concentración de grasas neutras con respecto a la determinada en animales intactos, mientras que el tratamiento con estrógenos causaba una significativa reducción de las grasas neutras comparada con

la de los controles. En cambio, la concentración de fosfolípidos (50) fue mayor en la fase folicular que en la fase luteal.

Trabajos realizados por Alden en el año 1947 (6) demostraron que en el caso de la rata, la progesterona por sí sola provocaba la aparición de una gran concentración de grasa basal en el endometrio, sin que para ello se requiriera la acción previa o simultánea de los estrógenos. En este aspecto parece que el endometrio de la rata es diferente al de otras especies.

1.2.2.- Aspectos funcionales.

Reynolds (159,160) había observado que el útero de varias especies animales carecía de actividad espontánea luego de la castración. Harper (92) por su parte, indicó que tal situación se caracterizaba por contracciones uterinas irregulares y de baja amplitud.

Sin embargo, Gimeno y col. (73) demostraron que el útero aislado de ratas multíparas castradas presentaba una clara actividad contráctil espontánea. Observaron así que la estabilidad en el tiempo de la tensión contráctil isométrica y la frecuencia de las contracciones era mayor en tales preparaciones que la presentada por el útero aislado de ratas en estro. Analizaron también dicha actividad luego de distintos períodos de castración, como ser 7, 20 y 60 días, notando que la estabilidad en el tiempo de las contracciones uterinas era mayor a partir de los 20 días post-ovariectomía, respecto de la observada en las ratas sacrificadas a los 7 días post-castración, y comparable a la correspondiente a ratas con 60 días de ovariectomía (71).

Estudios de la actividad contráctil del útero aislado de ratas supra-renaloprivas e hipofisoprivas descartaron la influencia de hormonas adrenales e hipofisarias sobre la mejor actividad contráctil espontánea del útero de ratas castradas comparada con el estro natural (71). Pudo observarse también que la hipofisectomía a ratas castradas no modificaba la estabilidad con el tiempo de la tensión contráctil, por lo cual se consideró como poco probable que los niveles altos de hormonas hipofisarias

fueran la causa de la mayor estabilidad en el tiempo de dicha actividad en el útero aislado de ratas ovariectomizadas (71).

Se analizó también la influencia de los estrógenos sobre la actividad espontánea del útero aislado de ratas ovariectomizadas de 20 días, inyectándoles con 17 β -estradiol (60 $\mu\text{g}/\text{día}/3$ días), observándose que en esas condiciones la actividad contráctil disminuía respecto de la del útero aislado de castradas no-inyectadas, lo cual indicaba que los estrógenos podían de alguna manera, regular dicha actividad (127).

En estudios posteriores, Gimeno y col. (76) demostraron que concentraciones crecientes de polifloretilén-fosfato (PPP), antagonista de prostaglandinas, producen reducciones crecientes de la actividad espontánea del útero aislado de ratas castradas, otorgando un posible papel a las prostaglandinas en este fenómeno. Este hecho fue corroborado años más tarde cuando pudo relacionarse la actividad contráctil del útero aislado de ratas ovariectomizadas de 20 días fundamentalmente con la PGE (78).

El análisis de la influencia del estradiol sobre la motilidad uterina y la liberación de prostaglandinas demostró que la inyección de 17 β -estradiol a ratas ovariectomizadas de 20 días producía un decremento de la actividad contráctil del útero aislado, disminuyendo también la liberación de prostaglandinas tipo E (177).

Con respecto a la medicación adrenérgica en la motilidad uterina, Ahlquist (4) postuló que el útero posee receptores adrenérgicos β -inhibidores y α -estimulantes. Estudios posteriores demostraron que la respuesta del útero de rata a la norepinefrina (NE) parece depender de un balance entre los receptores α - y β -adrenérgicos miometriales, balance que a su vez estaría regulado por las hormonas ováricas (51).

Así por ej., Borda y col. (24) demostraron que diferentes agonistas β -adrenérgicos como isoproterenol, norepinefrina y fenilefrina son capaces de inhibir la contractilidad uterina espontánea. Sin embargo, la sensibilidad del tejido a dichos agentes varía de acuerdo a las condiciones experimentales. El útero aislado de una rata en estro resultó más sensible a la acción depresora de los agentes simpaticomiméticos que el obteni-

do de una rata ovariectomizada de 20 días. Un antagonista β -adrenérgico como el propranolol logró bloquear dicha depresión. Por otra parte, observaron también que el efecto estimulante de un agonista α -adrenérgico puro como la metoxamina fue mayor en el útero aislado de una rata ovariectomizada de 20 días que en el de una rata en estro. La estimulación pudo ser bloqueada con fentolamina (antagonista α -adrenérgico puro).

Este estudio farmacológico (24) indicaría entonces que el útero aislado de una rata en estro es más sensible al efecto depresor de agentes β -adrenérgicos que el útero de rata ovariectomizada, en tanto que en este último caso se observa una mayor sensibilidad a la estimulación producida por un agonista α -adrenérgico que en el estro natural.

Estos resultados corroboran los datos de Krall (112), quien demostró que en el útero aislado de una rata ovariectomizada hay menos receptores β -adrenérgicos que en el de una rata en estro.

2.- Prostaglandinas.

2.1.- Introducción.

En 1930 dos ginecólogos de Nueva York, Kurzrok y Lieb (118) observaron que la instilación de semen en el útero humano podía producir contracciones fuertes o relajación. Independientemente, Goldblatt (79) y von Euler (189) identificaron el principio activo como un compuesto libre de nitrógeno, probablemente no saturado, y que, debido a sus propiedades de solubilidad, posiblemente tenía grupos hidrofílicos. von Euler lo denominó "Prostaglandina", ya que creía que era producido por la próstata, y a pesar de que Eliasson (58) demostró en 1959 que las prostaglandinas se formaban principalmente en la vesícula seminal, quedaron así denominadas en la literatura científica. Fue en 1957 que Bergström y Sjövall lograron aislar un principio activo en forma cristalina a partir de las vesículas seminales de oveja, la prostaglandina F (PGF), y también mencionaron la existencia de por lo menos un factor activo más (19). En poco tiempo, Bergström y sus asociados, especialmente Sjövall y Samuelsson, pudieron iden-

tificar y aislar no menos de 13 compuestos, todos derivados de una sustancia madre denominada ácido prostanoico.

El perfeccionamiento de las técnicas bioquímicas de ensayo permitió determinar que las prostaglandinas (PGs) están ampliamente distribuidas en un gran número de tejidos de mamíferos, como timo (18), cerebro (155), (164), iris (7), fluido menstrual humano (56), etc.; y también hay datos sobre su existencia en tejidos de animales inferiores (41). En la mayoría de los casos se presentan en concentraciones menores (0,5 a 1 μ g/g peso húmedo) que en el fluido seminal humano, la mayor fuente conocida (15).

2.2.- Estructura química.

Las PGs son ácidos grasos no saturados de 20 carbonos que derivan de una sustancia hipotética denominada ácido prostanoico (Fig. 1a)

Cada compuesto tiene un anillo ciclopentano en C₈-C₁₂ y 2 cadenas laterales. La estructura del anillo lleva a un sistema de clasificación de PGs. Hay 6 grupos clásicos que se diferencian sobre la base de los sustituyentes del anillo pentano: A, B, C, D, E, F. Los 2 grupos principales, PGE y PGF, difieren en la presencia de una función cetona o hidroxilo en C₉, y ambos tienen grupos hidroxilos en C₁₁ y C₁₅ (170) (Fig. 1b).

Dentro de dichos grupos se observan distintos grados de insaturación:

- la serie 1, con una doble ligadura en una cadena lateral, deriva del ácido graso esencial dihomogama-linolénico (ácido 8,11,14-eicosatrienoico);
- la serie 2, con 2 dobles ligaduras en la cadena lateral, deriva del ácido graso esencial araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico);
- la serie 3, con 3 dobles ligaduras, se forma a partir del ácido graso no-esencial 5,8,11,14,17-eicosapentenoico (184) (Fig. 1c).

Se han identificado otros 3 grupos:

- endoperóxidos, que tienen 2 átomos de oxígeno que derivan de la misma molécula de oxígeno, unidos a los C₉ y C₁₁ del ciclopentano. El PGH₂ tiene cadenas laterales semejantes a las de las PGs clásicas, mientras que el PGG₂ tiene un oxígeno extra entre el carbono 15 y su grupo hidro-

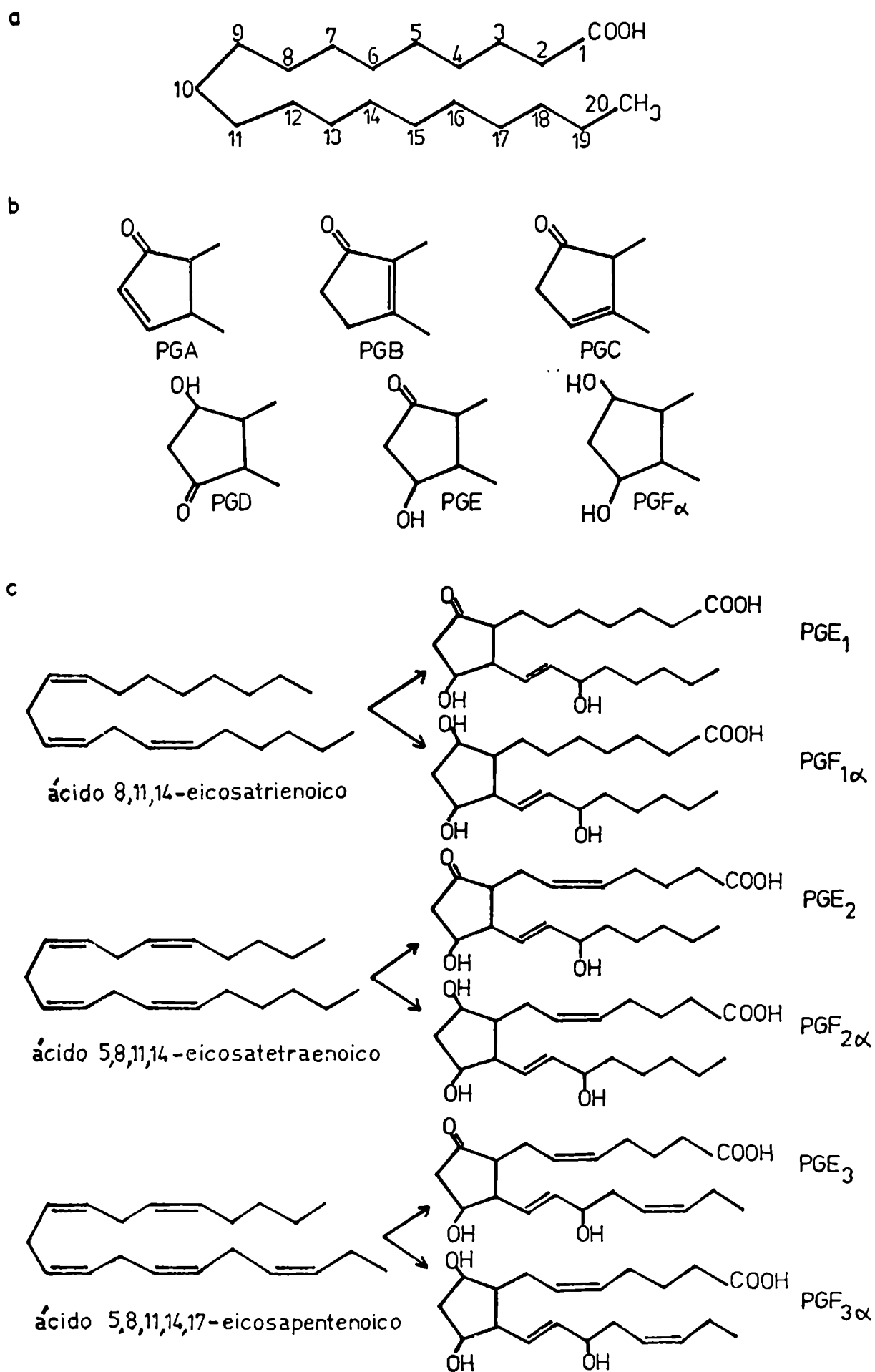


Figura 1. Clasificación de prostaglandinas.

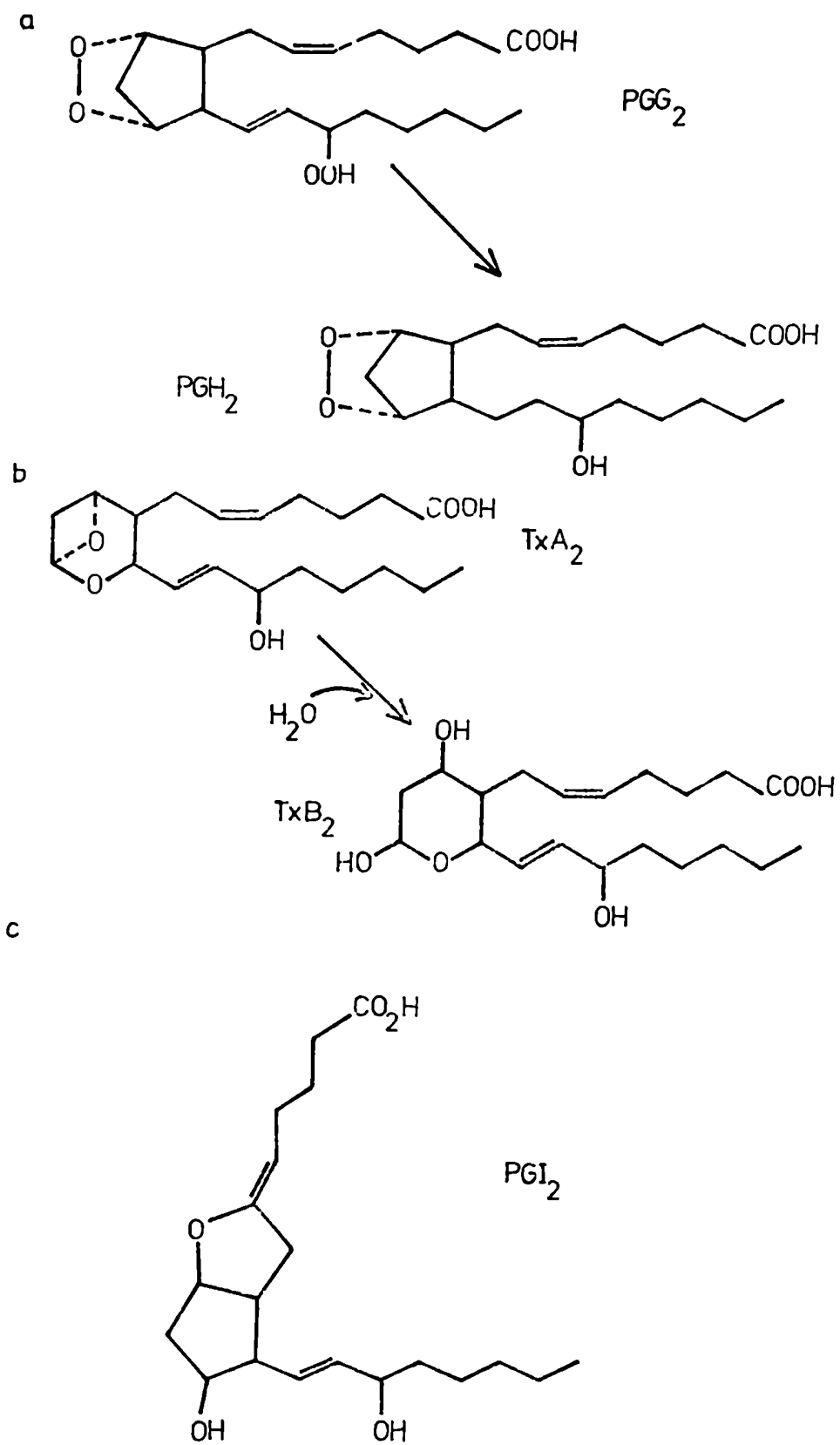


Figura 2. Prostaglandinas inestables.

xilo (Fig. 2a).

- tromboxanos (Tx), descubiertos por Hamberg y col. (90), trabajando con plaquetas humanas. Se forma a partir de ácido araquidónico y es un derivado no prostagléndico con un átomo de oxígeno insertado en el anillo. El intermediario inestable es el TxA_2 y el compuesto estable es el TxB_2 . (Fig. 2b).
- prostaciclina, compuesto en el cual un puente oxígeno une el C_9 del anillo al C_6 de la cadena lateral. Descubierta por Moncada (134) en microsomas preparados a partir de aorta de conejo o cerdo, fue llamada PGX, y más tarde PGI_2 o prostaciclina (154) para seguir el orden alfabético y numérico de nomenclatura. Es una sustancia inestable que inhibe la agregación plaquetaria (por oposición al TxA_2 que es pro-agregante) (Fig. 2c.)

2.3.- Síntesis.

Como las PGs no son almacenadas dentro de las células sino liberadas ante un estímulo (149), su biosíntesis debe preceder en forma inmediata a la liberación.

Poco después de que Bergström y col. aislaron y elucidaron las estructuras de la $\text{PGF}_{1\alpha}$ y PGE_1 , se demostró que el ácido araquidónico era el precursor de la serie 2 de PGs (PGs bis-no-saturadas) (17,184). El ácido araquidónico, junto con sus precursores linoleico y γ -linolénico, son denominados ácidos grasos esenciales. Esa denominación deriva del hecho de que la falta de los mismos en la dieta provoca una enfermedad carencial que manifiesta diversos síntomas (37). Los animales no pueden sintetizar ácido linoleico y γ -linolénico, que deben recibir de los vegetales superiores, pero sí ácido araquidónico (31).

En tanto que el ácido araquidónico es el precursor de la serie 2, el dihomogamma-linolénico lo es de la serie 1 (Fig. 3).

En los animales, el ácido linoleico se convierte en ácido araquidónico pero éste no puede convertirse en linoleico, lo que significa que la transformación de linoleico a araquidónico es unidireccional (31).

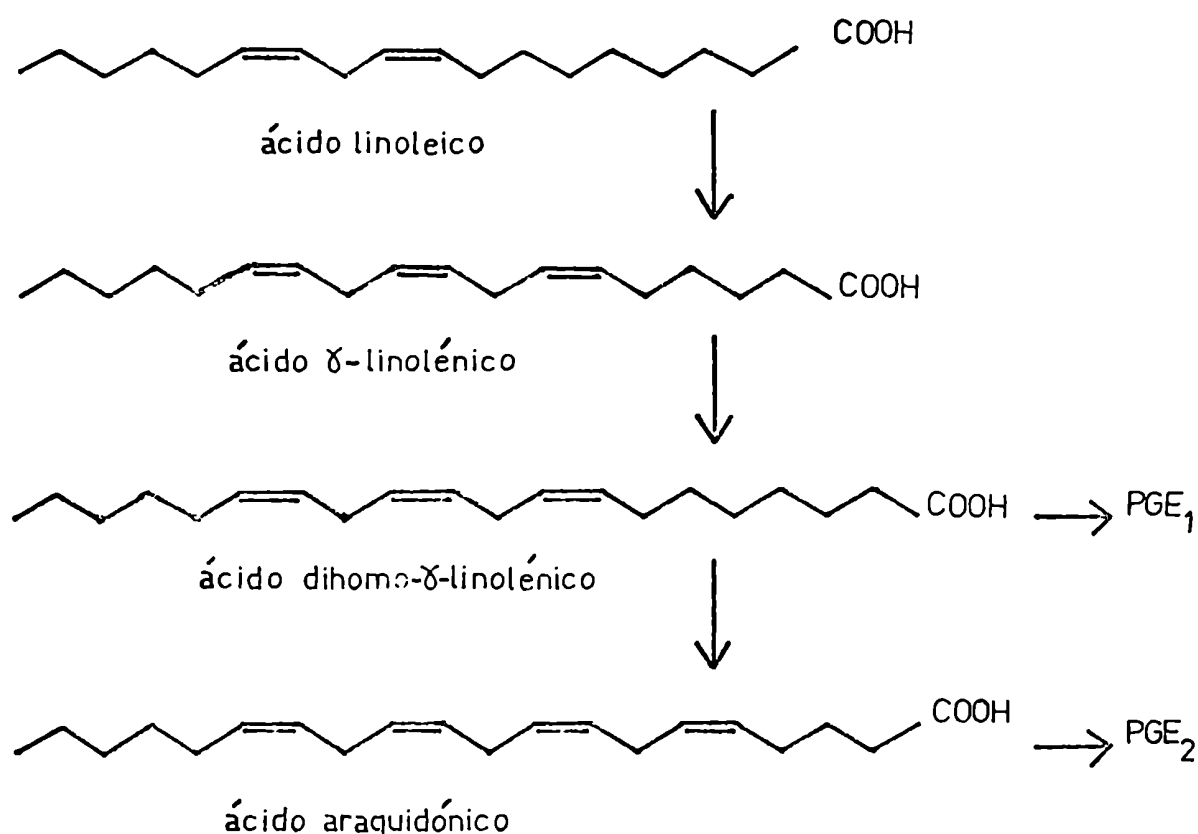


Fig. 3. Formación de ácido araquidónico a partir de ácido linoleico en animales, según Bergström S. (15).

Los sustratos para la síntesis de PGs (ácidos grasos no-saturados de 20 carbonos) deben estar en forma no esterificada (120,190), pero los niveles intracelulares de tales precursores son extremadamente bajos (116, 165). Estos ácidos grasos pueden surgir a partir de lípidos intracelulares: ésteres del colesterol, fosfátidos, mono, di o triglicéridos (65), que se encuentran como componentes de membranas. Predominan en ella los fosfoglicéridos o fosfátidos, con cantidades mucho menores de esfingolípidos (122).

Por lo tanto, el primer paso para la síntesis de PGs por cualquier célula requiere la liberación del sustrato. Diferentes estímulos como la agitación mecánica, hormonas, drogas, etc., interactúan con la membrana celular de modo tal que la fosfolipasa A₂, enzima que escinde los lípidos de membrana hidrolizando los fosfoglicéridos en la posición 2 (122), resulta activada, liberando los ácidos grasos precursores (65). En el riñón de rata no sólo la fosfolipasa libera araquidonato para la síntesis de PGs

sino también la triglicérido lipasa (49).

Una vez liberados, los ácidos grasos pueden encontrar varios impedimentos para interactuar con el complejo enzimático encargado de la síntesis de PGs (complejo de la PG-sintetasa): unión a otras proteínas del citosol o fluidos extracelulares; competencia por la enzima con otros ácidos grasos; activación por la acid:CoA ligasa (y subsecuente esterificación a lípidos); oxigenación por lipoxidasa(s) (119). Hay experimentos que indicaron la posibilidad de una liberación regional selectiva que ubicaría al ácido graso más cerca del complejo de la PG-sintetasa (101).

Trabajando con microsomas de glándula seminal bovina, Yamamoto y col. (198) demostraron que la PG-sintetasa constaba de 2 fracciones: una denominada ciclo-oxigenasa, que catalizaba la conversión de ácido 8,11,14-eicosatrienoico en PGG_1 y PGG_1 en PGH_1 , y otra denominada peroxidasa, que catalizaba la conversión de PGH_1 en PGE_1 . Estas 2 enzimas son las primeras del complejo. (Fig. 4).

El requerimiento de oxígeno molecular por la ciclo-oxigenasa ha creado una paradoja. Muchos investigadores han observado que niveles bajos de oxígeno pueden llevar a una producción aumentada de PGs. Sin embargo, la anoxia total, como puede lograrse "in vitro", evita la biosíntesis.

Una vez formado el endoperóxido PGH_2 , si se toma como ejemplo la serie 2 de PGs, éste puede ser atacado por más de una enzima, dando así lugar a la formación de diferentes PGs. Es así que, por acción de una isomerasa se forma la PGE_2 , y una reductasa es responsable de originar la $PGF_{2\alpha}$. Se ha aislado una enzima, la 9-ceto-reductasa, que convierte la PGE_2 en $PGF_{2\alpha}$, habiéndosela ubicado en sangre, corazón, hígado, riñón, cerebro y piel (119) (Fig. 4).

El hallazgo de Hamberg y col. (90,91) alteró el concepto previo de que los tejidos producen primariamente PGE_2 y $PGF_{2\alpha}$, ya que se detectó tromboxano en plaquetas humanas (90) y en pulmón de cobayo (89). La enzima responsable de su formación es la tromboxano-sintetasa, cuya especificidad es incierta, y que ha sido encontrada en muchos tejidos (181).

Por su parte, la prostaciclina (PGI_2) es producida por acción de la

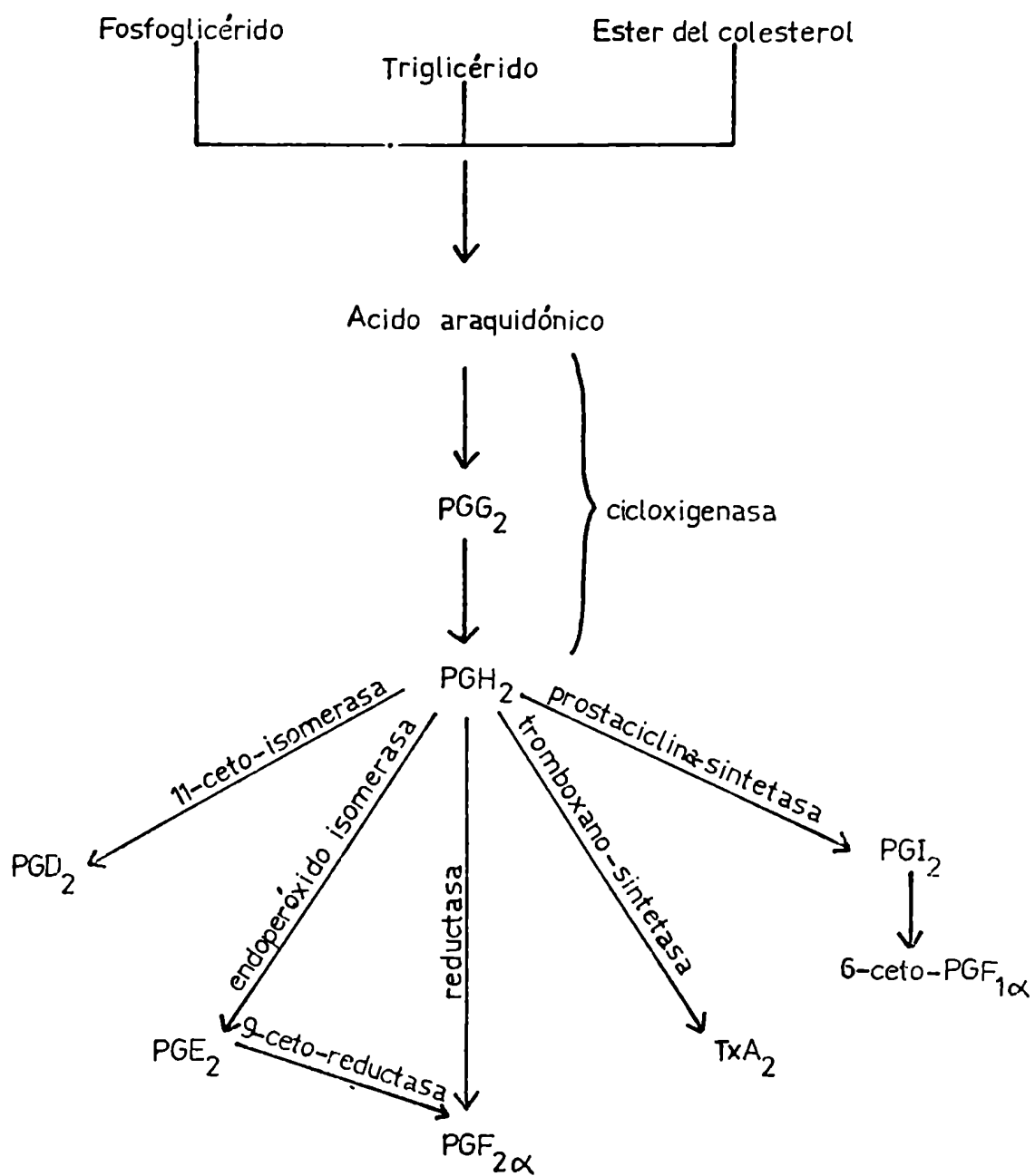


Figure 4. Esquema de síntesis de prostaglandinas.

prostaciclina-sintetasa, enzima que convierte el endoperóxido PGH_2 en la PGI_2 , quien se hidroliza a 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (Fig. 4). La síntesis está presente en muchos tejidos diferentes, y se ha observado que distintas células dentro de un mismo órgano pueden formar selectivamente ya sea PGI_2 (endotelio vascular de pulmón) o TxA_2 (parénquima pulmonar) (119).

La PGD_2 es formada a partir de PGH_2 en presencia de glutatión por la 11-ceto-isomerasa. Ha sido considerada una prostaglandina importante en cerebro y plaquetas. Aunque se la creía biológicamente inactiva se ha visto que inhibe la agregación plaquetaria y tiene receptores selectivos en plaquetas (119).

2.4.- Metabolismo.

La pérdida de actividad biológica de las PGs se asocia tanto con la oxidación enzimática del grupo 15-hidroxi de las PGs activas como con las reacciones hidrolíticas espontáneas de PGI_2 y TxA_2 (119) dando respectivamente 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ y TxB_2 . En algunas células, la oxidación enzimática es suficientemente rápida como para preceder la hidrólisis espontánea.

La oxidación del grupo 15-hidroxi está a cargo de la 15-hidroxidehidrogenasa (15-OH-PGDH). Esta oxidación da por resultado una cetona conjugada. Este derivado conjugado 15-ceto es convertido rápidamente en el compuesto 15-ceto-13,14-dihidro por acción de la 13-reductasa (88). Este último derivado es la forma que parece más disponible para la 9-ceto-reductasa, y es como se encuentra comúnmente a las PGs en la sangre periférica (Fig. 5).

Después de la 15-dehidrogenación y la reducción 13, 14, previo a ser excretados en la orina, los compuestos son degradados por diversos mecanismos (166):

- uno o dos pasos de oxidación β desde el carboxilo terminal para producir compuestos dinor (C_{18}) o tetranor (C_{16});
- oxidación ω que da por resultado la formación de compuestos ω_1 y ω_2 hidroxilados, y eventualmente ácidos dicarboxílicos;
- en algunas especies, oxidación β , también desde el extremo ω de los

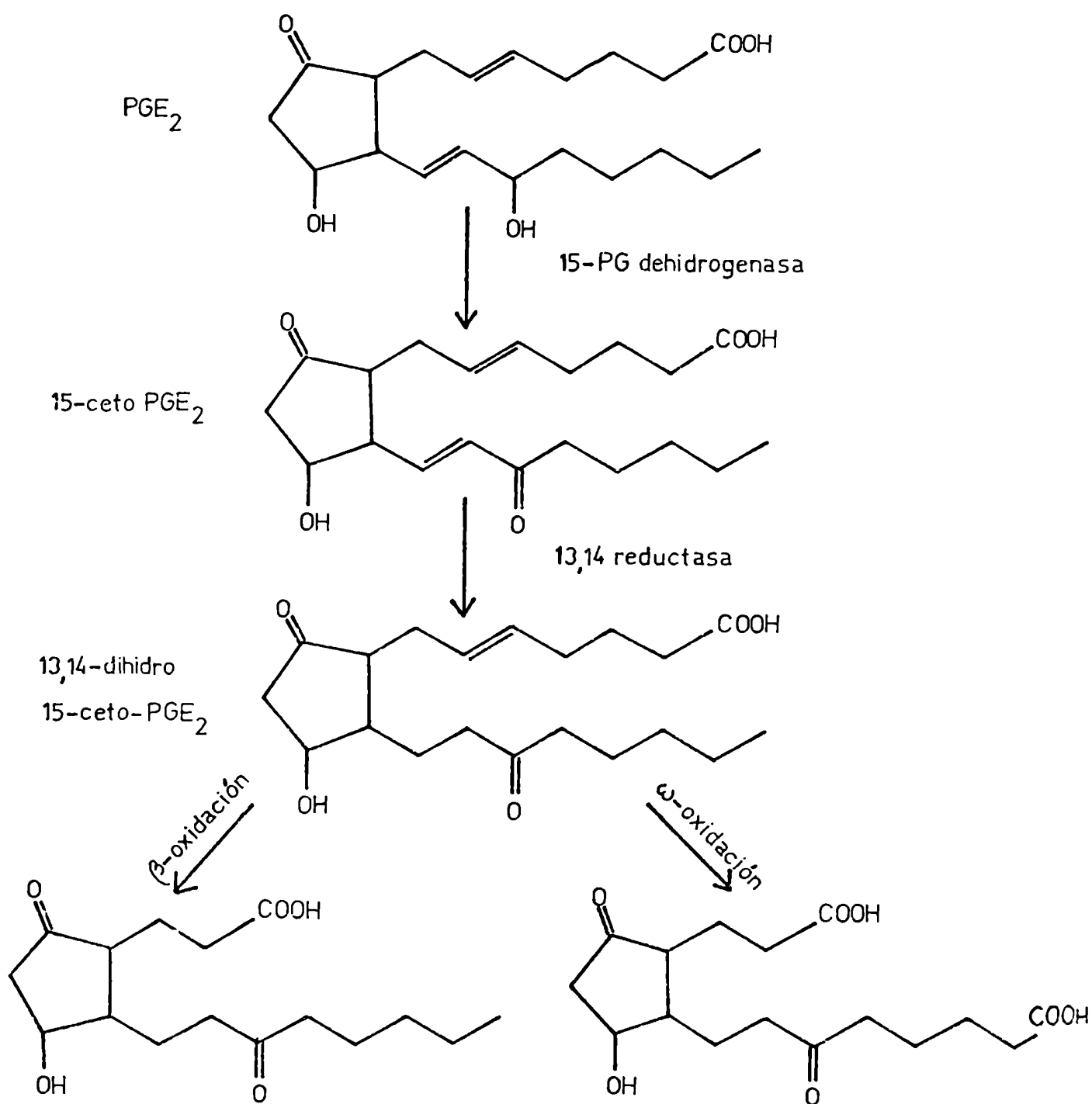


Figura 5. Metabolismo de prostaglandinas, tomando como ejemplo la PGE₂.

ácidos dioicos con la formación de metabolitos de C_{14} ;

- en el caso de las PGE también puede ocurrir deshidratación a derivados B (Fig. 1b);
- en el hombre se ha identificado una deoxi-PG como metabolito de la $PGF_{2\alpha}$.

Se ha identificado un gran número de metabolitos urinarios, formados por combinaciones de estas reacciones (Fig. 5).

2.5.- Actividad fisiológica de las prostaglandinas.

Se ha observado que las prostaglandinas están implicadas en procesos fisiológicos tales como reproducción, transmisión nerviosa, secreción gástrica, vasoconstricción, broncoconstricción y agregación plaquetaria.

Compuestos muy relacionados pueden tener efectos fisiológicos opuestos: ej. PGE vs. PGF o TxA_2 vs. PGI_2 (119). Diferencias altamente selectivas en las respuestas tisulares a distintas prostaglandinas (por ej. con trozos de estómago y arteria (135)) pueden reflejar diferencias en los tipos de receptores o en la forma como los receptores interactúan con la adenil ciclasa celular y los receptores β -adrenérgicos, para producir la respuesta celular (119).

2.5.1.- Receptores para prostaglandinas.

En el año 1972, Kuehl y Humes (115) dieron la primer evidencia experimental de un receptor para prostaglandinas. Ellos demostraron la unión específica de PGE_1 - 3H en una fracción particulada obtenida a partir de un homogenato de adipocitos aislados de rata. Posteriormente se demostró la existencia de receptores de PGs en útero de hamster (191); membranas de hígado de rata (174); cuerpo lúteo bovino (152,158), ovino (151) y humano (153); tiroides de buey (136); oviducto de conejo (192) y glándula pineal bovina (38).

2.5.2.- Actividad biológica de las prostaglandinas.

La amplia distribución del sistema de la PG-sintetasa junto con la presencia de sus ácidos grasos sustrato en los fosfolípidos de membrana

de las células de mamíferos sugiere que las PGs pueden formarse dentro de la mayoría de los tipos celulares, donde pueden actuar como mensajeros intracelulares (172). Otra posibilidad es que las PGs sean secretadas por células que recibieron un estímulo e influencien células o tejidos cercanos, actuando entonces como hormonas locales (172). Finalmente, existe una posibilidad de que las PGs, liberadas en la circulación general, actúen como hormonas clásicas en células blanco distantes (172).

2.5.2.1.- Prostaglandinas como mensajeros intracelulares.

Las células de los mamíferos sintetizan y liberan PGs en respuesta a hormonas u otros estímulos. Estas PGs recién sintetizadas podrían funcionar dentro de las mismas células antes de la liberación. En este caso pueden actuar como mensajeros intracelulares afectando directamente una actividad enzimática o modulando los niveles de otras sustancias biológicamente activas como nucleótidos cíclicos o calcio, los que se convierten así en 3^{er} mensajero.

Se considera al AMP_c (3', 5'- adenosina monofosfato cíclica) como un importante mensajero intracelular de información biológica. Hay fuertes evidencias de que las PGs exógenas, especialmente las del tipo E, aumentan o disminuyen los niveles intracelulares de AMP_c en distintos tejidos (169, 171). En muchos de ellos, los efectos biológicos asociados parecen ser mediados por un aumento de AMP_c.

Se ha observado también que ciertas actividades pueden estar mediadas por la 3', 5'- guanosina monofosfato cíclica (GMP_c), y hay evidencias de que la PGF₂α puede producir grandes aumentos de GMP_c en el útero de rata (114).

De igual modo debe considerarse la posibilidad de que el AMPc module la síntesis de PGs. Así, por ej., Dalton y Hope postularon un mecanismo de interrelación en células grasas por el cual la PGE₂ formada por un efecto estimulante del AMP_c inhibe la posterior formación del nucleótido (47).

Se ha demostrado que en algunos tejidos los efectos biológicos del

AMP_c no pueden obtenerse en ausencia de Ca²⁺. Parece también que el calcio ejerce un papel en la retroalimentación negativa de los efectos biológicos activados por AMP_c. Fue debido a esto que se consideró la posibilidad de que la PGE₁ podía producir la remoción de Ca²⁺ de las preparaciones de membrana de piel de rana, permitiendo así la entrada del Na⁺, el cual estimula a la adenil ciclasa (156).

2.5.2.2.- Prostaolándinas como hormonas locales.

Algunas PGs pueden ser secretadas e influenciar células o tejidos cercanos, actuando así como hormonas locales. Por ej., la PGF_{2α} que viene del útero de la oveja puede ser transferida desde la vena uterina a la arteria ovárica, y llegar al cuerpo lúteo para producir luteolisis (133). Otro ej. es la PGE₂, que se sabe aumenta la permeabilidad vascular y se encuentra en los exudados inflamatorios.

2.5.2.3.- Prostaqlándinas como hormonas clásicas.

La infusión i.v. de PGA₁ o PGA₂ produce una prolongada caída de la presión sanguínea, y se ha postulado que estas PGs pueden liberarse desde el riñón y actuar como hormonas clásicas para regular la presión sanguínea (121). Sin embargo, la PGA se forma rápidamente como producto de degradación de la PGE que fue sintetizada por los tejidos (87), y por lo tanto es difícil demostrar su síntesis a priori en el riñón.

Se ha encontrado PGB en semen, pero, al igual que la PGA, es un producto de degradación de la PGE (87).

A diferencia de la PGE₂ o PGF_{2α}, la prostaciclina no es inactivada en su paso por la circulación pulmonar. Gryglewsky y col. demostraron que la PGI₂ es continuamente generada y liberada por los pulmones de gato "in vivo" (84). Dada su potente actividad antiagregante (134), su circulación representa un importante mecanismo homeostático para el control de la agregación plaquetaria "in vivo".

2.5.3.- Influencia de las prostaglandinas sobre la actividad espontánea del músculo liso.

Las PGs fueron descubiertas por su acción estimulante sobre el miometrio. Se han usado diferentes preparaciones de músculo liso para estudiar en forma cuali y cuantitativa su actividad biológica.

2.5.3.1.- Sistema cardiovascular.

Una de las características del extracto crudo de PGs es que disminuye la presión sanguínea después de la inyección i.v. en el conejo, gato y perro. Los experimentos realizados con las PGs cristalinas generalmente demostraron que las PGE son bastante más activas que las PGF. Sin embargo, hay diferencias tanto cuali como cuantitativas entre las especies así como entre las distintas partes del sistema cardiovascular.

La respuesta de secciones musculares del lecho periférico vascular de perro a distintas PGs es dosis dependiente. Aunque la PGE₁, PGE₂, PGA y PGF_{1α} en concentraciones de 1 a 100 ng/ml producen relajación, dosis más altas (100 ng- 10 μg/ml) provocaron contracciones aumentadas (179). Sin embargo, estas concentraciones están muy por encima de los niveles fisiológicos.

La PGF_{2α} es un venoconstrictor específico.

La aorta de conejo y la coronaria de perro muestran respuestas contráctiles a las PGs E₁, E₂, A₁ y F_{1α} (179).

Las venas mesentéricas superiores aisladas tienen actividad rítmica espontánea. La PGE₁ aumenta las contracciones en venas de conejo y rata pero la PGF_{1α} es inactiva. Por el contrario, en venas de perro la PGE₁ deprime mientras que la PGF_{1α} aumenta la actividad (179).

Se ha demostrado que el endoperóxido PGH₂ administrado i.v. a las ratas puede producir una pronunciada caída en la presión sanguínea (197).

En el año 1977, Dusting, Moncada y Vane observaron que la PGI₂ mediaba la relajación inducida por ácido araquidónico en trozos de coronaria bovina (53). Como el endoperóxido PGH₂ era rápidamente convertido en prostaciclina por el tejido vascular de varias especies incluyendo al hombre,

se sugirió que la PGI_2 probablemente estaba involucrada en la regulación local del lecho coronario vascular (53). Opuestamente se había observado que el TxA_2 producía la contracción de segmentos de coronaria bovina.

2.5.3.2.- Sistema digestivo.

Hasta que fue posible cristalizar las distintas PGs, se emplearon preparaciones de músculo liso intestinal de distintos animales para bioensayo.

Si bien hay diferencias cuantitativas en la acción de las distintas series, las respuestas provocadas por las PGs E y F sobre el tracto gastrointestinal son semejantes. Las dos series aumentan la actividad intrínseca intestinal, pero la PGE es menos potente. Una excepción es, por ej., el caso del duodeno de rata, donde la PGE_1 (5 ng/ml) produce relajación (109).

En intestino se observó una inhibición de la acción propulsora (14), efecto que no fue evitado con bloqueantes adrenérgicos, y por lo tanto difiere de la relajación del duodeno de rata, ya que ésta es medida indirectamente por liberación de catecolaminas (109).

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ contrajo tanto el músculo circular como el longitudinal.

2.5.3.3.- Sistema reproductor femenino.

El útero aislado de rata y cobayo se contrae "in vitro" por acción de las PGE y PGF. En el útero de cobayo se requieren dosis menores de PGE que de PGF_α (58, 180) para producir el mismo efecto. Por su parte, el útero de rata muestra una mayor dependencia de las PGE que de las PGF para desarrollar actividad contráctil espontánea (78, 127).

Los ovarios de rata, cerda y cobaya también mostraron una respuesta diferencial a las PGs, variando ésta de acuerdo a la etapa del ciclo estral considerado (70, 77, 176).

En la mayoría de los casos el semen humano inhibe la motilidad del miometrio humano aislado (57, 118). Los 3 compuestos E disminuyen el tono, la frecuencia y amplitud de las contracciones espontáneas de los trozos

uterinos humanos. Las $PGF_{1\alpha}$ y $PGF_{2\alpha}$ difieren de las PGE en que ambas producen contracción del miometrio (16).

El estado hormonal influencia claramente la sensibilidad del miometrio humano, observándose que "in vitro" es más sensible a la acción relajante de la PGE_1 cerca de la ovulación, mientras que antes de la menstruación es más sensible a la $PGF_{2\alpha}$ (147).

Cuando en extractos de ístmo y ampolla de trompa de Falopio humana se analiza por cromatografía la presencia de PGs, se observa que la $PGF_{2\alpha}$ se encuentra preferencialmente en la región ístmica, mientras que la PGE_1 se asocia con la región ampular. Esta distribución diferencial podría relacionarse con la regulación de las distintas funciones de las regiones ístmica y ampular (188). Se ha observado también que la PGI_2 produce una depresión dosis-dependiente de la tensión contráctil isométrica y frecuencia contráctil tanto de la región ampular como ístmica (72).

La progesterona agregada "in vitro" disminuye la sensibilidad del útero aislado de cobaya y rata tanto a la PGE_1 como a la $PGF_{2\alpha}$ (180).

2.5.4.- Principales mecanismos reguladores de la transmisión adrenérgica e influencia de las prostaglandinas.

Una vez que la norepinefrina (NE) ha sido liberada del terminal adrenérgico, puede tener distintos destinos:

- actuar sobre receptores α o β post-sinápticos que, como se recordará, en el útero son estimulantes y depresores respectivamente (4) (Fig. 6)
- regular su propia liberación, actuando sobre un receptor α (retroalimentación negativa) o β (retroalimentación positiva) presináptico, disminuyendo o incrementando respectivamente dicha liberación (195)(Fig. 6).
- sufrir recaptación neuronal (1) o extraneuronal (2) para ser posteriormente metabolizada (195)(Fig. 6).

Existe considerable evidencia de que las PGs pueden estar involucradas en la regulación local de la transmisión adrenérgica en determinadas uniones neuroefectoras.

La principal PG liberada por los tejidos parece ser la PGE_2 , con con-

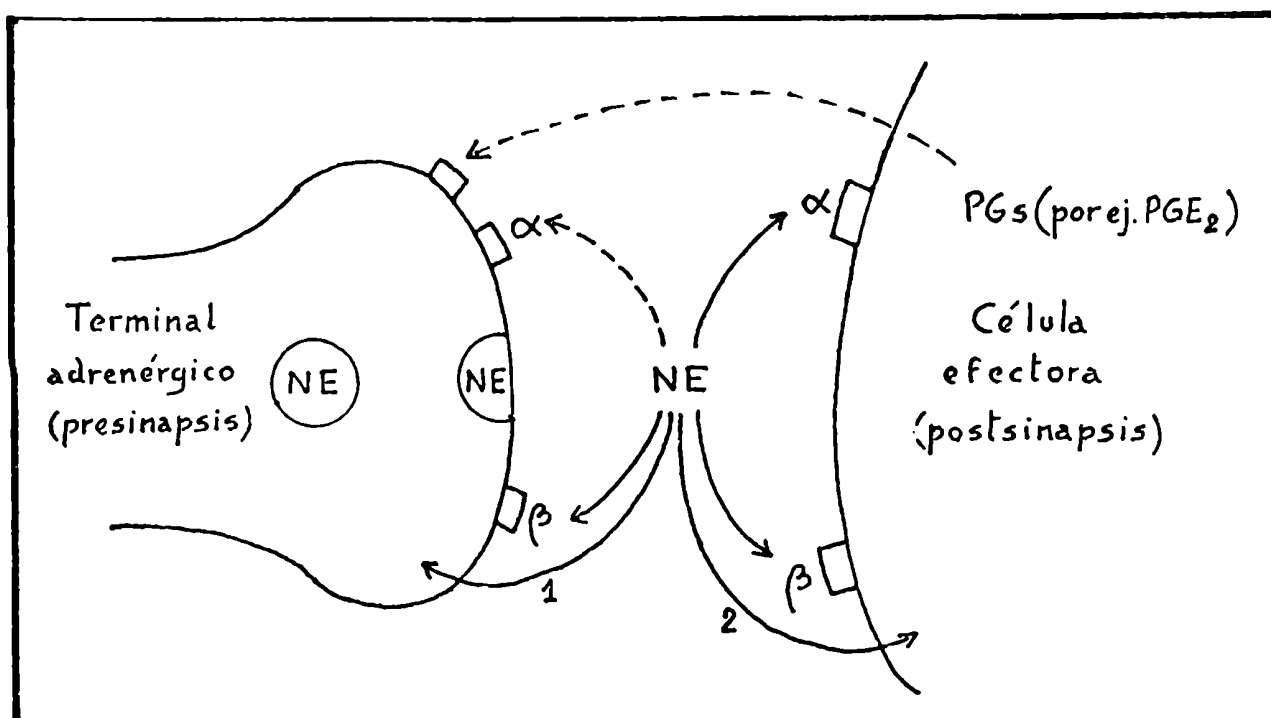


Fig. 6: Principales mecanismos reguladores de la transmisión adrenérgica e influencia de las prosteglandinas.

líneas llenas: estimulación ; líneas cortadas: inhibición.

1.- recaptación neuronal o recaptación 1.

2.- recaptación extraneuronal o recaptación 2.

Otras aclaraciones en el texto.

tidades menores de material tipo PGA y PGF. Por el contrario, en el sistema nervioso central parece que se forman de manera preferencial, si no exclusivamente, las de tipo F (30,157). En base a distintas observaciones, Hedqvist (96,97) postuló su hipótesis de que la PGE₂ puede inhibir la liberación posterior de NE por un mecanismo de retroalimentación negativa (Fig. 6). Se postuló más tarde que el papel modulador de la PGE₁ o PGE₂ podía basarse en los efectos a dos niveles diferentes del sistema neuroefector: inhibición de la liberación de NE desde los nervios e inhibición de la respuesta efectora de la NE liberada (98).

En contraste, parece que las PGs de la serie F aumentan la respuesta de la célula efectora a estimulación nerviosa o administración de NE (195).

3.- Glucocorticoides.

3.1.- Introducción.

Como consecuencia de la descripción de Addison en 1855 del síndrome clínico que surgía de la enfermedad destructora de las glándulas adrenales (2), se comenzó a considerar la importancia fisiológica de las mismas. Sus observaciones interesaron al fisiólogo Brown-Séquard (32) quien en 1856 llevó a cabo los primeros experimentos sobre los efectos de la adrenalectomía. De estudios posteriores, en los años '40 surge el concepto de 2 tipos de hormonas adrenocorticales: los mineralocorticoides, cuya función primordial es la regulación homeostática de electrolitos, y los glucocorticoides, quienes se relacionan con el metabolismo de los carbohidratos. Si bien ha sufrido modificaciones, este concepto ha llegado hasta nuestros días.

3.2.- Estructura química.

El colesterol es el precursor de muchos esteroides. Entre ellos se incluyen los ácidos biliares; los andrógenos u hormonas sexuales masculinas; los estrógenos u hormonas sexuales femeninas; la progesterona, que es una hormona progestágena; y las hormonas adrenocorticales (122). Den-

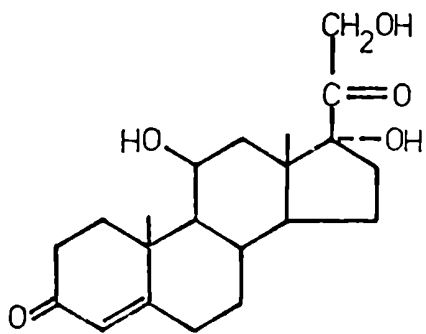
tro de estas últimas, tal como ya se mencionara, se diferencian los mineralocorticoides y los glucocorticoides. De los esteroides naturales, sólo el cortisol, la cortisona, la corticosterona y la 11-dehidrocorticosterona tienen actividad apreciable como glucocorticoides. De éstos, el cortisol es el glucocorticoide más potente. En ciertas especies tales como la rata, que no tienen capacidad para sintetizar cortisol, la corticosterona es el glucococorticoide más importante (126) (Fig. 7).

Se denomina esteroide a determinados compuestos que incluyen a los esteroides (alcoholes mayores, muchos naturales como el colesterol, ergosterol, etc.) y a otras sustancias que no son necesariamente alcoholes. Todos estos esteroides tienen el mismo esqueleto carbonado, al cual se da el nombre de núcleo ciclofenantreno o ciclopentanofenantreno (42) (Fig. 8a). El esqueleto esteroideo contienen 17 carbonos. En la mayoría de las hormonas naturales se agregan 1 ó 2 carbonos adicionales a los átomos de C_{10} y C_{13} , lo que lleva a un total de 18 ó 19 átomos (42). De esa manera, aquellos esteroides que tienen un carbono más o C_{18} unido al C_{13} se denominan esteroides C_{18} . Un ejemplo es el estrano, que sería el padre de la serie estrogénica (Fig. 8b).

La serie androgénica deriva de la anterior, con el agregado de otro carbono en el C_{10} , dando así el androstano (Fig. 8c).

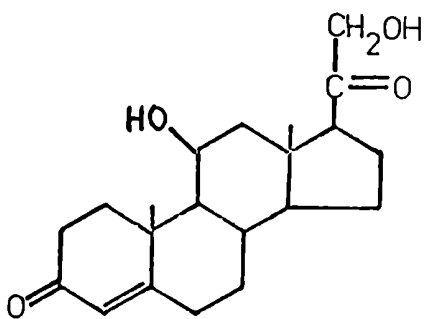
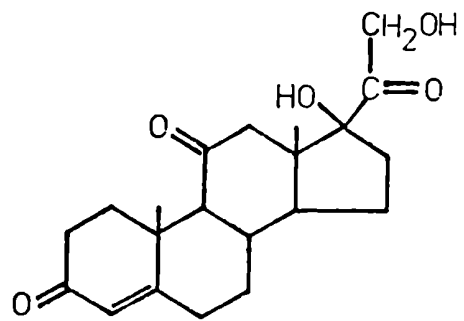
Todos los esteroides formados por la corteza adrenal tienen una cadena lateral más de 2 carbonos adicionales unidos al C_{17} . Los esteroides de la corteza adrenal son denominados entonces esteroides C_{21} . La estructura madre de este grupo es el pregnano (Fig. 8d). Cabe recordar que no todos los esteroides de 21 carbonos derivan necesariamente de la corteza adrenal.

Debido a varias adiciones a este núcleo pregnano se forman todos los esteroides adrenales. En su forma más simple, todas las valencias libres de este esqueleto carbonado son saturadas con hidrógeno, pero no se conoce este compuesto en la naturaleza y, de existir, no tendría acción hormonal, ya que para que ésta ocurra sería esencial una modificación inicial en este núcleo (42).



cortisol

cortisona



corticosterona

11 - dehidrocorticosterona

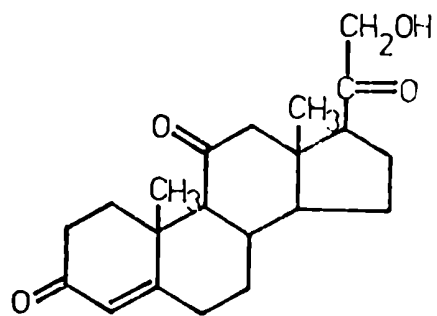


Figura 7. Principales glucocorticoides naturales.

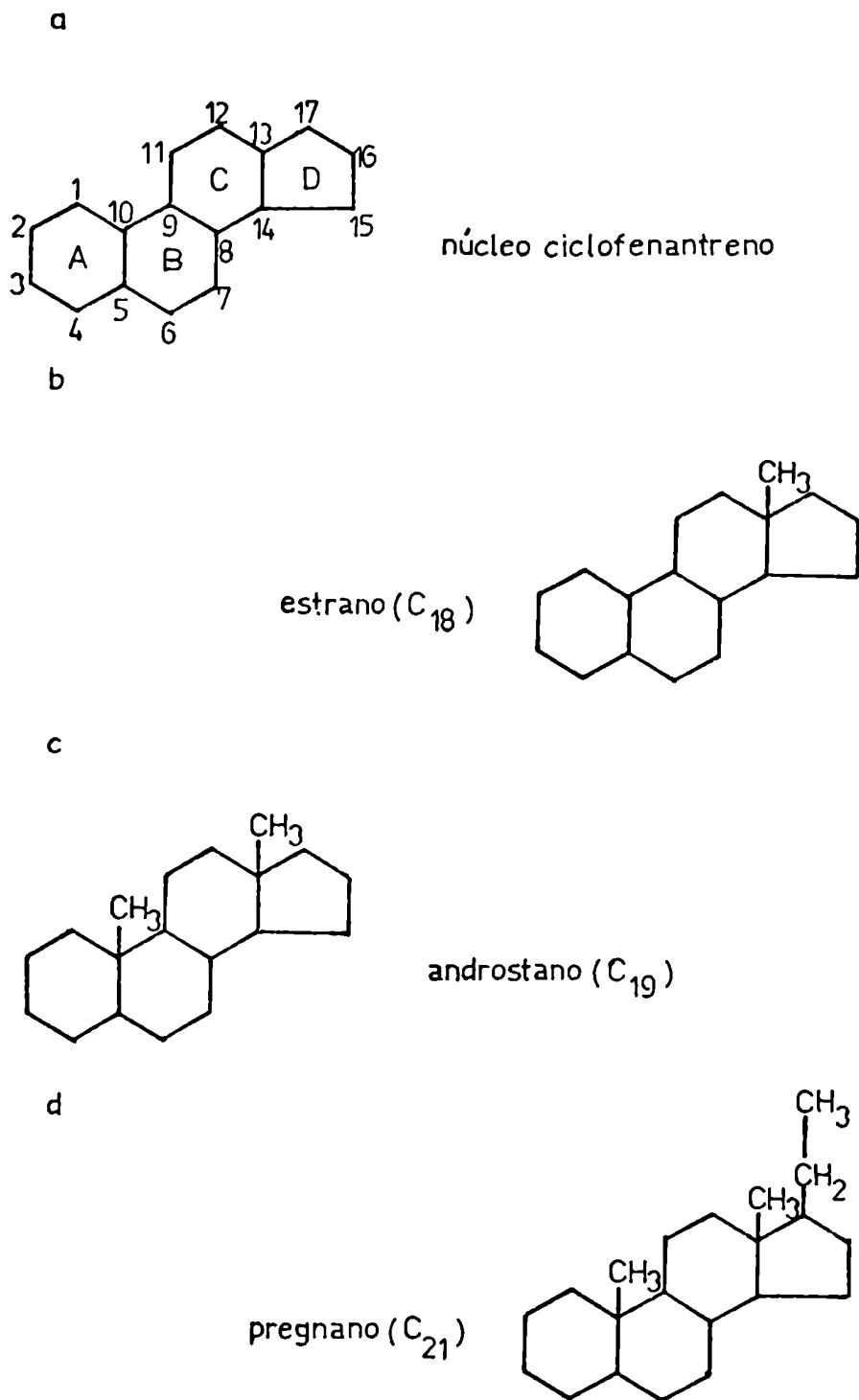


Figura 8. Núcleos que originan a los distintos esteroides.

Los esteroides difieren entre sí por el número y posición de sus dobles enlaces; tipo, localización y número de sus grupos funcionales sustituyentes; configuración α o β de los enlaces entre sus grupos sustituyentes y el núcleo, y en la configuración que adoptan los anillos entre sí (122).

3.3.- Síntesis.

Todos los esteroides se originan a partir del escualeno, triterpeno lineal que se cicla fácilmente, dando como primer producto importante el lanosterol, que es el precursor del colesterol en los tejidos animales. El colesterol se encuentra en las membranas plasmáticas de muchas células animales y en las lipoproteínas del plasma sanguíneo (122) (Fig. 9)

En 1953, Hechter y col. (94) presentaron la primera evidencia de que tanto el acetato como el colesterol podían actuar como precursores del cortisol. Se pensó entonces que el colesterol era un intermediario en la producción de acetato a cortisol. Sin embargo, en 1954 (178) se observó que la acción de la corticotrofina o ACTH se ejercía casi exclusivamente sobre el camino sintético desde el colesterol y no desde el acetato, lo cual se convertía en evidencia a favor de 2 caminos de síntesis separados.

En determinadas células, y presumiblemente en la corteza adrenal, el colesterol se sintetiza a partir de acetato. Pero no sólo puede sintetizarlo sino también tomarlo de la circulación. Lo que no se ha establecido aún es si la síntesis de colesterol por la adrenal es tan importante cuantitativamente como su captación, pero sí se sabe que ambos procesos ocurren (126).

La formación de esteroides corticales adrenales es mínima, a menos que la célula adrenal sea estimulada por algún regulador extra-adrenal. En presencia de un estimulante adrenal, el colesterol es transformado sucesivamente en 20α -hidroxicolesterol; $20\alpha,22$ -dihidroxicolesterol, llegando así a pregnenolona (Fig.10). Se sabe que en la biosíntesis esteroidea la conversión de colesterol en pregnenolona es el paso limitante, y en 1951 Hechter y col. (95) demostraron que ésta puede llevar a la for-

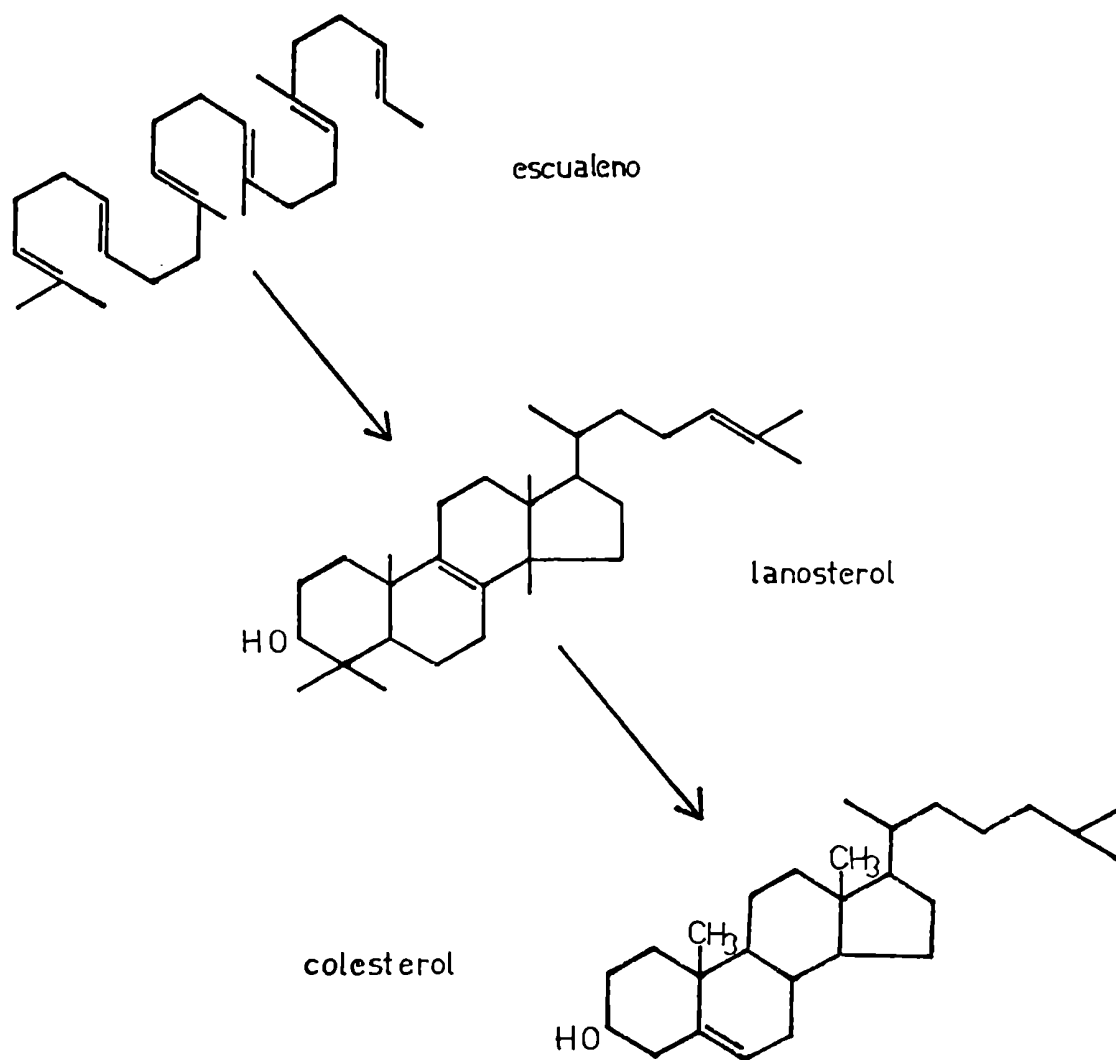


Figura 9. Síntesis de colesterol a partir del escualeno.

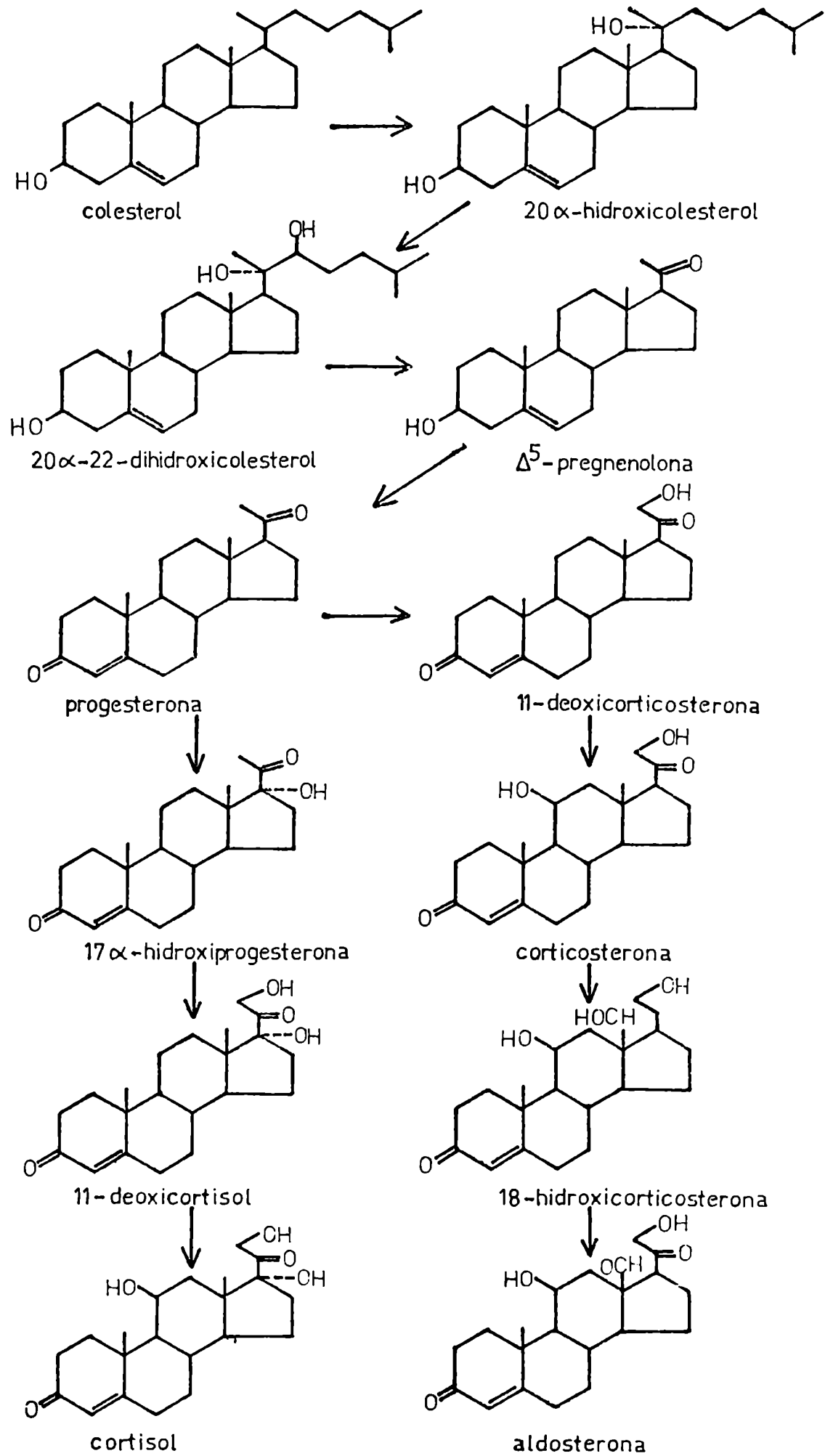


Figura 10. Caminos biosintéticos para cortisol y corticosterona.

mación de cortisol y corticosterona.

En la corteza adrenal se distinguen 3 zonas: la externa o glomerulosa; la media o fasciculada, y la interna o reticular. Tanto el cortisol como la corticosterona son sintetizados en la zona fasciculada de la corteza adrenal(126).

La pregnenolona pasa primero a progesterona. Si bien es principalmente producida por el cuerpo lúteo y la placenta, hay evidencias de que la progesterona se forma en la adrenal, ya que ha sido encontrada en el efluente venoso de adrenalectomizados (8). La progesterona en sí misma está bien establecida como precursor importante de la mayoría de las hormonas corticales adrenales.

El proceso de conversión de pregnenolona a progesterona involucra la acción secuencial de dos enzimas: la 3β -hidroxisteroide dehidrogenasa y la Δ^5 -3-oxosteroide isomerasa (126).

A partir de la progesterona, por acción de una 17α -hidroxilasa, se forma la 17α -hidroxiprogesterona, que es convertida en $17\alpha,21$ -dihidroxiprogesterona (11-deoxicortisol o compuesto S de Reichstein) por el sistema de la 21 -hidroxilasa. Finalmente, ésta es transformada en cortisol (compuesto F) por la 11β -hidroxilasa (126) (Fig. 10).

También puede formarse una pequeña cantidad de corticosterona como subproducto de la síntesis de cortisol. La diferencia en el camino de síntesis radica en que la progesterona escapa a la 17α -hidroxilación y es directamente atacada por la 21 -hidroxilasa, dando 11-deoxicorticosterona, quien finalmente sufre hidroxilación 11β . Por lo tanto, la corticosterona sólo difiere del cortisol en que le falta el hidroxilo 17α , y esto explica la gran diferencia de potencia biológica de las dos hormonas (126) (Fig. 10).

No todas las enzimas involucradas en la síntesis de corticoides se localizan en la misma parte de la célula. Es así que el sistema involucrado en la degradación de la cadena lateral del colesterol se cree está en las mitocondrias (163); el sistema 11β -hidroxilante principalmente en la fracción mitocondrial (33); la 3β -dehidrogenasa en la fracción micro-

somal (20); y los sistemas 17- y 21-hidroxilante en la fracción "soluble" de los contenidos celulares (150). En base a estos datos, Hayano y col. (93) postularon una "ruta" metabólica en la biosíntesis esteroidea: primero el colesterol se pone en contacto con las mitocondrias, donde es convertido en pregnenolona. Luego ésta es transferida a los microsomas donde pasa a progesterona por acción de la 3β -dehidrogenasa. Esta puede convertirse rápidamente en deoxicorticoesterona y 17-hidroxidesoxicorticoesterona. Pero estos compuestos deben ser finalmente transferidos de nuevo a las mitocondrias para permitir que la 11β -hidroxilase complete la formación de cortisol y corticosterona.

Existe sin embargo la posibilidad de que no sea ésta la única "ruta", ya que, por ej., hay evidencias de que al menos parte de la 3β -dehidrogenasa está adsorbida sobre las mitocondrias (20).

Parece probable que las enzimas intracelulares sean tan móviles dentro de la célula como los precursores esteroideos. Uniéndose ellos de manera ordenada a lugares específicos sobre la superficie mitocondrial como sistema integrado permitirían que toda la secuencia de hechos desde colesterol a hormona esteroidea se efectúe sobre una superficie única de la mitocondria.

3.3.1.- Unión proteica de hormonas adrenocorticales.

En el año 1959, Slaunwhite y Sandberg (173) demostraron que, dentro de la fracción de α -globulina plasmática existe una proteína especial o específica, que es principalmente responsable de la unión de cortisol a concentraciones normales. Esta glicoproteína plasmática fue denominada "transcortina" o CBG (corticosteroid-binding globulin). Tiene alta afinidad por el cortisol, progesterona, deoxicorticoesterona, corticosterona y algunos, pero no todos, los análogos corticosteroides sintéticos. En la mayoría de las circunstancias fisiológicas, aproximadamente el 75 % del cortisol plasmático está fuertemente unido, pero de manera reversible, a la transcortina (1 molécula de cortisol : 1 molécula de transcortina). Aproximadamente el 15 % del cortisol plasmático está débilmente unido a

la albúmina, y alrededor del 10 % está aún unida. Esta fracción no unida es la que tiene libertad de movimiento dentro de las células, ya sea para ejercer efectos metabólicos o para transformarse en un metabolito inactivo (126).

Si bien, tal como se mencionara antes, hay otros esteroides que tienen afinidad por la transcortina, éstos son secretados ordinariamente en cantidades tan pequeñas que no compiten seriamente con el cortisol por los lugares de unión sobre la molécula proteica.

No hay evidencias de que la transcortina lleve a cabo una función esencial en la actividad biológica de los glucocorticoides. Así, por ej., la dexametasona, uno de los glucocorticoides más potentes, tiene poca afinidad por la CBG, en contraste con el cortisol (162). Sin embargo, la transcortina puede influenciar la cinética de inactivación del cortisol por el hígado.

3.4.- Mecanismo de acción de los glucocorticoides.

3.4.1.- Acción sobre la membrana celular.

La naturaleza hidrofóbica de los glucocorticoides (GC) sugiere que podrían actuar sobre la membrana celular. De hecho, se ha observado que estas hormonas realmente interactúan con la membrana celular, modificando sus propiedades, y en ciertas especies inferiores probablemente ejercen su efecto sobre la superficie celular (124).

Algunas hormonas glucocorticoides aumentan la estabilidad de la membrana lisosomal, disminuyendo así la liberación de enzimas desde los lisosomas. Este efecto se observa con concentraciones del orden de 10^{-6} M o mayores, rango más alto que el necesario para otros efectos de los GC (194). Tales datos argumentarían en contra de una explicación generalizada sobre la base de un efecto estabilizador de membrana lisosomal para justificar la mayoría de las respuestas fisiológicas a los GC.

3.4.2.- Receptores para glucocorticoides.

Es factible que la mayoría, si no todos los efectos fisiológicos de

los GC, involucren su penetración en la membrana celular y unión a proteínas receptoras intracelulares específicas (124). Estas se encuentran en el citosol de los tejidos (11), y hay evidencias que indican que es necesaria la interacción GC-receptor para obtener una respuesta al GC (11,138, 161). Una vez formado, el complejo esteroide-receptor deja el citoplasma y se une en forma reversible a lugares específicos sobre la cromatina del núcleo celular. Esa interacción puede influenciar directa o indirectamente la cantidad o actividad de RNA_m (10). Estos a su vez codifican enzimas u otras proteínas que producen los efectos hormonales observados. Apoyando el hecho de que los GC influyen la síntesis de RNA está la observación de que no se observa respuesta al esteroide cuando se impide la síntesis de RNA.

3.4.3.- Glucocorticoides y AMP_c

Se ha observado que en ciertos casos los GC permiten, facilitan o mimetizan muchas acciones del AMP_c . Estos esteroides tienen un papel permisivo en la glucogenolisis medida por AMP_c en músculo (167) e hígado (68), lipólisis en células grasas (59), inhibición de fibroblasto (131), etc.

En tejido adiposo, hígado y otros tejidos se ha podido determinar que los niveles de fosfodiesterasa (enzimas que inactiva el AMP_c) son altos en animales suprarrenoprivos y disminuyen "in vivo" por los GC (123).

También hay datos que indican un efecto antagónico entre GC y AMP_c . Por ej., en el hígado el AMP_c favorece la glucogenolisis, mientras que los GC aumentan la glucogenesis (§).

3.5.- Metabolismo de los glucocorticoides.

En general, el hígado es el principal responsable de la conversión enzimática de hormonas esteroides, si bien las enzimas que metabolizan esteroides se encuentran en la mayoría de los tejidos (146).

El proceso principal a través del cual los corticoides son inactivados involucra la reducción enzimática de la doble ligadura 4-5 en el anillo A para formar el derivado dihidrosteroides, que generalmente no tiene

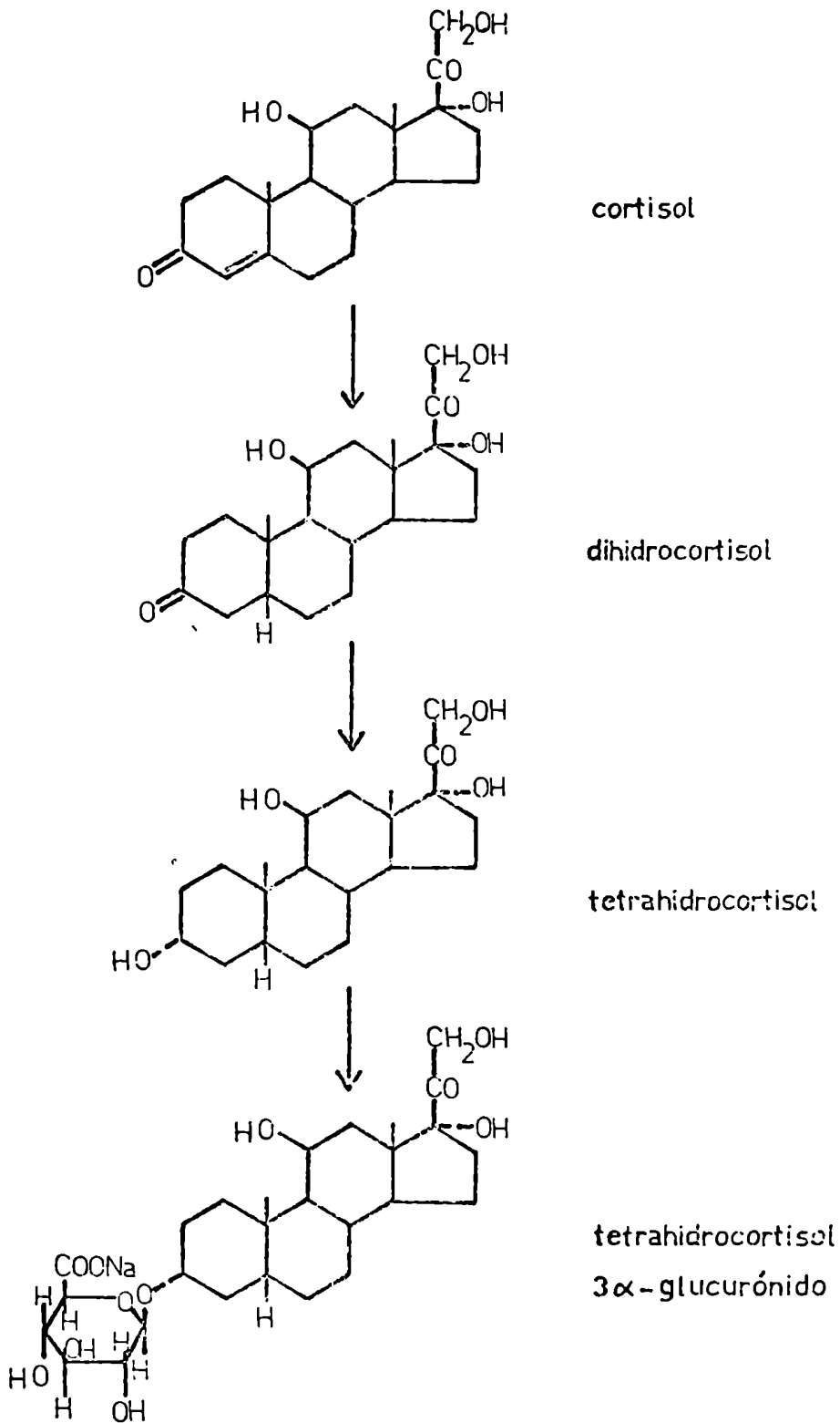


Figura 11). Pasos en el metabolismo de cortisol por el hígado y su excreción por el riñón (126).

actividad biológica. Este derivado es convertido rápidamente en un derivado tetrahidro, y luego éste es conjugado con ácido glucurónico, formando un producto soluble en agua que es rápidamente excretado por los riñones (126) (Fig. 11). Así, por ej., un derivado mayor del cortisol es el tetrahidrocortisol glucurónido, y de la corticosterona es la tetrahidrocorticosterona glucurónido.

Existen otros caminos metabólicos. Uno de ellos involucra una reacción que cliva el enlace 17-20 dando 17-cetosteroides. Esta reacción se limita a los esteroides que tienen grupos 17 α -hidroxí y grupos 20-oxo. El cortisol es uno de tales esteroides, y aproximadamente el 5 % del mismo aparece en orina como 17-cetosteroide (126).

Si bien el hígado es el mayor lugar extrarrenal de metabolismo de corticosteroides, no es el único. Otros tejidos, incluyendo músculo, piel, fibroblastos, intestino y linfocitos, pueden hacerlo (126).

3.6.- Efectos biológicos de los glucocorticoides.

3.6.1.- Generalidades.

Sucesivos estudios demostraron que el efecto de los GC no se debía sólo a acciones directas sobre el hígado, sino que podían ejercer su influencia en prácticamente todos los tejidos (123). De la misma manera, con el correr del tiempo pudo observarse que su acción sobre el metabolismo de los carbohidratos (126) era sólo uno de los tantos y variados efectos. Así, por ej., se sabe ahora que los GC aceleran la ruptura de proteínas; inhiben la captación de aminoácidos y síntesis proteica; suprimen la síntesis y secreción de ACTH; inducen la actividad de varias enzimas; inhiben la captación de glucosa por ciertos tejidos; incrementan la movilización de ácidos grasos "in vivo"; estimulan la lipólisis; en cantidades suprafisiológicas inhiben las reacciones inflamatorias y alérgicas (123,126). Es variado también su mecanismo de acción, observándose diferencias de acuerdo a la dosis y tejido estudiados (9,10,11,124,138,161,194).

3.6.2.- Relación con las prostaglandinas.

En el punto 2.3. se mencionó que diferentes estímulos, ya sea fisiológicos o no-fisiológicos (76, 122, 149), activan la fosfolipasa A_2 , desencadenando la síntesis de PGs (Fig. 12a)

Vane y col. consideraron la posibilidad de que el mecanismo de acción de drogas anti-inflamatorias no-esteroides del tipo de la aspirina e indometacina involucrara la inhibición de la síntesis de PGs, hecho que fue demostrado en distintos trabajos (60, 175, 187). En éstos se menciona también que la hidrocortisona (HC) (2 - 100 $\mu\text{g/ml}$) fue ineficaz, lo cual indicaba una posible diferencia en el mecanismo de acción de dichos anti-inflamatorios. Vane (187) postuló entonces que la aspirina (A) e indometacina (Indo) podían estar compitiendo con el ácido araquidónico (AA) por el sitio activo de la enzima, probablemente por contener un grupo ácido (Fig. 12b). Esto explicaría también el hecho de que la HC, anti-inflamatorio de tipo diferente, tuviera poco o ningún efecto sobre la(s) enzima(s) sintetizadora(s) de PGs.

En el año 1972, Flower y col. (67), trabajando con homogenatos de hongo, observaron que la indometacina inhibía la síntesis de PGs a partir de AA exógeno, mientras que potentes anti-inflamatorios esteroides como dexametasona, triamcinolona acetónida e HC tuvieron poco o ningún efecto. Ellos consideraron que la relativa inactividad de dichos esteroides en homogenatos con prostaglandina-sintetasa no significaba necesariamente que su mecanismo de acción estuviera completamente divorciado de la formación de PGs, sino que tal vez estuvieran interfiriendo con el transporte o liberación de precursores.

Años más tarde, Lewis y Piper observaron que la infusión arterial de ACTH producía la lipólisis en el tejido graso epigástrico, y que esto era acompañado de formación de PGE_2 en el tejido graso, y dilatación de los vasos sanguíneos. Si inmediatamente antes de la infusión de ACTH se inyectaba HC (2 nmol. min^{-1} a 2 $\mu\text{mol. min}^{-1}$), se reducía o bloqueaba la vasodilatación (125). Por distintos estudios descartaron que la HC inhibiera la vasodilatación impidiendo la lipólisis; antagonizando la ac-

ción de PGs; o evitando su formación (125). Pensaron que, dado que los corticoides inhibían la vasodilatación sin afectar la formación de PGs en el tejido, probablemente lo hacían evitando la liberación de PGs de las células grasas, impidiendo así su acción sobre los vasos sanguíneos. Propusieron entonces su "hipótesis de la inhibición del transporte activo", en la cual postulan que los corticosteroides se unen a la membrana celular e impiden el transporte trans-membrana de PGs desde el interior al exterior de la célula. La formación de PGs no es inhibida por los corticosteroides, y por lo tanto éstas se acumulan dentro de la célula (Fig. 12c.) Por su parte Gryglewsky y col. (85), trabajando en preparación vascular de mesenterio de conejo, observan que una infusión de norepinefrina (NE) (1-3 $\mu\text{g/ml/min}$) da por resultado un aumento en la presión de perfusión, lo que se asoció con la liberación de sustancias tipo PGE. La indometacina (3 $\mu\text{g/ml}$) inhibió ese efecto de NE, al igual que HC (10-30 $\mu\text{g/ml}$) y dexametasona (2-5 $\mu\text{g/ml}$). El efecto de ambos corticosteroides fue revertido con AA exógeno (0,2 $\mu\text{g/ml}$), mientras que no restauró la inhibición producida por indometacina. En base a estos resultados, los autores postularon su "hipótesis de la fosfolipasa" (83) (Fig. 12d), en la cual sugieren que los corticoides inhiben la síntesis de PGs debido a sus propiedades estabilizadoras de membrana, evitando la liberación de fosfolipasa de los lisosomas, interfiriendo con su activación o impidiendo el clivaje enzimático de los fosfolípidos de membrana. De este modo disminuye la disponibilidad de sustrato para la ciclo-oxigenasa y resulta inhibida la síntesis y liberación de PGs.

Comparando ambas hipótesis, se puede deducir que en el primer caso, como consecuencia de que los corticoides impiden la liberación de PGs sintetizadas en la célula, aumenta el contenido intracelular de las mismas y disminuye la cantidad liberada al exterior; el efecto no es revertido por AA exógeno. En el segundo caso, dado que los corticoides disminuyen la disponibilidad de sustrato para la síntesis de PGs, éstas se encuentran en menor cantidad tanto en el interior como en el exterior de la célula; este efecto puede revertirse con AA exógeno.

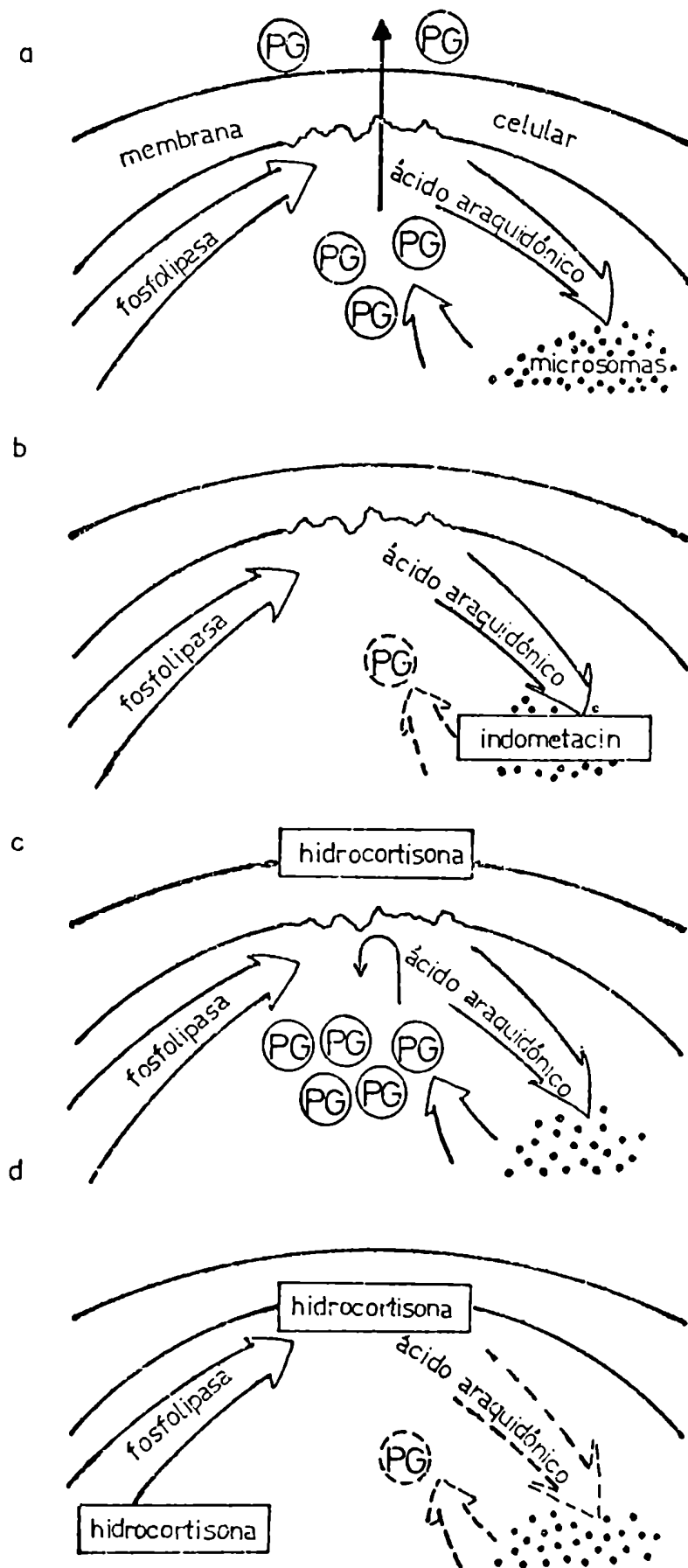


Figura 12. Mecanismo de acción de anti-inflamatorios esteroideos y no-esteroideos (83).

Posteriormente, Danon y Assouline (48), trabajando con papilas renales de rata observaron que "in vitro" la HC disminuía la liberación de PGE, y que dicho efecto podía ser revertido preincubando el tejido con Actinomicina D (0,5 μ g/ml) o Cicloeximida (1 μ g/ml). Como la Actinomicina D es un antibiótico que inhibe la síntesis de RNA, en tanto que la Cicloeximida impide la síntesis proteica, los autores postularon que para que el corticoide pudiera actuar necesitaba de la síntesis proteica. Los mismos resultados fueron obtenidos por Di Rosa y col. trabajando con leucocitos de rata (52).

Finalmente, Flower, Bleckwell y col. (22, 66) lograron aislar un polipéptido intracelular de PM aproximado 15.000 al que denominaron "macrocortina", cuya síntesis y liberación era estimulada por los glucocorticoides anti-inflamatorios. Observaron que dicho polipéptido actuaba como anti-fosfolipasa A_2 , inhibiendo la actividad de esta enzima, de modo tal que los ácidos grasos no pueden ser liberados de la membrana celular y por lo tanto no hay provisión de sustrato para la síntesis de PGs.

CAPITULO II
MATERIAL Y METODOS

1.- Animal utilizado.

En los experimentos realizados se emplearon ratas hembras multíparas variedad Wistar, cuyo peso oscilaba entre los 200 y 250 g, a quienes se practicó ovariectomía bilateral 20 días antes del sacrificio.

Para la intervención quirúrgica cada animal fue anestesiado con éter sulfúrico técnico. Luego se practicó una incisión longitudinal medio-lateral de aproximadamente 3 cm, desde la base de las costillas hacia abajo. Separados la piel y el músculo, se ubicó el ovario y el extremo uterino proximal a éste. Se ligó con hilo de cirugía a unos 5 mm de dicho extremo y se cortó el cuerno, extrayendo así el ovario y el oviducto. Finalmente se suturaron el tejido muscular y la piel. Se practicó la misma operación en el flanco opuesto del animal, para extraer el ovario restante.

Las ratas eran mantenidas 20 días con alimento Purina y agua "ad libitum", siendo el ritmo del vivero 14-10 hs luz-oscuridad respectivamente, a temperatura y humedad constantes.

2.- Preparación tisular.

Una vez concluido el período de preparación, cada animal fue sacrificado por decapitación con guillotina. Para extraer el útero se practicó una incisión longitudinal medio-ventral, y una vez separadas la piel y el músculo, se rechazaron las asas intestinales, dejando al descubierto los cuernos uterinos. Ubicado el cérvix, por detrás de la vejiga, se lo cortó de la vagina con tijera, y se sostuvo el útero con una pinza aplicada en la unión de los cuernos. Separados éstos, se los colocó inmediatamente en una cápsula de Petri con medio Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB), burbujeado con carbógeno, a temperatura ambiente. Se cortó cada cuerno por el extremo cervical y por el extremo distal al cervix, para eliminar, en este último caso, el tejido suturado. Luego se diseccionó completamente cada cuerno extrayendo así todo resto de tejido extraño. Se lo abrió longitudinalmen-

te siguiendo la línea del mesometrio. Finalmente se cortaron trozos transversales de útero de aproximadamente 3-4 mm de longitud, que fueron cosidos por los extremos con hilo y aguja. El tejido se colocó en la cámara tisular, sujetándolo a un soporte como se describirá luego, inmerso en solución KRB burbujeado con carbógeno, a 37°C y pH 7,4.

3.- Instrumental y equipos empleados.

Para registrar la actividad contráctil del útero aislado de rata ovariectomizada se contó con el siguiente equipo:

Baño exterior: para el control térmico de la cámara tisular se empleó una bomba de circulación Edmund Bühler UKT 2, termostatzada a 37°C, que bombeaba agua hacia la cámara tisular, en donde circulaba por el espacio comprendido entre sus dos paredes. De esta manera, la temperatura del medio de incubación se mantenía en 37°C (Fig. 13).

Cámara tisular: consta de una cámara de vidrio de doble pared, cerrada en la base. El espacio existente entre sus dos paredes presenta una boca inferior y otra superior para la entrada y salida del agua del baño exterior, respectivamente. En esta cámara se introduce un cable de plástico (burbujeador) que, conectado a una fuente de carbógeno, permite la oxigenación del tejido durante el experimento. (Fig. 13: 5)

Soporte tisular: consta de un tubo de vidrio en forma de "J". El extremo inferior está perforado para permitir el paso del hilo que fija el tejido. Este soporte se coloca dentro de la cámara tisular. (Fig. 13: 4)

Transductor: el trozo de tejido ya fijado al soporte tisular por el extremo inferior, se conecta con hilo por su extremo superior a un transductor. Este es capaz de transformar la actividad mecánica del tejido en una señal eléctrica. El circuito del transductor puede ser calibrado con pesos de valor conocido, que siendo capaces de deflexionar la pluma inscriptora del registrador permiten evaluar comparativamente la magnitud de la tensión contráctil desarrollada por el músculo. (Fig. 13: 1)

En los experimentos realizados se emplearon transductores Statham o TMI BLH. Adjunto a la cámara y unido al transductor se encuentra un dispo-

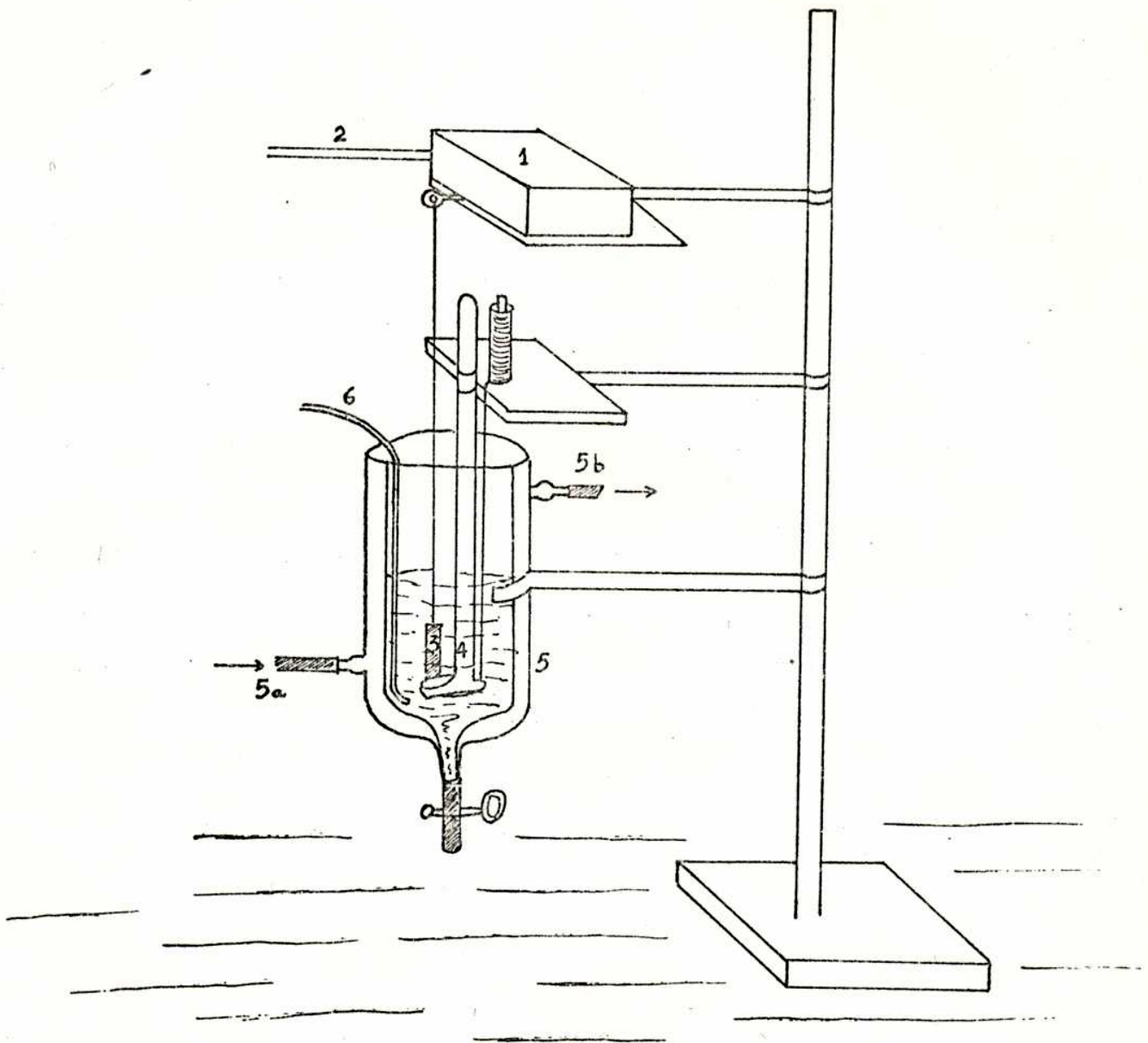


Figura 13. 1: transductor.

- 2: cable conectando el transductor con el sistema amplificador- polígrafo.
- 3: tejido.
- 4: soporte tisular.
- 5: cámara tisular; 5a: boca de entrada del agua de perfusión;
5b: boca de salida.
- 6: burbujeador.

sitivo micrométrico que se emplea para ajustar y controlar adecuadamente la tensión basal externa que se aplica al preparado muscular. El avance del dispositivo micrométrico tracciona sobre el hilo unido al extremo superior del tejido, comunicándole a éste una tensión registrable por el aparato inscriptor.

Sistema amplificador-inscriptor: la salida del transductor se conecta con un amplificador San-EI, que se comunica con un inscriptor Rectigraph 8S San-EI, de modo de registrar en forma inmediata y continua las curvas producidas por la actividad mecánica del tejido.

4.- Composición de la solución de perfusión tisular.

Como medio de incubación del tejido se utilizó una solución de Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB). A continuación se detalla la molaridad correspondiente a los distintos iones (74):

Na ⁺	145,00 mM
K ⁺	6,00 mM
Ca ²⁺	2,00 mM
Mg ²⁺	1,33 mM
Cl ⁻	126,00 mM
HCO ₃ ⁻	25,30 mM
SO ₄ ²⁻	1,33 mM
PO ₄ ³⁻	1,20 mM
glucosa	11,00 mM

El pH de la solución se mantuvo ajustado en un valor de 7,4 por un gasado con carbógeno (95 % de O₂ y 5 % de CO₂), a flujo constante.

La temperatura del medio nutriente fue estabilizada en 37° C durante todos los experimentos, con el sistema ya descrito.

5.- Procedimiento experimental.

Una vez montado el tejido en la cámara tisular se le aplicó una tensión basal de 500 mg, luego de lo cual se registró su actividad contráctil por un período de setenta minutos, considerándose los diez primeros como control interno de dicha actividad, y los 60 últimos como período experi-

mental. La hora de experimentación fue analizada en períodos de diez minutos, y las variaciones observadas se expresaron como porcentaje de cambio respecto de los 10 primeros minutos control, que fueron considerados como el 100 % de actividad.

En las series experimentales en las que se estudió el efecto de los corticoides y/o ácidos grasos, etanol, indometacina y ácido acetil salicílico la droga analizada fue agregada al medio de incubación dentro de los 10 primeros minutos del montaje, inmediatamente después del control.

Cuando se analizó la influencia de la corticosterona y/o Sotalol, el tejido fue preincubado 20 minutos en presencia de Sotalol, y luego se lo montó en la cámara tisular conteniendo Sotalol y/o corticosterona.

Para valorar la actividad contráctil del útero de rata ovariectomizada de 20 días se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- 1) Frecuencia (F): como número de contracciones en 10 minutos.
- 2) Tensión Contráctil Isométrica(TCI): medida desde el nivel de tensión de reposo hasta el punto de mayor tensión desarrollada (tensión pico). Se consideró la TCI promedio de las contracciones registradas en 10 minutos.
- 3) Actividad funcional(AF): producto de la F por la TCI.

En todos los casos, los valores obtenidos se expresaron como porcentaje de cambio respecto de los 10 primeros minutos control, que fueron considerados el 100 % de actividad.

Para expresar los resultados se confeccionaron gráficos indicando en ordenadas el % de cambio del parámetro en estudio, y en abcisas el curso temporal en minutos.

Para estudiar la reactividad del útero aislado de rata ovariectomizada de 20 días frente a distintas PGs y sus metabolitos, se realizaron curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo, en presencia de Indometacina. Dichas curvas se hicieron de acuerdo al procedimiento descrito por van Rossum (185), agregando una dosis cada 2 minutos. La preincubación con Indometacina tiene por objeto inhibir la síntesis endógena de PGs (y por ende la actividad contráctil del tejido), de modo de analizar sólo la rea-

puesta del útero a cantidades conocidas de PGs exógenas. Se valoró entonces la TCI en mg desarrollada por el tejido frente a las distintas concentraciones de PGs. Los resultados se graficaron indicando en la ordenada la tensión desarrollada en mg, y en la abscisa el logaritmo negativo de la concentración molar, tal como se observará en las Fig. 29, 30 del capítulo "Resultados".

6.- Dosaje de prostaglandinas.

Para cuantificar la cantidad de PGs liberadas por el útero, se recogió el medio luego de incubar el tejido durante 60 min con y sin $1 \mu\text{g/ml}$ de corticosterona. El medio se retiró y se guardó a -20°C para la subsecuente extracción de PGs. Las preparaciones tisulares se secaron durante 48 hs a 60°C y se pesaron.

Para extraer las PGs, los medios se descongelaron, se acidificaron a pH 3 con HCl 1 M y se extrajeron 3 veces con 1 volumen de acetato de etilo. El conjunto de extractos de acetato de etilo se secó en vacío en un evaporador rotatorio a 40°C y el residuo se suspendió en 10 ml de acetato de etilo. La fracción de acetato de etilo se extrajo 3 veces con 10 ml de buffer fosfato de K, pH 8, y los extractos acuosos combinados se acidificaron a pH 3 con HCl 1 M. Los lípidos acídicos se extrajeron luego 3 veces con 1 volumen de cloroformo. Las fases de cloroformo se llevaron a sequedad en vacío a 40°C . El residuo fue resuspendido en cloroformo-metanol (4:1 v/v) y se sembró en placas para cromatografía en capa delgada cubiertas con sílica gel G. Las placas se corrieron en el sistema solvente cloroformo-metanol-ácido acético-agua (90:9:1:0,65 v/v). Paralelamente se corrieron placas con standards de sal de trometamina de PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ auténticas.

Las posiciones de las PGs auténticas se visualizaron rociando las placas secas con ácido fosfomolibdico en etanol seguido por calentamiento a 70°C durante 15 min; los valores de Rf para PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ fueron 0,61 y 0,42 respectivamente. En las placas con las muestras, las zonas correspondientes a los valores de Rf de los standards se resperon, elu-

veron con cloroformo-metanol y llevaron a sequedad bajo vacío.

La actividad tipo PG fue estimada por el procedimiento de bioensayo descrito por Vane' (1966). Los eluidos cromatográficos recogidos con 0,2 ml de KRB se probaron sobre trozos de estómago y colon de ratas superfundidos con una solución de KRB conteniendo una mezcla que los volvió insensibles a acetilcolina, serotonina, catecolaminas e histamina (69). Se agregó indometacina (1 $\mu\text{g/ml}$) para evitar la formación de PGs endógenas.

Las contracciones de los músculos del fondo estomacal y colon se midieron con un transductor de fuerza isométrica y se registraron en un polígrafo inscriptor. Los ensayos de cierre se llevaron a cabo usando PGE_2 o $\text{PGF}_{2\alpha}$ como standards y la actividad tipo PG se expresó como equivalentes de PGE_2 o $\text{PGF}_{2\alpha}$ (ng/mg peso seco del tejido). Todos los valores de bioensayo fueron corregidos por la pérdida de extracción y cromatografía en capa delgada, determinados por standards paralelos. La recuperación osciló entre el 40 y 50 %. El coeficiente de variación interensayo fue menor del 10 %.

7.- Compuestos químicos utilizados.

Las concentraciones finales expresadas en $\mu\text{g/ml}$ y M se refieren a las obtenidas en el baño de incubación (conteniendo 20 ml de KRB). La hidrocortisona., el ácido araquidónico (sal sódica), el ácido acetil salicílico y el Sotalol se prepararon con agua destilada. La indometacina fue disuelta en buffer fosfato de sodio. (pH 8). En todos estos casos el máximo volumen incorporado al medio nutriente fue de 0.2 ml.

Los demás compuestos se solubilizaron en etanol, en cuyo caso, el volumen incorporado al medio nutriente osciló entre 1 y 4 μl (concentración final: 20 - 80 $\mu\text{g/ml}$). Dicha dosis de solvente no afectó la actividad contráctil espontánea uterina, tal como se demuestra en el capítulo correspondiente a Resultados.

	Concentración final	
	$\mu\text{g/ml}$	M
Hemisuccinato de hidrocortisona (Pfizer)	20	4×10^{-5}
	40	8×10^{-5}
Corticoesterona (Sigma)	0,4	$1,1 \times 10^{-6}$
	1	$2,9 \times 10^{-6}$
Acido araquidónico (sal sódica) (Sigma)	1	$3,1 \times 10^{-6}$
	2	$6,2 \times 10^{-6}$
Acido araquidónico (Sigma)	1	$3,3 \times 10^{-6}$
	2	$6,6 \times 10^{-6}$
Acido linoleico (Sigma)	1	$3,3 \times 10^{-6}$
	2	$6,6 \times 10^{-6}$
Acido γ -linolénico (Sigma)	1	$3,6 \times 10^{-6}$
	2	$7,2 \times 10^{-6}$
Indometacina (Merck, Sharp y Dohme)	5	$1,3 \times 10^{-5}$
Sotalol (Mead Jhon)	272	1×10^{-3}
Acido acetil salicílico (Sigma)	40	$1,8 \times 10^{-4}$

Para las curvas dosis-respuesta se emplearon las siguientes prostaglandinas y metabolitos: PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, 15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$, 13,14-diol-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 y 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (Upjohn Co.). En todos los casos, con excepción de la PGI_2 (que fue disuelta en buffer Tris pH 9) se partió de una solución madre 10^{-4} M, preparada con bicarbonato. Luego se hicieron sucesivas diluciones 1:9 (v/v) en buffer KRB. El volumen incorporado al medio nutriente en cada caso fue de 0,2 ml. Las concentraciones finales de las distintas PGs y sus metabolitos estuvieron en el rango de 10^{-9} M a 10^{-4} M.

B.- Método estadístico.

El efecto de los corticoides, los ácidos grasos, el Sotalol, la indometacina, el ácido acetil salicílico y el solvente (etanol) sobre la motilidad espontánea del útero de rata ovariectomizada de 20 días fue analizada según el test de Dunnet, considerándose significativa la diferencia para $p \leq 0,05$ (40).

La interacción de los ácidos grasos o del Sotalol con la corticosteroona fue estudiada según el análisis factorial para las comparaciones múltiples (128), considerándose significativas las diferencias para $p \leq 0,05$.

Las modificaciones en el dosaje de PGs fueron analizadas según el test t de Student, empleando las tablas dadas por Fisher y Yates (61). Las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas cuando $p \leq 0,05$.

CAPITULO III

RESULTADOS

1.- Características contráctiles, y respuestas fisiológicas y farmacológicas del útero aislado de rata ovariectomizada de 20 días.

1.1.- Actividad espontánea del útero.

Se analizó la estabilidad en el tiempo de la actividad contráctil del útero aislado de rata ovariectomizada (OV) de 20 días. Los resultados se expresaron como porcentaje de cambio de cada intervalo de 10 minutos con respecto al registro control considerado como 100 %, siendo éste los primeros 10 min del montaje. Luego se confeccionaron gráficos indicando en las ordenadas el % de cambio del parámetro en cuestión, y en abscisas el curso temporal en minutos.

Tal como se indica en la Fig. 14 a, la Actividad Funcional (AF) sufrió un decremento progresivo a lo largo del tiempo de experimentación alcanzando la disminución máxima a los 60 min, con un valor de -46 ± 5 (valor medio \pm error standard de la media).

Estudiando individualmente los factores responsables de la AF, es decir, Frecuencia (F) y Tensión Contráctil Isométrica (TCI), se comprobó que el decremento de la AF era causado tanto por una disminución en la TCI (-16 ± 6 a los 60 min) como en la F (-35 ± 5), siendo significativamente mayor el decremento de la F (Fig. 14 b y c)

1.2.- Influencia del solvente sobre la actividad espontánea del útero.

1.2.1.- Efecto del etanol.

La corticosterona, el ácido araquidónico, el ácido linoleico y el ácido γ -linolénico fueron disueltos en etanol. En cada caso, el volumen de solvente incorporado al medio nutriente osciló entre 1 y 4 μ l (concentración final en el baño tisular: 20 - 80 μ g/ml).

Con el objeto de descartar un efecto per se del etanol, se estudió su influencia sobre la actividad espontánea del útero.

En la Fig. 15 puede observarse que ninguna de las concentraciones finales de solvente obtenidas (20 y 80 μ g/ml) modificó la AF del útero

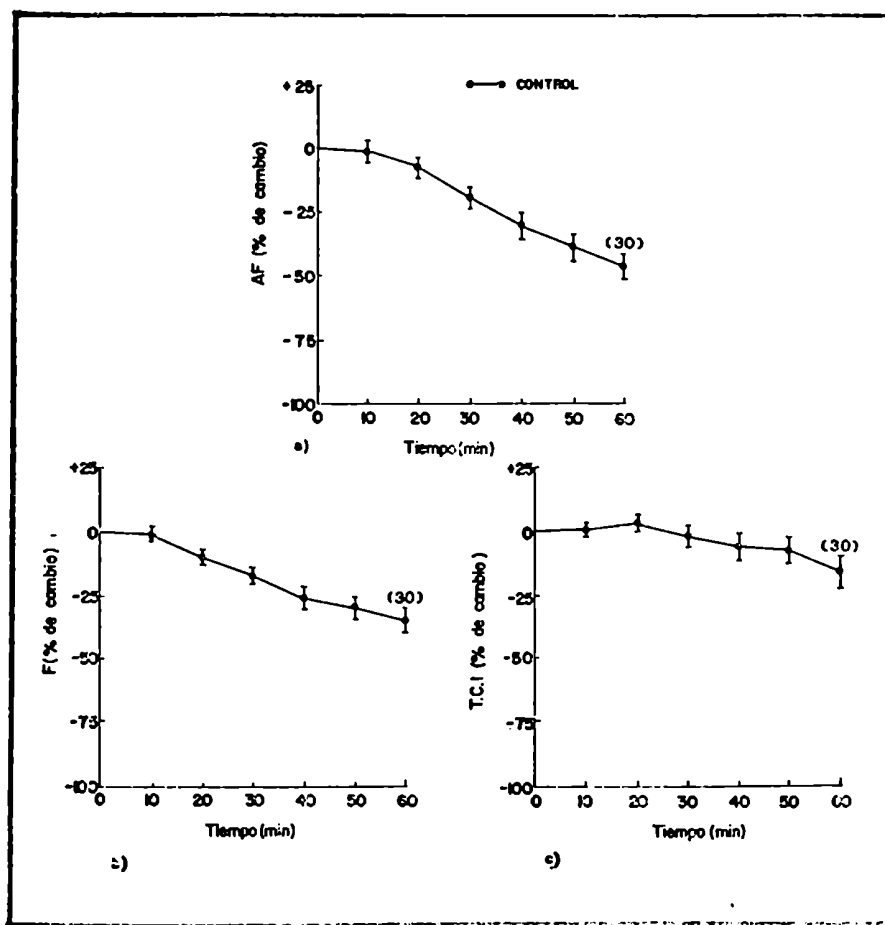


Fig. 14: Actividad contráctil espontánea del útero aislado. ORDENADAS: porcentaje de cambio del parámetro en estudio. ABCISAS: tiempo en minutos. Cada punto de las curvas representa los valores medios del número de preparaciones indicado por la cifra entre paréntesis. Las barras verticales indican el ESM (error standard de la media). AF: Actividad Funcional; F: Frecuencia; T.C.I.: Tensión Contráctil Isométrica. *: $p \leq 0,05$ versus control.

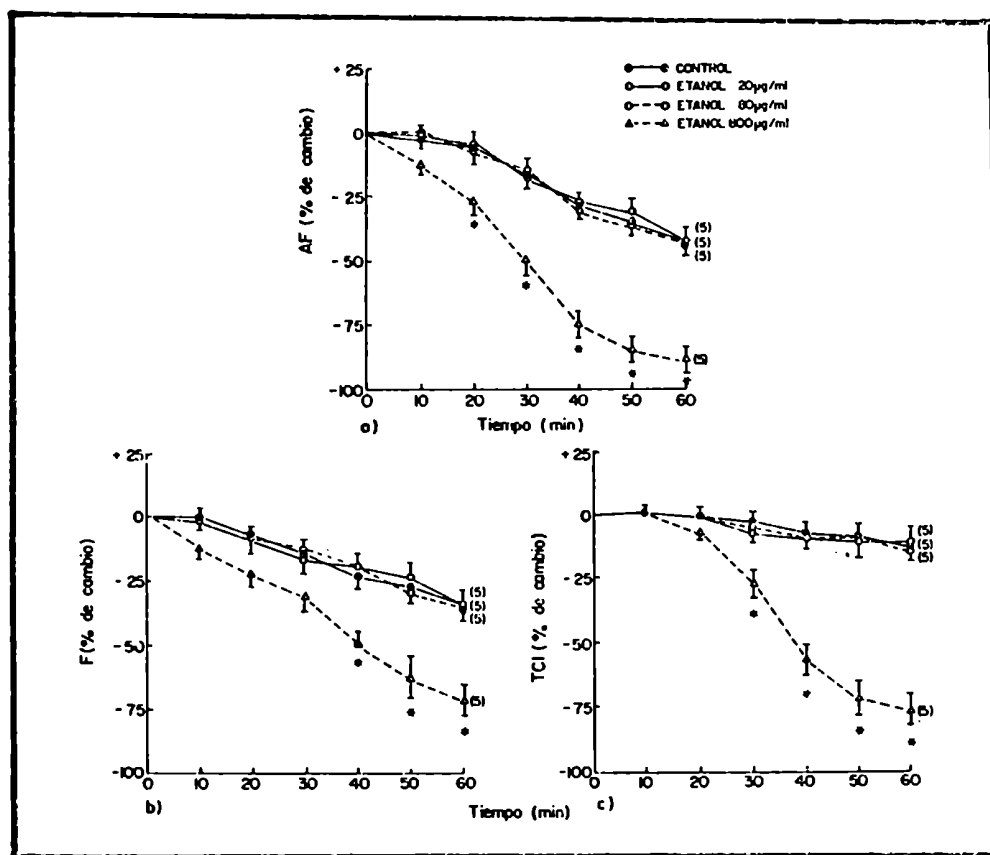


Fig. 15: Influencia del etanol sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado. Otras aclaraciones como en Fig. 14

aislado, hecho corroborado con el análisis independiente de la F y de la TCI.

La máxima concentración final de etanol (80 $\mu\text{g/ml}$) es 10 veces menor que la necesaria para deprimir significativamente la contractilidad espontánea del tejido, es decir, 800 $\mu\text{g/ml}$. En este caso se observa una progresiva y significativa disminución de la AF, llegando a un valor de $- 89 \pm 4$ a los 60 min. Esta inhibición de la contractilidad se debe a un decremento tanto de la F ($- 72 \pm 6$ a los 60 min) como de la TCI (-77 ± 7).

1.3.- Influencia de los corticoides sobre la actividad espontánea del útero.

1.3.1.- Efecto de corticosterona (CC)

En este modelo experimental se estudiaron los efectos de distintas dosis de CC sobre la actividad espontánea del útero de rata OV de 20 días. Las dosis empleadas fueron 0,4 y 1 $\mu\text{g/ml}$, que se incorporaron al medio de incubación a los 10 min del montaje.

Como se indica en la Fig. 16 a, ambas dosis deprimieron significativamente la AF, respecto de la AF control, observándose que la depresión producida por 0,4 $\mu\text{g/ml}$ fue significativa a partir de los 50 min, en tanto que con 1 $\mu\text{g/ml}$ lo fue desde los 30 min, alcanzándose una inhibición máxima de -71 ± 9 y $- 73 \pm 8$ respectivamente a los 60 min.

En la Fig. 16 b puede notarse que ambas dosis deprimieron significativamente la F a partir de los 30 min, con respecto al control sin tratar, no existiendo diferencias entre los valores obtenidos con 0,4 y 1 $\mu\text{g/ml}$ (-64 ± 6 y -64 ± 10 respectivamente).

En cuanto a la TCI (Fig. 16 c), ésta no fue modificada por 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de CC, pero 1 $\mu\text{g/ml}$ la deprimió de manera significativa a los 50 y 60 min (-52 ± 5 a los 60 min).

El análisis de la Fig. 16 revela que la disminución de AF producida por la CC se debe predominantemente a un efecto sobre la F (Fig. 18).

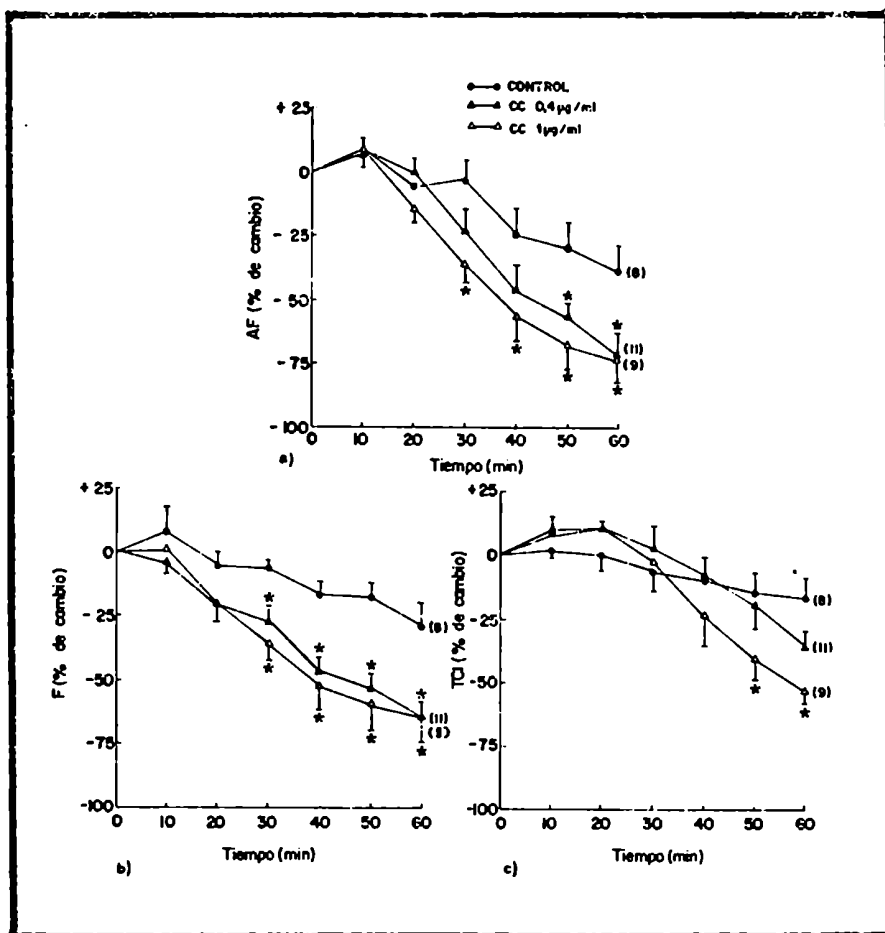


Fig. 16: Influencia de la corticosterona (CC) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado. Otras aclaraciones como en Fig. 14.

1.3.2.- Efecto de hidrocortisona (HC)

Para estudiar la respuesta a HC del útero de rata OV de 20 días se emplearon las dosis de 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$.

Tal como se indica en la Fig. 17 a, la AF fue deprimida significativamente de modo semejante con las dos concentraciones a partir de los 50 min (-76 ± 7 y -74 ± 6 a los 60 min respectivamente).

El análisis de la F (Fig. 17 b) indica que sólo la dosis de 40 $\mu\text{g/ml}$ de HC logró afectarla a los 60 min (-56 ± 8). En cambio, la TCI (Fig. 17c) disminuyó en forma significativa respecto de la TCI control con ambas dosis de HC a partir de los 50 min (-50 ± 11 y -51 ± 10 a los 60 min) (Fig. 18).

A diferencia de lo que ocurre con la CC, la HC deprime la AF por acción especialmente sobre la TCI.

Comparando el efecto de ambos corticoides puede deducirse que la CC es un inhibidor más potente que la HC, ya que dosis menores de CC produjeron una inhibición semejante a la obtenida con dosis mayores de HC.

Se observa también que la acción depresora de los corticoides sobre la motilidad espontánea del útero no es un efecto rápido, sino que se produce a partir de los 30 minutos de agregada la droga.

1.4.- Influencia de los ácidos grasos sobre la actividad espontánea del útero.

En el punto 1.3 pudo observarse que tanto la corticosterona como la hidrocortisona deprimieron significativamente la AF del útero de rata ovariectomizada de 20 días, siendo más potente la CC.

Dado que la motilidad del útero de rata ovariectomizada de 20 días depende de las prostaglandinas (PGs) endógenas (76, 78, 127), y que en la bibliografía se presentan datos que hablarían a favor de un papel inhibidor de los corticoides sobre la síntesis o liberación de las mismas, se trató de determinar su posible mecanismo de acción en este modelo experimental. Tal como se indicara en el punto 3.6.2., si los corticoides inhiben la liberación de PGs al medio de incubación por acción estabili-

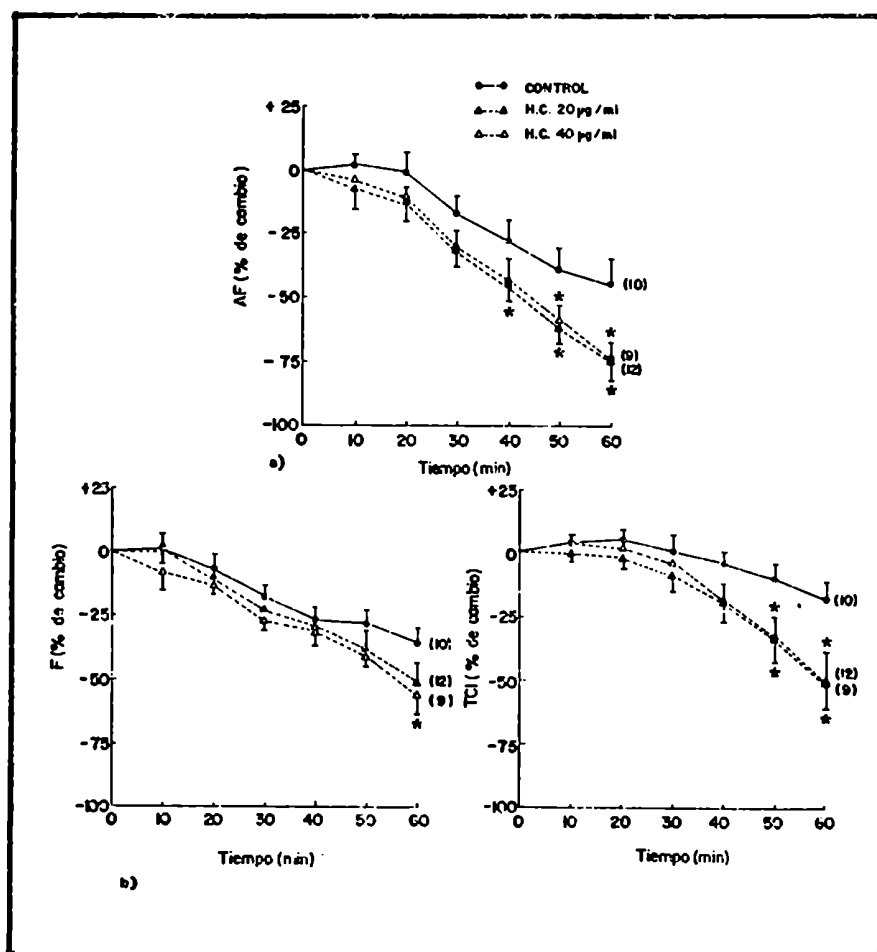


Fig. 17: Influencia de hidrocortisona (HC) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado. Otras aclaraciones como en Fig. 14.

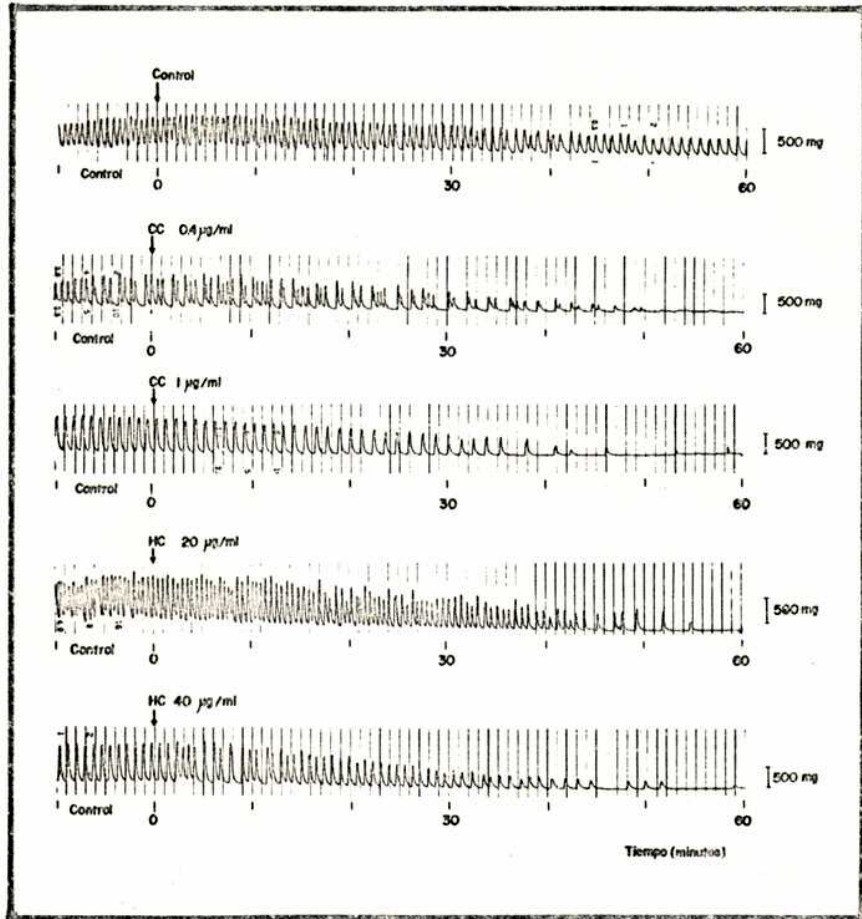


Fig. 18: Registros originales de la actividad contráctil uterina control; en presencia de corticosterona (CC) o de hidrocortisona (HC).

zadora de la membrana celular, el efecto no es revertido por el agregado de ácidos grasos precursores al tejido (125). En cambio, si los corticoides impiden la liberación de la membrana celular de ácidos grasos precursores de PGs tales como araquidónico, linoleico o dihomo- γ -linoléico, el mecanismo puede activarse nuevamente por el agregado de dicho ácido (83).

Con el fin de dilucidar la relación existente entre los corticoides y las prostaglandinas en este modelo experimental, se analizó el efecto que producía el agregado de corticosterona al medio de incubación conteniendo distintos ácidos grasos precursores de PGs. Paralelamente se hicieron estudios para descartar un efecto "per se" del ácido graso correspondiente como se indica a continuación.

1.4.1.- Efecto del ácido araquidónico y araquidonato de sodio.

Se emplearon dos dosis de ácido araquidónico (AA): 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$, que fueron agregadas en sendos experimentos al baño de incubación dentro de los 10 primeros minutos de montaje, y se estudió su efecto durante los siguientes 60 min.

Tal como se indica en la Fig. 19 a, ninguna de las dosis empleadas afectó en forma significativa la AF del tejido (-47 ± 11 y -58 ± 6 a los 60 min), comparándola con la AF control (-45 ± 10)

El análisis independiente de la F y de la TCI indica que dicha falta de efecto se debió a que ninguno de estos parámetros fue afectado por el agregado de 1 ó 2 $\mu\text{g/ml}$ de AA (F: control: -36 ± 6 ; AA 1 $\mu\text{g/ml}$: -42 ± 10 ; AA 2 $\mu\text{g/ml}$: -49 ± 8 . TCI: control: -17 ± 8 ; AA 1 $\mu\text{g/ml}$: -23 ± 11 ; AA 2 $\mu\text{g/ml}$: -27 ± 11 a los 60 min) (Fig. 19 b y c).

Los experimentos fueron repetidos con araquidonato de sodio, obteniéndose los mismos resultados.

1.4.2.- Efecto del ácido linoleico (AL)

Al igual que en el tratamiento anterior, en este esquema experimental se emplearon dos dosis de ácido graso: 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$, tratándose en este caso del ácido linoleico.

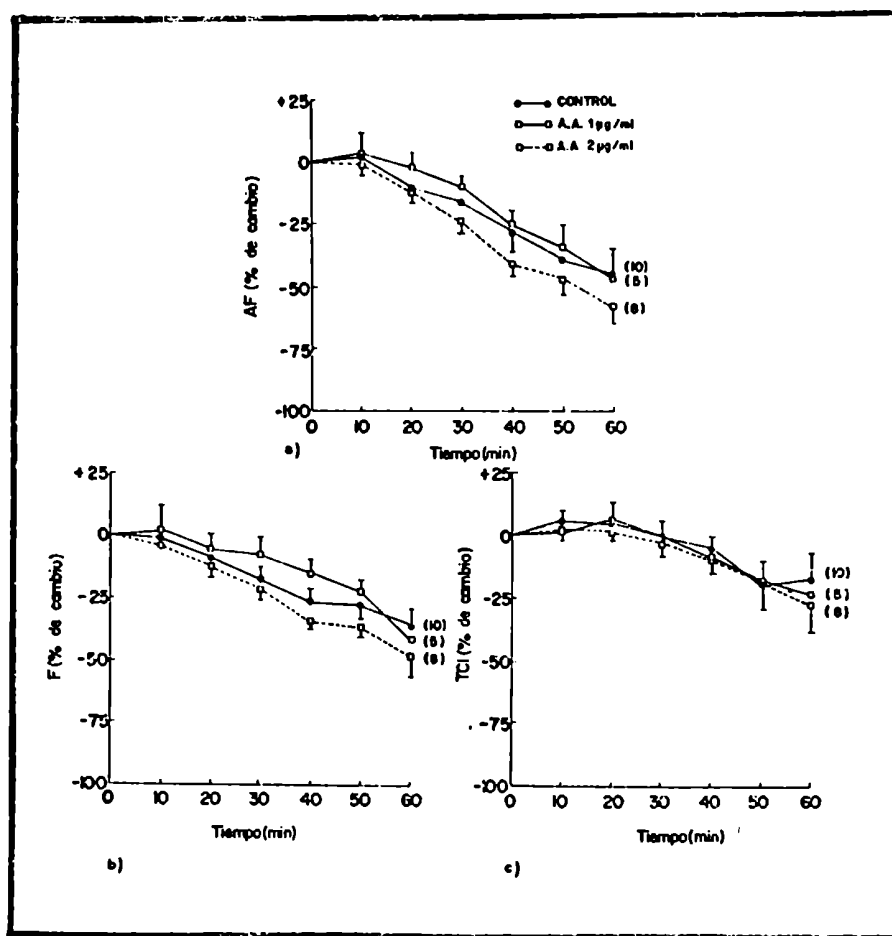


Fig. 19: Influencia de ácido araquidónico (AA) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado. Otras aclaraciones como en Fig. 14.

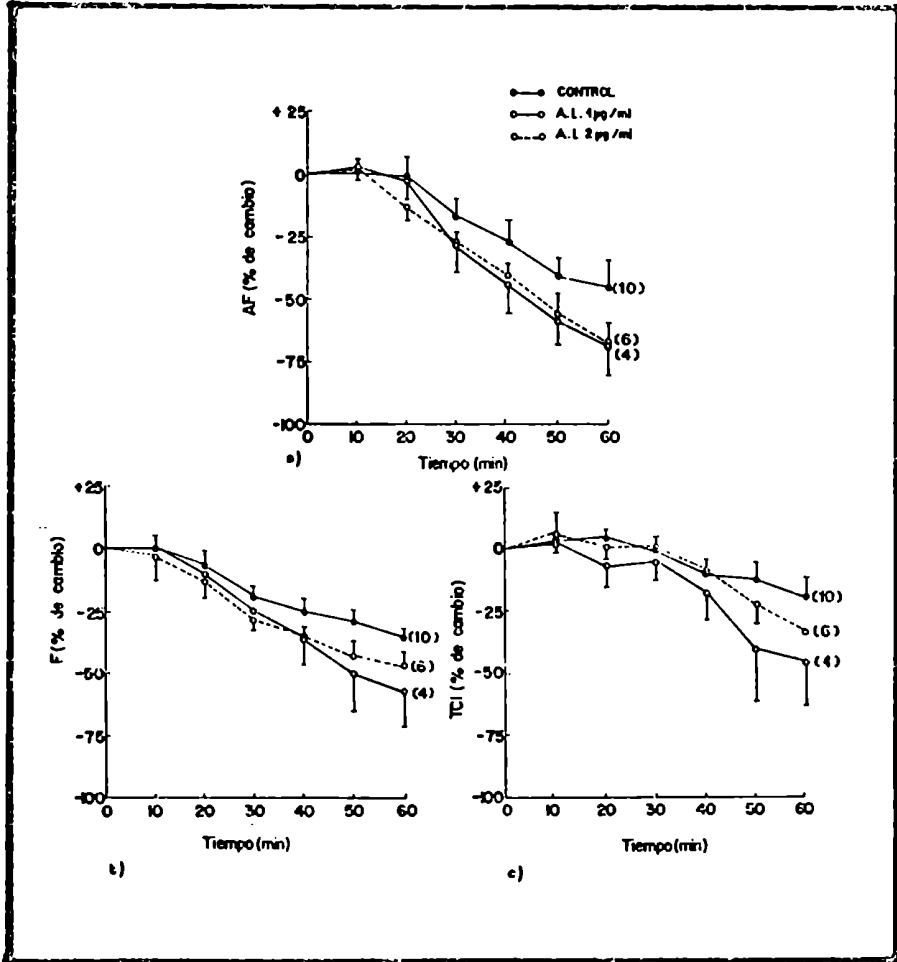


Fig. 20: Influencia de ácido linoleico (AL) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado. Otras aclaraciones como en Fig. 14.

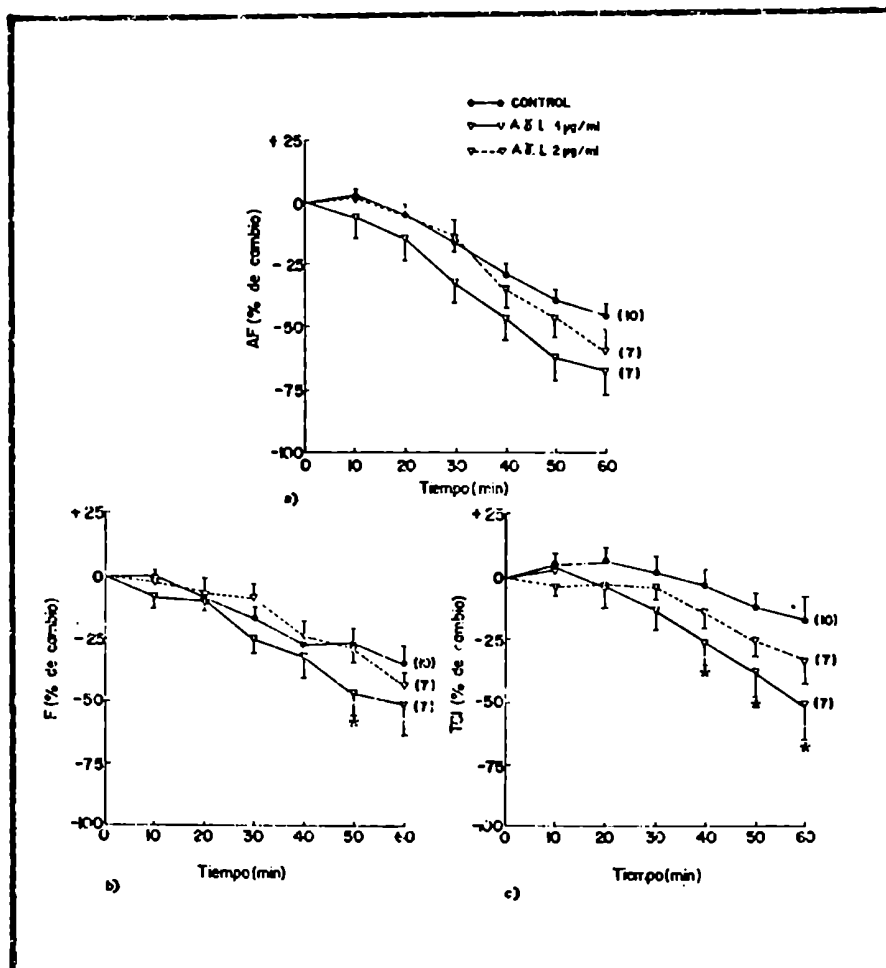


Fig. 21: Influencia de ácido γ -linolénico (A γ L) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado. Otras aclaraciones como en Fig. 14.

Nuevamente se observa que ninguna de las dosis empleadas afectó en forma significativa la AF del útero (control: -44 ± 11 ; AL 1 $\mu\text{g/ml}$: -68 ± 15 ; AL 2 $\mu\text{g/ml}$: -66 ± 8 a los 60 min) (Fig. 20 a).

Esto fue corroborado con el análisis individual de la F (control: -35 ± 3 ; AL 1 $\mu\text{g/ml}$: -57 ± 14 ; AL 2 $\mu\text{g/ml}$: -47 ± 6) y de la TCI (control: -18 ± 8 ; AL 1 $\mu\text{g/ml}$: -44 ± 15 ; AL 2 $\mu\text{g/ml}$: -32 ± 13) (Fig. 20 b y c)

1.4.3.- Efecto del ácido γ -linolénico (A γ L).

Finalmente se estudió el efecto de otro ácido precursor de prostaglandinas: el A γ L, empleándose como dosis experimentales 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$.

Tal como se indica en la Fig. 21 a, la AF del útero de rata OV de 20 días no fue afectada por 1 ni por 2 $\mu\text{g/ml}$ de A γ L (control: -45 ± 5 ; A γ L 1 $\mu\text{g/ml}$: -67 ± 10 ; A γ L 2 $\mu\text{g/ml}$: -59 ± 8 a los 60 min).

Dicha falta de efecto también fue observada en la F (control: -35 ± 7 ; A γ L 1 $\mu\text{g/ml}$: -51 ± 13 ; A γ L 2 $\mu\text{g/ml}$: -44 ± 5) (Fig. 21 b). Sin embargo, el análisis de la TCI reveló que 1 $\mu\text{g/ml}$ de A γ L tuvo efecto depresor (control: -17 ± 9 ; A γ L 1 $\mu\text{g/ml}$: -51 ± 14 ; A γ L 2 $\mu\text{g/ml}$: -33 ± 9) (Fig. 21 c).

1.5.- Influencia de la corticosterona sobre la actividad espontánea del útero preincubado con ácidos grasos.

1.5.1.- Efecto del ácido araquidónico (AA).

En la Fig. 22 se presentan los datos obtenidos al agregar 1 $\mu\text{g/ml}$ de CC al útero preincubado con 1 ó 2 $\mu\text{g/ml}$ de AA.

El análisis factorial de los datos presentados en la Fig. 19 a y 22 a, correspondientes a la AF, nos muestra que la preincubación con AA no modifica el efecto producido por 1 $\mu\text{g/ml}$ de CC (control: -45 ± 10 ; CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -73 ± 5 ; AA 1 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -76 ± 6 ; AA 2 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -71 ± 8 a los 60 min)

El estudio de la F (Fig. 19 b y Fig. 22 b) indica que el AA revierte la depresión de este parámetro (control: -36 ± 6 ; CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -65 ± 10 ; AA 1 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -46 ± 9 ; AA 2 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -52 ± 7), ab-

servándose una interacción significativa a partir de los 40 min ($p \leq 0,05$), así como también que dicha interacción es mayor con 1 $\mu\text{g/ml}$ de AA que con 2 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0,05$)

La depresión de la TCI, en cambio, no es afectada por la preincubación con el ácido graso (control: -17 ± 8 ; CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -56 ± 8 ; AA 1 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -60 ± 9 ; AA 2 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -47 ± 12) (Fig. 19 c y Fig. 22 c) (Fig. 25).

1.5.2.- Efecto del ácido linoleico (AL).

Observamos ahora que 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ de AL fueron ineficaces para restaurar la depresión de AF producida por 1 $\mu\text{g/ml}$ de CC, tal como se deduce del análisis factorial de los datos presentados en las Figs. 20 a y 23 a) (control: -44 ± 11 ; CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -76 ± 6 ; AL 1 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -72 ± 7 ; AL 2 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -80 ± 6 a los 60 min).

El estudio individual de la F y de la TCI nos indica que la preincubación con el AL no modifica la depresión producida por la CC, así como también que no hay diferencias según la dosis de AL empleada (Figs. 20 y 23, b y c) (F: control: -35 ± 3 ; CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -63 ± 8 ; AL 1 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -56 ± 9 ; AL 2 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -61 ± 9 - TCI: control: -18 ± 8 ; CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -55 ± 9 ; AL 1 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -49 ± 11 ; AL 2 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -60 ± 12) (Fig. 25).

1.5.3.- Efecto del ácido γ -linolénico (A γ L).

Finalmente, el análisis factorial de los datos obtenidos al tratar con CC el útero preincubado con A γ L (Fig. 21 a y Fig. 24 a) indica que existe una interacción significativa entre el ácido graso y la CC, siendo $p \leq 0,05$ a los 30 min y $p \leq 0,01$ desde los 40 min, dado que dicho ácido revierte la depresión de AF que producía la CC, no observándose diferencias según la dosis de A γ L empleada (control: -45 ± 5 ; CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -75 ± 4 ; A γ L 1 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -46 ± 5 ; A γ L 2 $\mu\text{g/ml}$ + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -47 ± 10 a los 60 min).

El análisis independiente de la F y de la TCI (Figs. 21 y 24, b y c) revela que la reversión producida por el A γ L se debe a que existe

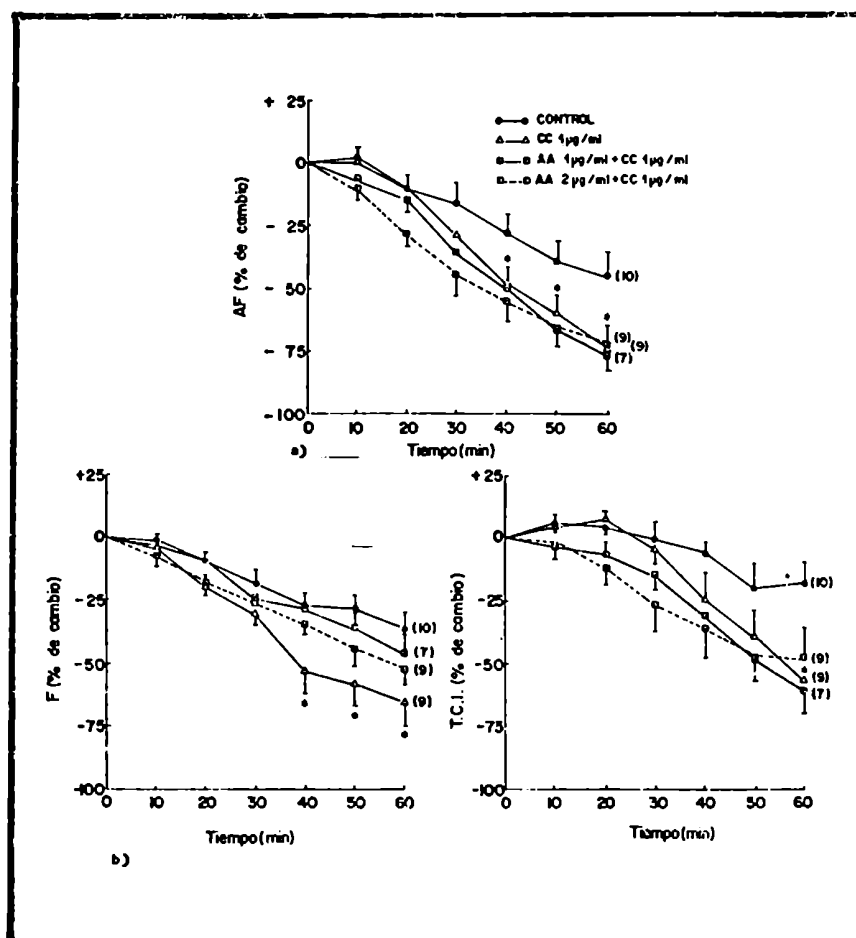


Fig. 22: Influencia de la corticosterona (CC) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado preincubado con ácido araquidónico (AA). Otras aclaraciones como en Fig. 14.

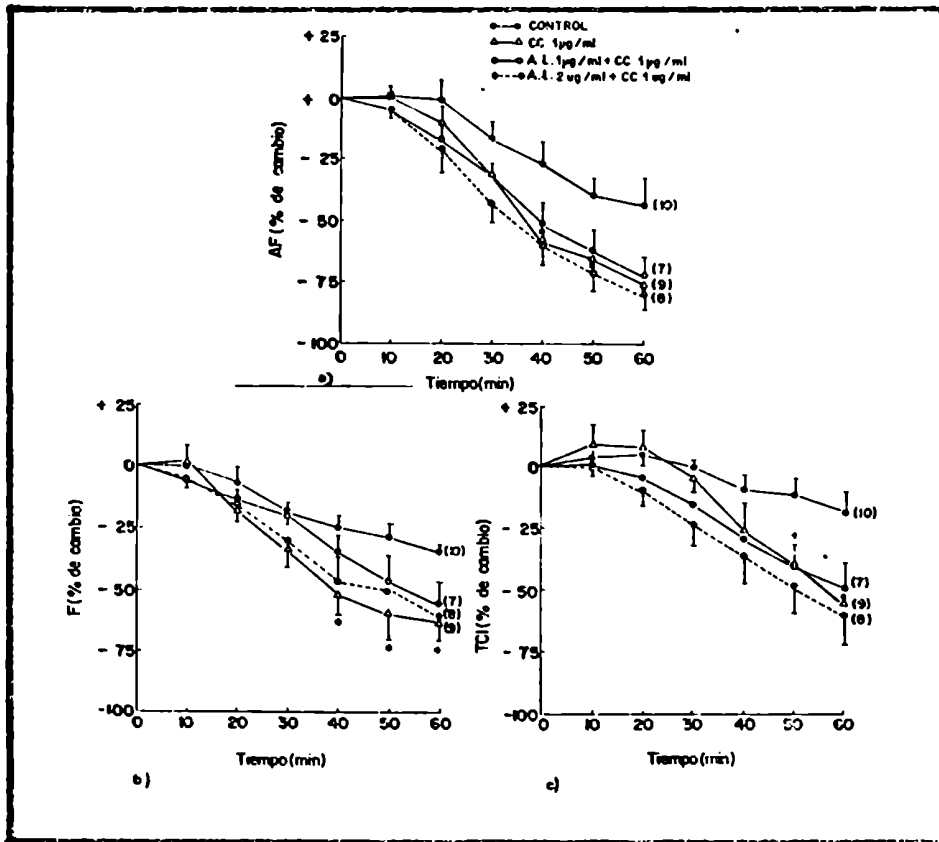


Fig. 23: Influencia de la corticosterona (CC) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado preincubado con ácido linoleico (AL). Otras aclaraciones como en Fig.14.

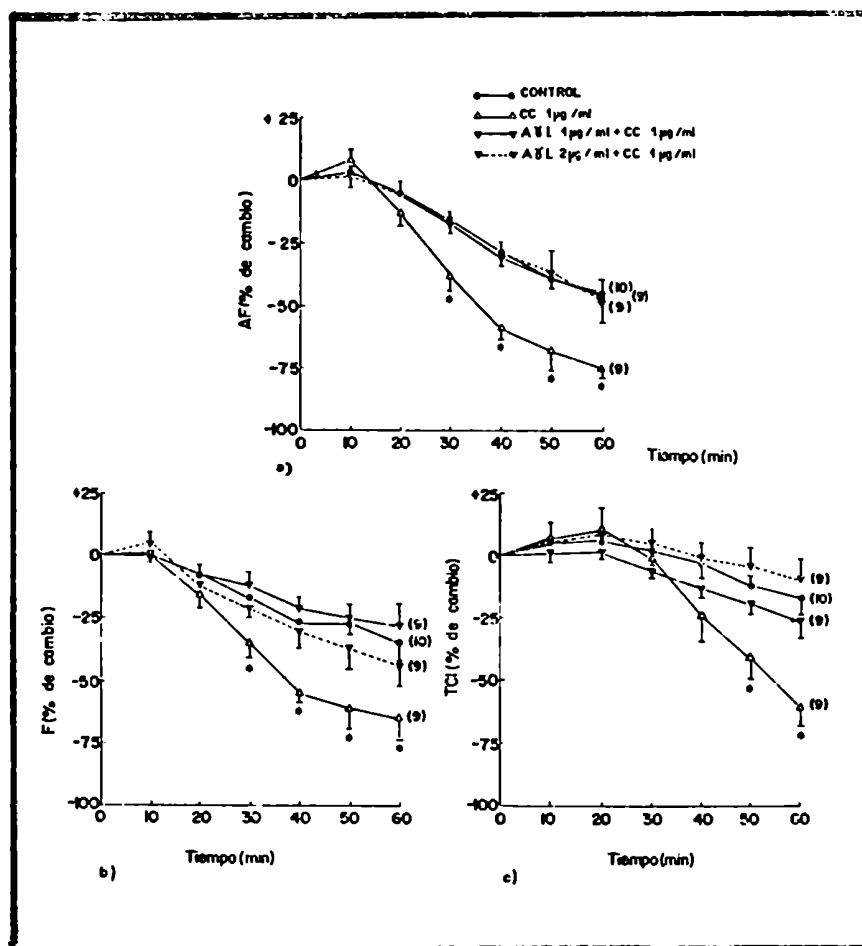


Fig. 24: Influencia de la corticosterona (CC) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado preincubado con ácido δ -linolénico (A δ L). Otras aclaraciones como en Fig. 14.

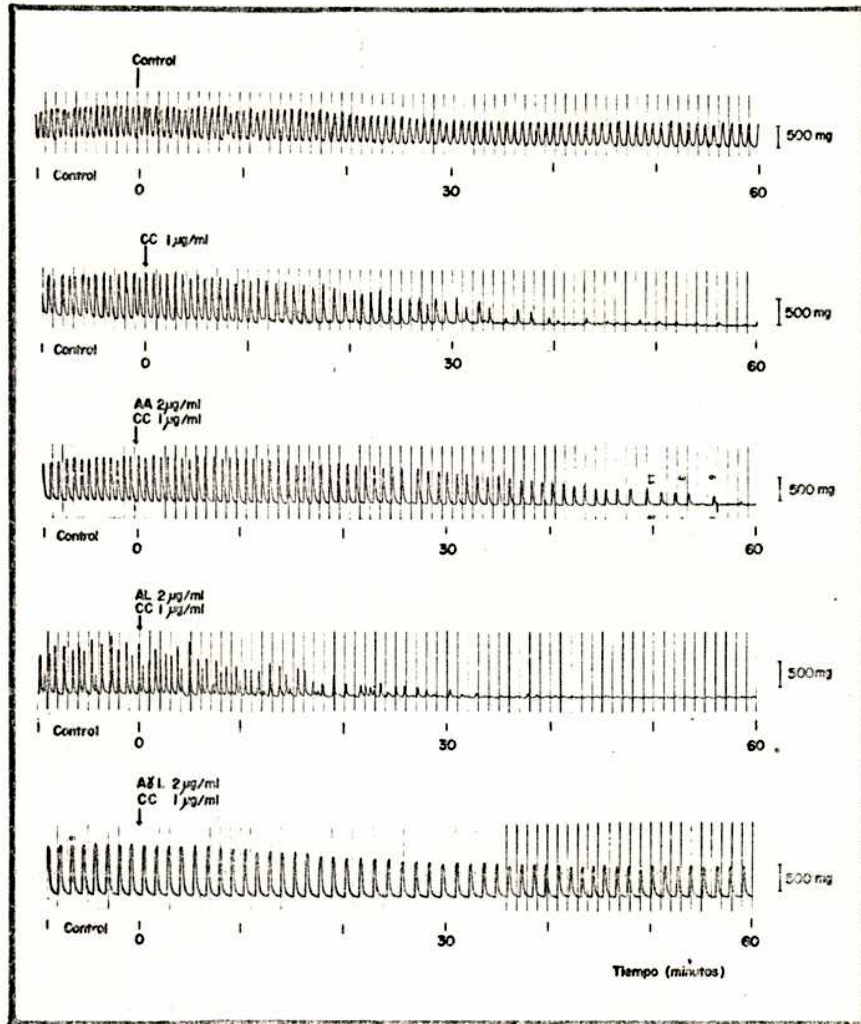


Fig. 25: Registros originales de la actividad contráctil espontánea del útero aislado control; en presencia de corticosterona (CC); ácido araquidónico (AA) + corticosterona (CC); ácido linoleico (AL) + corticosterona (CC); y ácido δ -linolénico (A γ L) + corticosterona (CC).

una interacción significativa entre el ácido y la CC tanto en la F ($p \leq 0,05$ desde los 50 min) como en la TCI ($p \leq 0,01$ desde los 40 min) (F: control: -35 ± 7 ; CC $1 \mu\text{g/ml}$: -65 ± 9 ; A δ L $1 \mu\text{g/ml}$ + CC $1 \mu\text{g/ml}$: -28 ± 8 ; A δ L $2 \mu\text{g/ml}$ + CC $1 \mu\text{g/ml}$: -44 ± 8 - TCI: control: -17 ± 9 ; CC $1 \mu\text{g/ml}$: -60 ± 8 ; A δ L $1 \mu\text{g/ml}$ + CC $1 \mu\text{g/ml}$: -26 ± 7 ; A δ L $2 \mu\text{g/ml}$ + CC $1 \mu\text{g/ml}$: -9 ± 8) (Fig. 25).

Por lo tanto se deduce que de los ácidos grasos empleados, sólo el A δ L logró revertir totalmente la depresión de AF producida por $1 \mu\text{g/ml}$ de CC, haciéndolo a expensas de la F y de la TCI. Por su parte, el AA bloqueó la inhibición de la F.

1.6.- Modificaciones inducidas por el bloqueo β -adrenérgico en la actividad espontánea del útero.

Dado que la corticosterona deprimió significativamente la AF del útero aislado de rata OV de 20 días, y que su motilidad espontánea depende de las PGs endógenas (76, 78, 127, 177) se decidió estudiar el efecto de un bloqueante β -adrenérgico como el Sotalol sobre dicha depresión, teniendo en cuenta que, tal como se mencionara en el punto 2.5.4., existen evidencias de que las PGs pueden estar involucradas en la regulación local de la transmisión adrenérgica.

Paralelamente se hicieron los estudios correspondientes para descartar un efecto "per se" del bloqueante β -adrenérgico.

1.6.1.- Efecto del Sotalol(S).

El estudio de la Tabla I revela que el Sotalol (S) 1 mM no modifica la AF del útero aislado, hecho corroborado con el análisis independiente de la F y de la TCI (Tabla II).

1.6.2.- Efecto de la corticosterona sobre la actividad espontánea del útero preincubado con Sotalol.

El análisis factorial de los datos obtenidos al tratar con CC el útero preincubado con S revela que existe una interacción significativa entre el bloqueante β -adrenérgico y la CC, dado que dicho antagonista

	Curso temporal en minutos						n
	10	20	30	40	50	60	
Control	2 ± 4 ^a	-1 ± 8	-17 ± 7	-28 ± 8	-39 ± 8	-45 ± 10	10
S 1 mM	-4 ± 4	-4 ± 5	-8 ± 6	-22 ± 5	-32 ± 5	-37 ± 6	11

Tabla I: Influencia del Sotalol (S) sobre la Actividad Funcional (AF) del útero aislado. a: valor medio ± ESM (error standard de la media) n: número de preparaciones.

		Curso temporal en minutos						n
		10	20	30	40	50	60	
F	Control	0 ± 5	-7 ± 6	-18 ± 5	-27 ± 5	-28 ± 5	-36 ± 6	10
	S 1 mM	-10 ± 4	-12 ± 4	-12 ± 6	-21 ± 5	-27 ± 5	-27 ± 6	11
TCI	Control	4 ± 3	5 ± 4	1 ± 6	-4 ± 5	-10 ± 6	-18 ± 7	10
	S 1 mM	8 ± 2	9 ± 2	6 ± 3	-1 ± 2	-7 ± 2	-13 ± 3	11

Tabla II: Influencia del Sotalol (S) sobre la Frecuencia (F) y Tensión Contráctil Isométrica (TCI) del útero aislado. Otras aclaraciones como en Tabla I.

	Curso temporal en minutos						n
	10	20	30	40	50	60	
Control	2 ± 4	-1 ± 8	-17 ± 7	-28 ± 8	-39 ± 8	-45 ± 10	10
CC 1 µg/ml	9 ± 5	-14 ± 5	-36 ± 7	-56 ± 9*	-67 ± 9*	-73 ± 8*	9
S 1 mM + CC 1 µg/ml	-1 ± 7	-7 ± 3	-20 ± 6	-28 ± 5	-35 ± 6	-50 ± 6	10

Tabla III: Influencia de la corticoesterona (CC) sobre la Actividad Funcional (AF) del útero aislado preincubado con Sotalol (S).

* $p \leq 0,05$ versus control. Otras aclaraciones como en Tabla I.

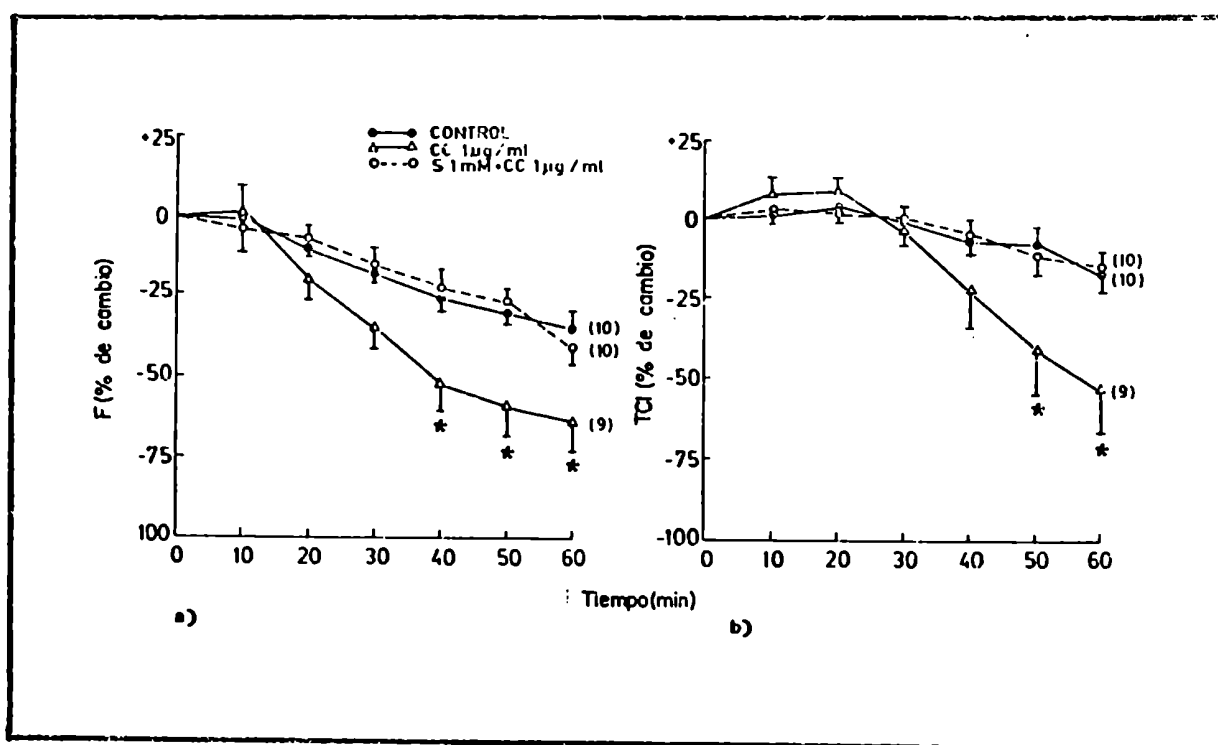


Fig. 26: Influencia de la corticoesterona (CC) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado preincubado con Sotalol (S). Otras aclaraciones como en Fig. 14.

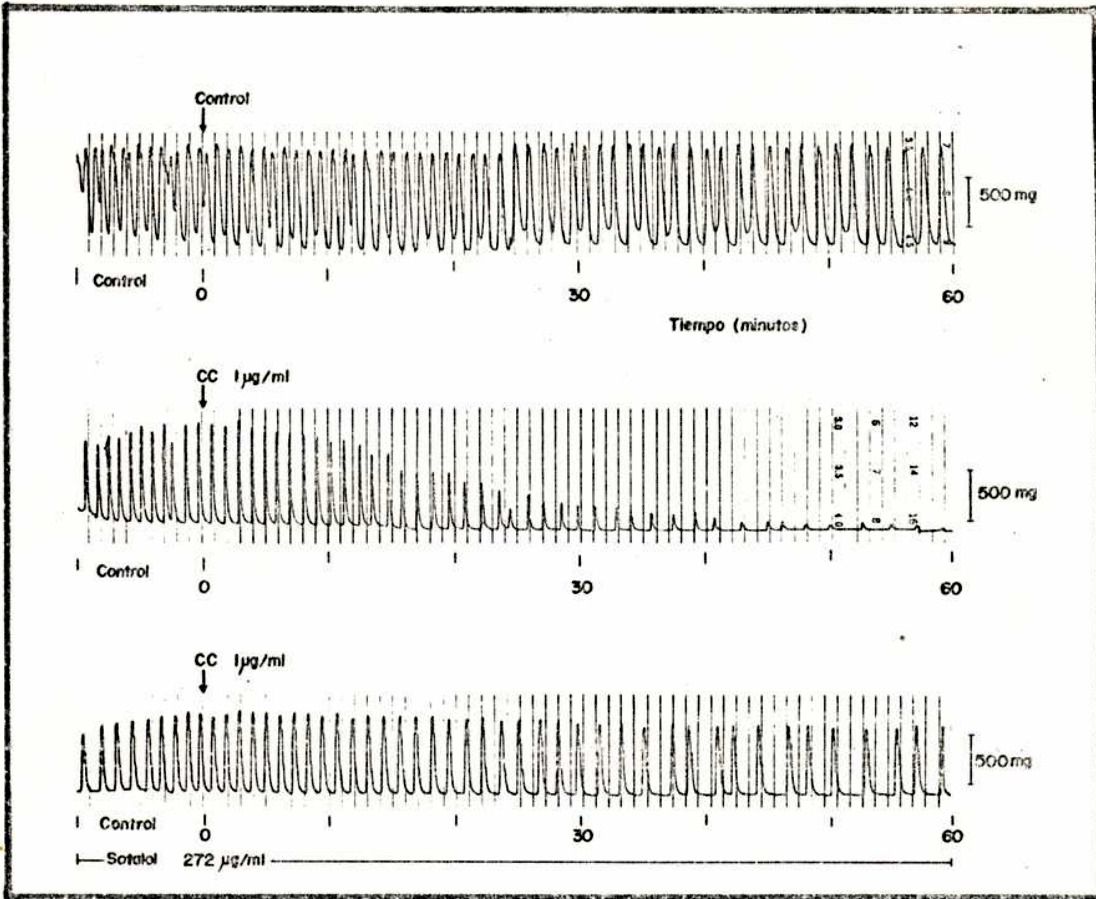


Fig. 27: Registros originales de la actividad contráctil espontánea del útero aislado control; en presencia de corticosterona (CC), y de Sotalol (S) + corticosterona (CC).

reverte la depresión de AF que producía la CC ($p \leq 0,05$ a partir de los 40 min) (Tabla I y III).

Analizando independientemente la F y la TCI (Tabla II y Fig. 26 b y c) puede observarse que existe una interacción significativa entre el bloqueante β -adrenérgico y la CC tanto en la F como en la TCI ($p \leq 0,05$ a partir de los 40 min y $p \leq 0,05$ desde los 50 min respectivamente) (Fig. 27). (F: control: -36 ± 6 ; CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -64 ± 10 ; S 1 mM + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -36 ± 5 - TCI: control: -18 ± 7 ; CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -52 ± 13 ; S 1 mM + CC 1 $\mu\text{g/ml}$: -15 ± 6 a los 60 min).

De ésto se deduce que el empleo de un bloqueante β -adrenérgico logra revertir la depresión producida por la CC sobre la motilidad espontánea del útero de rata OV de 20 días.

1.7.- Influencia de los inhibidores de síntesis de prostaglandinas sobre la actividad espontánea del útero.

1.7.1.- Efecto de indometacina y ácido acetil salicílico.

En el punto 3.6.2. de la Introducción se comentó que distintos trabajos demostraron que drogas anti-inflamatorias no-esteroides como indometacina (Indo) y ácido acetil salicílico (AAS) inhiben la síntesis de PGs.

Recordando la fuerte dependencia entre la motilidad espontánea del tejido empleado en estas series experimentales y la producción de PGs, se analizó el efecto de ambos anti-inflamatorios sobre dicha actividad contráctil.

En la Fig. 28 a, se observa que tanto la Indo (5 $\mu\text{g/ml}$) como el AAS (40 $\mu\text{g/ml}$) deprimieron significativamente la AF uterina respecto del control sin tratar a partir de los 20 min de montado el tejido, no observándose diferencias en cuanto a los valores alcanzados con los distintos inhibidores (control: -46 ± 7 ; Indo 5 $\mu\text{g/ml}$: -97 ± 2 ; AAS 40 $\mu\text{g/ml}$: -95 ± 6 a los 60 min).

El análisis de la Fig. 28 b revela una depresión significativa de la F con ambos inhibidores a partir de los 20 min, obteniéndose valores semejantes (control: -35 ± 5 ; Indo 5 $\mu\text{g/ml}$: -98 ± 10 ; AAS 40 $\mu\text{g/ml}$:

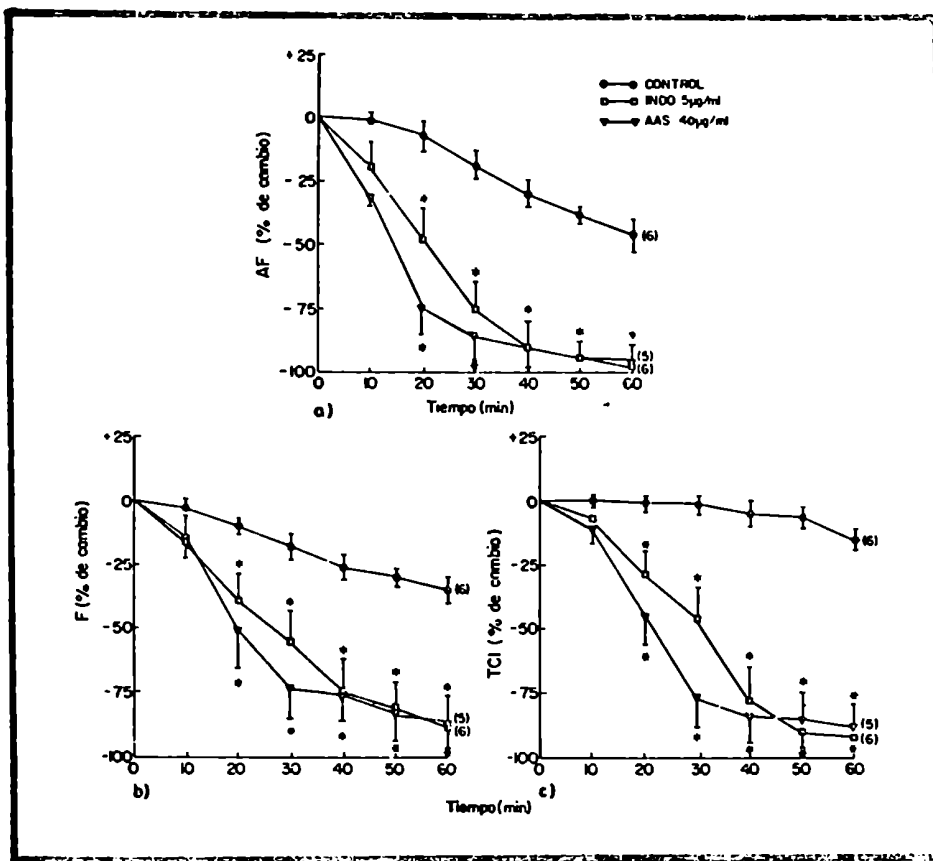


Fig. 28: Influencia de indometacina (Indo) y ácido acetil salicílico (AAS) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado. Otras aclaraciones como en Fig. 14.

- 87 ± 10). Del mismo modo, la TCI fue significativamente disminuída por los 2 anti-inflamatorios a partir de los 20 min (control: -16 ± 4 ; Indo $5 \mu\text{g/ml}$: -92 ± 9 ; AAS $40 \mu\text{g/ml}$: -88 ± 9) (Fig. 28 c).

Puede deducirse entonces que ambos anti-inflamatorios deprimen significativamente la contractilidad espontánea uterina a partir de los 20 min. Dicho efecto se observa tanto a nivel de la F como de la TCI.

1.8.- Influencia de prostaglandinas y sus metabolitos en el desarrollo de tensión contráctil por el útero.

Con el objeto de estudiar la importancia de las PGs y sus metabolitos en la actividad contráctil del útero aislado de rata OV de 20 días, se realizaron curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo, según el método de van Rossum (185), agregando una dosis cada 2 minutos. Dichas curvas se hicieron en presencia de indometacina ($5 \mu\text{g/ml}$), de modo de inhibir la síntesis de PGs y abolir completamente la actividad contráctil espontánea del tejido. De este modo es posible analizar la respuesta contráctil uterina frente a dosis conocidas de PGs exógenas.

1.8.1.- Efecto de PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGD_2 y PGI_2 .

En la Fig. 29 puede observarse que el umbral de respuesta (es decir, la mínima concentración necesaria para provocar el desarrollo de tensión contráctil) para la PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ es 10^{-9} M; para la PGD_2 es 10^{-8} M y para la PGI_2 es 10^{-6} M. La máxima tensión desarrollada por el tejido se obtiene respectivamente con 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M y 10^{-4} M.

1.8.2.- Efecto de los metabolitos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ y de la PGI_2 .

En la Fig. 30, el análisis de la respuesta contráctil del tejido frente a los metabolitos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ revela que el umbral de respuesta para la 15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ y para la 13,14-dih-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ es de 10^{-6} M, en tanto que el efecto máximo se obtiene con 10^{-5} M.

Con respecto a la 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, metabolito de la PGI_2 , puede observarse que tanto el umbral de respuesta como el efecto máximo se obtienen con las mismas dosis que en el caso de la prosteciclina, es decir, 10^{-6} M

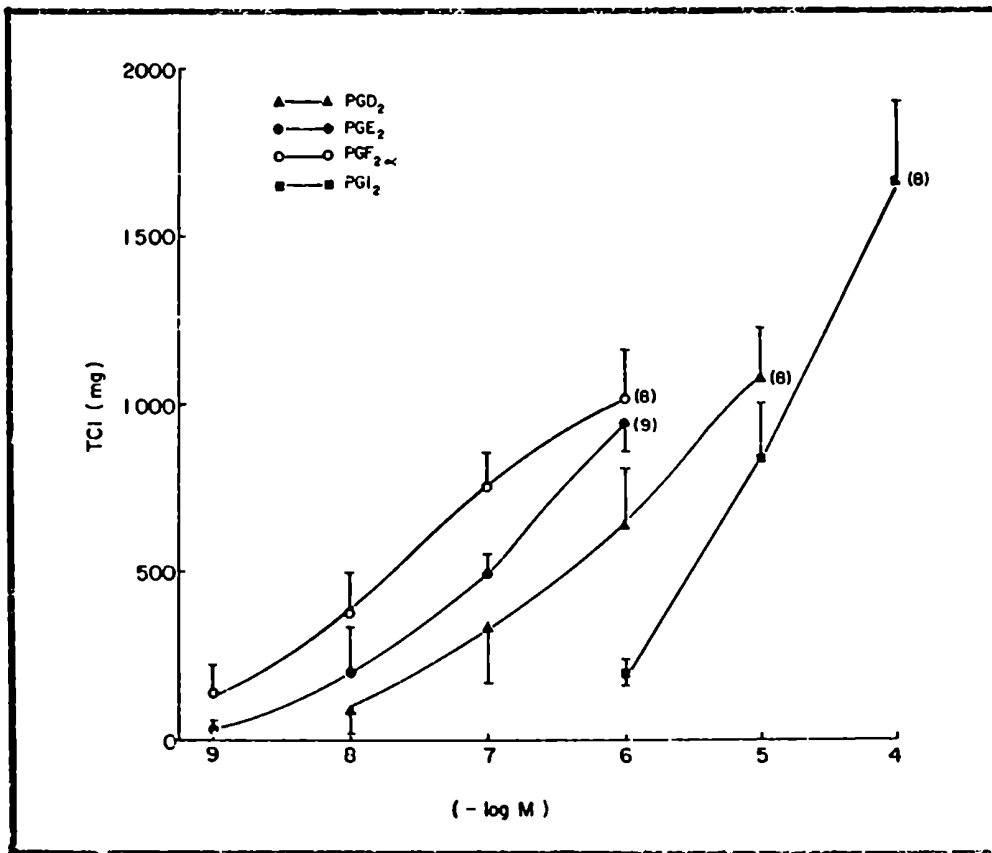


Fig. 29: Curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo de distintas prostaglandinas. ORDENADA: tensión contráctil uterina desarrollada expresada en mg. ABCISA: logaritmo negativo de la concentración molar de prostaglandina. Otras aclaraciones como en Fig. 14.

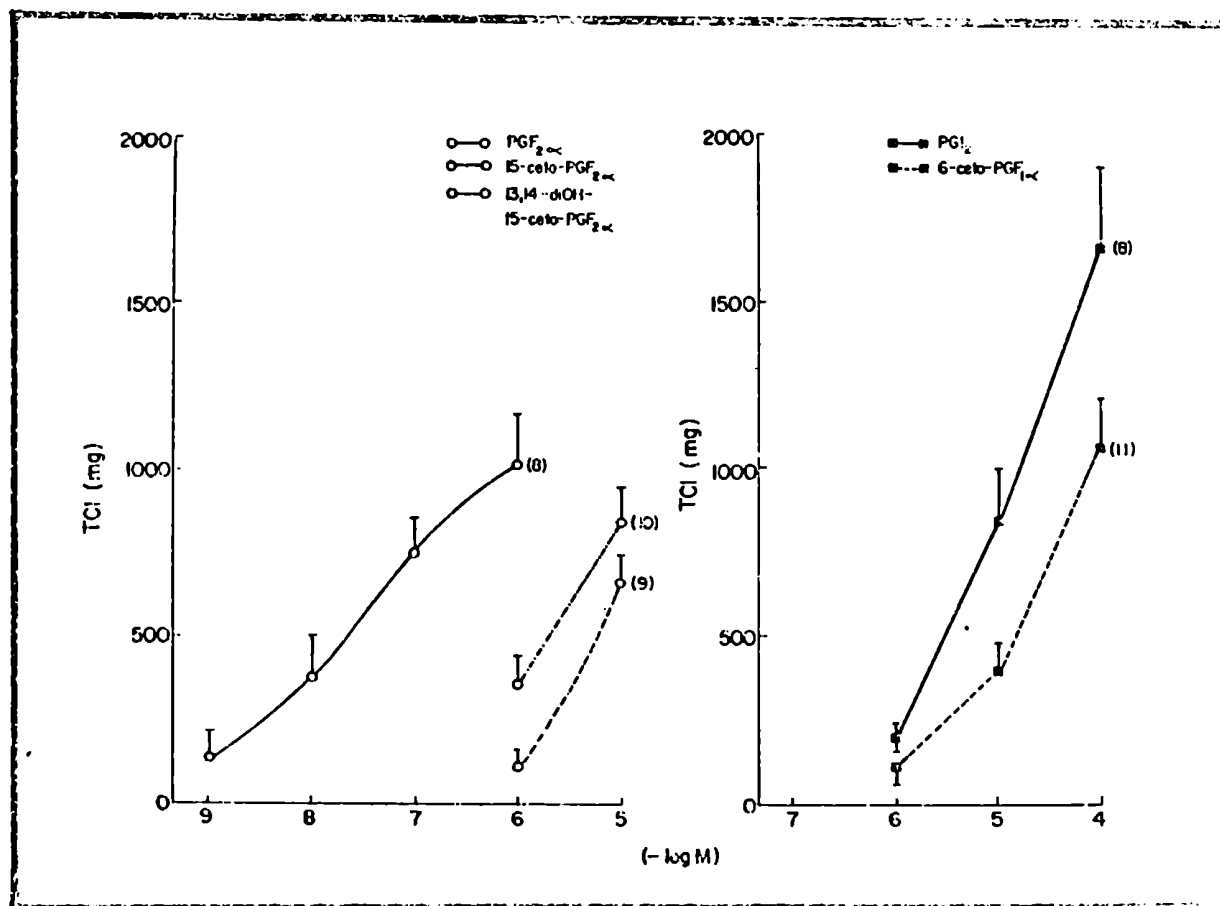


Fig. 30: Curves dosis-respuesta de tipo acumulativo de distintas prostaglandinas y metabolitos. Otras aclaraciones como en Fig. 29.

y 10^{-4} M respectivamente (Fig. 30 b). Sin embargo debe notarse que la tensión máxima desarrollada por la PGI_2 es significativamente mayor que la obtenida con su metabolito.

Los resultados permiten concluir que este tejido es más sensible a la PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ que a la PGD_2 , PGI_2 , su metabolito o los metabolitos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$.

2.- Relación entre la actividad espontánea del útero aislado de rata ovariectomizada de 20 días y la liberación de PGs al medio de incubación.

En el punto 6 del Capítulo II se describió el método empleado para cuantificar las PGs liberadas al medio de incubación. Pudo determinarse así que el útero de rata castrada multípara de 20 días a los 60 min de montado el tejido, libera $14,7 \pm 2,7$ ng/mg_{ps} de PG tipo E_2 y $8,9 \pm 1,6$ ng/mg_{ps} de PG tipo $\text{F}_{2\alpha}$ (ps: peso seco del tejido) (Fig. 31).

2.1.- Influencia de la corticosterona sobre la liberación de prostaglandinas al medio de incubación.

Cuando se incubaron los tejidos durante 60 min con CC $1 \mu\text{g/ml}$, los valores de PGs disminuyeron significativamente, siendo éstos $1,33 \pm 0,31$ ng/mg_{ps} y $2,20 \pm 0,32$ ng/mg_{ps} para las PGs tipo E_2 y tipo $\text{F}_{2\alpha}$ respectivamente (Fig. 31).

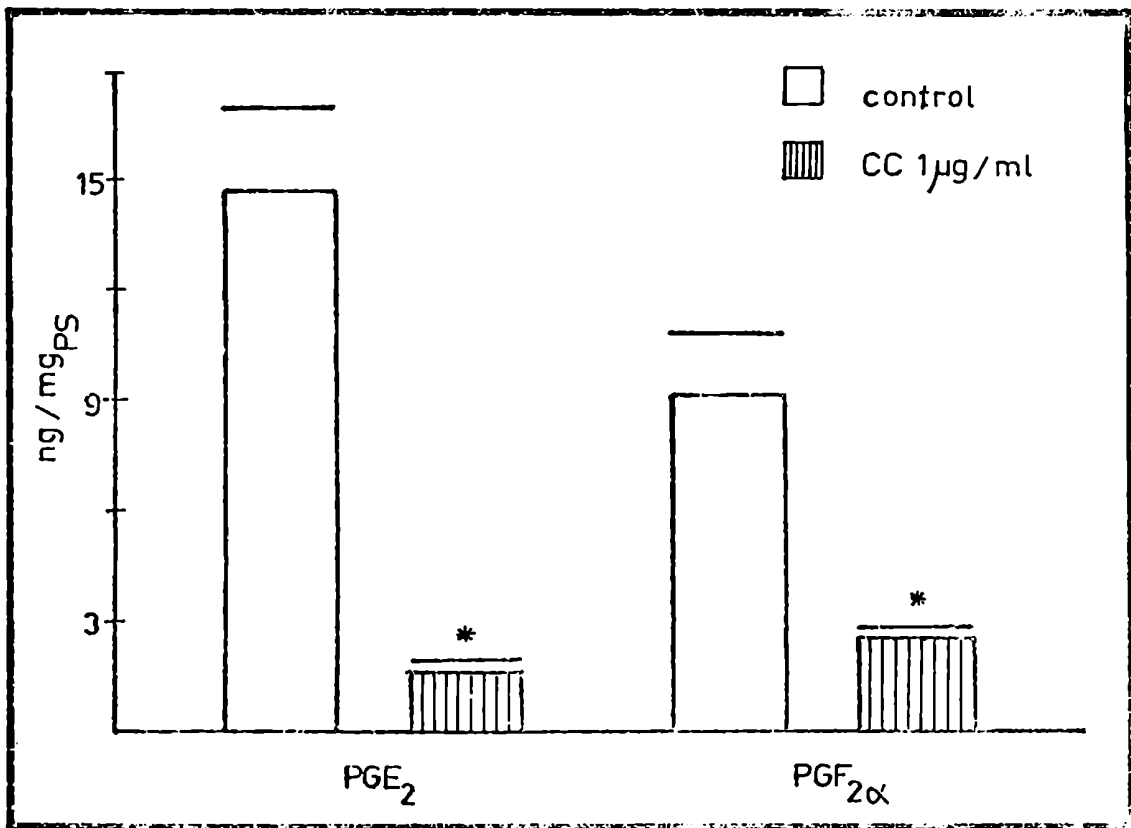


Fig. 31: Liberación de prostaglandinas al medio de incubación en ausencia y presencia de corticosterona (CC). Barras horizontales: ESM (error standard de la media). * $p \leq 0,05$

CAPITULO IV

DISCUSION

El objeto del presente trabajo ha sido estudiar el efecto de anti-inflamatorios esteroides sobre la motilidad espontánea del útero aislado de rata ovariectomizada (OV) de 20 días, su mecanismo de acción y su relación con la síntesis y/o liberación de prostaglandinas (PGs) el medio de incubación.

Diferentes trabajos demostraron que las PGs son mediadoras de procesos tales como la inflamación, hipertensión arterial, ovulación, etc.

Así por ej., pudo observarse que en la inflamación la producción de PGE y/o PGF está aumentada respecto de la condición no-patológica (62,63,105). La terapia con anti-inflamatorios no-esteroides como la aspirina o la indometacina, así como con anti-inflamatorios esteroides como la corticosterona, dexametasona, prednisona, hidrocortisona normalizaban la producción de PGs, con la consecuente reversión del proceso patológico.

También se ha descrito que la infusión de distintas sustancias como norepinefrina en mesenterio vascular de coneja (85); ACTH en grasa epigástrica de conejo (125) provocaban un aumento en la liberación de PGs. Este efecto observado como consecuencia de un estímulo exógeno podía ser bloqueado con indometacina o anti-inflamatorios esteroides como hidrocortisona (0,01 - 30 µg/ml) y dexametasona (2 - 5 µg/ml).

En estos casos, el agregado de un ácido graso precursor de PGs lograba revertir el bloqueo producido por el corticoide pero no la inhibición lograda con la indometacina o aspirina.

Trabajos en homogenato de bazo (67), de piel (81) y de pulmón (187) demostraron que, a diferencia de lo que ocurría en los tejidos intactos, el anti-inflamatorio esteroideo no lograba inhibir la producción de PGs, en tanto que la indometacina o la aspirina eran eficaces.

Estos estudios indicaban un mecanismo de acción diferente para ambos anti-inflamatorios. Tal como se mencionó en el punto 3.6.2., la indometacina actúa inhibiendo a la ciclo-oxigenasa que convierte el ácido graso

precursor en PGs; en tanto que el corticoide probablemente interfiere con la liberación del sustrato precursor de PGs, razón por la cual un ácido graso exógeno logra revertir la depresión de síntesis y/o liberación de PGs observada.

La comparación de los modelos experimentales, es decir, tejidos intactos y homogenatos, indicaba también que para que el anti-inflamatorio esteroideo pudiera actuar como inhibidor de la producción de PGs necesitaba contar con la integridad celular.

Distintos autores han presentado evidencias de que la función adrenocortical es importante en la regulación del eje pituitario-gonadal (34,145, 148,168). Por ejemplo, Buckingham y col. (34) propusieron que los corticosteroides aumentan la sensibilidad del ovario a las gonadotropinas. Mandl por su parte observó que la suprarrenalectomía produce una disminución en el tamaño del ovario, hecho que atribuyó a una menor sensibilidad del ovario hacia la hormona folículo-estimulante (FSH). Notó también que la respuesta ovárica a dicha hormona podía ser corregida con cortisona (130).

En condiciones normales, la rata, al igual que el hombre, presenta un ritmo circadiano en la concentración de corticosterona plasmática. A diferencia de lo que ocurre en el hombre, en quien los niveles más altos de hidrocortisona (su principal glucocorticoide) se encuentran en las primeras horas de la mañana, en la rata, de hábitos nocturnos, el pico de producción de corticosterona (su glucocorticoide fisiológico) se produce aproximadamente a las 18 hs., disminuyendo progresivamente para llegar a los valores mínimos hacia las 6 de la mañana (34). Se observa así que la mínima concentración plasmática de corticosterona es de aproximadamente 0,2 $\mu\text{g/ml}$ (34,111). La concentración máxima se observa la tarde del proestro, cuando el valor alcanzado es de 0,7 $\mu\text{g/ml}$, significativamente mayor que la observada a la misma hora en los siguientes días del ciclo estral (0,5 $\mu\text{g/ml}$ aproximadamente) (34). Kitay y col. observaron que de 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de corticosterona plasmática observada en una rata hembra en reposo, los niveles aumentan a 0,8 $\mu\text{g/ml}$ a los 30 minutos de provocar stress por ences-

tesia con éter. En el caso de una rata ovariectomizada, los niveles de corticosterona plasmática disminuyen significativamente respecto del animal no-operado, alcanzándose un valor de 0,09 $\mu\text{g/ml}$ (111). Pincus y col. observaron que ya existe disminución de corticosterona plasmática a partir de los 10 días post-castración, pero la diferencia significativa respecto del animal control se observa luego de pasados 20 días de la operación (148). Nuevamente, la inducción de estrés produce un aumento en la producción de corticosterona, observándose en la rata castrada un valor aproximado de 0,58 $\mu\text{g/ml}$ (111).

En base entonces al hecho de que los corticoides pueden intervenir en la regulación del eje pituitario-gonadal (34,145,148,168); y que, como se mencionara en el punto 2.5.3.3., las PGs pueden regular la actividad contráctil del útero, se decidió estudiar el efecto de 2 anti-inflamatorios esteroideos sobre la motilidad espontánea del útero aislado de rata, con el fin de integrar ambos conocimientos en un órgano como el útero, en el cual hasta el presente no se ha realizado este tipo de estudios.

Este tejido se caracteriza por presentar una producción basal de PGs aumentada respecto del útero aislado de una rata en estró, a consecuencia de la falta de hormonas ováricas quienes, como ya se mencionara, se sabe regulan la producción de PGs (78,177), y esto lo diferencia de otros modelos experimentales anteriormente citados, en los cuales la mayor producción de PGs es consecuencia de un estímulo exógeno (85,125), o bien está asociada a distintas patologías (62, 63, 105). En estudios previos se había demostrado que las PGs condicionan la actividad contráctil espontánea del útero aislado de rata OV (76,78,127,177). Por otra parte, un período de 20 días de castración previo al sacrificio del animal permite obtener una actividad contráctil uterina espontánea que permanece relativamente estable en el tiempo, comparada con el estró natural; mayor que la observada a los 7 días y comparable a la obtenida a los 60 días (71). Trabajos anteriores descuartaron la participación de las hormonas hipofisarias en la regulación de dicha actividad contráctil (71). Y cabe re-

cordar también que a los 20 días post-castración los niveles de corticosterona plasmática se encuentran significativamente disminuidos respecto del animal no-operado. (148).

Como anti-inflamatorios esteroideos se eligieron los más relevantes de la rata y el hombre, es decir, corticosterona (CC) e hidrocortisona (HC), respectivamente (126)

De las dosis de CC empleadas, 0,4 $\mu\text{g/ml}$ se encuentra dentro del rango de concentración plasmática observado en una rata hembra normal (0,2 - 0,7 $\mu\text{g/ml}$) y también es un valor cercano al que se observa en una rata OV de 20 días en condiciones de stress. Por otra parte, 1 $\mu\text{g/ml}$ estaría dentro del rango de máximas concentraciones fisiológicas encontradas.

En cuanto a la HC, glucocorticoide que la rata no puede sintetizar (126), su empleo tiene fines comparativos, y la dosis empleada corresponde a la citada por otros autores que estudiaron su efecto a nivel de producción de PGs.

En base a los datos obtenidos pudo observarse que la actividad espontánea del útero de rata OV de 20 días presentaba una AF que se mantuvo relativamente estable en el tiempo. Dicha estabilidad se debía a una F y una TCI que permanecían regulares durante los 60 minutos de experimentación. Estas características contráctiles coincidieron con datos previos obtenidos en nuestro laboratorio (76,78,127) en oposición a trabajos de otros investigadores, quienes sostenían que el útero de varias especies animales carecía de actividad espontánea luego de la castración (159,160) o bien que ésta se caracterizaba por contracciones uterinas irregulares y de baja amplitud (92).

La incubación del útero aislado de rata castrada de 20 días con 0,4 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de CC produjo una neta disminución de la AF, mostrando valores iguales entre sí y significativamente menores que la correspondiente al útero sin tratar. El análisis individual de la F y de la TCI mostró que 1 $\mu\text{g/ml}$ inhibió ambos parámetros, en tanto que 0,4 $\mu\text{g/ml}$ afectó fundamentalmente la F. Dado que la F ya es afectada con la dosis menor de CC, po-

dría pensarse que este corticoide tendría una acción preferencial sobre las células marcapaso uterinas que son las condicionantes de la F. Hasta la fecha no hay datos bibliográficos que mencionen este hecho.

El estudio de los resultados obtenidos con 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$ de HC arrojó conclusiones semejantes a las encontradas con CC, presentándose datos significativamente menores que el control sin tratar. Del mismo modo pudo observarse que la dosis mayor de HC empleada deprimió tanto la F como la TCI; la dosis menor, en cambio, actuó fundamentalmente sobre la TCI. Comparando el efecto ejercido por las dos dosis puede concluirse que la inhibición producida fue semejante.

Es interesante destacar distintos aspectos de estos resultados.

En primer lugar, en este modelo experimental se observa un efecto inhibitor tanto con CC como con HC sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado de rata OV de 20 días, hecho que lo diferencia de los resultados obtenidos por Zesztowt (199), quien estudió el efecto de los corticoides sobre la motilidad inducida por distintos agentes del útero aislado de rata no-castrada. Zesztowt (199) trabajando con 50 $\mu\text{g/ml}$ de HC no encuentra modificación de la actividad espontánea, y nota potenciación de la actividad contráctil inducida por acetilcolina, ocitocina e histamina.

En segundo lugar, la CC fue un inhibidor más potente que la HC, ya que dosis menores de CC ejercieron el mismo efecto que dosis mayores de HC. Sería factible pensar que, dado que la CC es el esteroide fisiológico de la rata, el tejido empleado en este modelo experimental presente mayor afinidad o sensibilidad hacia éste que hacia la HC, no fisiológica para esta especie. Pero cabe recordar también que la pequeña diferencia de su estructura química podría explicar la distinta potencia biológica entre ambas (126).

Finalmente debe notarse que la depresión producida por los corticoides en la actividad contráctil del útero aislado de rata OV de 20 días no es un efecto rápido, sino que se produce a partir de los 30 minutos de agregada la droga. Esto podría descartar un efecto de membrana del

corticoide, ya que en este último caso la respuesta del tejido al agente se observa a los pocos segundos de producirse el contacto tisular con la droga en estudio.

Dado que la castración mejora la contractilidad espontánea del útero aislado de rata si la comparamos con el estro natural, y que este hecho fue asociado con una mayor síntesis y liberación de PGs por el tejido uterino (76,78,127) se consideró la posibilidad de que los corticoides estuvieran interfiriendo de alguna manera con la síntesis o la liberación de las mismas, afectando así la motilidad espontánea. Como no existen datos bibliográficos que relacionen el efecto depresor de motilidad de los corticoides con la síntesis y/o liberación de PGs en el útero aislado de rata, se decidió determinar la cantidad de PGs liberadas al medio de incubación durante los 60 minutos del montaje, en presencia y ausencia de 1 µg/ml de CC. Se optó por la corticosterona ya que es el glucocorticoide fisiológico de la rata, y que resultó ser el más potente de los 2 corticoides empleados.

Se encontró así que cuando el tejido era incubado con CC, los valores de PGs disminuían a cantidades significativamente menores que los datos control. Por lo tanto pudo relacionarse la disminución de actividad contráctil del útero de rata OV de 20 días producida por la CC con una menor liberación de PGs, hallazgo original, dado que no se ha descrito que la CC disminuya la liberación de PGs en este modelo experimental.

El paso inmediato fue averiguar si la menor cantidad de PGs cuantificadas en el medio de incubación era consecuencia de que la CC, estabilizando la membrana celular, impedía la liberación de PGs pero no su síntesis, como postularan Lewis y Piper en su "Hipótesis de la inhibición del transporte activo", en base a estudios en tejido adiposo (125); o bien si, de acuerdo a la "Hipótesis de la fosfolipasa" de Gryglewsky y col. (83), en base a trabajos en mesenterio de conejo, el corticoide estaba interfiriendo con la síntesis de PGs al impedir la liberación de sustrato precursor. Como se recordará, en el primer caso disminuye la cantidad de PGs liberadas al medio por el tejido, efecto que no es revertido por el

agregado de ácidos grasos precursores exógenos, y aumenta el contenido intracelular de PGs (125). En el segundo caso hay una disminución de PGs intra y extratisulares, que sí puede ser contrarrestada con el precursor exógeno (62,63,83,100).

Por lo tanto se deduce que hay 2 formas de averiguar si el corticoide está actuando a nivel de síntesis o de liberación de PGs. Una de ellas es dosar los PGs intratisulares luego de 60 minutos de experimentación en presencia y ausencia de CC. La segunda es agregar corticosterona al medio de incubación conteniendo un ácido graso precursor de PGs. Como el objeto de esta tesis ha sido estudiar el efecto de anti-inflamatorios esteroideos sobre la contractilidad espontánea del útero se optó por el segundo método. Este permite no sólo mantener la integridad tisular (que como ya se mencionara, diferencia este estudio de algunos modelos experimentales empleados por otros autores que analizaron la interacción glucocorticoides-PGs (67,81,187)), sino también obtener paralelamente un registro de actividad contráctil en presencia de distintos ácidos grasos precursores de PGs y/o CC por un tejido que se encuentra en condiciones semejantes a las fisiológicas y funcionalmente activo. Hasta la fecha, los estudios con ácidos grasos y/o glucocorticoides para analizar la producción de PGs se han realizado en sistemas de células aisladas (62,63,105); por infusión de los mismos en tejidos intactos (85,125,143); o en homogénatos (67,81,187).

Se estudió entonces el efecto de la CC (1 µg/ml) sobre la motilidad espontánea del útero incubado con distintos ácidos grasos precursores de PGs, es decir, ácido araquidónico (AA), ácido linoleico (AL) y ácido γ-linolénico (AγL)(15)(Fig.3). Las dosis empleadas en cada caso fueron 1 y 2 µg/ml, que se encuentran en el orden de 10^{-6} M.

En base a los resultados, pudo observarse que el AγL logró revertir el efecto depresor de actividad contráctil producido por la CC, no existiendo diferencias entre la reversión producida por una u otra dosis. De los otros ácidos empleados, el AA solo revirtió la inhibición de la F, que es justamente el parámetro ya afectado con la dosis más baja de CC.

Por su parte, el AL resultó ineficaz.

Cabe preguntarse entonces por qué se observó una respuesta diferencial de acuerdo al ácido graso empleado.

En primer lugar, debe tenerse en cuenta que sólo el AA es sustrato de la ciclooxigenasa, enzima que metaboliza dicho ácido dando origen a las PGs. De hecho, el AA (y su sal sódica) logró revertir la depresión de F que producía la CC.

El A γ L, en cambio, no es sustrato de dicha enzima, pero fue eficaz para revertir la depresión ejercida por la CC tanto a nivel de F como de TCI. Esto podría deberse a que el A γ L es convertido en ácido dihomo- γ -linolénico, el cual sí es sustrato de la ciclooxigenasa. No hay datos bibliográficos que apoyen la existencia de tal conversión en el útero, pero sí en microsomas de testículo de rata (31). Sin embargo, dado que existen referencias que indican que el útero aislado puede sintetizar ácidos grasos a partir de acetato marcado (5), es factible suponer que en el presente modelo experimental el A γ L sea posteriormente elongado.

Pero cabe también preguntarse si dicho ácido, convirtiéndose en dihomo- γ -linolénico, dio origen a la serie 1 de PGs, o bien si fue luego desaturado a AA, dando origen a la serie 2. El método de identificación de PGs descrito anteriormente sólo permite averiguar si se trata de material tipo E y tipo F, pero no distingue entre serie 1 y 2. De hecho, con la mezcla de solventes cromatográficos empleada, el Rf de la PGE₂ es compartido por la PGE₁, y el Rf de la PGF₂ α es compartido por la PGF₁ α .

Así como el AA no modificó per se la motilidad espontánea del útero aislado de rata OV, el A γ L deprimió dicha actividad. En la bibliografía hay datos que revelan que los ácidos grasos precursores de PGs inhiben a la PG-sintetasa, complejo enzimático encargado de la síntesis de las mismas. Por ej., los ácidos oleico, linoleico y linolénico inhiben a dicha enzima en vesículas seminales (64) y en tejido estomacal de rata (144) cuando se los emplea en concentraciones del rango de $1,8 - 5 \times 10^{-3}$ M. El ácido linolénico también logró inhibir la conversión enzimática de AA a PGE₂ en piel humana (64). Sin embargo, debe notarse que la

dosis empleada es menor que la citada en la literatura, así como también el hecho de que se trata de un modelo experimental distinto.

Con respecto al AL, éste no sólo no tuvo efecto per se sino que tampoco logró revertir la depresión producida por la CC. Distintos factores pueden haber sido los responsables de los resultados obtenidos. En primer lugar, no se puede afirmar que AL haya penetrado el tejido. Esto lo diferencia del AA (y su sal sódica) y del A δ L en el hecho de que, en base a que tuvieron efecto sobre la contractilidad uterina, se puede pensar que alcanzaron su sitio de acción. En segundo lugar, el AL no es sustrato de la ciclooxigenasa. Y en tercer lugar, para dar origen a las PGs, este ácido debería ser transformado en A δ L y luego en dihomio- δ -linoléico (precursor de la serie 1 de PGs), o bien seguir siendo metabolizado hasta llegar a AA (precursor de la serie 2).

Para aclarar aún más la respuesta diferencial del tejido frente a los distintos ácidos grasos, sería necesario determinar la liberación de PGs en presencia del ácido graso solo o con CC, así como también cuantificar la proporción de ácido graso exógeno que es convertido en PGs. Sin embargo, debido a problemas técnicos, no fue posible obtener dichos datos, que aportarían mayores evidencias para explicar el mecanismo de acción de la CC a nivel de síntesis de PGs en este modelo experimental.

Por lo tanto, en base a los resultados hasta aquí discutidos se puede deducir que la CC deprime la motilidad del útero aislado de rata OV de 20 días probablemente disminuyendo la provisión de sustrato endógeno para la síntesis de PGs. De este modo, la síntesis de PGs estaría inhibida, hecho que se refleja en una menor liberación de PGs al medio de incubación. Dado que estas hormonas locales pueden regular la contractilidad uterina (76,78,127,177), su disminución tiene como consecuencia un decremento de la actividad contráctil.

En el punto 3.6.2. de la Introducción se comentó que distintos trabajos proveyeron evidencias de que los glucocorticoides anti-inflamatorios podrían actuar como inhibidores de la síntesis de PGs induciendo la formación de un polipéptido que actúa como anti-fosfolipasa A₂. De ese modo,

la fosfolipasa A_2 no podría actuar sobre la membrana celular liberando los ácidos grasos precursores de PGs (22,48,52,66). Estos datos surgieron en base a experimentos en los cuales se lograba bloquear la inhibición de síntesis de PGs producida por el corticoide por medio de antibióticos como Actinomicina D, Cicloeximida y Puromicina, lo cual indicaba una intervención del sistema de síntesis proteica.

En el modelo experimental de esta tesis, el empleo de antibióticos con el fin de revertir la depresión de actividad contráctil uterina producida por la CC presentó distintos inconvenientes. En primer lugar, tanto la Actinomicina D (0,5 y 1 $\mu\text{g/ml}$) como la Puromicina (2 y 5 $\mu\text{g/ml}$) inhibieron por sí mismas la motilidad espontánea del útero aislado de rata OV de 20 días, y por su parte, la Cicloeximida (2 $\mu\text{g/ml}$) tuvo efecto estimulante. Si bien es factible que exista alguna dosis de uno o de todos esos antibióticos que no modifique la contractilidad, sería necesario estudiar paralelamente síntesis proteica, de DNA y de RNA, para saber hasta qué punto son modificados dichos parámetros, así como también medir la actividad de las distintas enzimas involucradas en la síntesis de PGs como ser fosfolipasa A_2 , cicloxigenasa, endoperóxido reductasa, etc., a fin de averiguar si realmente en este sistema el glucocorticoide induce la formación de un polipéptido anti-fosfolipasa A_2 , como postularan distintos autores en tejidos como papilas renales, pulmón y leucocitos de rata (22,48,52,66), o bien si está induciendo la síntesis de algún otro factor que esté modificando alguna otra actividad enzimática, relacionada o no con la formación o metabolismo de PGs. Dado que no se cuenta con los medios necesarios para llevar a cabo dichos estudios, se descartó ese enfoque para analizar el mecanismo de acción de la corticosterona a nivel enzimático en el útero de rata, razón por la cual no se han presentado los datos preliminares obtenidos con antibióticos en el capítulo correspondiente a Resultados.

Dado que la CC (1 $\mu\text{g/ml}$) disminuyó significativamente la liberación de PG tipo E_2 y tipo $F_{2\alpha}$, que como ya se mencionara son condicionantes de la actividad contráctil uterina (76,78,127,177), se trató de averiguar

por qué mecanismo podían estar actuando en este modelo.

En el punto 2.5.4. de la Introducción se mencionó que, en base a distintas observaciones, Hedqvist (96,97) postuló que la PGE_2 puede inhibir la liberación de norepinefrina (NE) del terminal adrenérgico por un mecanismo de retroalimentación negativa.

Se consideró entonces la posibilidad de que la disminución de PG tipo E_2 podía estar favoreciendo un aumento en la liberación de NE al faltar el mecanismo de retroalimentación negativa antes mencionado. De ser así, existiría una mayor cantidad de NE disponible en la biofase para actuar sobre los receptores adrenérgicos post-sinápticos miométriales. Distintos estudios han demostrado la existencia de receptores β -adrenérgicos, es decir, depresores, en el útero de rata castrada (24,73,112).

Con el objeto de averiguar si la PGE_2 estaba mediando la acción depresora de la CC sobre la motilidad uterina espontánea a través de un mecanismo noradrenérgico, se decidió estudiar el efecto de un bloqueante β -adrenérgico post-sináptico como el Sotalol sobre dicha depresión.

Pudo observarse así que el Sotalol no modificó la actividad contráctil espontánea del útero aislado de rata OV de 20 días. Sin embargo, cuando se agregó CC al medio conteniendo dicho bloqueante se obtuvo una completa reversión del decremento de AF que producía la CC. El análisis de los resultados demuestra que dicho efecto sobre la AF se ejerció tanto a nivel de la F como de la TCI.

También podría pensarse que la CC podría estar actuando a nivel de metabolismo o liberación de NE.

Tal como se recordará, una vez liberada, la NE puede regular su propia liberación actuando sobre receptores α -inhibidores o β -estimulantes pre-sinápticos (195). Así mismo, la NE puede sufrir recaptación neuronal o extraneuronal (Fig. 6) para ser posteriormente metabolizada.

En el útero de rata OV, Bengtsson (13) demostró que el 95 % de la NE liberada es recaptada neuronalmente, y aproximadamente un 5 % extraneuronalmente, lo cual significa que la principal vía metabólica es la captación neuronal.

Por otra parte, Iversen y col. (103) demostraron que 1 $\mu\text{g/ml}$ de CC puede inhibir en un 50 % la captación extraneuronal de NE, y que no tiene efecto sobre la captación neuronal, incluso en una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Por lo tanto, distintas razones apoyan la hipótesis de que en este modelo experimental la CC puede estar deprimiendo la motilidad del tejido uterino por un mecanismo adrenérgico post-sináptico secundario a una inhibición de la síntesis de PGE_2 :

- 1.- No existen datos bibliográficos que mencionen que la CC actúe a nivel presináptico bloqueando el receptor de NE α -inhibidor o el β -estimulante que disminuyan o aumenten respectivamente la liberación de NE.
- 2.- Los datos bibliográficos indican que la CC sólo actuaría inhibiendo la captación extraneuronal, que en este tejido representa un 5 % del metabolismo de NE, frente al 95 % que implica la captación neuronal, sobre la cual no tiene efecto (13,103). Dado que 1 $\mu\text{g/ml}$ de CC puede bloquear en un 50 % la captación extraneuronal, esta vía metabólica representaría aproximadamente un 2,5 % funcionante de la captación de NE.
- 3.- Un ácido graso precursor de PGs como el A Δ L (en forma total) o el AA (en forma parcial), así como un bloqueante β -adrenérgico post-sináptico como el Sotalol lograron revertir la depresión de la motilidad uterina producida por la CC, lo cual indicaría que dicha depresión podría producirse por un mecanismo indirecto mediado por PGE_2 .

Esto significa que la CC, al disminuir la liberación de PGE_2 de las células efectoras (como consecuencia de un bloqueo de su síntesis) probablemente induciría un aumento en la liberación de NE del terminal adrenérgico. Esta mayor cantidad de NE disponible en la biofase actuaría sobre los receptores β -adrenérgicos post-sinápticos que como ya se mencionó, deprimen la contractilidad uterina.

Pero debe recordarse que no sólo puede la PGE_2 actuar como regulador adrenérgico, sino que las PGs son en sí mismas hormonas locales de conocida acción estimulante en el útero.

Se ha postulado que la PGE_2 actúa como agente ionóforo de Ca^{2+} , fe-

voreciendo de este modo la contractilidad del músculo liso, dado que es sabido que el Ca^{2+} es necesario para activar el sistema contráctil muscular. Por su parte, Kuehl y col.(114) demostraron que en el útero de rata la $\text{PGF}_{2\alpha}$ produce un aumento en los niveles de GMP_c , nucleótido que es capaz de estimular la motilidad de este tejido, al favorecer la entrada de Ca^{2+} .

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos, y a los datos presentados por otros autores (78,114,177) se puede concluir que el decremento de actividad contráctil uterina que se observa como consecuencia de una menor liberación de PG tipo E_2 y tipo $\text{F}_{2\alpha}$ podría producirse por distintos mecanismos:

.- la disminución de PG tipo E_2 estaría aumentando la liberación de NE, la cual, actuando sobre los receptores β -adrenérgicos miométriales, inhibiría la contractilidad. Este efecto pudo ser bloqueado con un antagonista β -adrenérgico como el Sotalol.

.- la disminución de las PGs tipo E_2 y tipo $\text{F}_{2\alpha}$, ambas hormonas de acción estimulante en el útero, traería aparejado un menor influjo de Ca^{2+} y por lo tanto una actividad contráctil disminuida.

A lo largo de este trabajo se correlacionó la liberación de PG tipo E_2 y tipo $\text{F}_{2\alpha}$ con la motilidad espontánea del útero aislado de rata OV de 20 días. Pudo observarse también que la CC disminuía la liberación de dichas PGs, y como consecuencia se observaba un decremento de la actividad contráctil espontánea. Para corroborar este hecho se decidió estudiar la respuesta contráctil del tejido frente a la PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógenas, cubriendo un cierto rango de concentraciones que incluye a las cuantificadas al analizar la liberación de PGs en presencia y ausencia de CC.

Se realizaron entonces curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo en presencia de indometacina.

Tal como se recordará, tanto la indometacina (Indo) como el ácido acetil salicílico (AAS) inhiben la síntesis de PGs (60,175,187)(Fig.12).

Los resultados han demostrado que ambos anti-inflamatorios no-esteroides deprimen significativamente la AF del útero aislado de rata OV

de 20 días, a partir de los 20 minutos de agregada la droga, a expensas de un decremento de la F y de la TCI. Este hecho es concordante con el efecto del Indo y el AAS sobre la síntesis de PGs, teniendo en cuenta que éstas son las responsables de la actividad contráctil de este tejido (76, 78, 127, 177)

De esta manera, al estar bloqueada la síntesis de PGs e inhibida la contractilidad uterina espontánea es posible analizar la respuesta del tejido frente a dosis conocidas de PGs exógenas, y probar en esta preparación la capacidad estimulante de las mismas.

Pudo observarse entonces que la máxima tensión desarrollada por el tejido frente a PGE_2 exógena se obtuvo con una dosis de 10^{-6} M, y la mínima con 10^{-9} M. Por su parte, una concentración de $\text{PGF}_{2\alpha}$ de 10^{-7} M produjo el desarrollo de la máxima tensión, en tanto que 10^{-9} M indujo la respuesta mínima.

Analizando los resultados obtenidos al cuantificar las PGs liberadas al medio de incubación luego de 60 minutos de montaje, y expresándolos ahora como concentración molar, se observa que en el caso del tejido control, la concentración de PG tipo E_2 obtenida fue aproximadamente $1,4 \times 10^{-8}$ M, en tanto que la correspondiente a la PG tipo $\text{F}_{2\alpha}$ fue $0,9 \times 10^{-8}$ M. Ubicando estos valores en el rango de concentraciones analizado en las curvas dosis-respuesta se observa que coinciden con las dosis necesarias de PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógenas para inducir una respuesta contráctil del tejido.

Por otra parte, en presencia de $1 \mu\text{g/ml}$ de CC, la concentración de PG tipo E_2 cuantificada en el medio de incubación fue aproximadamente $1,3 \times 10^{-9}$ M, y la correspondiente a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ tuvo un valor aproximado de $2,2 \times 10^{-9}$ M. Es decir que la CC disminuye aproximadamente 10 veces la concentración de PGs liberadas al medio nutricional. Tal como se observa en las curvas dosis-respuesta, esta cantidad no sería suficiente para mantener la actividad espontánea en esta preparación.

Los resultados demostraron que, en presencia de $1 \mu\text{g/ml}$ de CC, la AF del útero aislado de rata OV de 20 días decae un 73 % a los 60 minutos de experimentación. Una concentración de PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógenas com-

parable a la obtenida al cuantificar las PGs liberadas al medio de incubación en presencia de CC, induce una respuesta contráctil que está disminuida aproximadamente en un 75 % respecto de la observada con una concentración de PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ exógenas liberadas por el tejido control.

Puede concluirse entonces que la cantidad de PGs tipo E_2 o tipo $\text{F}_{2\alpha}$ liberada por el útero aislado de rata OV de 20 días es la necesaria para el desarrollo de su tensión contráctil. Por otra parte, la cantidad producida por el tejido en presencia de CC sólo es capaz de inducir una tensión contráctil mínima.

Con fines comparativos, se analizó también el efecto de otras PGs, así como de algunos metabolitos, en el desarrollo de tensión contráctil por el tejido en estudio.

Una de ellas fue la PGD_2 . Estudios "in vitro" realizados en útero de rata preñada a término han revelado que no sólo la PGE_2 y la $\text{PGF}_{2\alpha}$ aumentan en el momento del parto, sino que se ha descrito también un incremento en la producción de PGD_2 (106).

En el útero aislado de rata OV de 20 días pudo observarse que el umbral de respuesta (es decir, la mínima dosis necesaria para inducir una respuesta contráctil) de la PGD_2 fue 10^{-8} M, y el efecto máximo se obtuvo con 10^{-5} M. Comparando estos resultados con los datos obtenidos de las PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ se deduce que este tejido es menos sensible a la acción estimulante de la PGD_2 , ya que se necesita una concentración 10 veces mayor de PGD_2 que de PGE_2 o $\text{PGF}_{2\alpha}$ para inducir una respuesta contráctil.

Datos de la bibliografía revelan que en el útero humano, el endometrio produce principalmente $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGE_2 , en tanto que el miometrio sintetiza fundamentalmente 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, metabolito de la PGI_2 (1). Por su parte, Kennedy y col. (107) han atribuido un papel importante a la PGI_2 en la implantación del blastocisto en el útero de rata, así como a la 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$.

En el útero aislado de rata OV de 20 días se observa una menor sensibilidad hacia la PGI_2 que hacia la PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ o PGD_2 , ya que la dosis umbral fue 10^{-6} M y el efecto máximo se obtuvo con 10^{-4} M. Si bien con

esta concentración máxima de PGI_2 se obtuvo una respuesta significativamente mayor que la inducida por la dosis máxima de PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ o PGD_2 , debe notarse que dicha dosis no es fisiológica. La producción de PGI_2 por este tejido "in vitro" es de $1,8 \text{ ng/mg}_{\text{ps}}$ (ps: peso seco del tejido), que se encuentra en una concentración de $2 \times 10^{-8} \text{ M}$ (75).

Por otra parte, el análisis de la respuesta contráctil de este tejido frente a la 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, metabolito de la PGI_2 , revela que tanto el umbral de respuesta como el efecto máximo se obtienen con las mismas dosis que con la prostaciclina, es decir, 10^{-6} M y 10^{-4} M , respectivamente. Sin embargo, la máxima tensión desarrollada frente a la 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ fue significativamente menor que la obtenida con la PGI_2 . Esto significa que el útero aislado de rata OV de 20 días presenta la misma afinidad por la prostaciclina y por su metabolito, pero la PGI_2 es más potente.

Finalmente, el análisis de la tensión desarrollada por el tejido frente a los metabolitos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, es decir, frente a la 15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ y a la 13,14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ revela que tanto la tensión mínima como la máxima se obtuvieron con las mismas concentraciones, es decir, 10^{-6} y 10^{-5} M respectivamente. Esto demuestra que este tejido es más sensible a la $\text{PGF}_{2\alpha}$ que a sus metabolitos.

En base a los resultados puede concluirse entonces que el útero aislado de rata OV de 20 días presenta mayor sensibilidad hacia la PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ que hacia la PGD_2 , PGI_2 , los metabolitos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ o hacia la 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$, metabolito de la PGI_2 .

El hecho de que este tejido sea más sensible a la acción estimulante de las PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ que a otras PGs o sus metabolitos no significa que sólo las primeras sean fisiológicamente relevantes en el aparato reproductor femenino.

Debe tenerse en cuenta que el modelo experimental empleado se caracteriza por estar privado de hormonas sexuales, que como ya se mencionara se sabe regulan la producción de PGs (78,177). Del mismo modo, la falta de dichas hormonas puede estar condicionando la respuesta diferencial de este tejido hacia las PGs o sus metabolitos.

A lo largo de esta tesis se ha demostrado que dos glucocorticoides son capaces de inhibir la contractilidad espontánea del útero aislado de rata OV de 20 días. De ellos, la corticosterona, hormona esteroide fisiológica en la rata, lo hace a expensas de una disminución en la liberación de PGs, probablemente como consecuencia de una síntesis inhibida.

Considerando que a los 20 días post-castración el nivel de CC plasmática está significativamente disminuido respecto de la rata no-ovariectomizada (148), y que $1 \mu\text{g/ml}$ de CC homologa una concentración plasmática fisiológica de este glucocorticoide, es factible postular que los glucocorticoides sean también reguladores fisiológicos de la producción de PGs por el útero. Así también, el nivel bajo de CC plasmática en este animal puede estar induciendo modificaciones tisulares que tal vez podrían explicar la respuesta diferencial del tejido frente a PGs exógenas.

De modo entonces que no sólo serían las hormonas sexuales los probables reguladores endógenos de la producción uterina de PGs, sino que también los glucocorticoides podrían contarse entre ellos.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio fisiofarmacológico del útero aislado de rata ovariectomizada de 20 días permiten concluir que:

- 1.- En un modelo experimental que se caracteriza por presentar una producción basal de prostaglandinas aumentada respecto de un animal en estro, y como consecuencia una actividad contráctil relativamente estable en el tiempo, tanto la corticosterona como la hidrocortisona deprimen significativamente dicha motilidad. A dosis altas ambos glucocorticoides inhiben tanto la frecuencia como la tensión contráctil isométrica. A dosis bajas, la corticosterona deprime fundamentalmente la frecuencia, en tanto que la hidrocortisona deprime fundamentalmente la tensión contráctil isométrica.
- 2.- La corticosterona inhibe la liberación de PG tipo E_2 y tipo $F_{2\alpha}$, observándose como consecuencia un decremento de actividad contráctil. Esta liberación disminuida sería probablemente consecuencia de una síntesis inhibida, tal como se deduce por el hecho de que dos ácidos grasos precursores de PGs como ser el ácido araquidónico a nivel de frecuencia y el ácido γ -linolénico a nivel de frecuencia y de tensión contráctil isométrica lograron revertir la depresión de motilidad observada. El ácido linoleico resultó ineficaz.
- 3.- El mecanismo de depresión de la corticosterona sobre el músculo uterino, consecuencia de una menor producción de PGs, podría producirse a través de un aumento en la liberación de NE; o a una disminución en la síntesis y liberación de estas hormonas de conocida acción estimulante en el útero. El efecto inhibitor de la corticosterona pudo ser bloqueado con un antagonista β -adrenérgico como el Sotalol.
- 4.- La dependencia de la actividad espontánea uterina con la síntesis de PGs pudo demostrarse con indometacina y ácido acetil salicílico. Ambos anti-inflamatorios no-esteroides inhibieron significativamente dicha actividad.

5.- Curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo en presencia de indometacina de distintas PGs y sus metabolitos demostraron su acción estimulante. El tejido resultó ser más sensible a la acción estimulante de las PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$, que a la PGD_2 , PGI_2 , 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (metabolito de la PGI_2); 15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 13,14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (metabolito de la $\text{PGF}_{2\alpha}$).

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el efecto de corticosterona (CC) (0,4 y 1 $\mu\text{g/ml}$) y de hidrocortisona (HC) (20 y 40 $\mu\text{g/ml}$) sobre la actividad contráctil espontánea del útero aislado de rata ovariectomizada (OV) de 20 días.

Ambos anti-inflamatorios deprimieron significativamente la contractilidad uterina, respecto del control sin tratar. Dicho efecto no fue inmediato sino que se produjo a partir de los 30 minutos de agregada la droga. A dosis altas, ambos glucocorticoides afectaron la Frecuencia (F) y la Tensión Contráctil Isométrica (TCI). A dosis bajas, la CC afectó fundamentalmente la F, en tanto que la HC inhibió especialmente la TCI. Pudo observarse también que la CC resultó ser un inhibidor más potente que la HC, dado que dosis menores de CC tuvieron el mismo efecto depresor que dosis mayores de HC.

La CC (1 $\mu\text{g/ml}$) inhibió significativamente la liberación de PG tipo E_2 y tipo $F_{2\alpha}$, respecto del tejido control. Se comprobó que la cantidad de PGs liberadas por el útero no-tratado es la necesaria para el desarrollo de tensión contráctil, en tanto que la obtenida en presencia de CC sólo es capaz de inducir una tensión contráctil mínima.

La CC (1 $\mu\text{g/ml}$) disminuyó la liberación de PGs inhibiendo su síntesis, tal como se demostró al revertir la depresión de actividad contráctil con ácido γ -linolénico (A γ L) (1 y 2 $\mu\text{g/ml}$) a nivel de F y de TCI, y con ácido araquidónico (AA) en las mismas dosis a nivel de F. El ácido linoleico (AL) fue ineficaz. De estos ácidos, sólo el A γ L afectó per se la contractilidad uterina.

La disminución de PG tipo E_2 podría traer aparejado un aumento en la liberación de norepinefrina (NE) del terminal adrenérgico. En este caso, el decremento de actividad contráctil pudo ser bloqueado con un antagonista β -adrenérgico post-sináptico como el Sotalol (1 mM). Por otra parte, la producción disminuida de PG tipo E_2 y tipo $F_{2\alpha}$, ambas hormonas locales de conocida acción estimulante en el útero, también

podría explicar el decremento de actividad contráctil observado.

La dependencia de la motilidad uterina espontánea con la síntesis de PGs pudo demostrarse con indometacina (Indo) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y ácido acetil salicílico (AAS) (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ambos anti-inflamatorios no-esteroides inhibieron significativamente dicha actividad, a partir de los 20 min de agregada la droga, tanto a nivel de F como de TCI, y el grado de inhibición fue semejante con las dos drogas.

Curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo en presencia de Indo (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de distintas PGs y sus metabolitos demostraron su acción estimulante. El tejido resultó ser más sensible a la acción estimulante de las PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$, que a la PGD_2 , PGI_2 , 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (metabolito de la PGI_2); 15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ y 13,14-diOH-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ (metabolitos de la $\text{PGF}_{2\alpha}$).

La CC, glucocorticoide fisiológico de la rata, podría ser un regulador endógeno de la contractilidad uterina por su efecto a nivel de motilidad y síntesis de PGs.

SUMMARY

Corticosterone (CC) (0,4 and 1 $\mu\text{g/ml}$) and hydrocortisone (HC) (20 and 40 $\mu\text{g/ml}$) effect on the spontaneous motility of the 20 days-ovariectomized rat uterus was studied.

Both anti-inflammatories significantly depressed the uterine contractility when comparing with the untreated control. A 30 minutes lag period was observed before the drug effect was noticed. The higher doses affected the Contractile Frequency (CF) as well as the Isometric Developed Tension (IDT). At the lower dose, CC depresses mainly the CF, while HC did so on the IDT. It was also noticed that CC turned out to be a more potent depressing agent, considering that lower doses of CC exerted the same effect as higher ones of HC.

CC (1 $\mu\text{g/ml}$) significantly inhibited PGE_2 -like and $\text{PGF}_{2\alpha}$ -like material release to the bath tissue. Prostaglandins (PGs) liberated by the untreated uterus were the necessary to develop a contractile tension, whereas PGs quantified in the presence of CC are just enough to induce a minimum contractile tension.

CC (1 $\mu\text{g/ml}$) inhibited PGs release by diminishing their synthesis. as could be seen when reversing the inhibited contractile motility with γ -linolenic acid (γ LA) and arachidonic acid (AA). The first one blocked the depression observed on the CF and IDT, whereas the second one acted on the CF. Linoleic acid (LA) had no effect at all. In either case, 1 and 2 $\mu\text{g/ml}$ were employed. Only γ LA depressed the IDT by itself.

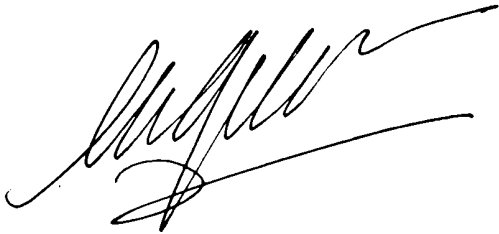
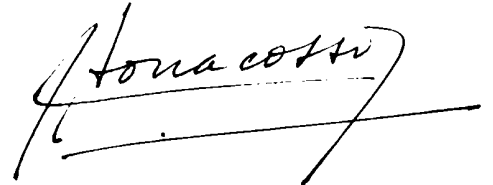
The lower amount of PGE_2 -like material would produce an increase in the norepinephrine release by the adrenergic terminal. A β -adrenoceptor antagonist (Sotalol 1 mM) could block the depression produced by CC. On the other hand, the lower production of PGE_2 -like and $\text{PGF}_{2\alpha}$ -like materials, well-known stimulants of the uterine motility, could also explain the inhibited contractility observed.

Uterine motility dependence on PGs production was demonstrated with indomethacin (Indo) (5 $\mu\text{g/ml}$) and acetyl-salicylic acid (40 $\mu\text{g/ml}$). Both

non-steroidal anti-inflammatories significantly depressed that activity, from 20 minutes on, affecting the CF as well as the IDT. No difference was found with either drug.

Cumulative dose-response curves in the presence of Indo (5 $\mu\text{g/ml}$) showed that this tissue is more sensitive to PGE_2 and $\text{PGF}_{2\alpha}$, than to PGD_2 , PGI_2 , 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ (PGI_2 metabolite), 15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ and 13,14-dihydro-15-keto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$ metabolites).

Corticosterone, the physiologic glucocorticoid in the rat, is suggested to be an endogenous regulator of uterine contractility, because of its effect on the spontaneous motility and PGs production.

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that are difficult to decipher.A handwritten signature in black ink, starting with the name 'Hona' followed by a cursive flourish and a horizontal line.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Abel M. y Rodney W. Kelly
Prostaglandins 18: 821 (1979)
- 2.- Addison T., On the constitutional and local effects of diseases of the suprarenal capsules, Samuel Highley. London, 1855, en The Pharmacological Basis of therapeutics (Goodman L.S. y Gilman A., ed.) Macmillan Publishing Co., Inc., pp. 1472 (1975)
- 3.- Adham N. y Schenk E.A.
Am. J. Obstet. Gynecol. 104: 508 (1969)
- 4.- Ahlquist R.P.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 139: 38 (1962)
- 5.- Aizawa Y. y Mueller G.C.
J. Biol. Chem. 236: 381 (1961)
- 6.- Alden R.H.
Anat. Rec. 97: 1 (1947)
- 7.- Anggård E. y Samuelsson B.
Biochem. Pharmacol. 13: 281 (1964)
- 8.- Balfour W.E., Comline R.S. y Short R.V.
Nature (London) 180: 1480 (1957)
- 9.- Baxter J.D. y Forsham P.H.
Amer. J. Med. 53: 573 (1972)
- 10.- Baxter J.D., Rousseau G.G., Benson M.C., Garcea R.L., Ito J. y Tomkins G.M.
Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 1892 (1972)
- 11.- Baxter J.D. y Tomkins G.M.
Proc. Natl. Acad. Sci. 68: 932 (1971)
- 12.- Bell G.H. y Robson J.M.
J. Physiol. (London) 92: 131 (1938)
- 13.- Bengtsson B.
Acta physiol. scand. 104: 287 (1978)
- 14.- Bennet A., Eley K.G. y Scholes G.B.
Brit. J. Pharmacol. 34: 639 (1968)

- 15.- Bergström S.
Science 157: 382 (1967)
- 16.- Bergström S., Carlson L.A. y Weeks J.R.
Pharm. Rev. 20: 1 (1968)
- 17.- Bergström S., Danielsson H. y Samuelsson B.
Biochim. Biophys. Acta 90: 207 (1964)
- 18.- Bergström S. y Samuelsson B.
Acta Chem. Scand. 17: S 282 (1963)
- 19.- Bergström S. y Sjövall J.
Acta Chem. Scand. 11: 1086 (1957)
- 20.- Beyer K.F. y Samuels L.T.
J. Biol. Chem. 219: 69 (1956)
- 21.- Bitman J., Cecil H.C., Mench M.L. y Wrenn T.R.
Endocrinology 76: 63 (1965)
- 22.- Blackwell G.J., Carnuccio R., Di Rosa M., Flower R.J., Parente L.
y Persico P.
Nature 287: 147 (1980)
- 23.- Goettiger E.G.
J. Cell. Physiol. 27: 9 (1946)
- 24.- Borda E., Agostini M. del C., Sterin-Borda L., Gimeno M.F. y Gimeno
A.L.
Europ. J. Pharmacol. (aceptado para su publicación 1980)
- 25.- Bozler E.
Am. J. Physiol. 124: 502 (1938)
- 26.- Bozler E.
Am. J. Physiol. 133: P 221 (1941)
- 27.- Bozler E.
Biol. Symposia 3: 95 (1941)
- 28.- Bozler E.
Am. J. Physiol. 144: 693 (1945)
- 29.- Bozler E.
Am. J. Physiol. 149: 299 (1947)

- 30.- Bradley P.B., Samuels G.M.R. y Shaw J.E.
Brit. J. Pharmacol. 37: 151 (1969)
- 31.- Brenner R.R.
Acta physiol. latinoam. 26: 453 (1976)
- 32.- Brown-Séquard C.E.
C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci., Paris, 43: 422 (1856), en The Pharmacological basis of therapeutics (Goodman L.S. y Gilman A., ed.), Macmillan Publishing Co., Inc., pp. 1472, 1975.
- 33.- Brownie A.C. y Grant J.K.
Biochem. J. 57: 255 (1954)
- 34.- Buckingham J.C., Dohler K.D. y Wilson C.A.
J. Endocrinol. 78: 359 (1978)
- 35.- Bülbbring E., Casteels R. y Kuryama H.
Brit. J. Pharmacol. 34: 388 (1968)
- 36.- Burnstock G. y Prosser C.L.
Am. J. Physiol. 198: 921 (1960)
- 37.- Burr G.O. y Burr M.M.
J. Biol. Chem. 82: 345 (1929)
- 38.- Cardinali D.P., Ritta M.N., Speziale N.S. y Gimeno M.F.
Prostaglandins 18: 577 (1979)
- 39.- Carroll W.R.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49: 50 (1942)
- 40.- Ching Chun Li, Ph. D., Introducción a la estadística experimental, Omega, Barcelona (1969)
- 41.- Christ E.J. y van Dorp D.A.
Biochim. Biophys. Acta 270: 537 (1972)
- 42.- Cope C.L., Adrenal steroids and disease, Pitman Medical Publishing Co. Ltd., London, 1965.
- 43.- Coupland R.E.
J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw. 69: 1041 (1962)
- 44.- Ceapo A., The role of progesterone in the maintenance and termination of pregnancy. en A.C.Barnes (ed.), Brook Lodge Symposium on Progesterone, pp. 7, Brook Lodge Press, Augusta, Michigan.

- 45.- Caapo A.
Am. J. Physiol. 162: 406 (1950)
- 46.- Caapo A.
Am. J. Obstet. Gynecol. 85: 359 (1963)
- 47.- Dalton C. y Hope W.C.
Prostaglandins 6: 227 (1974)
- 48.- Danon A. y Assouline G.
Nature 273: 552 (1978)
- 49.- Danon A., Chang L.T.C., Sweetman B.J., Nies A.S. y Oates J.A.
Biochim. Biophys. Acta 388: 71 (1975)
- 50.- Davis J.S. y Alden R.H.
Anat. Rec. 134: 725 (1959)
- 51.- Diamond J. y Brody T.M.
Life Sciences 5: 2187 (1966)
- 52.- Di Rosa M. y Persico P.
Br. J. Pharmacol. 66: 161 (1979)
- 53.- Dusting G.J., Moncada S. y Vane J.R.
Prostaglandins 13: 3 (1977)
- 54.- Eccles J.C. y Magladery J.W.
J. Physiol. (London) 90: 31 (1937)
- 55.- Eccles J.C. y Magladery J.W.
J. Physiol. (London) 90: 58 (1937)
- 56.- Eglinton G., Raphael R.A., Smith G.N., Hall W.J. y Pickles V.R.
Nature 200: 960 (1963)
- 57.- Eliasson R.
Acta physiol. scand. 39: 141 (1957)
- 58.- Eliasson R.
Acta physiol. scand. 46: suppl. 158 (1959)
- 59.- Fain J.N.
Endocrinology 82: 825 (1968)
- 60.- Ferreira S.H., Moncada S. y Vane J.R.
Nature New Biol. 231: 237 (1971)

- 61.- Fisher R.A. y Yates F., Statistical tables for biological, agricultural and medical research, Hafner Publishing Co., N.Y., 5^{ta} ed., (1957)
- 62.- Floman Y., Floman N. y Zor U.
Prostaglandins 3: 591 (1976)
- 63.- Floman Y. y Zor U.
Prostaglandins 12: 403 (1976)
- 64.- Flower R.J.
Pharm. Rev. 26: 33 (1974)
- 65.- Flower R.J. y Blackwell G.J.
Biochem. Pharmacol. 25: 285 (1976)
- 66.- Flower R.J. y Blackwell G.J.
Nature 278: 456 (1979)
- 67.- Flower R., Gryglewsky R.J., Herbaczynska-Cedro y Vane J.R.
Nature New Biol. 238: 104 (1972)
- 68.- Friedman N., Exton J.H. y Park C.R.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 29: 113 (1967)
- 69.- Gilmore N., Vane J.R. y Willie J.H.
Nature 218: 1135 (1968)
- 70.- Gimeno A.L., Borda L.S., Borda E. y Gimeno M.F.
Acta physiol. latinoam. 24: 638 (1974)
- 71.- Gimeno A.L., Gimeno M.F., Goldraij A., Sterin-Speziale N.
Reproducción 3: 235 (1976)
- 72.- Gimeno A.L., Sterin-Speziale N., Landa A., Zapata C. y Gimeno M.F.
Int. J. Fertil. 24: 281 (1980)
- 73.- Gimeno M.F., Bednere A.S., Goldraij A. y Gimeno A.L.
Acta physiol. latinoam. 20: 275 (1970)
- 74.- Gimeno M.F., Borda E., Borda L., Vidal J.H. y Gimeno A.L.
Obstetrics and Gynecol. 47: 218 (1976)
- 75.- Gimeno M.F., Borda E.S., Lazzari N.A. y Gimeno A.L.
Prostaglandins 20: 223 (1980)
- 76.- Gimeno M.F., Gimeno A.L., Lima F. y Borda E.
Acta physiol. latinoam. 23: 105 (1973)

- 77.- Gimeno M.F., Sterin-Speziale N., Landa A., Bonaccossa A. y Gimeno A.L.
Acta physiol. latinosam. 27: 321 (1977)
- 78.- Gimeno M.F., Sterin-Speziale N., Landa A., Bonaccossa A. y Gimeno A.L.
Prostaglandins 17: 673 (1979)
- 79.- Goldblatt M.W.
J. Soc. Chem. Ind. (London) 52: 1056 (1933)
- 80.- Grassé P.-P.
Traité de Zoologie, Tumo XVI, fascículo VI (Masson et Cie. Eds.),
París, (1969)
- 81.- Greaves M.W. y Mc Donnell-Gibson W.
Br. Med. J. 2: 83 (1972)
- 82.- Greene E.C., Gross Anatomy, en The rat in laboratory investigation
(Griffith J.Q. y Farris E.J. ed.), Lippincott J.B. Co., USA, pp.23,
(1942)
- 83.- Gryglewsky R.J.
Pharm. Res. Comm. 8: 337 (1976)
- 84.- Gryglewsky R.J., Korbut R. y Ocetkiewicz A.
Nature 273: 765 (1978)
- 85.- Gryglewsky R.J., Fenczenka B., Korbut R., Grodzinska L. y Ocetkiewicz
A.
Prostaglandins 10: 343 (1975)
- 86.- Han A.W.
Tratado de Histología, (Ed. Interamericana), México, 6^a ed. (1970)
- 87.- Hamberg M. y Samuelsson B.
J. Biol. Chem. 241: 257 (1966)
- 88.- Hamberg M. y Samuelsson B.
J. Biol. Chem. 246: 1073 (1971)
- 89.- Hamberg M. y Samuelsson B.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 61: 942 (1974)
- 90.- Hamberg M. y Samuelsson B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3400 (1974)
- 91.- Hamberg M., Svensson J. y Samuelsson B.
Proc. Natl Acad. Sci. USA 72: 2994 (1975)

- 92.- Harper M.J.K.
J. Endoc. 30: 1 (1964)
- 93.- Hayano M., Saba N., Dorfman R.I. y Hechter O.
Rec. Progr. Horm. Res. 12: 79 (1956)
- 94.- Hechter O., Solomon M.M., Zaffaroni A. y Pincus G.
Arch. Biochem. Biophys. 46: 201 (1953)
- 95.- Hechter O., Zaffaroni A., Jacobson R.P., Levy H., Jeanloz R.W.,
Schenker V. y Pincus G.
Rec. Prog. Horm. Res. 6: 215 (1951)
- 96.- Hedqvist P.
Acta physiol. scand. 75: 511 (1969)
- 97.- Hedqvist P.
Acta physiol. scand suppl. 345: 1 (1970)
- 98.- Hedqvist P. y Wennmalm A.
Acta physiol. scand. 83: 156 (1971)
- 99.- Holaday D.A., Volk H. y Mandell J.
Am. J. Physiol. 195: 505 (1958)
- 100.- Hong S.C.L. y Levine L.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1730 (1976)
- 101.- Haugh W., Isakson P.C. y Needleman P.
Prostaglandins 13: 1073 (1977)
- 102.- Ichikawa S. y Bozler E.
Am. J. Physiol. 182: 92 (1955)
- 103.- Iversen L.L. y Salt P.J.
Br. J. Pharmacol. 40: 528 (1970)
- 104.- Jordan S.M.
J. Physiol. (London) 210: 115 P (1970)
- 105.- Kantrowitz F., Robinson D.R., Mc Guire M.B. y Levine L.
Nature 258: 737 (1975)
- 106.- Katari M., Horets Y., Yamashita Y., Ishibashi M. y Miyazaki H.
Prostaglandins 15: 697 (1978)
- 107.- Kennedy T.G. y Zamecnik J.
Prostaglandins 16: 599 (1978)

- 108.- Kerly M.
Biochem. J. 34: 814 (1940)
- 109.- Khairallah P.A., Page I.H. y Türker R.K.
Arch. Int. Pharmacodyn. Therap. 169: 328 (1967)
- 110.- Khayyal M.A. y Scott C.M.
Q. J. Physiol. 24: 249 (1934)
- 111.- Kitay J.
Endocrinology 73: 253 (1963)
- 112.- Krall J.F., Mori H., Tuck M.L., LeShon S.L. y Korzenin S.G.
Life Sci. 23: 1073 (1978)
- 113.- Krentz K.E.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 75: 770 (1959)
- 114.- Khuel F.A.Jr, Cirillo V.J., Ham E.A. y Humes J.L., en Advances in
Biosciences 9, International Conference on Prostaglandins, (Bergström
S. y Bernhard S., ed.), Pergamon Press, Viewig, Braunschweig, pp. 155,
(1973)
- 115.- Khuel F.A.Jr. y Humes J.L.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 480 (1972)
- 116.- Kunze H. y Vogt W.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 180: 123 (1971)
- 117.- Kuriyama H. y Caspo A.
Endocrinology 68: 1010 (1961)
- 118.- Kurzrok R. y Lieb C.C.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 28: 268 (1930)
- 119.- Lands W.E.M.
Ann. Rev. Physiol. 41: 633 (1979)
- 120.- Lands W.E.M. y Samuelsson B.
Biochim. Biophys. Acta 164: 426 (1968)
- 121.- Lee J.B.
Am. J. Med. Sci. 263: 334 (1972)
- 122.- Lehninger A.L., Bioquímica: las bases moleculares de la estructura
y función celular, Ediciones Omega S.A., Barcelona, (1978)

- 123.- Leung K. y Munck A.
Ann. Rev. Physiol. 37: 245 (1975)
- 124.- Levinson B.B., Baxter J.D., Rousseau G.G. y Tomkins G.M.
Science 175: 189 (1972)
- 125.- Lewis G.P. y Piper P.J.
Nature 254: 308 (1975)
- 126.- Liddle G.W. y Melmon K.L., The adrenals, en Textbook of endocrinology
(Williams R.H., ed.), Saunders W.B.Co., USA, pp. 233 (1974)
- 127.- Lima F., Gimeno M.F., Goldraj A., Bednera A.S. y Gimeno A.L.
Life Sci. 10; Part I: 999 (1971)
- 128.- Lison L., Estadística aplicada a la biología experimental, Capítulo
VI, Eudeba (1976)
- 129.- Lung J.A. y Evans H.N., The oestrus cycle in the rat and its associated
phenomena, Memoire University of California 6 (1922), en The rat
in laboratory investigation (Griffith J.Q. y Ferris E., ed.), Lippin-
cott J.R.Co., USA, pp. 52 (1942)
- 130.- Mandl A.M.
J. Endocr. 11: 358 (1954)
- 131.- Manganiello V., Breslow J. y Vaughan M.
J. Clin. Invest. 51: 60 a (1972)
- 132.- Marshall J.M.
Am. J. Physiol. 197: 935 (1959)
- 133.- McCracken J.A., Carlson J.C., Glew M.E., Goding J.R. y Seird D.T.
Nature New Biol. 230: 129 (1972)
- 134.- Moncada S., Gryglewsky R., Bunting S. y Vane J.R.
Nature 263: 663 (1976)
- 135.- Moncada S., Mugridge K.G. y Whittle B.J.R.
Br. J. Pharmacol. 61: 451 P (1977)
- 136.- Moore W.V. y Wolff J.
J. Biol. Chem. 248: 5705 (1973)
- 137.- Mueller G.C., Herranen A.M. y Jervell K.F.
Rec. Prog. Horm. Res. 14: 95 (1958)

- 138.- Munck A. y Brinck-Johnsen T.
J. Biol. Chem. 243: 5556 (1968)
- 139.- Mustonen T. y Teräväinen H.
Acta physiol. scand. 82: 264 (1971)
- 140.- Neal H.V. y Rand H.W.
Comparative anatomy, (Blakiston's Son & Co., Inc.), USA, (1943)
- 141.- Needham D.M., Pharmacology of smooth muscle, Second Intern. Pharmacol. Meeting, Oxford, Pergamon Press Inc., 6: 87 (1964)
- 142.- Neill J.D. y Smith M.S., Pituitary-ovarian interrelationships in the rat, en Current topics in experimental endocrinology, (James V.H.T. y Martini L., ed.), Academic Press Inc., pp. 73 (1974)
- 143.- Newcombe D.S., Fahey J.V. y Yoshinori I.
Prostaglandins 13: 235 (1977)
- 144.- Pace-Asciak W.
Biochim. Biophys. Acta 152: 784 (1968)
- 145.- Pepler R.D. y Jacobs J.J.
Biol. Reprod. 15: 173 (1976)
- 146.- Peterson R.E., Metabolism of adrenal cortical steroids, The Human adrenal cortex (Christy N.P. ed.), N.Y., Harper y Row, pp. 87 (1971)
- 147.- Pickles V.R.
J. Endocrinol. 19: 150 (1959)
- 148.- Pincus G. y Hirai M.
Acta Endocrinol. Suppl. 90: 191 (1964)
- 149.- Piper P.J. y Vane J.R.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 180: 363 (1971)
- 150.- Plager J.E. y Samuelson L.T.
J. Biol. Chem. 211: 21 (1954)
- 151.- Powell W.S., Hammarström S. y Samuelsson B.
Europ. J. Biochem. 41: 103 (1974)
- 152.- Powell W.S., Hammarström S. y Samuelsson B.
Europ. J. Biochem. 56: 73 (1975)
- 153.- Powell W.S., Hammarström S., Samuelsson B. y Sjöberg B.
Lancet 1120 (1974)

- 154.- Ramwell P.W. (editor)
Prostaglandins 13: 375 (1977)
- 155.- Ramwell P.W. y Shaw J.E.
Am. J. Physiol. 211: 125 (1966)
- 156.- Ramwell P.W. y Shaw J.E.
Rec. Prog. Horm. Res. 26: 139 (1970)
- 157.- Ramwell P.W., Shaw J.E. y Jessup R.
Am. J. Physiol. 211: 998 (1966)
- 158.- Rao Ch. V.
Prostaglandins 4: 567 (1973)
- 159.- Reynolds S.R.M.
Am. J. Physiol. 97: 554 (1931)
- 160.- Reynolds S.R.M., Physiology of the uterus, Hoeber P.B., Inc., N.Y.
2^a ed., (1949)
- 161.- Rosenau W., Baxter J.D., Rousseau G.G. y Tomkins G.M.
Nature New Biol. 237: 20 (1972)
- 162.- Rousseau G.G., Baxter J.D. y Tomkins G.M.
J. Molec. Biol. 67: 99 (1972)
- 163.- Saba N. y Hechter U.
Fed. Proc. 14: 775 (1955)
- 164.- Samuelsson B.
Biochim. Biophys. Acta 84: 218 (1964)
- 165.- Samuelsson B.
Fedn. Proc. Am. Soc. Exp. Biol. 31: 1442 (1972)
- 166.- Samuelsson B., Granström E., Green K., Hamberg M. y Hammarström S.
Ann. Rev. Biochem. 44: 669 (1975)
- 167.- Schaeffer L.D., Chenoweth M. y Dunn A.
Biochim. Biophys. Acta 192: 304 (1969)
- 168.- Sheikh A.A. y Sheikh S.A.
Endocrinology 96: 37 (1975)
- 169.- Shaw J., Gibson W., Jessup S. y Ramwell P.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 180: 241 (1971)

- 170.- Shaw J.S y Ramwell P.W.
Worcester Foundation for Experimental Biology 1: 1 (1971)
- 171.- Shio H., Shaw J. y Ramwell P.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 185: 327 (1971)
- 172.- Silver M.J. y Smith J.B.
Life Sci. 16: 1635 (1975)
- 173.- Slaunwhite W.R. y Sandberg A.A.
J. Clin. Invest. 38: 384 (1959)
- 174.- Smigel M. y Fleischer S.
Biochim. Biophys. Acta 332: 353 (1974)
- 175.- Smith J.B. y Willis A.L.
Nature New Biol. 231: 235 (1971)
- 176.- Sterin-Borda L., Borda E., Gimeno M.F. y Gimeno A.L.
Fert. Steril. 27: 319 (1976)
- 177.- Sterin-Speziale N., Gimeno M.F., Bonaccossa A. y Gimeno A.L.
Prostaglandins 20: 223 (1980)
- 178.- Stone D. y Hechter O.
Arch. Biochem. Biophys. 51: 457 (1954)
- 179.- Strong C.G. y Bohr D.F.
Am. J. Physiol. 213: 725 (1967)
- 180.- Sullivan T.J.
Br. J. Pharmacol. 26: 678 (1966)
- 181.- Sun F.F., Chepman J.P. y Mc Guire J.C.
Prostaglandins 14: 1055 (1977)
- 182.- Szego C.M. en Physiological triggers, (Bullock T.H.ed.), American
Physiological Society, Waverly Press, Inc., Baltimore, (1957)
- 183.- Thiersch J.B., Landa J.F. y West T.C.
Am. J. Physiol. 196: 901 (1959)
- 184.- van Dorp D.A., Beerthuis R.K., Nutgeren D.H. y Vunkeman H.
Biochim. Biophys. Acta 90: 204 (1964)
- 185.- van Rossum J.M.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 143: 299 (1963)
- 186.- Vane J.R.
Br. J. Pharmac. Chemother. 23: 360 (1964)

- 187.- Vane J.R.
Nature New Biol. 231: 232 (1971)
- 188.- Vastik-Fernández J., Girono M.F., Lima F. y Gimeno A.L.
Am. J. Obstet. Gynecol. 122: 663 (1975)
- 189.- von Euler U.S.
Klin. Wochschr. 14: 1182 (1935)
- 190.- Vonkeman H. y van Dorp D.A.
Biochim. Biophys. Acta 164: 430 (1968)
- 191.- Wakeling A.E., Kirton K.T. y Wyngarden L.J.
Prostaglandins 4: 1 (1973)
- 192.- Wakeling A.E. y Spilman C.H.
Prostaglandins 4: 405 (1973)
- 193.- Walass U., Walass E. y Lücken F.
Acta Endocrinol. 10: 201 (1952)
- 194.- Weisemann G. y Thomas L.
J. Clin. Invest. 42: 661 (1963)
- 195.- Weetfall T.C.
Physiol. Rev. 57: 659 (1977)
- 196.- Williams H.E. y Province H.T.
Endocrinology 79: 786 (1966)
- 197.- Willie A.L., Vane F.M., Kuhn D.C., Scott C.G. y Petrin N.
Prostaglandins 8: 453 (1974)
- 198.- Yamamoto S., Ogino N., Ohki S. y Yoshimoto T., Enzymological studies on prostaglandin biosynthesis, en Biochem, Aspects of Prostaglandins and Thromboxanes (Kharasch N. y Fried J., ed.), Academic Press, pp. 1 (1977)
- 199.- Zaasztowt O.
Ginek. Pol. 39: 1093 (1968)