

## Tesis de Posgrado

# Influencia de hormonas sexuales sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas en el útero de rata

Franchi, Ana María

1985

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas 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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Franchi, Ana María. (1985). Influencia de hormonas sexuales sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas en el útero de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1904\\_Franchi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1904_Franchi.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Franchi, Ana María. "Influencia de hormonas sexuales sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas en el útero de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1985.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1904\\_Franchi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1904_Franchi.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INFLUENCIA DE HORMONAS SEXUALES SOBRE LA SINTESIS Y LIBERACION  
DE PROSTAGLANDINAS EN EL UTERO DE RATA

Autor: Lic. Ana María Franchi

Director de tesis: Dra. Martha F. Gimeno

Lugar de trabajo: Centro de Estudios Farmacológicos y de Principios  
Naturales. CONICET

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

- 1985 -

Rec. 1904

tesis 1904  
ej. 2

A mis padres

Al abuelo Victor

Los que me mostraron el camino..

## AGRADECIMIENTOS

Al CONICET por las becas que permitieron el desarrollo del presente trabajo.

Al CEFAPRIN por los medios técnicos utilizados en la parte experimental de estos estudios.

A la Dra. Martha F. Gimeno por la dirección de esta tesis, por su confianza y dedicación.

Al Dr. Alvaro L. Gimeno por su colaboración en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Carlos Lantos por sus enseñanzas.

A Elida González y Alicia G. Faletti por su ayuda constante, por soportar mis desórdenes.

A Marcela Chaud por ser compañera de afanes y penurias.

A los demás, porque sí.

## INDICE

### CAPITULO I: INTRODUCCION

#### I.1 - PROSTAGLANDINAS

I.1.1	Introducción .....	2
I.1.2	Estructura química y nomenclatura .....	3
I.1.3	Biosíntesis .....	9
I.1.4	Metabolismo .....	21
I.1.5	Inhibidores .....	24
I.1.6	Receptores .....	29
I.1.7	Mecanismo de acción .....	30
I.1.8	Acción de Prostaglandinas en el aparato reproductor fe menino .....	32
I.1.8.1	Ovulación .....	32
I.1.8.2	Luteólisis .....	34
I.1.8.3	Motilidad uterina .....	37

#### I.2 - UTERO

I.2.1	Anatomía .....	39
-------	----------------	----

I.2.2 Histología .....	41
I.2.3 Fisiología .....	43
I.2.4 Castración y restitución hormonal .....	44
I.2.5 Prepúberes .....	47

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

II.1 - <u>ANIMAL UTILIZADO</u> .....	50
II.2 - <u>TRATAMIENTOS HORMONALES</u> .....	51
II.3 - <u>DOSAJE DE PROSTAGLANDINAS</u> .....	52
II.3.1 Preparación tisular .....	52
II.3.2 Composición del medio de incubación .....	53
II.3.3 Determinación de Prostaglandinas .....	53
II.4 - <u>ENZIMAS METABOLIZANTES</u> .....	59
II.4.1 Actividad de la 15-hidroxi prostaglandin deshidrogenasa .....	59
II.4.2 Acción de la 9-ceto-reductasa .....	60

II.5 - <u>RADIOCONVERSION DEL ACIDO ARAQUIDONICO</u> .....	61
II.6 - <u>DETERMINACION DE PROTEINAS</u> .....	63
II.7 - <u>ESTADISTICA</u> .....	63

### CAPITULO III: RESULTADOS

III.1 - <u>ACCION DE DISTINTAS HORMONAS SOBRE LA SINTESIS Y LIBERACION DE PROSTAGLANDINAS POR EL UTERO AISLADO DE RATA OVARIECTOMIZADA</u> .....	65
III.1.1 Síntesis de prostaglandinas por el útero aislado de ratas ovariectomizadas .....	65
III.1.2 Efecto de diversos estrógenos .....	65
III.1.2.1 Acción del 17-beta-estradiol .....	65
III.1.2.2 Acción del estriol .....	69
III.1.2.3 Acción de estrona .....	71
III.1.3 Acción de catecolestrógenos .....	71
III.1.3.1 Efecto de 2-hidroxi-estradiol .....	72
III.1.3.2 Efecto de 2-hidroxi-estrona .....	72
III.1.3.3 Efecto de 2-hidroxi-estriol .....	72
III.1.4 Efecto de una dosis única de progesterona sobre un tratamiento estrogénico .....	72

III.1.5	Acción de la progesterona .....	74
III.1.5.1	Efecto de una dosis única de progesterona .....	74
III.1.5.2	Acción de distintas dosis de progesterona .....	77
III.1.5.3	Estudio en el tiempo de la acción de progesterona .....	80
III.2	- <u>ACCION DE LA PROGESTERONA SOBRE LA SINTESIS Y LIBERACION DE PROSTAGLANDINAS POR UTEROS DE ANIMALES OVARIECTOMIZADOS Y SUPRARRENOPRIVOS</u> .....	83
III.3	- <u>ACCION DE HORMONAS SEXUALES SOBRE SINTESIS Y LIBERACION DE PROSTAGLANDINAS POR LOS UTEROS DE ANIMALES PREPUBÉRES</u> .....	85
III.3.1	Síntesis de prostaglandinas por los úteros de ratas prepúberes .....	85
III.3.2	Acción de la progesterona .....	87
III.3.3	Acción del 17-beta-estradiol .....	87
III.4	- <u>EFEECTO DE HORMONAS SEXUALES SOBRE LA RADIOCONVERSION DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR EL UTERO DE RATA OVARIECTOMIZADA</u> ...	88
III.4.1	Perfil en la síntesis de prostaglandinas por el útero de ratas ovariectomizadas .....	88

III.4.2 Efecto de la progesterona .....	88
III.4.3 Efecto del 17-beta-estradiol .....	90
III.5 - <u>ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 9-CETO-REDUCTASA</u> .....	91
III.5.1 Conversión de $^3\text{H-PGE}_2$ por úteros de ratas ovariectomizadas .....	91
III.5.2 Conversión de $^3\text{H-PGE}_2$ por úteros de ratas en estro .....	91
III.5.3 Acción de hormonas sexuales sobre la conversión de $^3\text{H-PGE}_2$ por úteros de ratas ovariectomizadas ...	93
III.5.3.1 Acción de la progesterona .....	93
III.5.3.2 Acción del 17-beta-estradiol .....	93
III.6 - <u>METABOLISMO DE LAS PROSTAGLANDINAS POR EL UTERO DE RATA OVARIECTOMIZADA. INFLUENCIA HORMONAL</u> .....	96
III.6.1 Actividad de la 15-hidroxi-prostaglandinodeshidrogenasa en útero de rata ovariectomizada .....	96
III.6.2 Acción de la progesterona .....	99
III.6.3 Acción del 17-beta-estradiol .....	99
<u>CAPITULO IV: DISCUSION</u> .....	101

- <u>POSIBLE IMPLICANCIA FISIOLÓGICA DE ESTE ESTUDIO</u> .....	117
<u>CAPITULO V: CONCLUSIONES</u> .....	121
<u>CAPITULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	127

I - INTRODUCCION

## I.1 - PROSTAGLANDINAS

### I.1.1 Introducción

Prostaglandinas (PGs) es el nombre genérico de una familia de lípidos con actividad biológica.

Los primeros datos de su existencia los comunicaron Kurzrok y Lieb en 1930, quienes encontraron que el fluido seminal humano fresco producía contracciones cuando se aplicaba al miometrio humano (150).

Poco tiempo después, entre 1933 y 1934, Goldblatt (96) en Inglaterra y von Euler (284) en Suecia descubrieron independientemente en extractos de vesícula seminal actividad vasopresora y estimulante del músculo liso. Von Euler encontró que esta actividad estaba asociada con una sustancia liposoluble que poseía propiedades ácidas, a la que denomina "Prostaglandina" (285).

Fue recién a fines de la década del cincuenta que se comenzó a trabajar en la purificación de las PGs así como en la determinación de su estructura química.

En 1957 Bergström y Sjövall (24) aislaron, a partir de vesícula seminal de oveja, dos de estas sustancias que denominaron PGE<sub>1</sub> y PGF<sub>1</sub>. Mediante técnicas de cromatografía gaseosa, espectroscopía de masa y de rayos X pudieron determinarse las estructuras de estos dos compuestos como así también algunos detalles de su conformación tridimensional.

En los años siguientes fue descubierta una gran familia de PGs y sus estructuras fueron determinadas por Bergström, Ryhage, Samuelsson y Sjövall (22, 23, 238).

El rápido desarrollo de los métodos analíticos concernientes a Pgs ha permitido determinar la muy extensa distribución biológica de estos compuestos, no sólo en la mayoría de los tejidos de los mamíferos sino también en vertebrados inferiores y aún en algunos invertebrados.

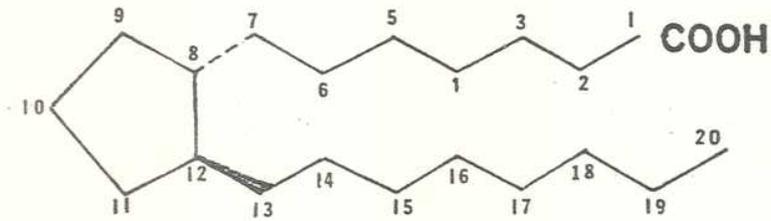
A pesar de hallarse presente en muchos tejidos la actividad en cada uno de ellos varía ampliamente.

#### I.1.2 Estructura química y nomenclatura

Las PGs son ciclopentanos derivados, formados a partir de ácidos grasos poliinsaturados.

Todas las PGs contienen veinte átomos de carbono y poseen el esqueleto común del hipotético "ácido prostanoico" (Fig. 1). Cada PG contiene un anillo ciclopentano en C<sub>8-12</sub> en el cual distintos sustituyentes permiten clasificarlas en los seis grupos clásicos: A, B, C, D, E, y F (Fig. 2).

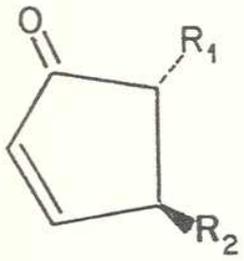
Las PGs E y F conocidas como "primarias" poseen ambos grupos alfa-oxhidrilos en posición 11 y 15 y un doble enlace trans entre los C<sub>13</sub> y C<sub>14</sub>. Difieren entre sí en el C<sub>9</sub>, las de tipo E presentan un grupo ceto mientras que las de tipo F un oxhidrilo.



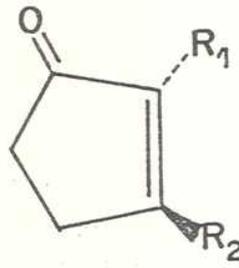
## A. PROSTANOICO

Fig. nro. 1: Acido prostanoico

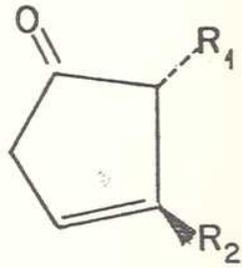
PGA



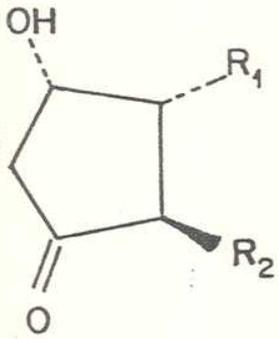
PGB



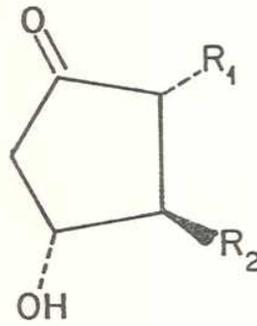
PGC



PGD



PGE



PGF<sub>α</sub>

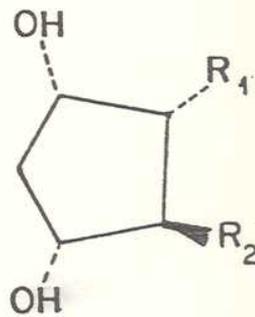


Fig. nro. 2: Ciclopentano de las distintas prostaglandinas

Las PGs A, B, C y D llamadas "secundarias" poseen también el oxhidrilo en C<sub>15</sub> y sólo la PGD tiene un grupo ceto en posición 11.

Todas las PGs tienen un oxígeno en C<sub>9</sub> siendo para la PGD un grupo oxhidrilo y uno ceto en las restantes. Las PGs A, B y C poseen un doble enlace dentro del anillo pentano en diversas posiciones: 10 para la PGA, 8 para la PGB y 11 para la PGC.

Además de esta clasificación las PGs se dividen en tres series dependiendo del número de insaturaciones de las cadenas laterales.

Las PGs de la serie I presentan un solo doble enlace entre los C<sub>13</sub> y C<sub>14</sub>, las de la serie II tienen otra insaturación entre C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub> y finalmente las pertenecientes a la serie III tienen una tercera doble ligadura entre C<sub>17</sub> y C<sub>18</sub> (Fig. 3).

Luego del descubrimiento de las PGs clásicas, Samuelsson (239) encontró que los oxígenos del anillo pentano de las PGs provenían de la misma molécula de oxígeno y por lo tanto propuso un endoperóxido como intermediario. Este compuesto al que se llamó PGH tiene las cadenas laterales iguales a la PGE y dos átomos de oxígeno unidos entre sí y a los C<sub>9</sub> y C<sub>11</sub>. Fue en 1973 que Hamberg y colaboradores (113) demostraron que poseía actividad biológica (Fig. 4).

Nugteren y colaboradores (200) y también Hamberg y colaboradores (116) hallaron otro endoperóxido con la misma estructura del PGH pero con un grupo hidroperóxido en C<sub>15</sub>, que denominaron PGG (Fig. 4).

Hamberg y colaboradores (115) descubrieron, poco después, un compuesto altamente inestable de vida media de treinta a cuarenta segun-

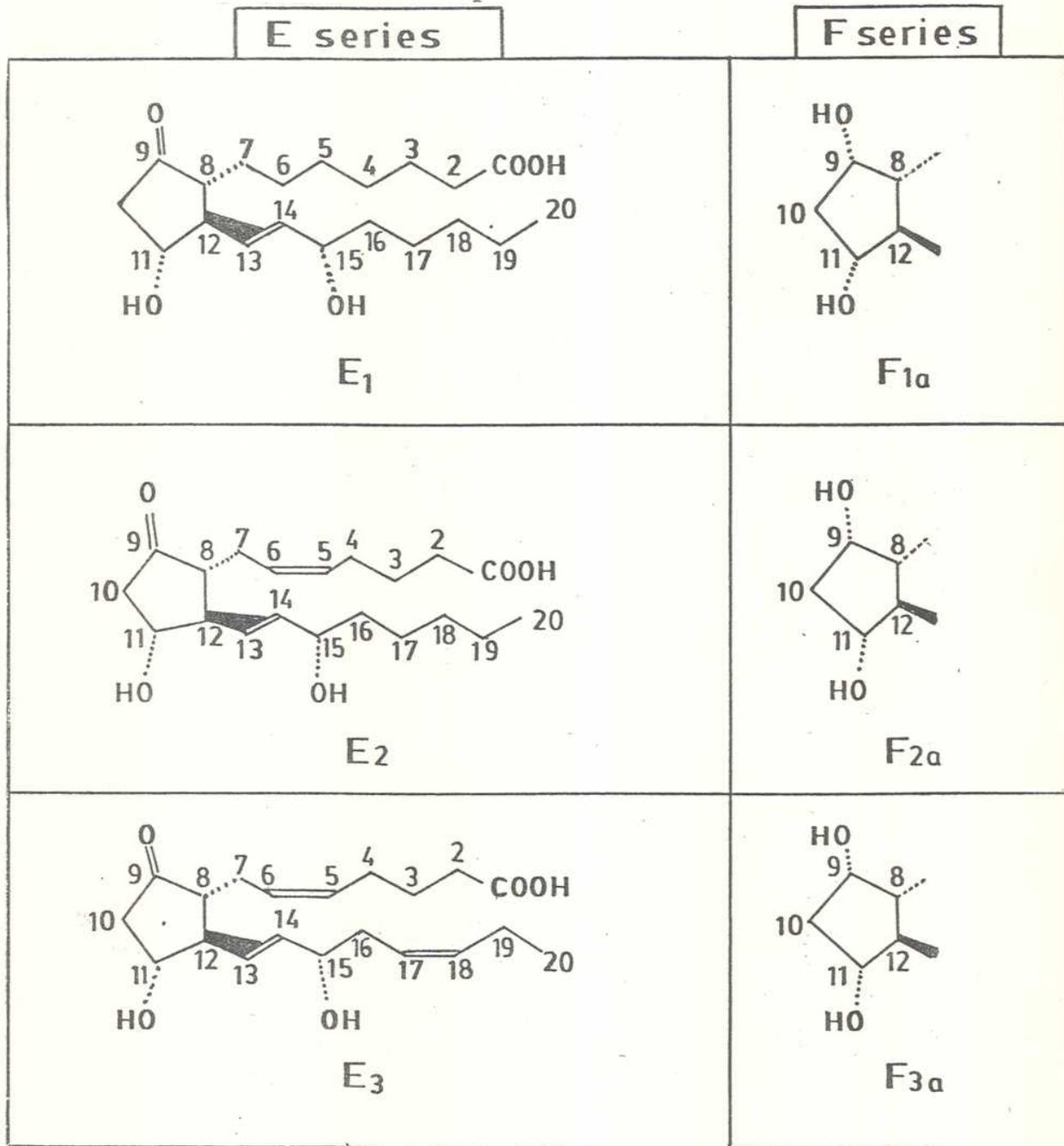


Fig. nro. 3: Clasificación de las prostaglandinas

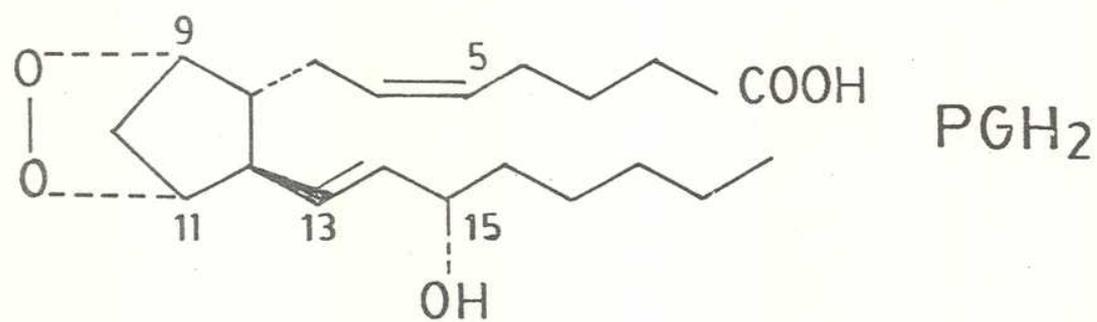
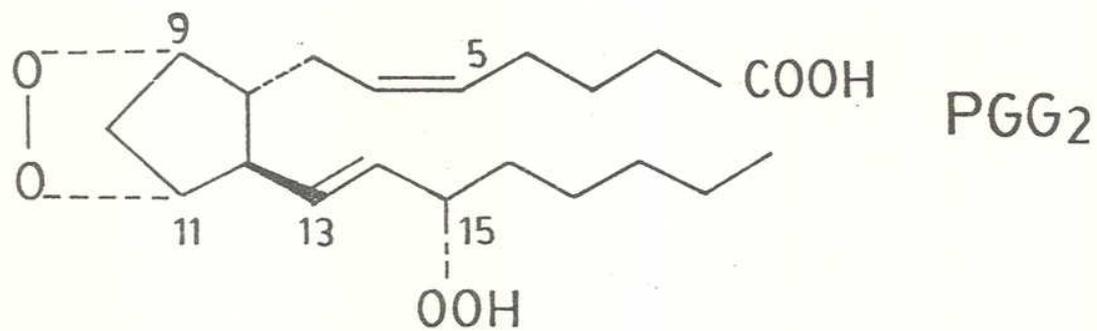


Fig. nro. 4: Endoperóxidos

dos, que favorecía la formación de trombos y que por esta propiedad lo denominaron tromboxano  $A_2$  ( $TxA_2$ ) (Fig. 5). Este compuesto carece del esqueleto común y por ello no se lo considera una PG. Presenta un anillo oxano y un oxígeno unido a los  $C_9$  y  $C_{11}$ . Su derivado estable es el Tromboxano  $B_2$  ( $TxB_2$ ) que presenta dos grupos oxhidrilos en  $C_9$  y  $C_{11}$ .

En 1975 Moncada y colaboradores (185) estudiando la biosíntesis de  $TxA_2$  encontraron que los vasos sanguíneos no producían este compuesto pero sí un producto hasta este momento desconocido al que llamaron PGX y que mostraba propiedades biológicas antagónicas a las del  $TxA_2$ .

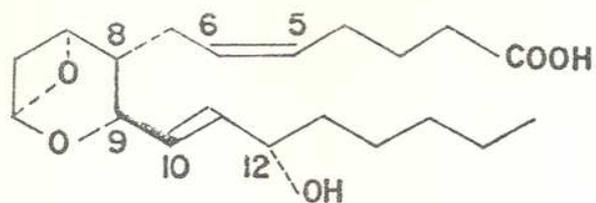
Johnson y colaboradores (134) determinaron la estructura química de este compuesto que se llamó prostaciclina o  $PGI_2$ , cuyo nombre comercial es epoprostenol (Fig. 5).

### I.1.3 Biosíntesis

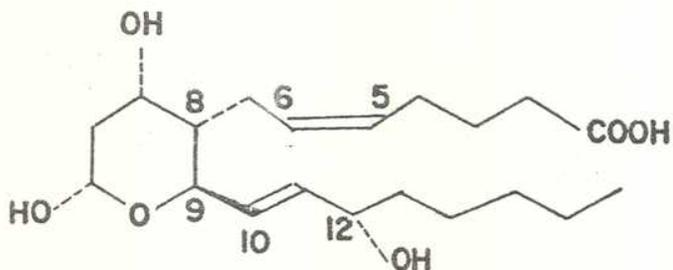
Las PGs derivan de ácidos grasos poliinsaturados (Fig. 6). En el caso de la serie I su precursor es el ácido dihomo-gama-linolénico (ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico). El ácido araquidónico (ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico) da origen a la serie II y por último el ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico a la serie III.

Los ácidos gama-linolénico, linoleico y araquidónico son ácidos grasos esenciales o sea deben suministrarse en la dieta para evitar trastornos funcionales (35).

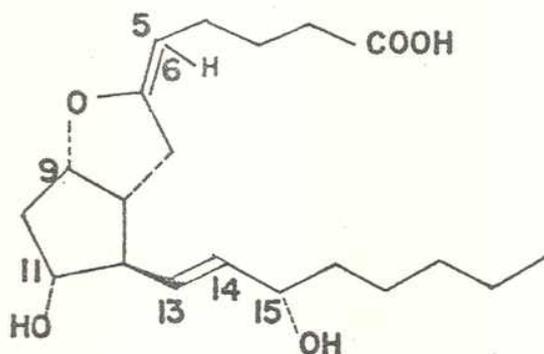
El ácido linoleico puede sufrir desaturación a gama-linolénico y éste a su vez elongación a dihomo-gama-linolénico. Este último se con-



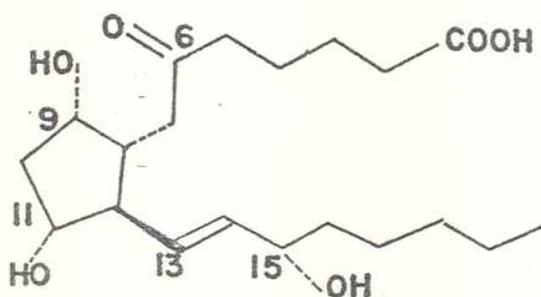
TROMBOXANO A<sub>2</sub>



TROMBOXANO B<sub>2</sub>

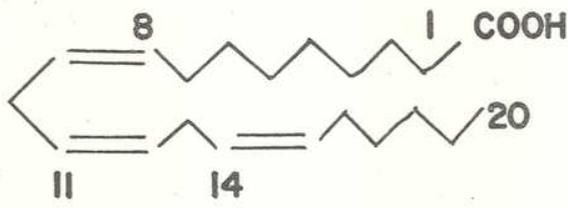


PROSTACICLINA

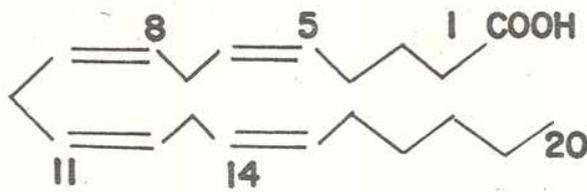


6-OXO-PGF<sub>1α</sub>

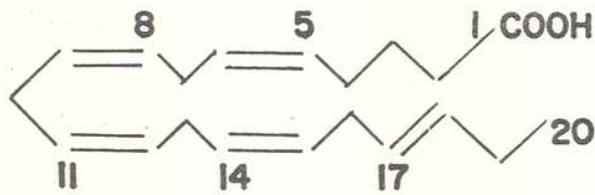
Fig. nro. 5: Estructura química de la prostaciclina y del tromboxano



A. DIHOMO-GAMA-LINOLENICO



A. ARAQUIDONICO



A. EICOSAPENTAENOICO

Fig. nro. 6: Acidos grasos precursores

vierte en ácido araquidónico por acción de una  $\Delta$ 5-6 desaturasa (223) en un proceso de tipo unidireccional (35). El ácido alfa-linolénico por dos desaturaciones y una elongación da lugar al ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoico (35), ácido graso no esencial (Fig. 7).

Salvo en concentraciones muy bajas, los ácidos grasos no se encuentran libres sino que están unidos a los lípidos intracelulares: ésteres de colesterol, compuestos fosfatídicos, mono, di o triglicéridos (82). Por lo tanto para que suceda la síntesis de PGs es necesario liberar el sustrato, reacción que es catalizada por un grupo de enzimas, acilhidrolasas, como la fosfolipasa  $A_2$  y la triglicérido lipasa (150).

Diversos estímulos hormonales, la injuria tisular y varias drogas que inducen la síntesis de PGs, pueden liberar los ácidos grasos de sus depósitos por estimulación de las acilhidrolasas (Fig. 8).

La fosfolipasa  $A_2$  tiene un papel preponderante en la síntesis de PGs porque los fosfolípidos son la fuente más importante de ácido araquidónico. Sin embargo no sólo la fosfolipasa  $A_2$  libera ácido araquidónico. En ovario por ejemplo, en donde existe una gran concentración de ácido araquidónico de colesterol, hay una colesterol esterasa estimulada por LH que libera araquidonato (144).

Existe también un mecanismo secuencial de liberación del ácido araquidónico en plaquetas. Este consiste en la estimulación de una fosfolipasa C que fosforila un diglicérido resultando la formación de un ácido fosfatídico que sería el que activaría la fosfolipasa  $A_2$  (156). Este mecanismo también tiene lugar en pared vascular y en riñón (256).

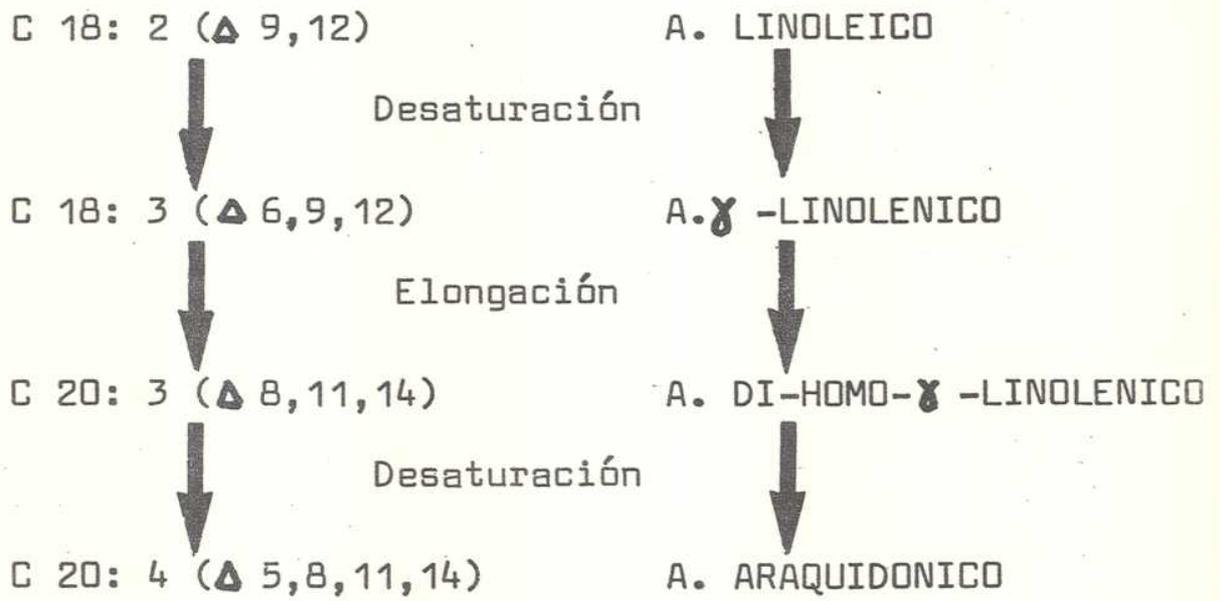


Fig. nro. 7: Transformaciones de los ácidos grasos

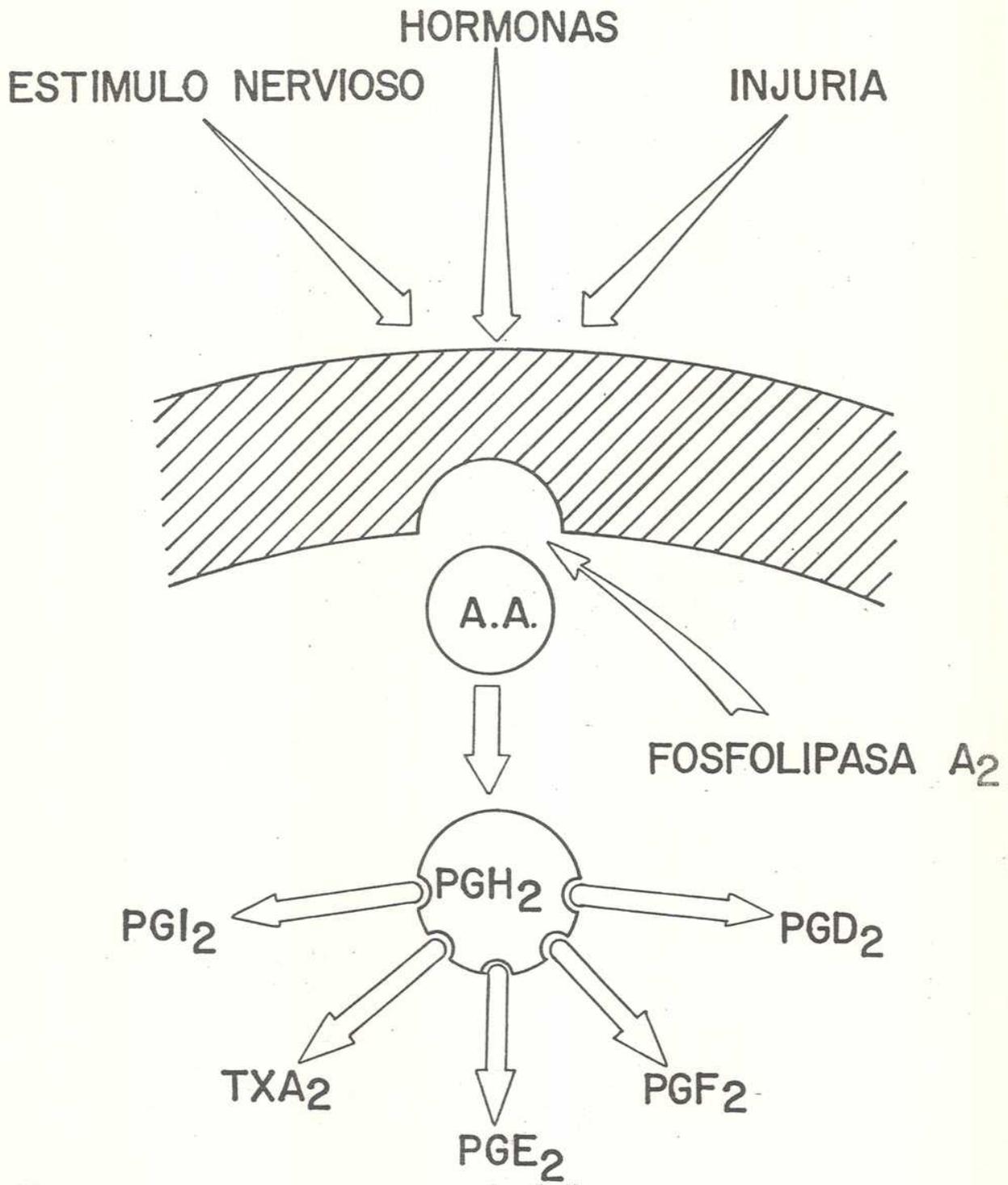


Fig. nro. 8: Liberación del ácido araquidónico

Una vez liberados los ácidos grasos pueden sufrir diversos procesos:

- a) Beta-oxidación: es poco importante ya que el ácido araquidónico no es fuente de energía significativa.
- b) Elongación de la cadena: el ácido dihomo-gama-linolénico y el araquidónico pueden elongarse hasta un ácido de veintidos átomos de carbono y cinco dobles enlaces, el docosa-4, 7, 10, 13, 16-pentenoico mientras que el eicosa-5, 8, 11, 14, 17-pentenoico da otro ácido graso de veintidos átomos de carbono y seis dobles ligaduras; el docosa-4, 7, 10, 13, 16, 19-hexenoico (35).
- c) Reincorporación: uno de los procesos más favorecidos es la captación de los ácidos grasos por las acilasas y su reincorporación a los fosfolípidos. Ocho horas después de alimentar ratas con ácido araquidónico-<sup>14</sup>C el 95% del araquidónico marcado en hígado se encontró en los fosfolípidos (56).
- d) Autooxidación: o sea la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos insaturados por un proceso de radicales libres. Biológicamente existen dos tipos de oxidación: enzimático y no enzimático. Cuando la autooxidación es no enzimática los productos se forman no específicamente y son ópticamente inactivos mientras que la oxidación por lipooxigenasas tales como la de soja da origen a productos específicos ópticamente activos.
- e) Cascada: consiste en la síntesis de PGs y requiere del ácido graso libre (257). Una vez liberado el araquidonato, la síntesis de PGs y tromboxanos ocurre en dos pasos principales (Fig. 9).

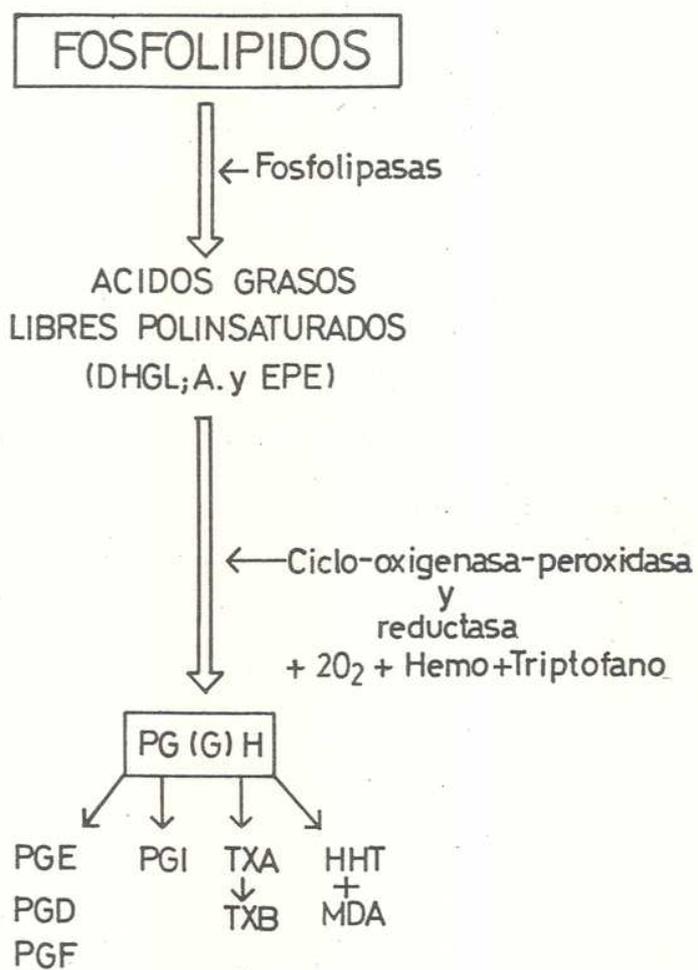


Fig. nro. 9: Liberación y metabolización de los ácidos grasos

El primero está catalizado por la ciclooxigenasa que se ha encontrado prácticamente en todas las células de mamíferos. Da como resultado la oxigenación y ciclización del ácido graso para formar los intermediarios inestables; los endoperóxidos (Fig. 10).

El segundo paso incluye enzimas específicas de cada tejido y lleva a la formación de los productos característicos de cada uno de ellos; por ejemplo el tromboxano en las plaquetas.

Todo este sistema, llamado PG sintetasa, fue solubilizado de vesículas seminales bovinas (184) y resuelto en sus dos componentes por cromatografía en DEAE-celulosa. Estos fueron la ciclooxigenasa, también llamada PG endoperóxido sintetasa, y la PG endoperóxido isomerasa, que convierte el PGH en PGE.

La PG endoperóxido sintetasa fue purificada hasta homogeneidad, de vesículas seminales bovinas (181) y ovinas (121, 279). Se encontró que la reacción necesita como cofactor al hemo para la conversión del ácido dihomo-gama-linolénico en PGE<sub>1</sub> (181). El hemo podría reemplazarse por hemoglobina, mioglobina o catalasa, mientras que el hemato hemo y el citocromo C eran inefectivos. Se determinó que 8 era el pH óptimo y 7.2 su punto isoeléctrico. El extremo N terminal contenía solamente alanina, y la composición de aminoácidos mostró un alto contenido en sustancias hidrofóbicas: prolina e histidina (279).

La autodestrucción del sistema PG sintetasa que ya había sido descrita (152) también se encontró en la enzima purificada (181, 279). La actividad de ciclooxigenasa disminuye luego de 15-30 segundos de catálisis, aparentemente por un inactivador formado durante la reacción (181). Como la hidroquinona previene la autodestrucción (279) se

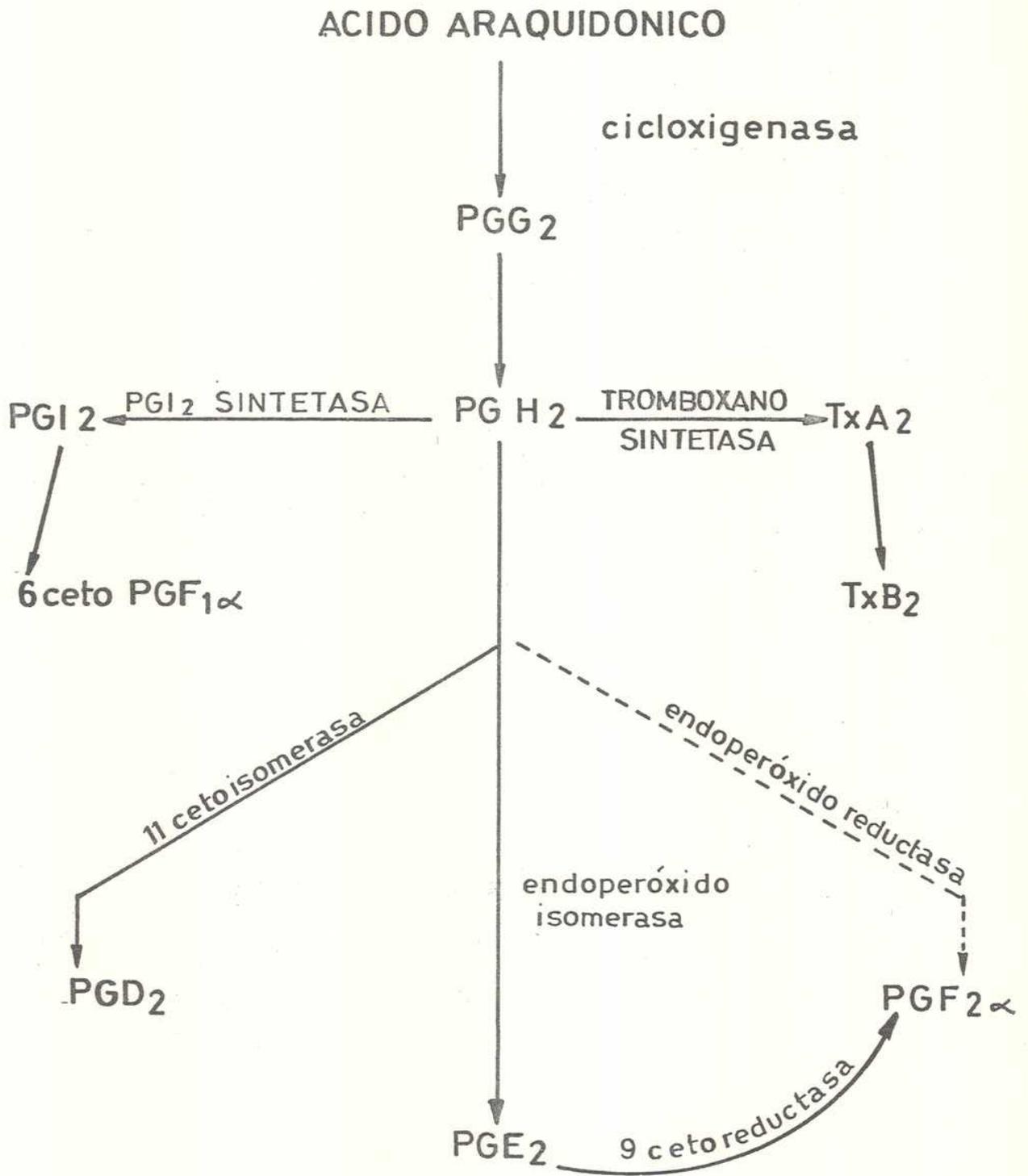


Fig. nro. 10: Cascada del ácido araquidónico

ha sugerido que el inactivador es un hidroperóxido derivado del ácido graso. También se ha propuesto al PGG como mediador de la autodestrucción (76).

De la incubación de PGG<sub>2</sub>-<sup>14</sup>C y PGH<sub>2</sub>-<sup>14</sup>C con homogenatos enteros de vesículas seminales ovinas se obtuvo principalmente PGE<sub>2</sub> (200, 242). La conversión del PGG<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub> implica dos reacciones: isomerización de la estructura endoperóxido en una beta-hidroxicetona por una endoperóxido isomerasa y la reducción del grupo hidroperóxido en C<sub>15</sub> a oxhidrilo. Se observó por incubación de (1-<sup>14</sup>C)-PGH<sub>2</sub> con vesículas seminales, que la endoperóxido isomerasa estaba asociada a la fracción microsomal y que su actividad enzimática se estimulaba con glutatión reducido y se inhibía con p-mercuribenzoato y N-etilamina. Se ha comunicado ya la solubilización y purificación parcial de esta enzima (184).

Se determinó también que la actividad de la peroxidasa estaba asociada a la fracción soluble (111). Como la actividad de esta enzima disminuía con glutatión reducido se propuso que sería idéntica a la glutatión peroxidasa.

La enzima que sintetiza TxA<sub>2</sub> a partir de endoperóxido, la tromboxano sintetasa, fue localizada por primera vez en la fracción particulada de alta velocidad de plaquetas humanas y de caballo (188, 195). Posteriormente la enzima fue solubilizada y separada de la ciclooxigenasa (66, 117, 303). Aunque esta enzima fue descripta originalmente en plaquetas se ha encontrado actividad de tromboxano sintetasa en tejidos tan variados como: pulmón (114, 60), arteria umbilical (273), tejido decidual de rata (291), mucosa estomacal bovina (7), bazo (109),

leucocitos polimorfonucleares (240, 97) y cerebro (297).

La tromboxano sintetasa también cataliza la reacción que convierte el  $\text{PGH}_2$  en ácido hidroxihexadecadienoico y malondialdehído (295). Esta dismutación parece ser una actividad alternativa del mismo sitio catalítico de la enzima porque se copurifica con la sintetasa y es inhibida en el mismo grado por distintos inhibidores (66).

Dos o tres proteínas catalizan la conversión de los endoperóxidos a PGD. Una de ellas se encontró en pulmón de rata, estómago e intestino (200). La reacción requiere glutatión como cofactor (49) y la enzima implicada se denomina 11-cetoisomerasa.

Se encontró un mecanismo altamente especializado que convierte los endoperóxidos a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en microsomas de útero de cobayo (296) y se identificó como endoperóxido reductasa o PGF sintetasa, aunque este factor reductor no se ha aislado. La reacción es inhibida por p-hidroximercuribenzoato.

Se ha encontrado PGA isomerasa, enzima que cataliza la conversión de PGA a PGC (215) y PGC isomerasa que transforma esta última en PGB, en suero de conejo (216).

La conversión enzimática del  $\text{PGH}_2$  en  $\text{PGI}_2$  por la  $\text{PGI}_2$  sintetasa fue descrita en el ductus arterial (209), el corazón (62), el útero (79), el cuerpo lúteo (258), el pulmón (265), el granuloma (46) y las arterias coronarias (71), etc.

El producto formado a partir de  $\text{PGI}_2$  por descomposición en solución acuosa, fue identificado como 6-ceto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  por comparación con el

material sintético.

Existe una PGE<sub>2</sub> 9-cetoreductasa que convierte la PGE<sub>2</sub> en PGF<sub>2α</sub>. Esta enzima, NADPH dependiente, se ha encontrado en ovario humano, de rata y de cerda (289), en testículo de rata (272), en sangre, en corazón, en hígado (122), en riñón (143), en piel (304) y en tiroides (86). No actúa sobre el 11-cetoisómero (158) y parece ser estimulada por bradiquinina (158, 301).

Se ha encontrado también una 9-hidroxidehidrogenasa que convierte la PGF<sub>2α</sub> en PGE<sub>2</sub> en el riñón humano (206).

En hígado de conejo se ha descrito una 11-cetoreductasa, NADPH dependiente, que convierte la PGD<sub>2</sub> en PGF<sub>2α</sub> (298).

#### I.1.4 Metabolismo

La rápida pérdida de la actividad biológica de las PGs está asociada a la oxidación enzimática del grupo alcohol del C<sub>15</sub> (10) y por las reacciones hidrolíticas espontáneas de PGI<sub>2</sub> y TxA<sub>2</sub> a 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> y TxB<sub>2</sub>.

La primera reacción está catalizada por una 15-hidroxi-PG deshidrogenasa (10, 192, 250) que está ampliamente distribuida en los tejidos de los mamíferos (11, 197, 208, 10) (Fig. 11). Según Lee y colaboradores (159) existen dos tipos de esta enzima, una unida a NAD<sup>+</sup> que sería la que se encuentra en pulmón, corazón, riñón, bazo y placenta, y la otra ligada a NADP<sup>+</sup>, presente en cerebro, riñón y eritrocitos.

La mayor concentración de esta enzima se encuentra en pulmón, hígado y riñón. No existe especificidad de sustrato con respecto a las

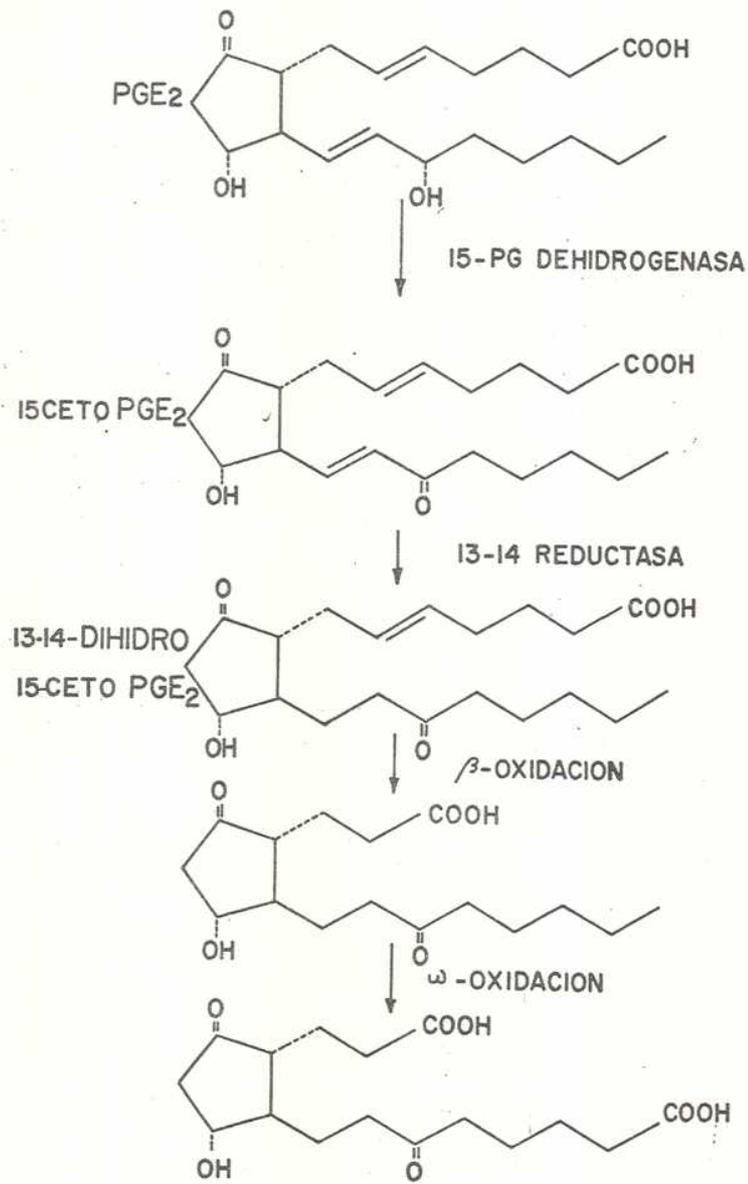


Fig. nro. 11: Metabolismo de la PGE<sub>2</sub>

distintas PGs, pero se ha encontrado una enzima específica para PGA en papilas renales de conejo (201). Además la  $PGD_1$  y la  $PGD_2$  no son sustratos de esta enzima (261). Probablemente la  $PGD_2$  sea transformada a  $PGF_{2\alpha}$  en el hígado por acción de la 11-cetoreductasa antes de su metabolismo (227).

La 15-hidroxi-PG deshidrogenasa es una proteína de vida corta y su velocidad de recambio está regulada por esteroides estrogénicos y otras hormonas (27).

La oxidación es seguida por una reducción del doble enlace 13-14 trans, dando por resultado los dihidrocetoderivados, los más importantes metabolitos en circulación periférica (241). Esta reacción es catalizada por una 13-reductasa. La enzima se encuentra en la fracción sobrenadante; necesita de NADH y NADPH (10) y requiere para su acción del carbonilo en posición 15 (112).

Luego de lo mencionado ocurre una beta-oxidación de la cadena carboxílica lateral (110). Los dinor ( $C_{16}$ ) o tetranor ( $C_{18}$ ) derivados se forman generalmente, aunque existen excepciones, luego de la 15-des hidrogenación y la reducción del doble enlace en 13-14. Se ha encontrado en orina de ratas un dinor  $PGF_{1\alpha}$  (88), un dinor  $TxB_2$  en orina de primates (231) y también, en ratas, un dinor 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$  (207). Fue demostrada también la  $\omega$ -oxidación de la cadena alquílica lateral seguida por la hidroxilación en  $C_{19}$  o  $C_{20}$  o en ambos (132). Los  $\omega(1)$  y  $\omega(2)$ -hidroxiderivados son los metabolitos de mayor concentración en orina. Los  $\omega(1)$ -hidroxiderivados de  $PGE_1$  y  $PGE_2$  son los principales componentes en semen de primates (140). En cuanto al  $TxA_2$ , que es conver-

tido en  $\text{TxB}_2$ , se excreta en parte como tal y en parte como dinor  $\text{TxB}_2$  (142). En el hombre, cuando se realiza una infusión intravenosa de  $\text{TxB}_2$ - $^3\text{H}$ , el 74% de la radioactividad total se recupera en orina a las 13 horas, siendo el 2, 3-dinor- $\text{TxB}_2$  el metabolito más importante (230).

La 6-ceto-PGF $_{1\alpha}$  no es el principal metabolito de la prostaciclina, sino que éste sería un producto de degradación química (260). Estudios in vitro han demostrado que en pulmón (177) y en vasos sanguíneos (259) la prostaciclina es oxidada por acción de la 15-hidroxi-PG deshidrogenasa; mientras que la 6-ceto-PGF $_{1\alpha}$  es un pobre sustrato para dicha enzima (Fig. 12).

El metabolismo de la PGI $_2$  por el riñón y los vasos mesentéricos da diferentes productos. En el riñón el producto principal es el ácido 4, 13-diceto-7, 9-dihidroxidinorprostanico formado por la acción sucesiva de la 15-hidroxi-PG deshidrogenasa, la PG  $\Delta$ -13-reductasa y las beta-oxidadas (299). Una pequeña cantidad es convertida en dinor-6-ceto-PGF $_{1\alpha}$  mientras que en vasos sanguíneos el único producto identificado hasta ahora es el 6, 15-ceto-PGF $_{1\alpha}$ , por la acción de la 15-dihidroxi-PG deshidrogenasa (300).

### I.1.5 Inhibidores

Por su importancia clínica y farmacológica se ha trabajado mucho en el hallazgo de inhibidores de la síntesis de PGs.

Una serie de inhibidores se obtuvieron probando análogos de los

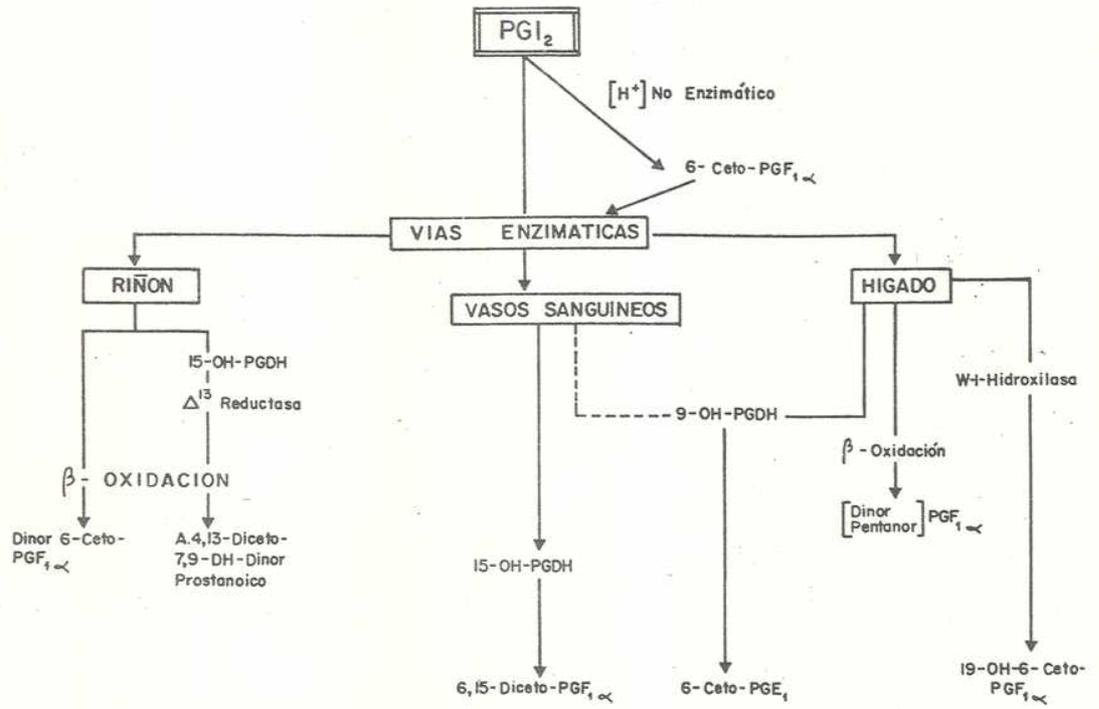


Fig. nro. 12: Metabolismo de la PGI<sub>2</sub>

sustratos naturales de la ciclooxigenasa. El ácido eicosa-5, 8, 11, 14-tetraenoico (TYA), análogo acetilénico del ácido araquidónico, inhibe en forma irreversible la síntesis de PGs (2). Lands y Vanderhoek (154, 155, 278) sugieren que los compuestos acetilénicos inhiben la síntesis de PGs por destrucción del sitio catalítico. Los 12-trans análogos (199) del ácido dihomo-gama-linolénico y del ácido araquidónico son inhibidores competitivos de la ciclooxigenasa. Los ácidos oleico, linoleico y linolénico son inhibidores pero las concentraciones necesarias son altas (1.8 - 5.0 mM) (210). Según Lands (155) esta inhibición es del mismo tipo que la del TYA.

Otro tipo de inhibidores es el de drogas "tipo aspirina", o sea aquellas drogas que poseen acción antipirética, analgésica y antiinflamatoria como el ácido acetilsalicílico. En 1971 se demostró simultáneamente la inhibición de la síntesis de PGs por drogas tipo aspirina en plaquetas humanas (255), bazo de perro (80) y en homogenatos libres de células de pulmón de cobayo (280). La inhibición de la síntesis de PGs por estas drogas ha sido demostrada en más de 30 sistemas tan diversos como: útero de cobayo y rata (100), cerebro de ratón (162), vesículas seminales de carnero (253), etc.

Dentro de la clasificación de drogas tipo aspirina se incluyen: el paracetamol (84), la indometacina (63), la fenelzina (129), la quinidina (129), el fenbufeno (273), el fenoprofeno (211), etc.

El mecanismo de acción en el caso del ácido acetilsalicílico sería dependiente de la acetilación selectiva del sitio activo de la ciclooxigenasa (233, 235).

Los corticoides inhiben también la síntesis y liberación de PGs. La primera evidencia de este hecho fue presentada en 1974 en el congreso de la Sociedad Húngara de Farmacología (124), donde se vio que el aumento en la liberación de PGs por estimulación eléctrica del nervio ciático en perros, era abolida por infusión intraarterial de hidrocortisona. Poco después Lewis y Piper (167), estudiando la vasodilatación que acompaña a la lipólisis en tejido adiposo subcutáneo, encontraron que la vasodilatación era abolida por antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos pero no la lipólisis. Se conocía que la vasodilatación era debida a  $PGE_2$  (165) y que los antiinflamatorios no esteroideos inhibían su formación. Estos investigadores hallaron que los antiinflamatorios esteroideos no bloqueaban la síntesis de PGs (166). Por todo esto determinaron que los corticoides inhibirían, por unión a la membrana, el mecanismo de transporte a través de la misma de las PGs y por lo tanto estas se acumularían dentro de la célula.

Por otro lado Gryglewski y colaboradores (106) trabajando en vasos mesentéricos de conejo y en pulmones perfundidos de cobayo, vieron que la noradrenalina aumentaba la presión de perfusión por la liberación de sustancias tipo PGE y que ello era bloqueado por indometacina, hidrocortisona y dexametasona. También observaron que la infusión de ácido araquidónico, con hidrocortisona o con dexametasona, no anulaba el efecto de la noradrenalina. De estos resultados dedujeron que el efecto de los corticoides dependía de la inhibición de la fosfolipasa  $A_2$ , impidiendo así la liberación del sustrato para la síntesis de las PGs.

En 1978 Danon y Assouline (58) determinaron, en papilas renales de rata, que inhibiendo la síntesis de proteínas y RNA impedían la dis

minución en la síntesis de PGs por el cortisol. Este hecho fue confirmado en leucocitos de rata (67) y en pulmón de cobayo (83). Se propuso entonces que los esteroides antiinflamatorios inducían la síntesis de un factor que inhibiría la fosfolipasa  $A_2$  (83, 41).

Finalmente se determinó que este factor era un polipéptido de peso molecular aproximadamente igual a 15.000 al que se denominó macrocortina cuya síntesis y liberación era estimulada por los esteroides y que inhibía la actividad de la fosfolipasa  $A_2$  (25).

Dada la importancia de la  $PGI_2$  y el  $TxA_2$  en procesos tales como la coagulación y la trombosis, ha sido amplia la investigación en busca de inhibidores específicos de cada uno de estos prostanoides.

En contraste con la ciclooxigenasa, la tromboxano sintetasa es deficientemente inhibida por indometacina (188). Los inhibidores selectivos de esta enzima ensayados fueron: benzidamina (188), un fenilfosfonato derivado del florentínfosfato designado como N-0164 (140), el compuesto 1'-(isopropil-2-indolil)-3-piridil-3-cetona, conocido como 18027 o nictindol (115), imidazol (181) y alguno de sus análogos (26, 264). Además los análogos de los endoperóxidos son inhibidores potentes de la tromboxano sintetasa (98). Actualmente se prueba la administración a humanos de inhibidores de la tromboxano sintetasa como el UK-37248-01 (276) y el UK-34787 (123) derivados del imidazol.

La formación enzimática de  $PGI_2$  es inhibida por un peróxido lipídico, el 15-hidroperóxido del ácido araquidónico (186) y por la tranilciproamina (104).

No se han encontrado inhibidores específicos de las restantes PGs.

### I.1.6 Receptores

La primera evidencia de receptores para prostaglandinas fue descrita por Kuehl y colaboradores (147) cuando encontraron que la  $\text{PGE}_1$ - $^3\text{H}$  se ligaba específicamente a las membranas plasmáticas de adipocitos de rata.

A partir de allí son numerosos los trabajos que indican la presencia de receptores para PGs en tejidos tan distintos como el útero de hamster (287), el cuerpo lúteo bovino (223), ovino (218) y humano (219), la glándula pineal bovina (40), las células mononucleares de sangre humana (189), la tiroides de buey (157), etc.

Se han determinado también receptores para endoperóxidos y  $\text{TxA}_2$  en plaquetas y vasos (157) y para  $\text{PGI}_2$  en vasos (157). Se comprobó además que los receptores para  $\text{PGI}_2$  son tan específicos que no admiten alteraciones en la cadena alfa del ligando y que los receptores para  $\text{TxA}_2$  son distintos en los vasos que en las plaquetas (157).

Se han estudiado profundamente la presencia de receptores para PGs en cuerpo lúteo; así Rao y colaboradores determinaron que existen receptores para  $\text{PGE}$  y  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en cuerpo lúteo bovino (223); que estos son dos entidades distintas (226) y que ambos son receptores de membrana, pero los de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  son más periféricos que los de  $\text{PGE}$  (225).

### I.1.7 Mecanismo de acción

Las PGs, ampliamente distribuidas en los distintos órganos de los seres vivos, participan en múltiples y diversas acciones biológicas. Para tener una idea más clara de su actividad Sylver y colaboradores (252) clasificaron las PGs según sus funciones, en hormonas clásicas, hormonas locales y mensajeros intracelulares.

a.- PGs como hormonas clásicas: La infusión intravenosa de  $PGA_1$  y  $PGA_2$  disminuye la presión sanguínea. Se propuso que estas PGs podrían ser liberadas por el riñón y por lo tanto actuar como hormonas clásicas regulando la presión sanguínea (125). Sin embargo, se comprobó más tarde que son productos de degradación de la  $PGE_1$  y  $PGE_2$ , respectivamente.

Gryglewski (105) y Moncada (187) sugirieron que la  $PGI_2$  era una hormona circulante liberada continuamente por el pulmón, que funcionaría en este aspecto como un órgano endócrino y produciría la inhibición de la agregación plaquetaria. No obstante, estudios posteriores, llevados a cabo con métodos más exactos, sugieren que la  $PGI_2$  debe considerarse como una hormona local que inhibe la agregación plaquetaria sólo en lugares cercanos a su formación (120, 48).

b.- PGs como hormonas locales: Existen varios ejemplos de las acciones de las PGs como hormonas locales.

La PGE producida en la médula renal va a corteza donde disminuye la resistencia preglomerular y de esta forma se obtiene una autoregulación del flujo sanguíneo renal (125).

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  producida en el útero de la oveja es transferida de la vena uterina a la arteria ovárica y en este órgano causa luteólisis (175).

La  $\text{PGE}_2$  presente en exudados inflamatorios aumenta la permeabilidad vascular (293).

c.- PGs como mensajeros intracelulares: Las PGs sintetizadas por una célula podrían actuar en la misma antes de su liberación comportándose así como mensajeros intracelulares.

Estas PGs pueden regular los niveles de otras sustancias biológicamente activas o modular algunas actividades enzimáticas.

Las PGs  $\text{E}_1$  y  $\text{E}_2$  modifican la actividad de la Na/K ATPasa  $\text{Mg}^{2+}$  dependiente y la adenilato quinasa en eritrocitos y plaquetas humanas, en mitocondrias de hígado de rata y en el músculo esquelético del conejo (135).

En piel de rana (133) y en fondo de estómago de rata (55) la estimulación del influjo de  $\text{Na}^+$  por  $\text{PGE}_1$  es precedida por una remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana.

En plaquetas (90) el  $\text{TxA}_2$  actúa como ionóforo de  $\text{Ca}^{2+}$ , translocándolo desde sus sitios de fijación en el sistema tubular denso, al citoplasma.

Las PGs tipo E aumentan o disminuyen el AMPc intracelular mientras que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  es capaz de aumentar en 45 segundos hasta cuatro veces los niveles de GMPc del útero de rata (145). La relación GMPc/AMPc se incrementa con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y disminuye con  $\text{PGE}_2$  (145). El primer efecto

de la PGE sería aumentar la actividad de la adenilato ciclasa (164). La PGI<sub>2</sub> y la PGE<sub>2</sub> elevan el AMPc intracelular del útero de la rata (282).

### I.1.8 Acción de PGs en el aparato reproductor femenino

#### I.1.8.1 Ovulación

La posible participación de las PGs en el proceso de ovulación ha sido largamente estudiado. Ya en 1972 Orczik y Behrman (203) describieron el bloqueo de la ovulación por inhibidores de la síntesis de PGs como la indometacina y el ácido acetilsalicílico. Esta respuesta fue revertida por una mezcla de PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub> o por inyección de LH administrada tres horas después del pico ovulatorio de LH. Cuando el tratamiento con indometacina fue crónico no pudo restaurarse la ovulación con LH.

Estos resultados sugerían un posible papel de las PGs en la ovulación y además que su acción podría ejercerse tanto a nivel central como en el ovario.

La administración de PGE<sub>2</sub> a ratas tratadas con fenobarbital origina un pico de LH adecuado para causar ovulación y tal respuesta es prevenida por inmunización pasiva contra LHRH (50).

La PGE<sub>2</sub> pero no la PGF<sub>2α</sub> inyectada en el tercer ventrículo aumenta la concentración de LH circulante en ratas ovariectomizadas, efecto enardecido por un pretratamiento con estradiol (118).

La liberación de LHRH desde fragmentos hipotalámicos de rata incubado con  $PGE_2$  está aumentada mientras que la  $PGF_{2\alpha}$  no provoca dicho efecto (202).

Se encontró un aumento en la liberación de  $PGE_2$  debido a noradrenalina (NA) en explantes de eminencia media de ratas al comienzo del pico de LH durante el proestro (64).

La  $PGE_2$  podría ser un componente fisiológico del mecanismo neural que controla la secreción adenohipofisaria de LH ya que el efecto de las catecolaminas (NA y dopamina) aumentando la liberación de LHRH es inhibido por indometacina (202).

Otros investigadores, sin embargo, hallaron que la indometacina administrada en dosis adecuadas como para bloquear la síntesis de  $PGE_2$  hipotalámica, no previenen el pico de LH preovulatorio (284, 243) pero sí la ovulación; cosa que se revierte con la administración de  $PGE_2$  o  $PGF_{2\alpha}$  pero no con la de LHRH o hCG (243). Apparently la indometacina interferiría en procesos ovulatorios tardíos.

Los niveles de PGs en folículos preovulatorios están aumentados (161, 9) y ello se debería a las gonadotrofinas. Nueve horas luego de la inyección de hCG se elevan los niveles de PGE y PGF en folículos preovulatorios de conejo pero ello no ocurre a las cinco horas (161).

En folículos aislados de distintas especies se observó un aumento de la producción de PGs por LH (173, 249, 17) hecho mimetizable con AMPc (173, 306, 53) e inhibible con bloqueantes de síntesis de proteínas (52). En cambio, la aminoglutetimida, inhibidor de la síntesis de estrógenos y progesterona, fue incapaz de bloquear el efecto de LH so-

bre la síntesis de PGs en los folículos preovulatorios (17).

Las ratas tratadas con indometacina en la mañana del proestro mostraron retención del huevo en el folículo con estigma (parte más prominente y delgada de la pared folicular por donde se expulsa el óvulo) pero no en el lugar correcto. Las concentraciones de FSH y LH así como el peso uterino y ovárico eran normales y no existía inhibición en las enzimas encargadas de desintegrar la pared (204).

Un trabajo empleando microscopía electrónica en los folículos ováricos de conejos tratados con indometacina, mostró que el tejido del apex de los folículos normales comienza a afinarse nueve horas después del coito mientras que los provenientes de animales tratados con indometacina no mostraron signos de afinamiento aún doce horas después del coito. En ausencia de PGs también ocurre en parte la pérdida de tejido conectivo y existen algunas evidencias de edema, pero ello no resulta suficiente como para que el óvulo sea expulsado (76).

Las PGs podrían actuar favoreciendo el movimiento de los fibroblastos (76), estimulando enzimas proteolíticas como sucede en otros tejidos (61, 70) o aumentando las contracciones ováricas para permitir la expulsión del óvulo (65,93).

#### I.1.8.2 Luteólisis

Se ha postulado la existencia de una "luteolisina" hormona capaz de causar la regresión histológica del cuerpo lúteo y la disminución de los niveles plasmáticos de progesterona. Esta hormona sería la PGF<sub>2α</sub> para la mayoría de las especies (214, 107, 45, 176, 236) incluyendo la

humana (212).

Son varios los hechos que sugieren el papel fisiológico de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en la luteólisis.

- a) La administración directa de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  causa regresión luteal (28, 305).
- b) La inmunización del animal contra  $\text{PGF}_{2\alpha}$  prolonga la vida del cuerpo lúteo (222).
- c) La inhibición de la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  con indometacina aumenta la vida del cuerpo lúteo (128).
- d) En el momento de la regresión del cuerpo lúteo debe existir un aumento en los niveles de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (29, 72).

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  actuaría en forma muy localizada ya que en especies como el cobayo que presenta úteros bicornes, cada cuerpo uterino ejerce efecto sobre su ovario adyacente (81).

La forma de transferencia de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  del útero al ovario fue estudiada en oveja por McCracken y colaboradores (175). Estos autores demostraron el pasaje de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  tritiada de la vena útero-ovárica a la arteria ovárica. Además, la separación de estos dos vasos previene la regresión del cuerpo lúteo (15). El mecanismo por el cual la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  causa la luteólisis no está bien determinado y se han propuesto varios:

- a) Constricción de la vena ovárica (214).
- b) Cambios en la hemodinámica ovárica que lleva a una pérdida del flu-

jo sanguíneo al cuerpo lúteo (198).

c) Liberación de una luteolisina pituitaria (153).

d) Antagonismo de la acción de las gonadotrofinas (20).

El efecto central fue rápidamente descartado puesto que en cobayos hipofisectomizados cuyo cuerpo lúteo se mantiene con gonadotrofinas exógenas, la  $PGF_{2\alpha}$  causa luteólisis (28) y además la síntesis de progesterona por LH en células cultivadas de cuerpo lúteo de hamster, es bloqueada directamente por  $PGF_{2\alpha}$  (213).

La  $PGF_{2\alpha}$  reduce el flujo sanguíneo útero-ovárico en dosis farmacológicas (213) pero no en concentraciones fisiológicas con las cuales la secreción de progesterona está efectivamente disminuída (20).

La  $PGF_{2\alpha}$  tiene un efecto antigonadotrofinas directo en células luteales de rata, hecho comprobado in vivo (102) e in vitro (271). La exposición simultánea de células luteales a LH y  $PGF_{2\alpha}$  resulta en la supresión del aumento de AMPc inducido por LH y en el de la secreción de progesterona. Este hecho parece estar mediado por receptores específicos para  $PGF_{2\alpha}$  (302). Dicho efecto rápido no parece relacionarse con la unión de LH a sus receptores porque no existen cambios en estos en las ratas tratadas con  $PGF_{2\alpha}$  dos horas antes del sacrificio (18).

La inhibición por  $PGF_{2\alpha}$  de la síntesis de progesterona inducida por LH en células luteales cultivadas, es revertida por la adición de dibutiril AMPc (271). Sin embargo, no se observaron efectos ni en la unión de LH a su receptor como tampoco en la actividad de la fosfodiesterasa. En membrana plasmática de células luteales de rata la  $PGF_{2\alpha}$  no

tuvo efecto sobre la actividad de la adenilatociclasa inducida por LH (69).

El mecanismo de acción de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , no es conocido, pero un ionóforo de calcio, el A-23187, mimetiza la acción de esta hormona. Además la administración de calcio a membranas plasmáticas produce una inhibición, dosis dependiente, de la estimulación por LH de la adenilatociclasa (69). Aparentemente la acción de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  estaría relacionada con una redistribución del calcio en el interior de la célula o con modificaciones del influjo de calcio.

Existe también un efecto tardío de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sobre las células luteales que consistiría en la inhibición de la acción de la prolactina, hecho que resulta en la pérdida de los receptores para LH. Este proceso que tardaría más de ocho horas en la rata (103) y es mimetizado por ergocriptina (103) o por hipofisectomía (18) y prevenido por prolactina (18, 103); sería irreversible porque implica la pérdida de los receptores para LH.

Recientemente se ha estudiado el efecto de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sobre la producción de progesterona por cuerpos lúteos humanos estimulados con hCG (212). Se ha visto que esta PG inhibe la cantidad de progesterona presente en el medio. Ello, unido al aumento de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en la fase lútea tardía, (282) llevan a sugerir que esta PG puede causar luteólisis funcional del cuerpo lúteo humano.

### I.1.8.3 Motilidad uterina

El descubrimiento de las PGs se derivó del hallazgo del efecto

del semen sobre las contracciones uterinas (150). A partir de allí las distintas PGs fueron relacionadas con la motilidad del útero, debido a numerosas observaciones.

Bergström y colaboradores (21) determinaron que las PGs provocaban contracciones uterinas en varias especies animales. Además se vió que eran liberadas por la distensión del útero de cobayo (220).

El aumento de las PGs en sangre humana (137) y en el líquido amniótico (138) durante el parto; junto con los trabajos que muestran que el útero aislado de rata preñada presenta contracciones espontáneas y libera sustancias tipo PGs y que ambos efectos son eliminados por inhibidores de la síntesis de PGs (281); sugirieron una contribución fisiológica de estos autacoides en la expulsión del contenido uterino en el parto. Además la administración de drogas inhibidoras de la síntesis de PGs prolonga la preñez de las ratas (3).

La liberación de PGs podría ser una consecuencia y no la causa de la actividad mecánica. Por ello, se utilizó papaverina, un relajante muscular, observándose que la liberación de PGs se mantenía en su presencia y que la PGF<sub>2α</sub> era capaz de restaurar la actividad uterina bloqueada por ácido acetilsalicílico pero no cuando ésta era anulada con papaverina (4).

Se ha visto que los fragmentos aislados de úteros de ratas ovariectomizadas exhibían una motilidad uterina más constante en el tiempo, que los provenientes de ratas en estro natural (94) y ello coincidía con una mayor producción de PG tipo E por los úteros de ratas ovariectomizadas (95).

Se estableció, además, una correlación positiva tanto entre la frecuencia como entre la estabilidad en el tiempo y la PG tipo E liberada al medio de incubación por fragmentos uterinos de rata aislados en distintos estadios del ciclo sexual (85).

Todo esto llevó a sugerir que la PGE podría tener participación en la estabilidad y constancia en el tiempo de la motilidad uterina (95, 85).

## I.2 - UTERO

### I.2.1 Anatomía

El útero de rata, al igual que el de los restantes roedores es de tipo duplex (194). Otros autores proponen para el mismo la denominación de "bicornes" (246).

Aunque los cuernos uterinos parecen estar unidos se mantienen separados y cada uno de ellos desemboca por sus respectivos conductos cervicales en el extremo superior de la vagina (101) (Fig. 13).

Cada oviducto tiene una de sus terminaciones abierta sobre el ovario y la otra en el cuerno uterino correspondiente (246).

Existen dos tipos de fibras nerviosas en el útero; las colinérgicas (57) y las adrenérgicas (136). Ambas se hallan alrededor de los vasos sanguíneos y en el miometrio. Las colinérgicas son más abundantes en el cervix que en el cuerpo uterino y las adrenérgicas se encuentran en los plexos nerviosos perivasculares fundamentalmente en el cervix

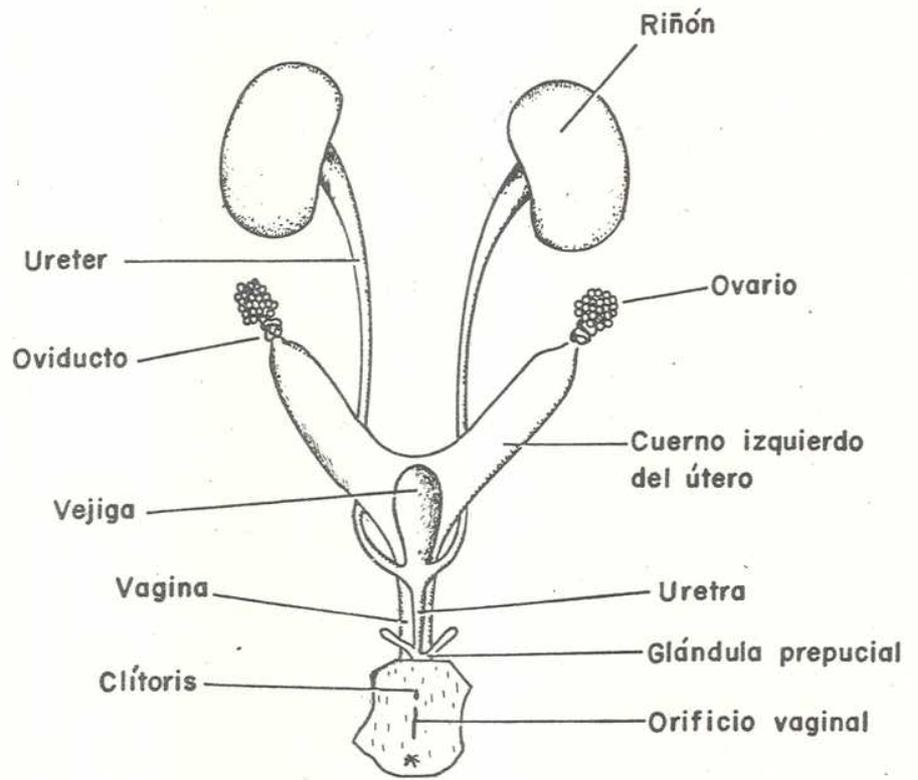


Fig. nro. 13: Sistema urogenital de la rata nembra

(1).

Las fibras nerviosas post-sinápticas del plexo hipogástrico constituyen el componente nervioso simpático y las que provienen del plexo sacro integran el parasimpático (190). Los dos plexos forman el ganglio de Frankenhauser en la región paracervical del útero (190).

### I.2.2 Histología

El útero está constituido por tres capas de tejido diferentes: la externa o serosa; la media muscular o miometrio y la interna, mucosa o endometrio (108).

La serosa es la cubierta peritoneal del útero. Está constituida por una capa de células mesoteliales sostenidas por tejido conectivo que se continúa con el peritoneo (108).

El miometrio está formado por músculo liso cuyas células se denominan fibras. Son alargadas, de extremos afilados y en su citoplasma se encuentran dos componentes fundamentales: el sarcoplasma y las miofibrillas (108). El núcleo celular es más bien excéntrico. Estas células musculares están dispuestas en paquetes rodeadas por fibras de colágeno. La capa longitudinal es la externa y la circular la interna y entre ambas hay una capa bien definida de tejido conectivo. Los paquetes de la capa externa son más compacto que los de la interna. El tejido conectivo está formado por fibroblastos y fibras de colágeno (251).

El endometrio está formado por epitelio cilíndrico simple y una gruesa lámina propia. Hay algunos paquetes de células ciliadas entre

las cilíndricas simples. La lámina propia suele denominarse estroma endométrico. En el estroma se hallan incluidas las glándulas tubulares simples, cuyos conductos, atravesando la superficie epitelial, se abren en la luz del útero y cuyas porciones más profundas casi alcanzan al miometrio (108).

La vagina está formada por epitelio estratificado sostenido por una lámina propia. Está rodeado por una capa muscular conectada por una adventicia al tejido conectivo circundante. Las fibras están dispuestas tanto circular como longitudinalmente pero no en capas separadas sino entrelazándose entre sí (3).

El ciclo estral de la rata tiene una duración de cuatro días. Los cambios histológicos ocurren fundamentalmente en el útero pero se ven reflejados también en la vagina (33).

Durante el proestro y el estro los cuernos uterinos están distendidos por la presencia de líquido y congestionados. El epitelio del endometrio es cilíndrico bajo con membrana basal. En el metaestro los cuernos se presentan de tamaño más reducido y finalmente en el diestro la luz uterina es mínima. Durante el metaestro el epitelio es pseudoestratificado para pasar a cúbico simple sin membrana basal en el diestro (99).

Las células del epitelio vaginal, que sufren modificaciones por los cambios hormonales, son constantemente descamadas hacia el lumen y por las características de ellas es posible clasificar a las distintas fases del ciclo estral (33).

Durante el proestro la presencia de células epiteliales nucleadas en los extendidos vaginales reflejan la proliferación del mismo. En el estro las células epiteliales son cornificadas mientras que en el metaestro la proliferación epitelial de la vagina se detiene y comienza a ser invadida por linfocitos. En el extendido vemos células epiteliales, cornificadas y linfocitos. El espesor epitelial se reduce considerablemente durante el diestro, las paredes vaginales se hacen delgadas y las capas superficiales se encuentran invadidas por linfocitos. Estas células son las únicas presentes en el extendido (33, 99).

### I.2.3 Fisiología

Los músculos lisos viscerales se dividen en dos grupos, dependiendo ello de sus características electrofisiológicas (34). Aquellos que poseen actividad espontánea se denominan "unitarios" y esta actividad se inicia en una zona específica del tejido llamada "marcapaso". Los que carecen de esta actividad son los llamados "multiunitarios", se caracterizan por tener fibras organizadas en unidades motoras y son activados por el nervio motor extrínseco (73, 74).

El miometrio es un tejido del tipo unitario (73, 74). Las contracciones de estos músculos aunque no necesariamente sean iniciadas por el impulso nervioso son coordinadas y reguladas por mediación nerviosa (38). Además responden al estiramiento desarrollando una tensión activa (38).

Cuando se inserta un microelectrodo dentro de una célula muscular uterina de la rata, la diferencia de potencial existente con refe-

rencia a un electrodo externo es de 55 a 60 mV (174). Al llegar esta diferencia de potencial a un nivel crítico se producen descargas espontáneas. Este valor de potencial es conocido como umbral del potencial de acción que al descargarse autosostenidamente determina la iniciación de las contracciones rítmicas del músculo uterino (174).

Las características de las contracciones, su frecuencia, amplitud y duración, están determinadas por la frecuencia de descarga de los potenciales de acción, por la duración de la serie de potenciales de acción y por el número total de células estimuladas (126).

El marcapaso uterino se distribuye en todo el tejido; característica que lo diferencia del cardíaco (174). Todas las células del útero pueden ser marcapaso pero sólo las que poseen excitabilidad elevada pueden generar potenciales de acción (174).

Existen evidencias importantes para suponer que la transmisión de los potenciales de acción entre las células es eléctrica; probablemente a través de vías de baja resistencia existente entre células adyacentes (191).

#### I.2.4 Castración y restitución hormonal

En la rata ovariectomizada la ausencia de las hormonas sexuales (estrógenos y progesterona) produce diversos cambios en el útero.

Desde el punto de vista histológico se observa que las células del estroma uterino de la rata castrada forman una matriz continua tridimensional. En el interior de la red, las células son similares en ta

estrógenos (267).

Existe un segundo incremento del peso uterino veinte horas después del tratamiento estrogénico asociado a un aumento en el material protoplasmático (262). El estradiol restablece los niveles de RNA disminuidos por la castración (277).

Tanto la estrona (141) como el estradiol (42) aumentan el consumo de oxígeno del útero de ratas ovariectomizadas.

La actividad de la glucógeno sintetasa es rápidamente elevada por el estradiol (31) como así también la oxidación de glucosa (254) y su utilización por la vía de las hexosas monofosfato (288).

El tratamiento estrogénico disminuye la concentración de grasas neutras y aumenta la de los fosfolípidos en útero de rata ovariectomizada (59); mientras que la progesterona no necesita la acción de los estrógenos para incrementar los lípidos basales (59).

Las investigaciones electrofisiológicas sugieren que la actividad espontánea está asociada a un útero dominado por estrógenos (229, 87) y que los de ratas ovariectomizadas presentan contracciones muy poco frecuentes (229).

Sin embargo, Gimeno y colaboradores (91) observaron una clara actividad espontánea en los úteros de ratas castradas, actividad que era más estable en el tiempo que la que presentaban los úteros de ratas en estado natural. Además dicha actividad espontánea y estable disminuía significativamente cuando se trataba a los animales operados con 17-beta-estradiol (168).

La ovariectomía produce una marcada disminución en los receptores para estrógenos y progesterona (172) y los valores normales son restituidos mediante tratamiento estrogénico (172).

#### I.2.5 Prepúberes

Las variaciones hormonales, tanto histológica como fisiológicamente que afectan al útero, son importantes desde el nacimiento hasta la pubertad.

La secreción de estrógenos de los ovarios tiene lugar aparentemente desde temprana edad, hecho evidenciable en los trabajos de Baker y colaboradores (13) como así también en los de Price (221) que observaron pesos uterinos subnormales en ratas de 10 a 14 días que sufrieron castración neonatal.

La medición de las concentraciones plasmáticas de estrógenos dan valores máximos entre los 9 y 19 días (68, 180) y no detectables o muy bajos entre los 25 y 35 días de vida (68, 180).

Los valores plasmáticos de progesterona son muy bajos entre los días 6 y 15 y entre los 25 y 32; existiendo incrementos importantes, con niveles comparables al metaestro del animal adulto, los días 20 al 22 (169).

Los receptores citoplasmáticos para estrógenos están presentes en ratas neonatales de un día (51), aumentan hasta un valor máximo en el día 10 (51) para luego disminuir y alcanzar una meseta alrededor del día 30 (160).

Los receptores citoplasmáticos para progesterona están bajo control hormonal dual. Los estrógenos aumentan la concentración del receptor a través de un mecanismo que depende de la síntesis de RNA y de proteínas. La progesterona disminuye la concentración de su propio receptor, probablemente aumentando su velocidad de inactivación (286). Debido al bajo tenor estrogénico, en animales de 25 a 30 días se encuentran en mínima concentración (78).

## OBJETIVO

El presente trabajo de tesis examina el papel de las hormonas sexuales en la regulación de la síntesis de las Prostaglandinas uterinas.

Son sus objetivos:

- 1.- Determinar la acción de los esteroides ováricos sobre la síntesis de Prostaglandinas.
- 2.- Hallar su posible lugar de acción en la cascada del ácido araquidónico.

II - MATERIALES Y METODOS

## II.1 - ANIMAL UTILIZADO

Se usaron ratas hembras vírgenes variedad Wistar, mantenidas con alimento Purina y agua "ad libitum" en un ritmo de vivero 14-10 horas de luz-oscuridad, respectivamente, a temperatura y humedad constantes.

Las características de los distintos modelos experimentales utilizados fueron:

- a) Ratas prepúberes: animales de 25 días de vida.
- b) Ratas ovariectomizadas: animales que sufrieron ovariectomía bilateral 20 días antes del sacrificio. La intervención quirúrgica se realizó bajo anestesia con éter sulfúrico técnico. Se les practicó una incisión longitudinal medio-lateral, de aproximadamente un centímetro, desde la base de las costillas hacia abajo. Separadas la piel y el músculo se ubicó el ovario y el extremo del útero proximal a éste. Se ligó con hilo de cirugía a unos 5 mm. de este punto cortándose junto a la ligadura para extraer de esta forma el ovario y el oviducto. Luego se suturó el músculo y la piel. Esta misma operación se practicó en el flanco opuesto del animal.
- c) Ratas ovariectomizadas suprarrenoprivas: estos animales sufrieron a los quince días de la ovariectomía, la extracción de las suprarrenales. Bajo anestesia con éter sulfúrico técnico, se realizó una incisión en la línea media dorsal, comenzando en el borde de las costillas y extendiéndose caudalmente de 20 a 25 mm. Se separó el músculo y se identificaron las suprarrenales, las cuales se extrajeron

mediante una suave tracción y luego se suturó el músculo y la piel. Los animales fueron mantenidos durante cinco días hasta el sacrificio con alimento Purina y solución fisiológica (NaCl 0.9%) "ad libitum", en las mismas condiciones de vivero que las restantes.

- d) Ratas en estro natural: a estos animales se les realizó el extendido vaginal diariamente para poder determinar la fase del ciclo estral en que se encontraban (33). Cuando dicho extendido presentó só lo células cornificadas se consideró el estadio como de estro. Las ratas en estro fueron utilizadas luego de detectar dos ciclos estrales completos.

## II.2 - TRATAMIENTOS HORMONALES

Todos los controles se realizaron inyectando el mismo volumen de vehículo que el usado para administrar la droga.

- a) Progesterona: esta hormona fue administrada por inyección subcutánea, disuelta en 0.5 ml de aceite de maní.
- b) Estrógenos: los estrógenos fueron disueltos originalmente en etanol absoluto en una concentración de 1 mg/ml. De allí se hicieron sucesivas diluciones 1:10 hasta obtener una de 1ug/ml de agua. De esta última se inyectó 0.5 ml para la primera dosis. Cuando la segunda dosis fue de 1 ug, se inyectó 0.1 ml de una solución de 10 ug/ml en agua. Si esta dosis era de 50 ug se administró 0.5 ml de una solución de 100 ug/ml en una mezcla de etanol:agua 7:3 (v:v). Todas las inyecciones de estrógenos se realizaron en forma intraperitoneal.

c) Catecólestroógenos: las diluciones se realizaron igual que las de los estrógenos pero la solución contenía 1 mg/ml de ácido ascórbico como antioxidante y se inyectaron también en forma intraperitoneal.

## II.3 - DOSAJE DE PROSTAGLANDINAS

### II.3.1 Preparación tisular

Los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina y el útero se extrajo mediante una incisión longitudinal medio-ventral. Luego de la extracción se lo colocó en cápsula de Petri conteniendo solución buffer Krebs-Ringer-bicarbonato (KRB) burbujeada con carbógeno y mantenida a temperatura ambiente. Allí se eliminó todo el tejido extraño y los cuernos uterinos fueron abiertos longitudinalmente, siguiendo la línea del miometrio y se cortaron en dos partes también longitudinalmente.

El tejido se colocó en una cámara tisular, sujetándolo a un soporte fijo de vidrio por un extremo y a un transductor Statham, por el otro. Esto permitió aplicar al tejido, mediante un dispositivo micrométrico, una tensión basal de 500 mg. La cámara tisular contenía KRB burbujeado con carbógeno y mantenido a 37°C gracias al uso de una bomba de circulación Edmund Bühler UKT2.

Luego de sesenta minutos de incubación, el medio tisular fue recogido y guardado a -20°C para la posterior cuantificación de las PGs. Los tejidos fueron secados a 60°C durante 48 horas y subsecuentemente se pesaron.

### II.3.2 Composición del medio de incubación

El medio de incubación utilizado fue una solución Krebs-Ringer-bicarbonato modificada con la siguiente composición:

Componente	Concentración (mM)
Na <sup>+</sup>	145.0
K <sup>+</sup>	6.0
Ca <sup>2+</sup>	2.0
Mg <sup>2+</sup>	1.3
Cl <sup>-</sup>	126.0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25.3
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.3
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1.2
glucosa	11.0

El pH de la solución se mantuvo ajustado a 7.4 con gaseado constante de carbógeno (95% de O<sub>2</sub> con 5% de CO<sub>2</sub>).

### II.3.3 Determinación de prostaglandinas

La determinación de prostaglandinas en el medio de incubación

consta de tres pasos principales:

- a) Extracción
- b) Separación por cromatografía en placa delgada
- c) Cuantificación por bioensayo

a) Extracción: las PGs como ácidos débiles, tienen la propiedad de ser fácilmente extraíbles en solventes orgánicos cuando se encuentran en forma protonada. Esta fue la base del procedimiento de extracción utilizado.

Las muestras a extraer, luego de descongelarse, eran llevadas a pH 3-3.5 con HCl 1 N, lo que convierte a las PGs y ácidos grasos a su forma no disociada, insoluble en agua.

Se realizan tres extracciones con igual volumen de acetato de etilo. Los extractos se reunieron y fueron evaporados bajo presión reducida en un evaporador rotatorio a 40°C. El residuo fue eluido con 15 ml de una mezcla cloroformo:metanol 4:1 (v:v) y llevado nuevamente a sequedad en estufa bajo presión reducida a 40°C.

b) Cromatografía en placa delgada: el procedimiento llevado a cabo extrae eficientemente las PGs, los ácidos grasos y los hidroxiácidos pero, se hace necesario separar los distintos componentes para su posterior cuantificación.

La mayor parte de las PGs y el Tx<sub>8</sub> pueden separarse como ácidos libres en sílica gel G usando varios sistemas de solventes (163).

Las placas cromatográficas utilizadas fueron: TLC aluminio sílica gel 60F<sub>254</sub> precubiertas, Merck. Las mismas fueron activadas, an-

tes de utilizarse, en estufa a 110°C durante treinta minutos.

Los residuos de las muestras provenientes de la extracción fueron eluidos con metanol y sembrados mediante tubos capilares. Se corrieron en paralelo testigos de  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$ . La corrida se realizó en cubas conteniendo aproximadamente 100 ml de mezcla de solventes, la cual estaba constituida por cloroformo:metanol:ácido acético:agua 90:9:1:0.65 (v:v:v:v). Los testigos fueron revelados con ácido fosfo mólbdico al 10% en etanol, seguido de calentamiento a 70°C durante treinta minutos.

Los Rf obtenidos fueron 0.61 y 0.42 para  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  respectivamente. Las zonas de las placas correspondientes a los Rf fueron cortadas y eluidas cuatro veces con 5 ml de cloroformo:metanol 4:1 (v:v). Los eluidos fueron llevados a sequedad en estufa a presión reducida.

c) Bioensayo: este método de cuantificación de las PGs se basa en su capacidad para contraer todos los músculos lisos del tracto digestivo.

El estómago de rata es un tejido muy sensible a las  $PGE_2$  y  $PGF_{2\alpha}$  de allí su elección en este ensayo (184).

La figura 14 ilustra las características principales del aparato utilizado, basado en la técnica de superfusión en cascada.

El estómago de rata aislado es superfundido en serie con solución buffer KRB conteniendo antagonistas capaces de bloquear la acción de otras sustancias que puedan interferir en el ensayo. Los efectos de histamina, adrenalina, noradrenalina y acetilcolina pueden anularse mediante el uso de una mezcla de un antihistamínico y anti-

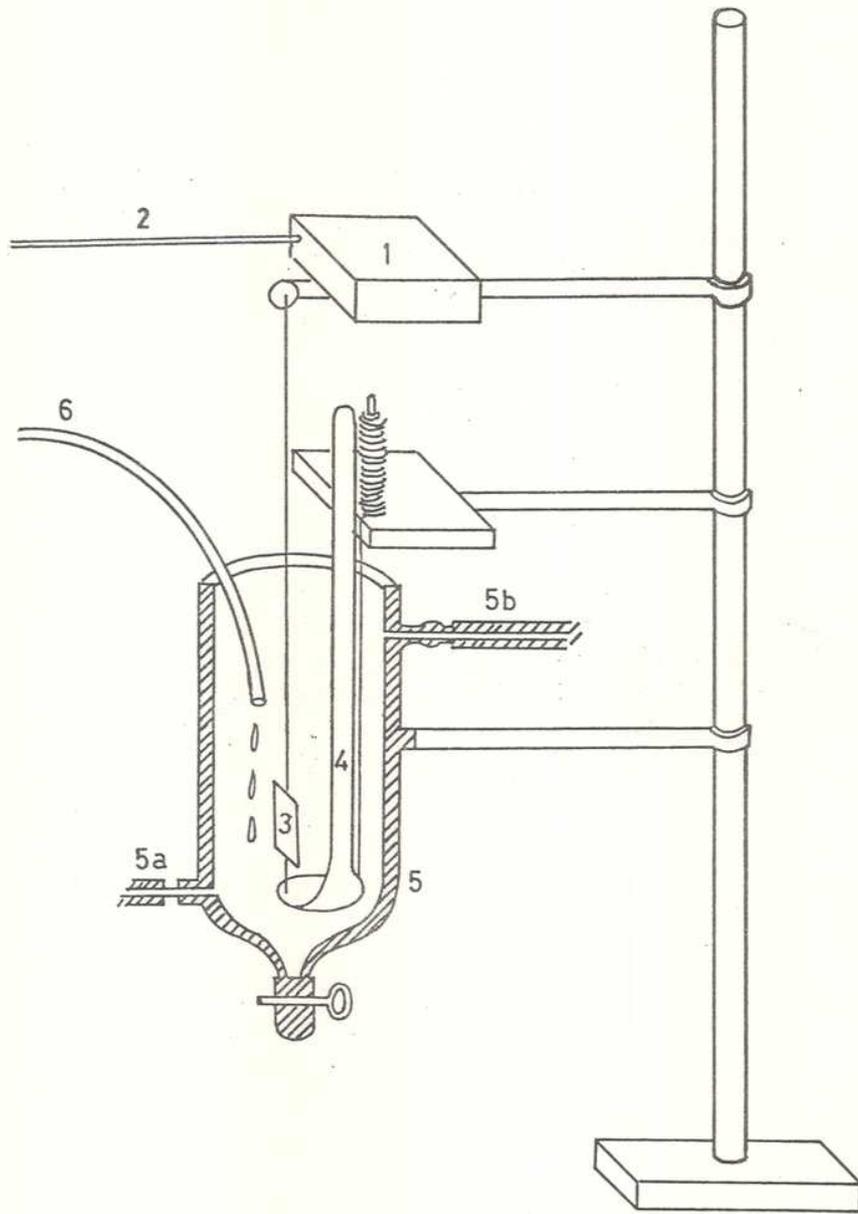


Fig. nro. 14: Sistema de Bioensayo

- 1- Transductor
- 2- Conexión con el sistema amplificador-polígrafo
- 3- Tejido
- 4- Soporte tisular
- 5- Cámara tisular: a) Entrada del agua de perfusión  
b) Salida del agua de perfusión
- 6- Goteo del líquido de superfusión

serotoninérgico (ciproheptadina  $10^{-8}$  g/ml), un bloqueante de adreno-  
receptores alfa (fentolamina  $2 \cdot 10^{-6}$  g/ml) y beta (propranolol  
 $3 \cdot 10^{-6}$  g/ml) y un agente anticolinérgico (atropina  $10^{-7}$  g/ml)  
(90). Se empleó además un inhibidor de la síntesis de PGs (indometa-  
cina 1 ug/ml) para prevenir la generación de PGs por el tejido aislado (75). El buffer fue mantenido a 37°C mediante un refrigerante y burbujeado con carbógeno. La velocidad de goteo fue de 5-20 ml/minuto.

El tejido se colocó en una cámara tisular, fijando uno de sus extremos a un soporte de vidrio y conectando el otro a un transductor que transforma la actividad mecánica en señal eléctrica. La salida del transductor se acopló con un amplificador San-EI, que se comunica con un inscriptor de tinta Rectigraph 8S San-EI de manera de registrar las respuestas mecánicas del tejido (Fig. 15).

Las muestras provenientes de la cromatografía se inyectaban disueltas en 0.2 ml de KRB y las respuestas que inducían se comparaban con las de distintas concentraciones de las PGs auténticas.

Los resultados obtenidos se expresaron en ng PG/mg peso seco del tejido y fueron corregidos por ensayos de recuperación realizados con cada grupo de 5-6 muestras. Los porcentajes de recuperación oscilaron entre el 40 y el 50%.

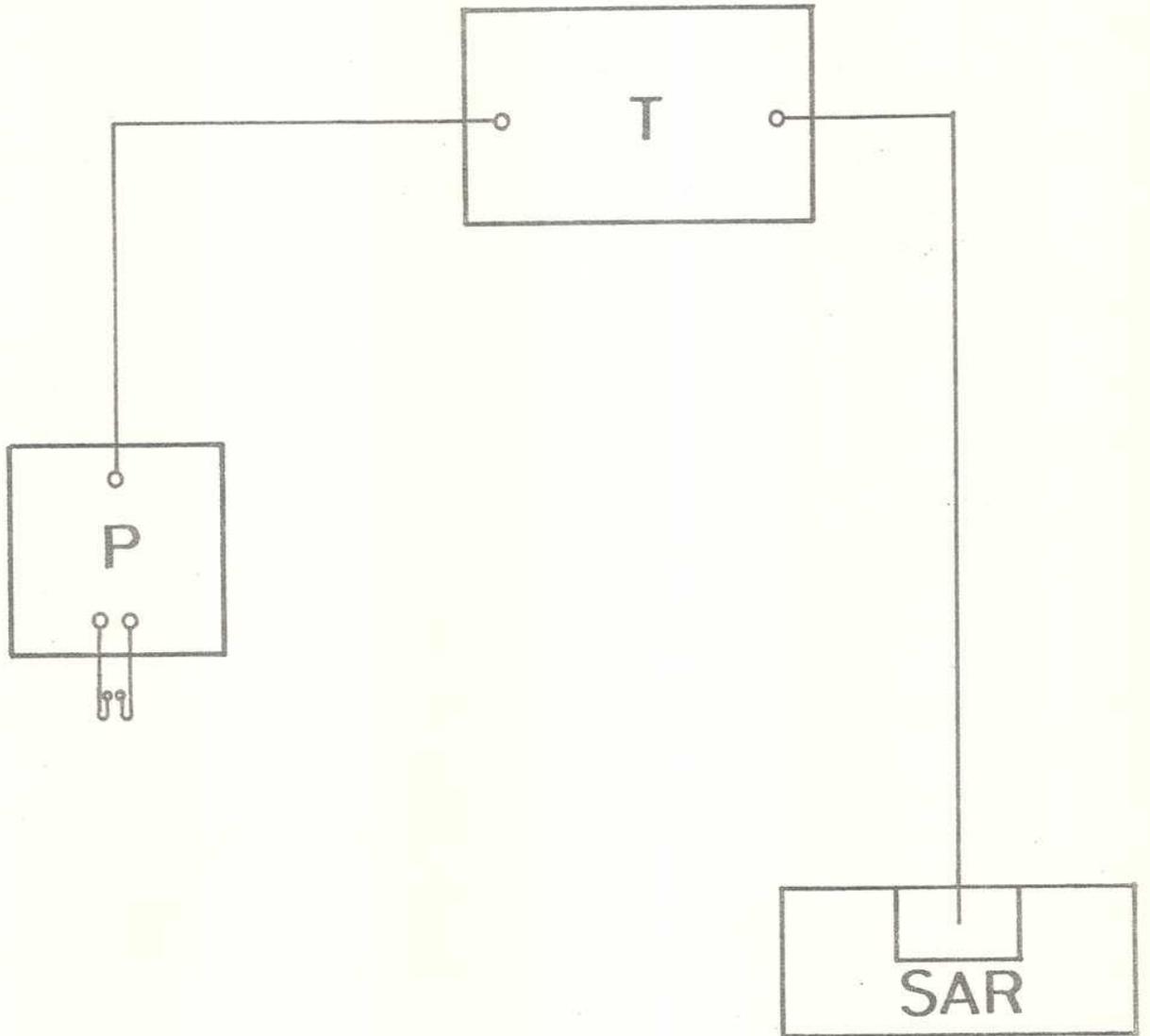


Fig. nro. 15: Esquema del equipo utilizado para registrar las respuestas del estómago de rata a las PGs ensayadas

T: Transductor

P: Preparación muscular

SAR: Sistema de amplificación y registro

## II.4 - ENZIMAS METABOLIZANTES

### II.4.1 Actividad de la 15-hidroxi prostaglandin deshidrogenasa

La actividad de la 15-hidroxi prostaglandin deshidrogenasa (PGDH), primera enzima metabolizante de las PGs, puede medirse espectrofotométricamente por la formación de NADH.

Los úteros libres de todo material graso son homogenizados con 10 volúmenes de buffer Tris ClH (pH 8.6 0.1 mM con EDTA 1 mM) a 0°C. Luego se centrifuga la muestra a 48.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante se utiliza como fuente de enzima.

La actividad enzimática se mide en un espectrofotómetro (Griflond Instrument 250) en cubetas mantenidas a 37°C. La mezcla de reacción contiene 2.7 umoles de NAD en 2.5 ml de homogenato. La reacción se inicia por el agregado de 0.12 umoles de PGs en 12 ul de etanol.

Para obtener los valores de NADH formado se los compara con una curva de calibración con concentraciones de NADH desde  $10^{-5}$  hasta  $5 \cdot 10^{-4}$  M.

La actividad enzimática fue expresada en unidades/mg de proteína siendo una unidad igual a la cantidad de enzima capaz de reducir 1.0 nmol de NAD/minuto bajo las condiciones del ensayo (6).

No se obtuvo formación de NADH por el agregado de 12 ul de etanol.

#### II.4.2 Actividad de la 9-cetoreductasa

La medición de la actividad de esta enzima se basa en la incubación de un homogenato del tejido en presencia de  $\text{PGE}_2$  marcada y la determinación de la existencia de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  o alguno de sus metabolitos, por medio de la cromatografía en placa delgada.

Los úteros, aproximadamente 400 mg de tejido, libres de todo material graso fueron homogenizados en un Polytron en baño de hielo, a máxima velocidad, diez veces durante 30 segundos con intervalos de 60 segundos. El buffer de homogenización fue  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1 mM pH 7.4 con ditiotreitol 0.1 mM.

El homogenato así obtenido fue centrifugado durante 15 minutos a 15.000 rpm y a 5°C. El sobrenadante de esta centrifugación se usó para medir la actividad enzimática siguiéndose la técnica de Wong y colaboradores (301) con algunas modificaciones.

El sistema de reacción contiene  $\text{PGE}_2$  ( $8 \cdot 10^{-7}$  mM), NADPH (4 mM),  $^3\text{H-PGE}_2$  ( $10^{-9}$  mM AE 165 Ci/mmol), 0.9 ml de sobrenadante en un volumen total de 1.2 ml.

La incubación se realizó en un baño termostático modelo Dubnoff a 37°C durante distintos tiempos: 0, 5, 30 y 60 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de 5 volúmenes de metanol y posterior centrifugación por 5 minutos a 1.800 rpm. El "pellet" fue lavado con 0.5 ml de metanol y los extractos orgánicos llevados a sequedad bajo presión reducida en estufa a 40°C. El residuo fue eluido con una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (v:v) y sembrado en placas cromatográficas (sílica gel

60 F<sub>654</sub> Merck) por medio de tubos capilares. Las placas fueron desarrolladas en cubas cromatográficas conteniendo 100 ml de la siguiente mezcla de solventes: cloroformo:metanol:ácido acético:agua 90:9:1:0.65 (v:v:v:v). Junto a las muestras se sembraron testigos de PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGE<sub>2</sub> y 15-ceto-13, 14-dihidro-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  siendo sus Rf: 0.42, 0.61 y 0.82, respectivamente.

Las placas se revelaron con ácido fosfomolibdico al 10% en etanol, seguido de calentamiento a 70°C durante 30 minutos.

Los segmentos de la placa correspondientes a los Rf de los testigos fueron cortados y colocados en viales a los que se les agregó 10 ml de líquido de centelleo, determinándose también la radioactividad total de la placa.

Los resultados se expresaron como porcentaje de conversión de radioactividad total.

## II.5 - RADIOCONVERSION DEL ACIDO ARAQUIDONICO

Esta técnica permite estudiar la capacidad de síntesis de PGs por un tejido aislado.

Los úteros fueron colocados en solución buffer Krebs a 0°C tras eliminárseles todo material graso, Los tejidos fueron pesados utilizándose aproximadamente 200 mg de útero, los que luego fueron cortados en segmentos de alrededor de 2 mm.

La mezcla de incubación consistió en 1 ug de ácido araquidónico-

$^{14}\text{C}$  (AE 53.9 mCi/mmol, 20  $\mu\text{Ci/ml}$ ) en 1 ml de solución buffer Krebs por cada 100 mg de tejido húmedo. Se incubó durante tres horas con agitación constante a 37°C en un baño termostático modelo Dubnoff bajo atmósfera de carbónico (5%  $\text{CO}_2$  en  $\text{O}_2$ ). Se detuvo la reacción por el agregado de ácido cítrico 1 M hasta obtenerse un pH de 3-3.5. Se agregó un volumen de cloroformo y se dejó en contacto durante 16 horas. Se realizaron dos extracciones más con iguales volúmenes de cloroformo y los extractos orgánicos combinados se llevaron a sequedad en estufa bajo presión reducida a 40°C.

Se procedió a realizar una cromatografía en placa delgada para poder separar los metabolitos del ácido araquidónico formados durante la incubación. Las placas utilizadas fueron Merck DC-Plastikfolien kieselgel 60 F<sub>254</sub>. Estas placas fueron activadas por calentamiento a 70°C durante 30 minutos; los residuos de las muestras provenientes de la incubación fueron eluidos con una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (v:v) y se sembraron mediante tubos capilares. Paralelamente se sembraron testigos auténticos de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ .

La corrida se realizó en cubas conteniendo aproximadamente 100 ml de una mezcla de solventes consistente en acetato de etilo:2, 2, 4-trimetilpentano:ácido acético:agua 90:50:20:100 (v:v:v:v). Los testigos fueron revelados con ácido fosfomolibdico al 10% en etanol, seguido de calentamiento a 70°C durante 30 minutos. Los Rf obtenidos fueron 0.17, 0.28 y 0.42 para 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y  $\text{PGE}_2$ , respectivamente.

Las placas se cortaron en segmentos de 1 cm, se colocaron en viales y se les agregó 10 ml de líquido de centelleo. La radioactividad presente se determinó en un contador de centelleo líquido Beckman LS

100 C.

Los resultados se expresaron como porcentajes de conversión de la radioactividad total de la placa.

#### II.6 - DETERMINACION DE PROTEINAS

Se realizó por el método de Lowry (170).

#### II.7 - ESTADISTICA

Las evaluaciones estadísticas de los datos fueron efectuadas usando el test t de Student. La diferencia entre medias se consideró significativa si la p era igual o menor que 0.05.



### III.1 - ACCION DE DISTINTAS HORMONAS SOBRE LA SINTESIS Y LIBERACION DE PROSTAGLANDINAS POR EL UTERO AISLADO DE RATA OVARIECTOMIZADA

#### III.1.1 Síntesis de prostaglandinas por el útero aislado de ratas castradas

Se midieron las PGs sintetizadas y liberadas al medio de incubación durante 60 minutos desde el útero aislado de ratas ovariectomizadas (OV) sacrificadas 21 días después de la operación. Los resultados se expresaron como ng de PG por mg de peso seco del tejido.

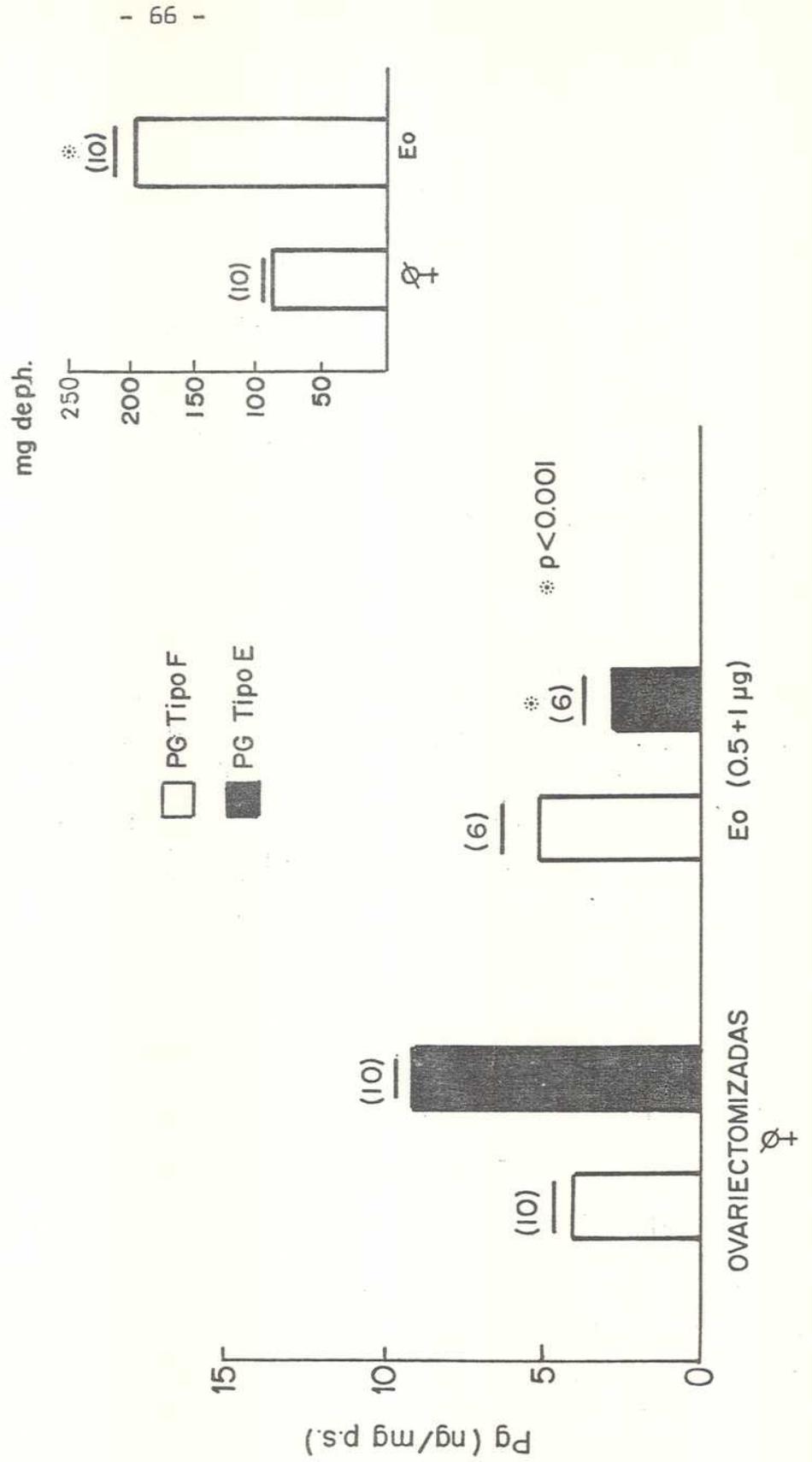
Las columnas de la izquierda de la figura 16 expresan los valores de este dosaje. Las oscuras la magnitud de la síntesis de PG tipo E y las claras la de PG tipo F. Como se puede observar la síntesis y liberación de PG tipo E es significativamente superior ( $p < 0.001$ ) que la de PG tipo F.

#### III.1.2 Efecto de diversos estrógenos

##### III.1.2.1 Acción del 17-beta estradiol

Se estudió el efecto de esta hormona sobre la liberación de PGs al medio de incubación. Para ello se administró intraperitonealmente a los animales el esteroide vehiculizado en agua para la dosis baja (0.5 y 1.0 ug) o en etanol:agua 7:3 (v:v) para la dosis mayor (50 ug). En esta última circunstancia los animales controles (OV) fueron tratados con el mismo volumen de solvente.

Fig. nro. 16: Acción del 17-beta-estradiol sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas por el útero de rata ovariectomizada



a) Dosis baja de 17-beta-estradiol: se trató a los animales con una cantidad "priming" de la hormona (0.5 ug) el primer día y 1.0 ug el segundo. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la segunda inyección.

Para comprobar si la cantidad de hormona utilizada tenía efecto uterotrófico, se pesaron los úteros de los animales OV usados como controles, así como los correspondientes a las ratas tratadas con 17-beta-estradiol. Los resultados se pueden observar en el inserto superior derecho de la figura 16. Los pesos uterino de los animales estrogenizados fueron significativamente superiores a los de los órganos provenientes de ratas OV.

Se procedió entonces al dosaje de las PGs liberadas al medio en iguales condiciones que en el punto anterior (III.1.1)

La síntesis y liberación de PG tipo F no se ve afectada por el tratamiento estrogénico realizado. En cambio la PG tipo E liberada al medio de incubación es 2 veces menor en los animales tratados con 17-beta-estradiol.

La relación entre PG tipo E a PG tipo F que era de 2.28 en animales OV disminuye a 0.47 con el tratamiento estrogénico.

b) Dosis farmacológica de 17-beta-estradiol: en la tabla nro. I se puede observar los valores obtenidos al dosar la síntesis de PGs por los úteros de animales OV tratados con una dosis farmacológica de 17-beta-estradiol (0.5 + 50 ug) como así también los valores correspondientes a ratas inyectadas con una dosis menor de este estrógeno (0.5 + 1.0 ug) y a animales OV que sólo recibieron el vehículo del

Tabla nro. I: Acción de distintas dosis de 17-beta-estradiol sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas por el útero de rata ovariectomizada

TRATAMIENTO	PG Tipo E ng /mg p.s.	PG Tipo F ng /mg p.s.
OVARIECTOMIZADA	9.6 ± 0.9 n = 6	4.9 ± 0.8 n = 6
Eo (0.5 + 1 µg)	2.8 ± 0.7 n = 6 ***	5.2 ± 1.0 n = 6
Eo (0.5 + 50 µg)	0.8 ± 0.5 n = 6 ***	8.7 ± 0.5 n = 6 **

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.001

esteroide.

El efecto ya mencionado en el punto III.1.2.1. apartado a) con una dosis baja de 17-beta-estradiol se ve magnificado al ser utilizada una dosis mayor de la hormona; o sea la disminución en la síntesis de PG tipo E, ya observada es, en este caso, significativamente superior ( $p < 0.05$ ).

A diferencia de lo que sucede con una dosis menor de 17-beta-estradiol, con 50 ug del esteroide se observó un aumento significativo en la síntesis y liberación de PG tipo F ( $p < 0.01$ ).

### III.1.2.2 Acción del estriol

Se estudió el efecto de este esteroide sobre la síntesis y liberación de PGs por el útero de ratas OV. Las condiciones experimentales tanto para la administración de la hormona como para el tratamiento de los animales controles fueron las mismas que en el caso del 17-beta-estradiol. Los resultados se representan en la tabla nro. II.

a) Dosis baja de estriol: consistió en la administración de 0.5 ug de estriol el primer día y de 1.0 ug del mismo el segundo.

Esta hormona, a la concentración indicada, no tuvo ningún efecto sobre las PGs liberadas al medio de incubación, a pesar de presentar efecto uterotrófico como se refleja en el aumento significativo del peso uterino respecto de los animales OV.

b) Dosis farmacológica de estriol: se administraron 50 ug del esteroide luego de una primera inyección de 0.5 ug. Tampoco esta dosis de hormona fue capaz de alterar la síntesis de PGs, pero sí provocó un au-

\* P < 0.01

Tabla nro. II: Acción de diversos estrógenos sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas sobre el útero de rata ovariectomizada

TRATAMIENTO	PG Tipo E ng / mg p.s.	PG Tipo F ng / mg p.s.	P húmedo del útero (mg)
OVARIECTOMIZADA (21 días)	9.6 ± 0.9 n = 6	4.9 ± 0.8 n = 6	78.5 ± 8.7 n = 6
ESTRIOL (0.5 + 1µg)	11.6 ± 1.6 n = 6	5.7 ± 0.9 n = 6	135.3 ± 9.3 <sup>*</sup> n = 6
ESTRIOL (0.5 + 50 µg)	8.8 ± 1.9 n = 6	6.4 ± 0.5 n = 6	158.3 ± 8.2 <sup>*</sup> n = 6
ESTRONA ( 0.5 + 1µg )	11.0 ± 2.9 n = 7	4.5 ± 1.0 n = 7	129.8 ± 9.1 <sup>*</sup> n = 6
ESTRONA (0.5 + 50 µg)	8.8 ± 1.0 n = 6	3.6 ± 0.5 n = 6	160.2 ± 10.5 <sup>*</sup> n = 6

mento del peso uterino.

### III.1.2.3 Acción de estrona

Las condiciones experimentales y las dosis utilizadas son similares a las señaladas en los puntos III.1.2.1 y III.1.2.2. Los datos obtenidos se encuentran resumidos en la tabla nro. II.

- a) Dosis baja de estrona: se inyectó 1.0 ug de estrona luego de una dosis inicial de 0.5 ug. En estas condiciones experimentales, la estrona no afectó la síntesis de PGs, sin embargo aumentó el peso uterino demostrando así su efecto uterotrófico.
- b) Dosis farmacológica de estrona: se trató a los animales con 0.5 ug de este esteroide el primer día y 50 ug el segundo, no detectándose modificaciones en la síntesis de PGs por el útero de rata OV.

### III.1.3 Acción de catecolestrógenos

Según algunos investigadores (182, 139) los estrógenos actuarían mediante sus metabolitos, los catecolestrógenos, modificando la síntesis de PGs. Por ello se estudió la influencia de los mismos en la síntesis y liberación de PGs por el útero de rata OV en dos dosis distintas; (0.5 + 1.0) ug y (0.5 + 50) ug.

Los catecolestrógenos se vehiculizaron en agua, que contenía ácido ascórbico (1.0 mg/ml) como antioxidante en el caso de las dosis menores (0.5 y 1.0 ug) y en etanol:agua 7:3 con la misma concentración de ácido ascórbico cuando se utilizó 50 ug. Los animales usados como con-

troies se inyectaron con igual volumen del vehículo conteniendo la misma concentración de antioxidante.

Los valores obtenidos en estos dosajes se expresan en la tabla nro. III.

#### III.1.3.1 Efecto de 2-hidroxiestradiol

- a) Dosis baja: el tratamiento de los animales con (0.5 + 1.0)ug de este catecolestrógeno no modificó la síntesis de PGs.
- b) Dosis farmacológica: cuando se utilizaron 50 ug de este catecolestrógeno en la segunda inyección la síntesis y liberación de PG tipo F no se vió afectada. Sin embargo, los valores obtenidos en el dosaje de PG tipo E, fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ).

#### III.1.3.2 Efecto de 2-hidroxiestrone

Ninguna de las dos dosis utilizadas afectó la síntesis de PGs por úteros de ratas OV.

#### III.1.3.3 Efecto de 2-hidroxiestriol

Tampoco este catecolestrógeno fue capaz de modificar la producción de PGs por el tejido uterino.

#### III.1.4 Efecto de una dosis única de Progesterona sobre un tratamiento estrogénico

Se ha sugerido que la progesterona puede antagonizar la acción

Tabla nro. III: Acción de catecolestrógenos sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas por el útero de rata ovariectomizada

TRATAMIENTO	PG Tipo E ng/mg p.s.	PG Tipo F ng/mg p.s.
Control (♀ 21 d) +0.5ml	9.5 ± 1.2 (n = 6)	5.3 ± 0.9 (n = 6)
2 OH Estradiol (0.5 + 1µg)	8.6 ± 1.2 (n = 6)	5.8 ± 0.8 ng / ml
2 OH Estradiol (0.5 + 50ug)	3.8 ± 0.9 * (n = 6)	4.8 ± 0.6 (n = 6)
2 OH Estrona (0.5 + 1 µg)	7.9 ± 2.0 (n = 5)	4.3 ± 1.5 (n = 5)
2 OH Estrona (0.5 + 50µg)	8.2 ± 1.5 (n = 6)	5.6 ± 1.2 (n = 5)
2 OH Estriol (0.5 + 1µg)	10.1 ± 1.8 (n = 6)	5.3 ± 1.5 (n = 5)
2 OH Estriol (0.5 + 50µg)	9.3 ± 1.9 (n = 5)	5.0 ± 1.1 (n = 5)

\* p < 0.05

estrogénica reduciendo el número de receptores citoplasmáticos a estrógenos. Este fenómeno se refleja en una disminución de la respuesta uterina a los estrógenos (36). Por ello se estudió el efecto de una dosis única de progesterona (2 mg) administrada después de la segunda dosis de 1.0 ug de estradiol y se lo comparó con la acción del 17-beta-estradiol sólo sobre la síntesis de PGs del útero de animales OV.

En la figura 17 se puede observar que el efecto del estrógeno sobre la síntesis de PG tipo E no se ve afectada por la progesterona, ya que no existen diferencias significativas entre ambos dosajes. En cambio a diferencia del tratamiento realizado con solamente 17-beta-estradiol, cuando se administraron en forma combinada estrógenos y progesterona, comprobamos un aumento significativo en la síntesis y liberación de PG tipo F que alcanzó a un valor de  $9.3 \pm 1.4$  ng/mg peso seco.

### III.1.5 Acción de la progesterona

#### III.1.5.1 Efecto de una dosis única de progesterona:

Es generalmente aceptado que la progesterona, per se, carece de efecto sobre la síntesis de PGs de animales OV (193, 43), mientras que esta hormona ejerce una acción estimulante cuando se la administra en combinación a estrógenos (193, 43). A pesar de esto, se decidió estudiar la acción de progesterona sola en relación con la síntesis de PGs, debido a que el efecto observado en el punto III.1.4 sobre la PG tipo F no se vió con el tratamiento estrogénico.

En la figura 18 se graficaron los resultados del dosaje de PGs

Fig. nro. 17: Efecto de una dosis de progesterona sobre un tratamiento estrogénico en la síntesis y liberación de prostaglandinas por el útero de rata ovariectomizada



Fig. nro. 18: Acción de la progesterona sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas por el útero de rata ovariectomizada



producidos por los úteros de animales OV inyectados con 0.5 ml de aceite de maní y los provenientes de preparaciones aisladas de animales tratados con 2 mg de progesterona disueltos en el mismo volumen de vehículo administrado a los controles.

Las columnas oscuras muestran que esta hormona no tuvo efecto sobre la síntesis y liberación de PG tipo E.

El efecto observado sobre la PG tipo F, cuando la progesterona se administró junto a estrógenos, se vió incrementado. La progesterona aumentó significativamente la síntesis de PG tipo F y el incremento fue significativamente superior al señalado en el punto III.1.4.

#### III.1.5.2 Acción de distintas dosis de progesterona

Se estudiaron los efectos de diversas dosis de progesterona sobre la síntesis y liberación, durante 60 minutos, de PGs desde el útero de rata OV.

Los animales se inyectaron con la hormona disuelta en 0.5 ml de aceite de maní y fueron sacrificados seis horas después. Se procedió luego de la misma manera que en los casos anteriores.

La figura 19 muestra la cantidad de PG tipo E sintetizada y liberada, luego de 60 minutos, al medio de incubación de los úteros de animales OV tratados con distintas dosis de progesterona. Como se puede observar la PG tipo E liberada al medio no difirió del valor control en ninguno de los casos estudiados.

En la figura 20 se puede observar la síntesis y liberación de

Fig. nro. 19: Acción de distintas dosis de progesterona sobre la síntesis y liberación de PG tipo E por el útero de rata ovariectomizada

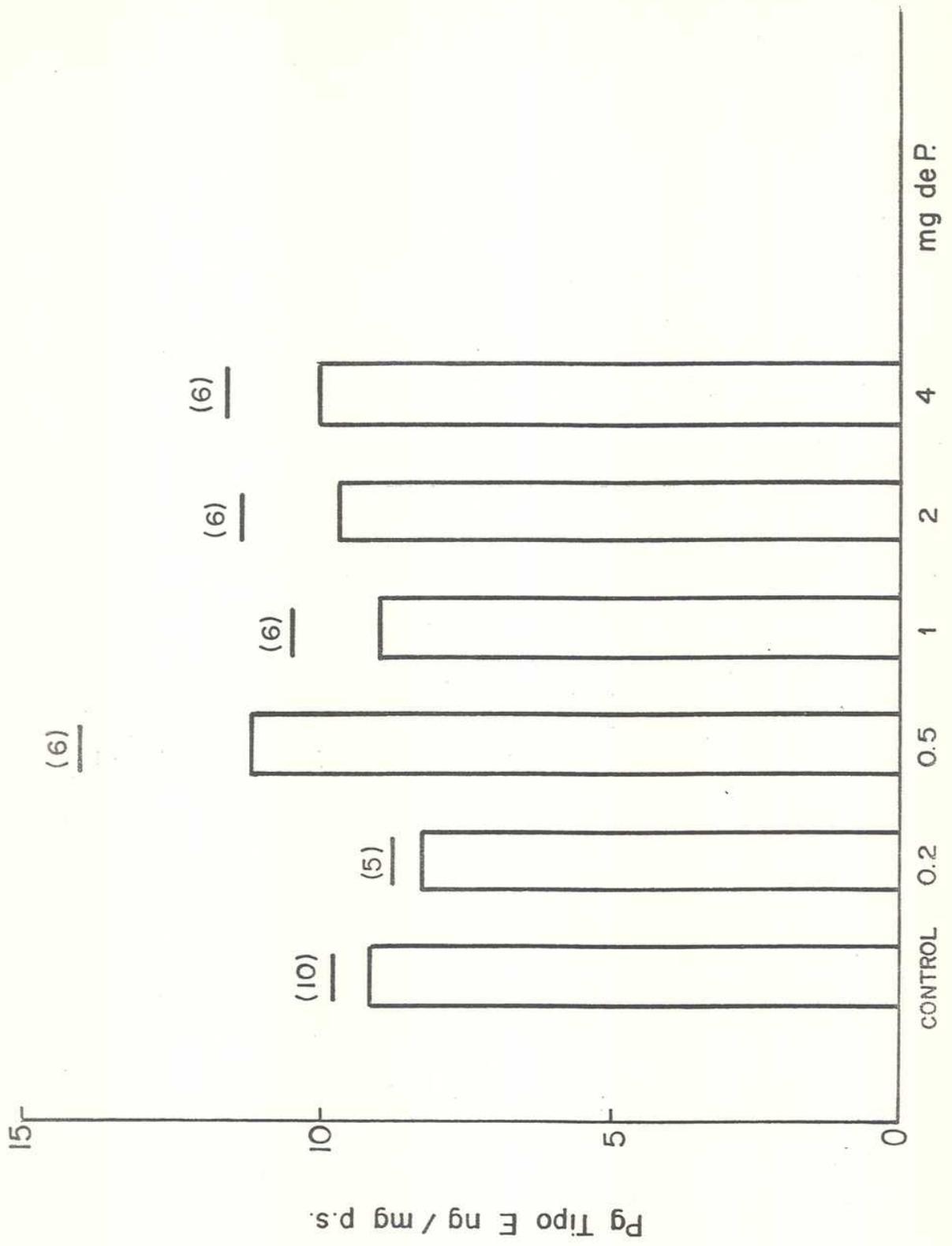
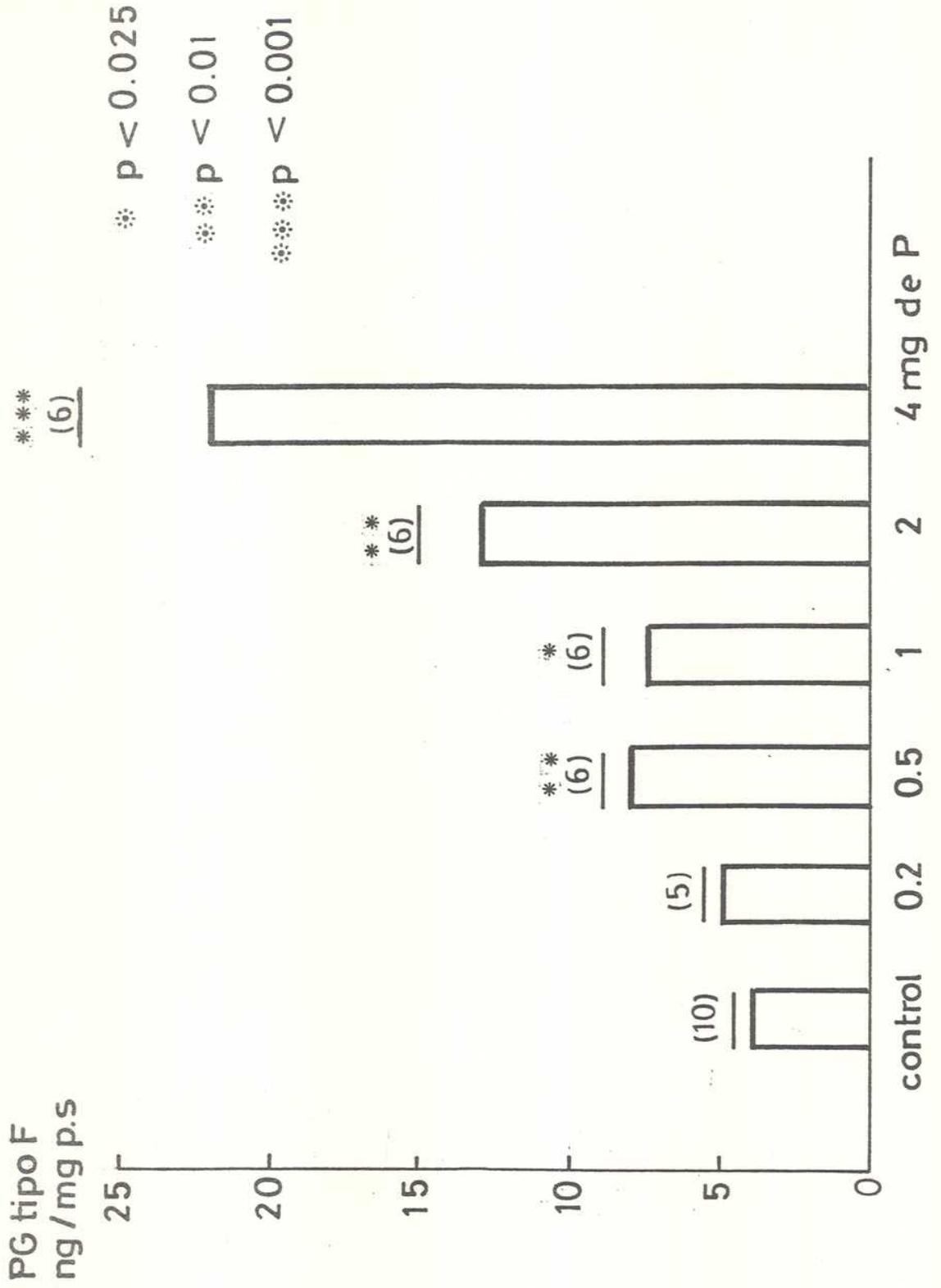


Fig. nro. 20: Acción de distintas dosis de progesterona sobre la síntesis y liberación de PG tipo F por el útero de rata ovariectomizada



PG tipo F. Una dosis de 0.2 mg de progesterona no fue capaz de alterar los valores de esta PG. Por otro lado la cantidad de PG tipo F liberada al medio de incubación fue significativamente mayor que en las controles cuando se trató a los animales con dosis de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg de progesterona.

La síntesis y liberación de PG tipo F en el caso del útero de animales tratados con 4.0 mg de esta hormona superó, en más de cinco veces, los valores hallados en controles.

### III.1.5.3 Estudio en el tiempo de la acción de progesterona

Se exploraron relaciones temporales para el efecto de la progesterona y para ello se inyectaron a los animales OV una misma dosis de 4.0 mg de esta hormona y se los sacrificó a distintos tiempos.

Los resultados obtenidos del dosaje de PGs liberadas por el útero de animales tratados fueron comparados con los valores obtenidos de ratas OV inyectadas con 0.5 ml de aceite de maní, el vehículo de la hormona.

La figura 21 muestra que en ninguno de los casos la PG tipo E liberada al medio de incubación fue significativamente distinta del valor control.

En la figura 22 se grafica el dosaje de PG tipo F sintetizada por los úteros de animales OV que recibieron el tratamiento ya citado. Como puede observarse cuando la progesterona es inyectada sólo quince minutos antes del sacrificio no es capaz de alterar la síntesis de esta

Fig. nro. 21: Estudio en el tiempo del efecto de una dosis de progesterona (4 mg) sobre la síntesis y liberación de PG tipo E por el útero de rata ovariectomizada

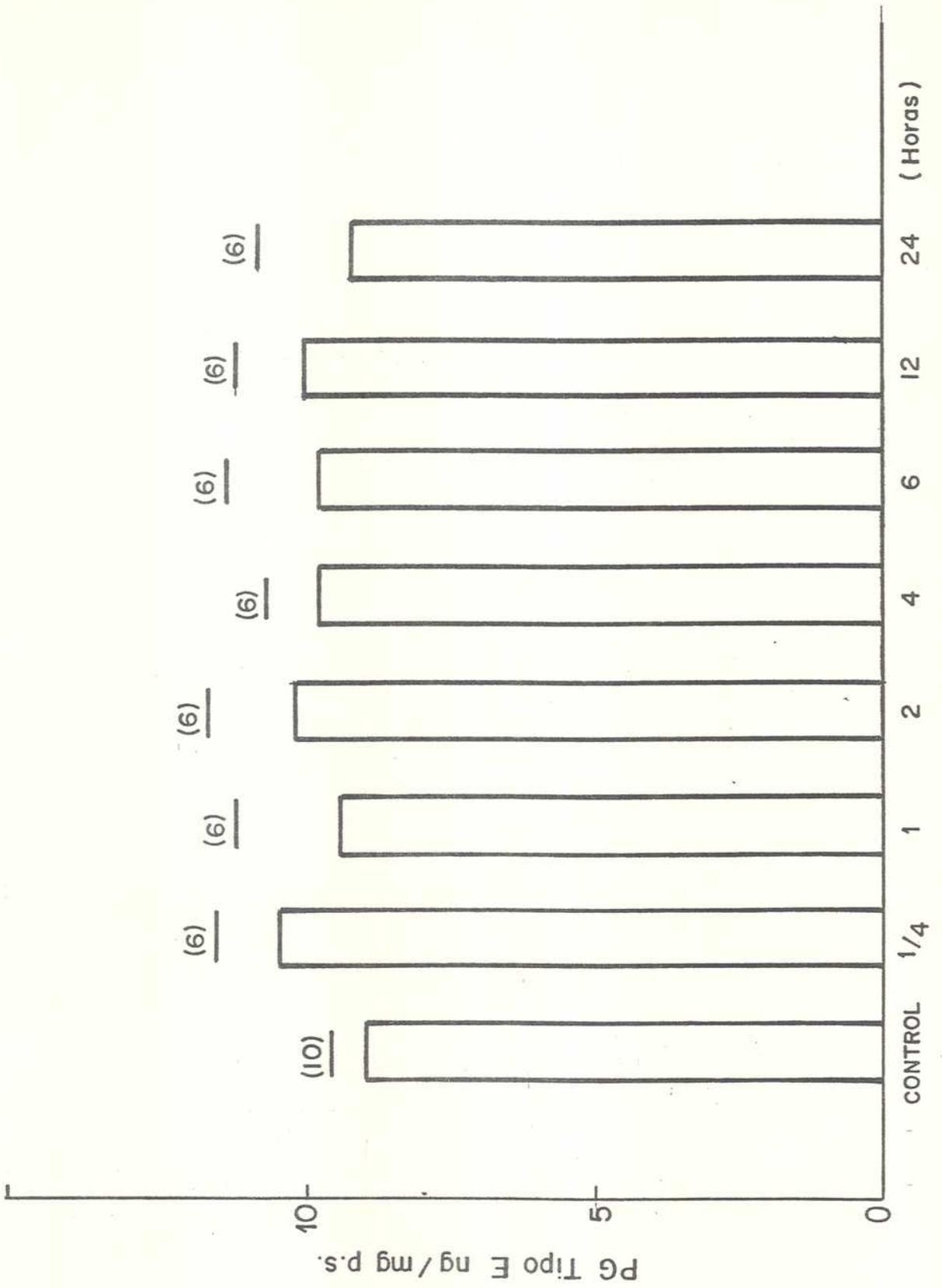
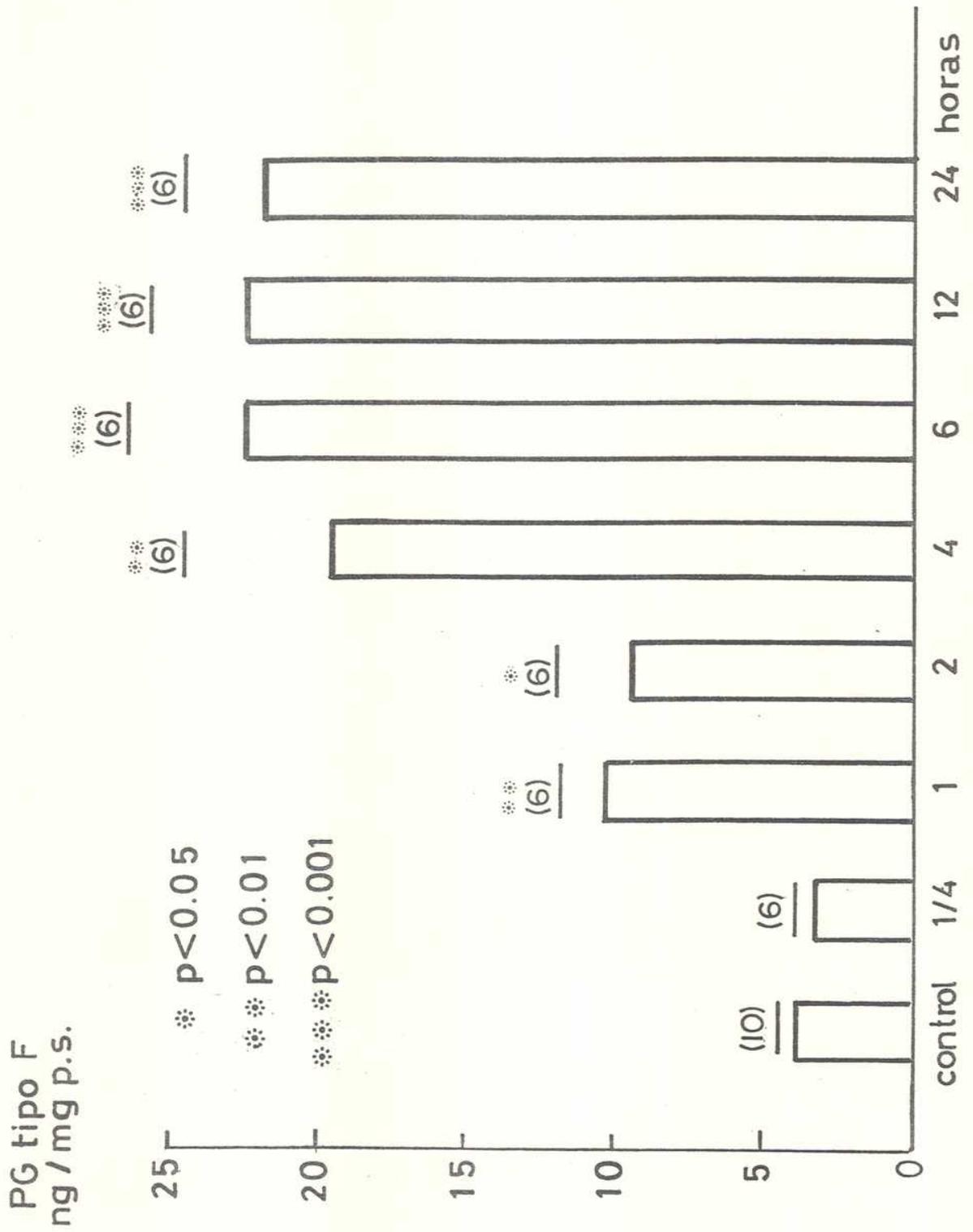


Fig. nro. 22: Estudio en el tiempo del efecto de una dosis de progesterona (4 mg) sobre la síntesis y liberación de PG tipo F por el útero de rata ovariectomizada



PG. De todas formas basta una hora desde la inyección de la hormona para que ésta aumente la cantidad de PG tipo F presente en el medio de incubación ( $p < 0.01$ ). Resultados similares se obtuvieron cuando los animales fueron sacrificados 2, 4, 6, 12 y 24 horas después de la administración de progesterona.

### III.2 - ACCION DE LA PROGESTERONA SOBRE LA SINTESIS Y LIBERACION DE PGS POR UTEROS DE ANIMALES OVARIECTOMIZADOS Y SUPRARRENOPRIVOS

Como las suprarrenales de rata secretan considerables cantidades de estrógenos (245) y además las ratas OV desarrollan tumores adrenocorticales funcionales con actividad estrogénica (234), se estudió el efecto de la progesterona en animales OV que sufrieron además la extracción de sus suprarrenales cinco días antes del sacrificio (OV/SR).

Los animales fueron inyectados en forma subcutánea con 4 mg de progesterona en aceite de maní durante dos días y sacrificados 24 horas después de la segunda dosis de la hormona. Los controles recibieron el mismo volumen de vehículo que los tratados.

En la tabla nro. IV se exponen los datos obtenidos en el dosaje de PGs sintetizadas y liberadas por el útero de ratas OV, OV/SR y ambas tratadas con progesterona.

Los animales OV/SR producen menor cantidad de PGs tanto del tipo E ( $p < 0.001$ ) como F ( $p < 0.05$ ) respecto de los animales OV.

La síntesis y liberación de PG tipo E es significativamente ma-

Tabla nro. IV: Acción de la progesterona sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas por el útero de ratas ovariectomizadas y suprarrenoprivas

TRATAMIENTO	PG tipo E ng/mg p.s.	PG tipo F ng/mg p.s.
OVARIECTOMIZADAS	9.1 ± 0.4 n = 10	4.0 ± 0.6 n = 10
OVARIECTOMIZADAS + P (4 mg / día / 2 días)	9.2 ± 1.2 n = 5	45.4 ± 4.6 n = 5 ⚙
OVARIECTOMIZADAS Y SUPRARRENOPRIVAS	6.0 ± 0.4 n = 5	2.4 ± 0.2 n = 5
OVARIECTOMIZADAS Y SUPRARRENOPRIVAS + P (4 mg / día / 2 días)	5.3 ± 0.4 n = 6	20.5 ± 1.5 n = 6 ⚙

⚙ P < 0.01

yor ( $p < 0.001$ ) que la de PG tipo F en los animales OV/SR, hecho que también se había observado en los OV (III.1.1).

Cuando a las ratas OV/SR se las trata con progesterona la cantidad de PG tipo E liberada al medio de incubación de sus úteros no es afectada. Sin embargo, la síntesis de PG tipo F se ve incrementada más de ocho veces por el tratamiento hormonal. Este fenómeno es el mismo que ocurre cuando se trata con progesterona a los animales OV.

### III.3 - ACCION DE HORMONAS SEXUALES SOBRE SINTESIS Y LIBERACION DE PROSTAGLANDINAS POR LOS UTEROS DE ANIMALES PREPUBERES

Otro modelo experimental donde los valores hormonales son muy bajos, es el de la rata prepúber (51, 160). Es por ello que se utilizaron además este tipo de animales para las presentes investigaciones.

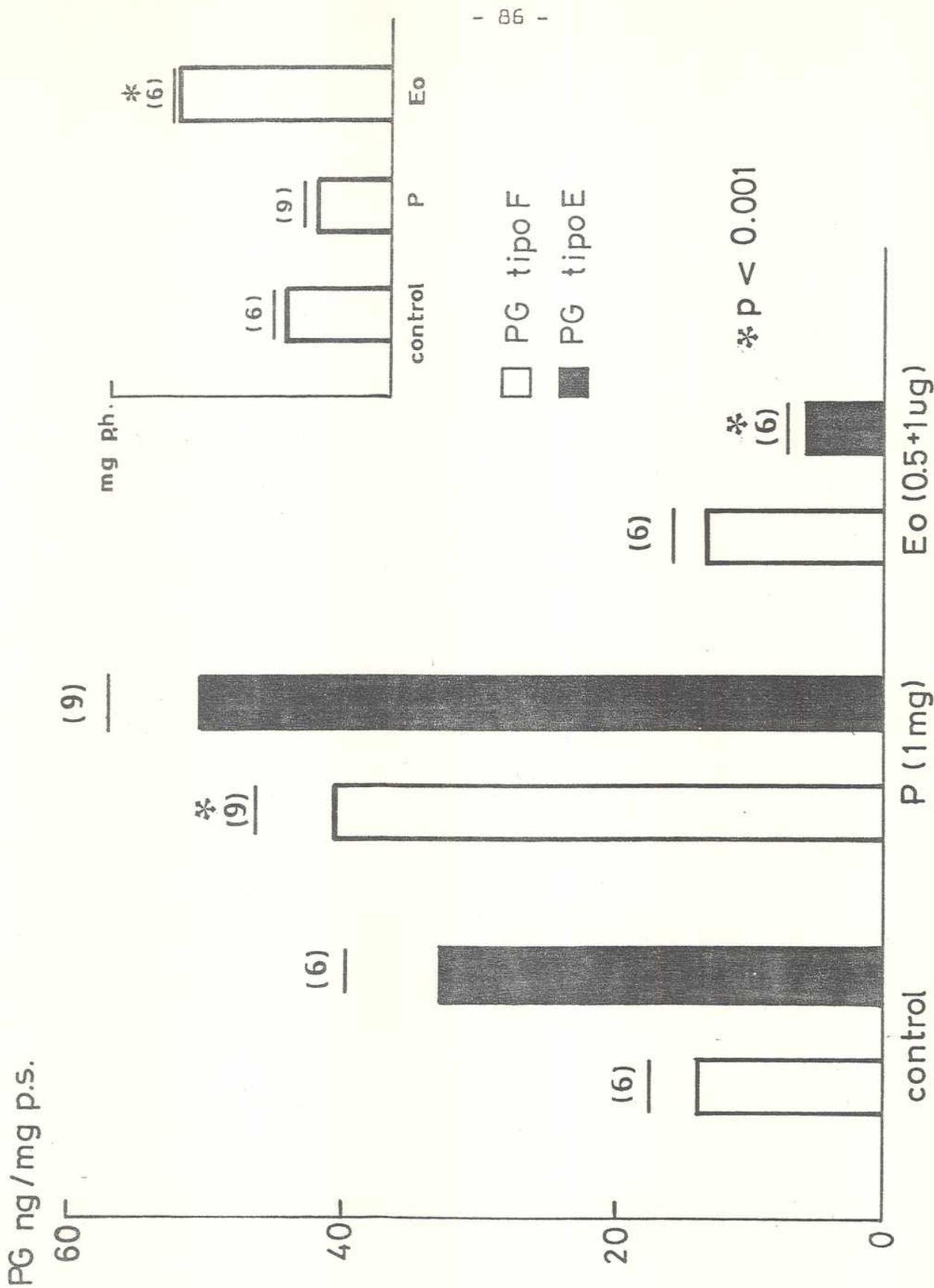
Se dosaron las PGs sintetizadas y liberadas al medio de incubación durante 60 minutos por cada cuerno uterino y se expresaron como ng PG por mg de peso seco del tejido.

#### III.3.1 Síntesis de prostaglandinas por los úteros de ratas prepúberes

En la parte inferior izquierda de la figura 23 pueden observarse los valores de las PGs sintetizadas por el útero de animales prepúberes. En columnas claras la PG tipo F y en las oscuras las de PG tipo E.

Al igual que en los animales OV y en los OV/SR la síntesis de PG tipo E fue significativamente superior que la de PG tipo F ( $p < 0.05$ ).

Fig. nro. 23: Efecto de hormonas sexuales sobre síntesis y liberación de prostaglandinas por el útero de rata prepuéber



### III.3.2 Acción de la progesterona

Se trató a los animales con 1.0 mg de progesterona y se los sacrificó 6 horas después.

En la parte inferior central de la figura 23 se observa la magnitud de la producción de PGs por estos úteros.

La cantidad de PG tipo F liberada del útero al medio de incubación es significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) que la de animales controles, mientras que no se alteró la síntesis y liberación de PG tipo E.

Se pone así de manifiesto el mismo efecto de la progesterona ya visto en animales OV y en OV/SR.

### III.3.3 Acción del 17-beta-estradiol

Los animales fueron inyectados con 0.5 ug de 17-beta-estradiol el primer día y 1.0 ug el segundo; sacrificándose los 24 horas después.

En la parte inferior derecha de la figura 23 se grafican los valores de PGs detectados después de este tratamiento.

La concentración de PG tipo E es significativamente menor ( $p < 0.001$ ) que la de los controles mientras que no existen variaciones en los valores de PG tipo F.

Para saber si esta dosis de estrógenos era uterotrónica, se pesaron los úteros de los animales controles y tratados. En el inserto superior derecho de la figura se expresan los pesos uterinos húmedos en

mg. Puede observarse que los pertenecientes a animales estrogenizados son significativamente mayores que los restantes.

### III.4 - EFFECTO DE HORMONAS SEXUALES SOBRE LA RADIOCONVERSION DEL ACIDO ARAQUIDONICO POR EL UTERO DE RATA OVARIECTOMIZADA

#### III.4.1 Perfil de la síntesis de prostaglandinas por el útero de ratas ovariectomizadas

Se incubaron úteros de ratas OV con ácido araquidónico-<sup>14</sup>C para poner de manifiesto la capacidad de síntesis de PGs por este tejido. Los resultados se expresaron como porcentaje de conversión de la radioactividad total de la placa.

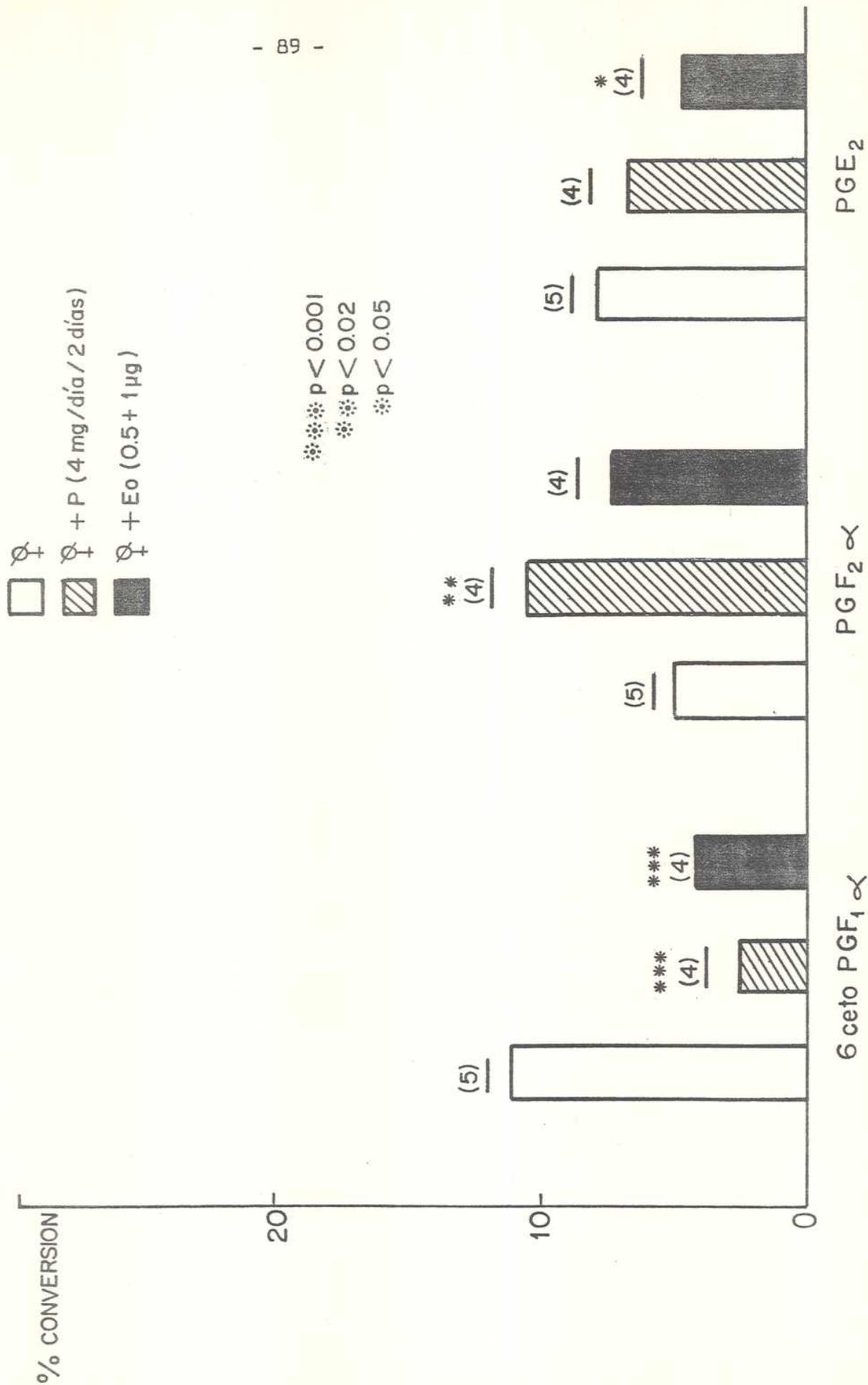
En la figura 24 se grafican los datos obtenidos en los distintos experimentos de radioconversión. Las columnas claras expresan los valores pertenecientes a úteros de rata OV.

El porcentaje de conversión más alto ( $p < 0.05$ ) es hacia 6-ceto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> , metabolito de la PGI<sub>2</sub>, o sea ésta sería la principal PG sintetizada por el útero de rata OV.

Además la conversión hacia PGE<sub>2</sub> es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que hacia PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , hecho que coincide con los valores de síntesis y liberación de estas PGs en este modelo experimental.

#### III.4.2 Efecto de la progesterona

Fig. nro. 24: Radioconversión del ácido araquidónico-<sup>14</sup>C por el útero de rata ovariectomizada



Los animales OV se inyectaron, durante dos días, con 4 mg de progesterona y fueron sacrificados 24 horas después de la segunda inyección de esta hormona.

En la figura 24 las columnas rayadas son las correspondientes a este tratamiento. Se puede observar que la conversión a 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> está significativamente disminuída ( $p < 0.001$ ). En cambio no se detectó influencia sobre la PGE<sub>2</sub>. La administración de progesterona aumentó significativamente la cantidad de ácido araquidónico-<sup>14</sup>C metabolizado a PGF<sub>2α</sub> por el útero de rata OV. Esto también coincide con lo hallado al dosar las PGs liberadas al medio por úteros de animales tratados con esta hormona.

La conversión a PGF<sub>2α</sub> fue significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) que a 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>

#### III.4.3 Efecto del 17-beta-estradiol

Los animales OV fueron inyectados con 0.5 ug de 17-beta-estradiol el primer día y con 1.0 ug el segundo, siendo sacrificados 24 horas más tarde.

Las columnas oscuras de la figura 24 son las que representan el porcentaje de conversión correspondiente a los úteros de animales estrogezados.

Al igual que con el tratamiento con progesterona la conversión a 6-ceto-PGF<sub>1α</sub> fue significativamente menor ( $p < 0.001$ ) que en los controles.

El porcentaje de conversión a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no se modificó y en cambio hubo una disminución significativa ( $p < 0.02$ ) de la cantidad de precursor transformada en  $\text{PGE}_2$ .

### III.5 - ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 9-CETO-REDUCTASA

#### III.5.1 Conversión de $^3\text{H-PGE}_2$ por úteros de ratas ovariectomizadas

En la parte izquierda de la figura 25 se representan los valores de conversión de  $^3\text{H-PGE}_2$  por úteros de ratas OV.

Se midieron los porcentajes de conversión a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (columnas rayadas) y a su metabolito (13,14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) (columnas oscuras). Ninguno de los dos valores son significativos; por lo tanto no existió conversión de la  $\text{PGE}_2$  por el útero de rata OV.

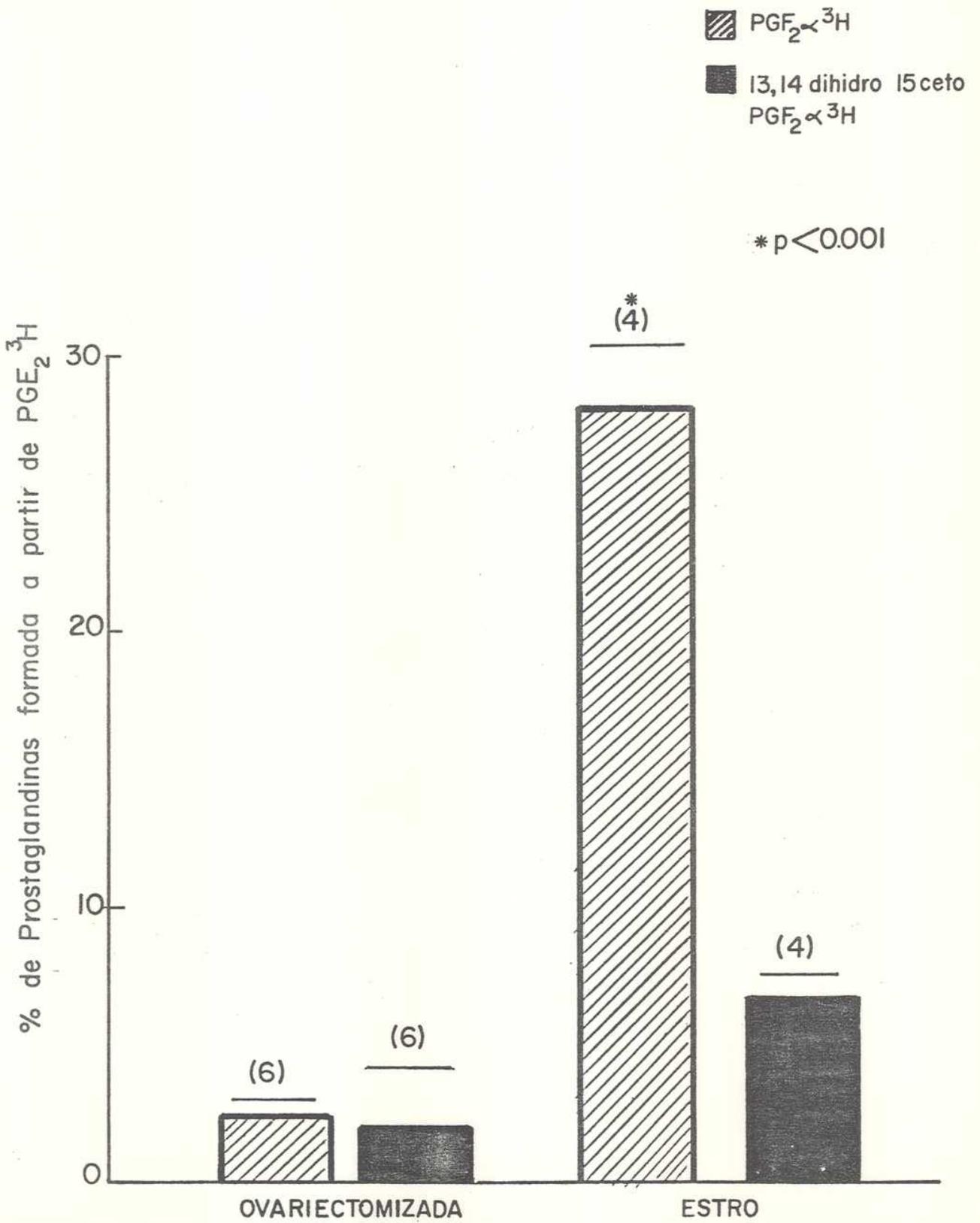
#### III.5.2 Conversión de $^3\text{H-PGE}_2$ por úteros de ratas en estro

En la parte derecha de la figura 25 se grafican los porcentajes de conversión de la  $^3\text{H-PGE}_2$  por úteros de ratas en estro natural.

La columna rayada que representa el porcentaje de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  alcanza un valor de 28 y la conversión al metabolito es de casi 7%.

Cuando se incubó  $^3\text{H-PGE}_2$  con homogenato calentado a 100°C durante 2 minutos la conversión no superó el 3%. Lo mismo sucedió cuando se utilizó buffer en vez de homogenato.

Fig. nro. 25: Conversión de la  $^3\text{H-PGE}_2$  por el útero de rata ovariectomizada y en estro natural



### III.5.3 Acción de hormonas sexuales sobre la conversión de $^3\text{H-PGE}_2$ por úteros de ratas ovariectomizadas

#### III.5.3.1 Acción de la progesterona

Se trataron los animales con 4 mg de progesterona por día durante dos días y fueron sacrificados 24 horas después de la segunda inyección.

Se incubó la PG tritiada con homogenatos de útero durante distintos tiempos (0, 5, 30 y 60 minutos) y se compararon los valores obtenidos con los de ratas OV.

Las columnas oscuras de la figura 26 se representan los valores de conversión a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y en la figura 27 la conversión a 13, 14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

En ningún caso estos datos fueron significativamente distintos de los obtenidos con ratas OV ni de sus propios valores de tiempo cero.

#### III.5.3.2 Efecto del 17-beta-estradiol

a) Dosis baja: se inyectaron ratas OV con 0.5 ug de 17-beta-estradiol el primer día y con 1.0 ug el segundo, siendo sacrificados al día siguiente.

Las columnas rayadas de la figura 26 y 27 representan los porcentajes de conversión a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y a su metabolito, respectivamente.

Tal como se indicó en el punto III.5.3.1 no existen diferen-

Fig. nro. 26: Acción de hormonas sexuales en la formación de  $^3\text{H-PGF}_{2\alpha}$  por el útero de rata ovariectomizada

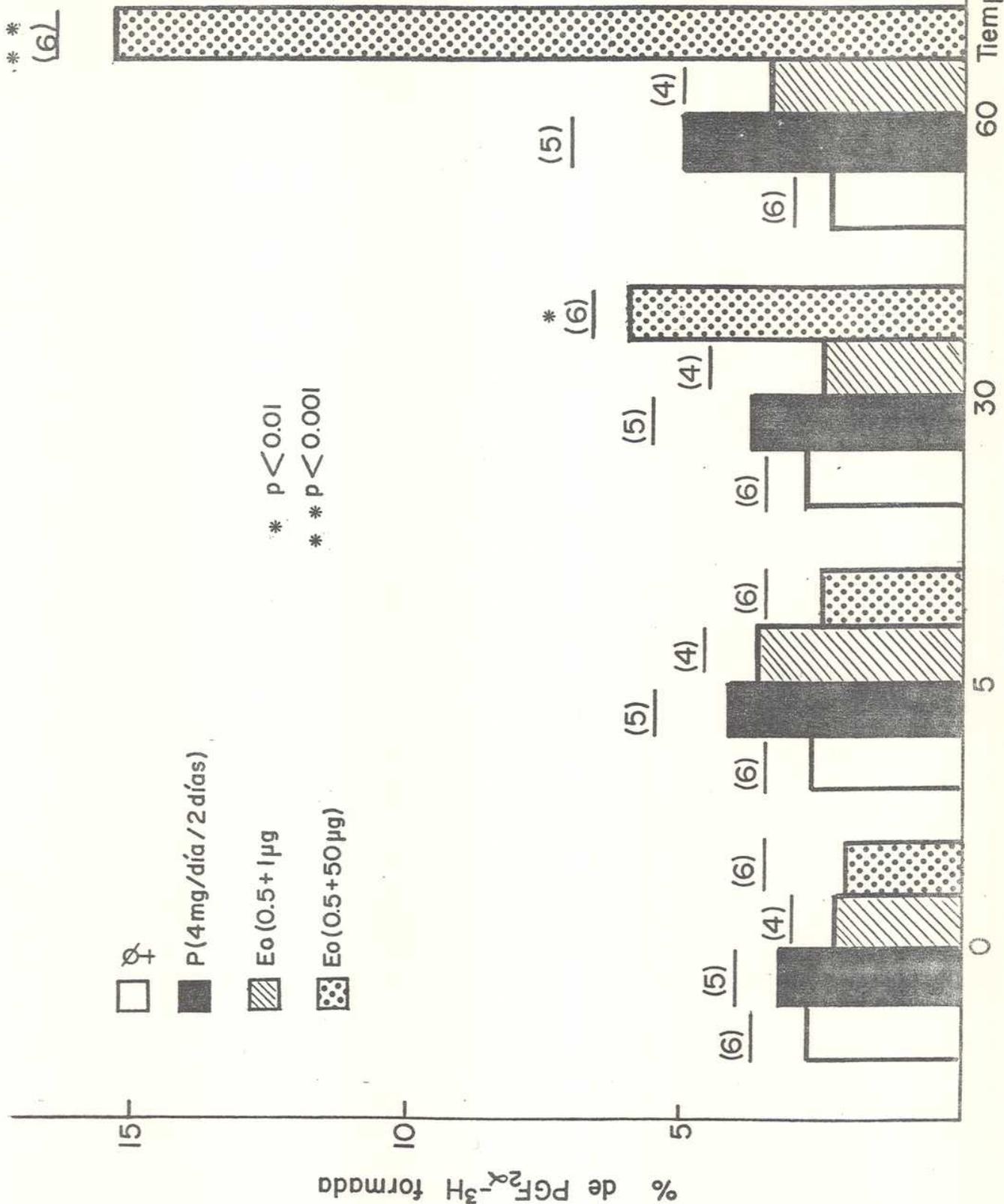
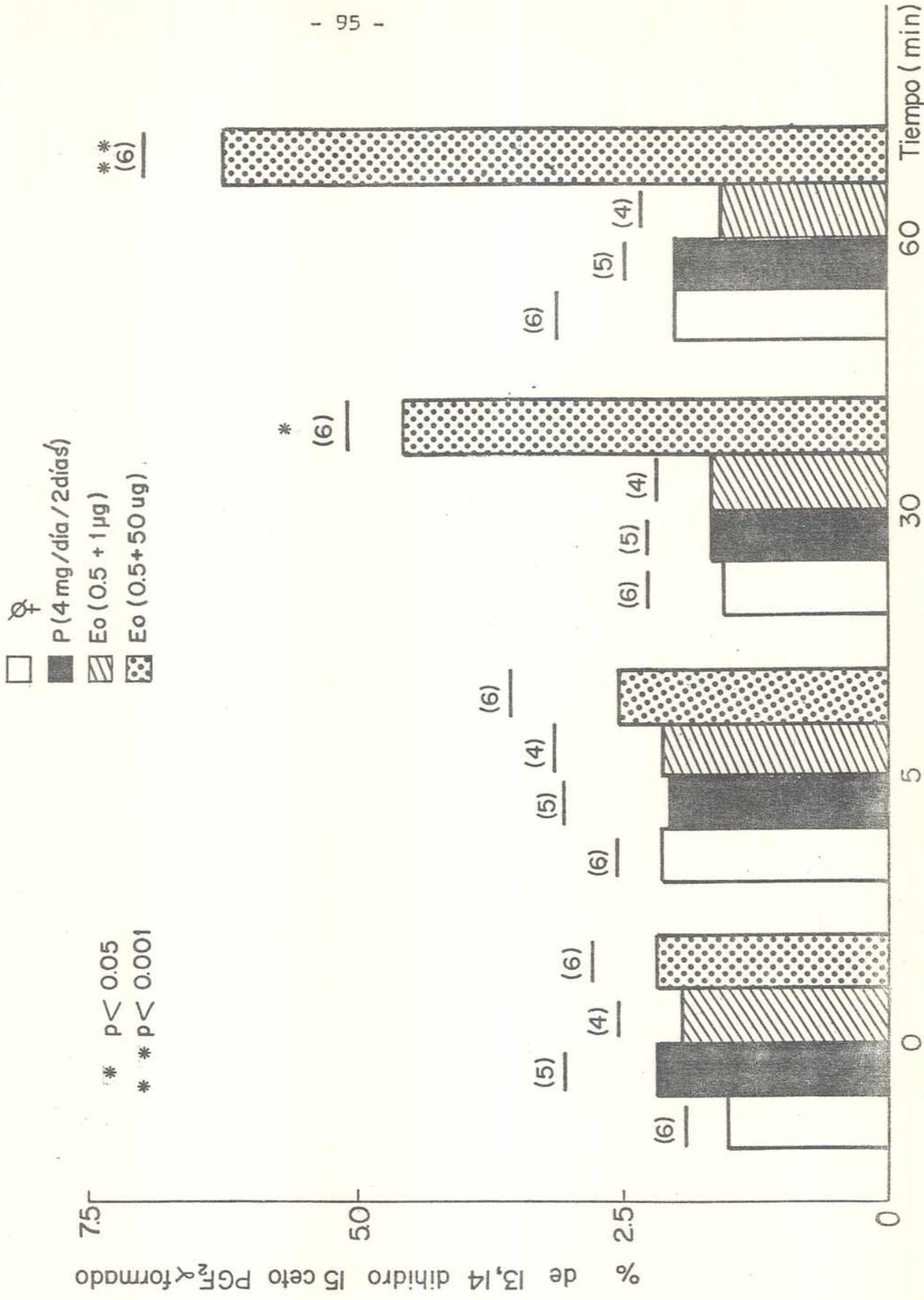


Fig. nro. 27: Acción de hormonas sexuales en la formación de  $^3\text{H}$ -13, 14-dihidro-15-ceto-PGF $_{2\alpha}$  por útero de rata ovariectomizada



cias significativas en ninguno de los casos con respecto a los porcentajes de conversión en úteros de ratas OV ni a su valor de tiempo cero.

- b) Dosis farmacológica: se administraron a los animales 0.5 ug de 17-beta-estradiol el primer día y 50 ug en el segundo, realizándose la experiencia 24 horas después de esta inyección.

Las columnas con puntos son las que indican los valores obtenidos en la conversión de  $^3\text{H-PGE}_2$  a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y a 13, 14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Los porcentajes a los cinco minutos de incubación, no difieren significativamente de los valores controles.

A los treinta minutos de incubación tanto la conversión a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  como a su metabolito son significativamente mayores ( $p < 0.01$ ) que los valores obtenidos con ratas OV.

Cuando se cumplen sesenta minutos de incubación los porcentajes obtenidos de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y 13, 14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  son significativamente mayores ( $p < 0.001$ ) que los controles y también que los valores registrados a los treinta minutos de incubación ( $p < 0.05$ ).

### III.6 - METABOLISMO DE LAS PROSTAGLANDINAS POR EL UTERO DE RATA OVARIECTOMIZADA. INFLUENCIA HORMONAL

#### III.6.1 Actividad de la 15-hidroxiprostaglandinodeshidrogenasa en el útero de rata ovariectomizada

En las columnas claras de las figuras 26 y 29 se puede observar

Fig. nro. 28: Acción de hormonas sexuales sobre la actividad de la 15-prostaglandin deshidrogenasa para  $PGF_{2\alpha}$  del útero de rata ovariectomizada

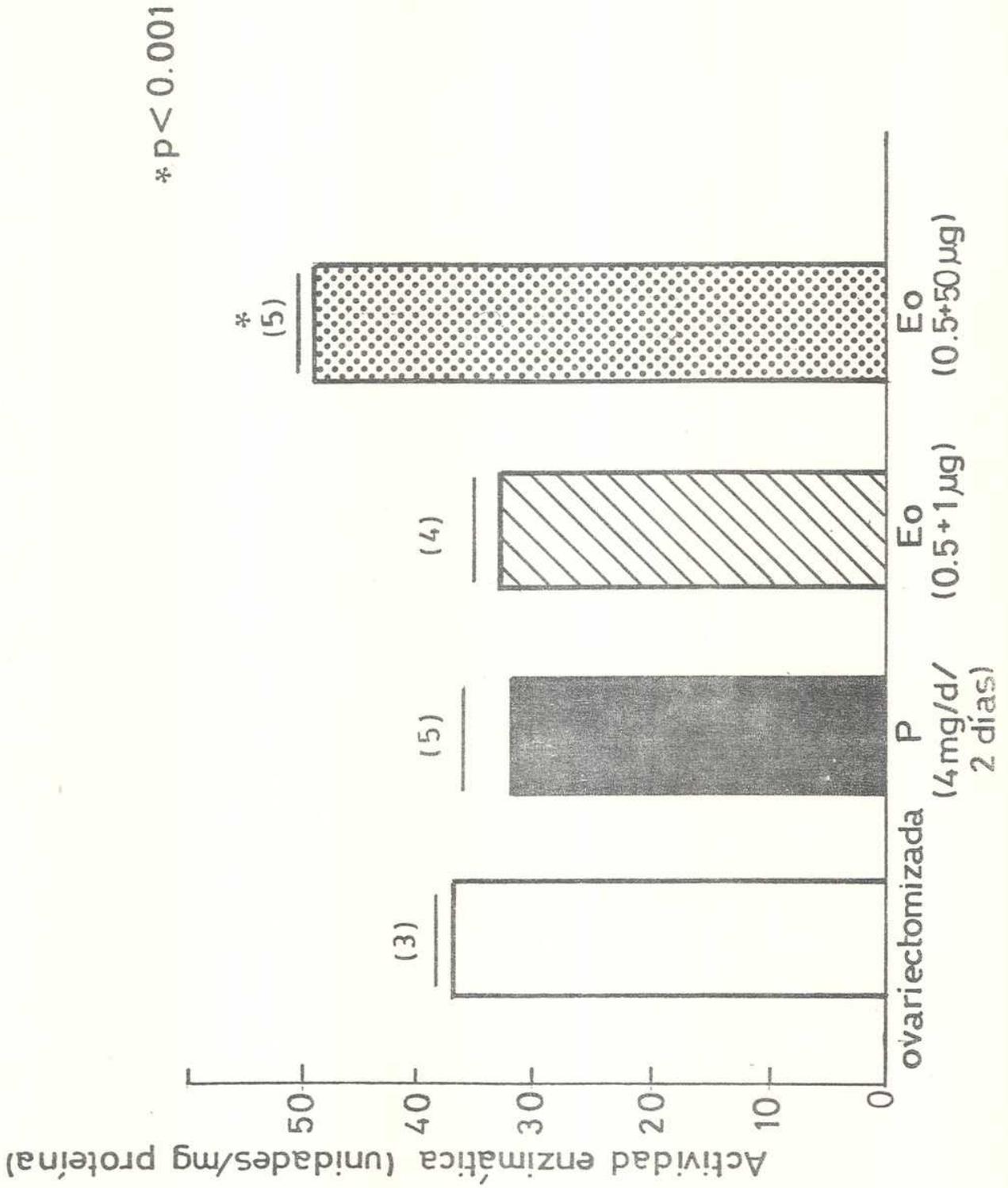
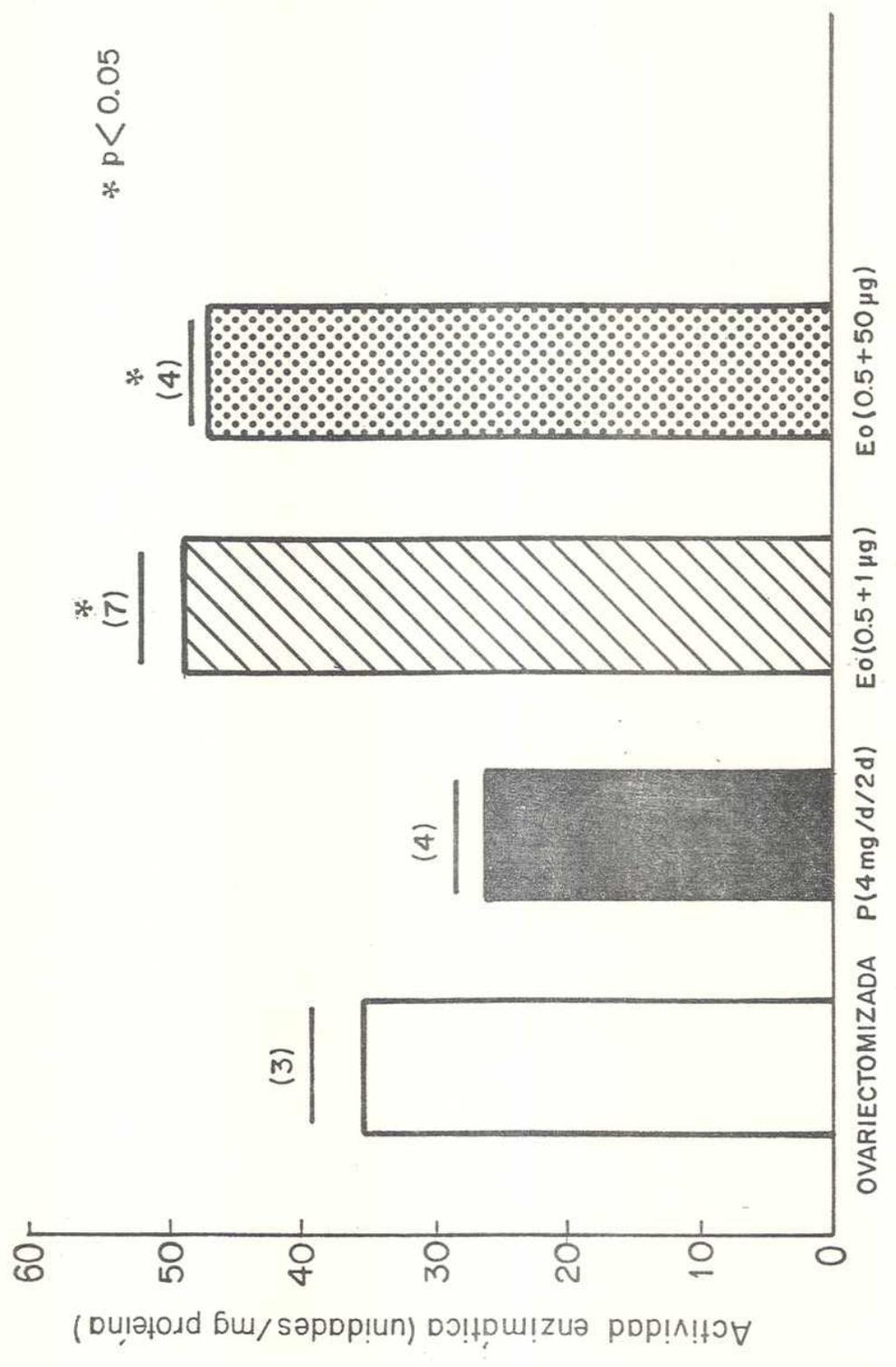


Fig. nro. 29: Acción de hormonas sexuales sobre la actividad de la 15-prostaglandin deshidrogenasa para PGE<sub>2</sub> de útero de rata ovariectomizada



la actividad de la 15-hidroxi-PG-deshidrogenasa para  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y  $\text{PGE}_2$  del útero de rata OV. Dicha actividad se expresó como unidades enzimáticas por mg de proteína.

En el caso de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  el valor alcanzado fue de  $37 \pm 1$  unidades por mg de proteína y no difiere significativamente del de la  $\text{PGE}_2$  ( $35 \pm 4$ ).

### III.6.2 Acción de la progesterona

Se trataron los animales OV con 4 mg de progesterona por día durante dos días y fueron sacrificados 24 horas después de la segunda inyección.

Las columnas oscuras de las figuras 28 y 29 expresan la actividad de esta enzima en el útero de animales inyectados con progesterona. Los valores obtenidos para ambas PGs no difirieron significativamente de los controles. Tampoco existieron diferencias significativas entre la actividad de la enzima para ambos sustratos en este modelo experimental.

### III.6.3 Acción del 17-beta-estradiol

a) Dosis baja: los animales OV fueron inyectados intraperitonealmente con 0.5 ug de 17-beta-estradiol el primer día y 1.0 ug el segundo. Se lo sacrificó 24 horas después.

Las columnas rayadas son las que indican la actividad de la enzima en el útero de los animales estrogenizados.

La actividad enzimática no difirió del valor control cuando se usó como sustrato la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . En cambio existió un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) respecto del obtenido con ratas OV cuando la enzima actuó sobre  $\text{PGE}_2$ .

Además, la actividad enzimática cuando el sustrato fue  $\text{PGE}_2$  resultó significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) que cuando se utilizó  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

- b) Dosis farmacológica: el tratamiento consistió en la administración de 0.5 ug de 17-beta-estradiol el primer día y 50 ug el segundo. Nuevamente se sacrificaron los animales el tercer día.

Las columnas con puntos representan los valores obtenidos en este modelo.

Tanto cuando se usó como sustrato  $\text{PGE}_2$  como  $\text{PGF}_{2\alpha}$  la actividad enzimática aumentó significativamente ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$  respectivamente) respecto de lo encontrado en animales OV. No existieron diferencias significativas cuando se usó una u otra PG.

IV - DISCUSSION

El papel de las PGs uterinas en distintas funciones reproductivas ha sido largamente estudiado.

La  $PGF_{2\alpha}$  ha sido identificada como la luteolisina uterina en la mayoría de las especies (214, 107, 45, 176, 236) incluyendo la humana (212).

Además, las PGs, especialmente la  $PGE_2$ , serían las responsables de buena parte de la motilidad uterina (85, 95).

Por otro lado, la producción uterina de PGs se ha correlacionado con aumento en los niveles de estrógenos y/o con la disminución en los de progesterona, al final del ciclo estral de la oveja (39) y en la terminación de la preñez de la rata (151).

La administración de estrógenos y progesterona a ovejas (39), cobayos (30), ratones (237) y ratas (43) altera la síntesis uterina de PGs.

A pesar de los numerosos estudios en este campo no se ha especificado la función exacta de las hormonas ováricas en la producción de PGs por el útero.

El objeto de este estudio fue determinar el papel de las hormonas sexuales en la síntesis y metabolismo de las PGs uterinas y su posible lugar de acción.

El primer modelo experimental utilizado fue el de la rata ovariectomizada durante 21 días (OV) situación que se provocó para excluir los efectos de los esteroides ováricos endógenos.

Se midieron las PGs sintetizadas y liberadas, durante sesenta minutos, por el útero aislado de rata OV. La cantidad de PG tipo E liberada al medio de incubación fue significativamente superior a la de PG tipo F y este resultado confirmó hallazgos anteriores de otros investigadores y de nuestro laboratorio (146,95).

La PG tipo E liberada por el útero de rata OV es significativamente mayor que la observada en iguales condiciones experimentales en estro natural (85), mientras que no existen diferencias significativas en cuanto a la PG tipo F (85). Estos datos coinciden con los obtenidos por Thaler Dao y colaboradores (268) trabajando con homogenato de útero de ratas OV.

Como los bajos niveles de PG tipo E observados en los animales en estro natural podrían deberse a una acción inhibitoria de los estrógenos, se estudió en primer término el efecto del 17-beta-estradiol sobre la generación de PGs. Los animales tratados con 0.5 + 1.0 ug (III.1.2.1 apartado a)) de este esteroide, mostraron el esperado efecto uterótrófico, reflejado en un aumento del peso uterino. En cuanto a la síntesis de PGs, pudimos ver una disminución en la de PG tipo E siendo ésta dos veces menor que en los animales OV, mientras que no se vió afectada la de PG tipo F. Existe así una alteración en la relación PG tipo E a PG tipo F que de 2.28 en las ratas OV disminuyó a 0.47 con el tratamiento estrogénico.

La acción inhibitoria del 17-beta-estradiol sobre la liberación de PG tipo E fue aún más marcada cuando se utilizó una dosis de 50 ug de este esteroide (III.1.2.1 apartado b)). Además con esta cantidad de

estrógeno se observó un aumento significativo en la cantidad de PG tipo F liberada al medio de incubación; llevando la relación PG tipo E a PG tipo F a un valor de 0.09.

Para verificar si esta acción del 17-beta-estradiol sobre la síntesis de PGs era compartida por otros estrógenos se trató a los animales OV con estrona y estriol, a las dos mismas dosis que las utilizadas para el estradiol. Se verificó también en estos casos la acción uterotrófica de estas hormonas por medio del peso uterino. A pesar de observarse en estas situaciones el efecto citado, no hubo alteraciones en la síntesis y liberación de PGs al medio de incubación.

La evidencia experimental obtenida aquí, sugiere al igual que la de otros trabajos (43, 146), que el 17-beta-estradiol estaría implicado en la regulación de la síntesis de PGs por el útero. El mecanismo por el cual sucede dicho fenómeno no está aclarado.

Existen muy pocos ejemplos de estimulación de la producción de PGs uterinas in vitro por estradiol. Además, en el cobayo, aún dosis farmacológicas de estradiol son prácticamente inefectivas para estimular la generación de PGs por homogenatos de útero (193), sugiriendo que el metabolismo del estradiol in vivo podría participar en la regulación de la síntesis de PGs. Castracane y Jordan (44) demostraron que la modificación de la síntesis de PGs por el estradiol observada en úteros OV no era afectada ni por inhibidores de síntesis proteica como la actinomicina D o la cicloheximida ni tampoco por un antiestrógeno como el MER-25 en concentraciones que es conocido que bloqueaban el aumento de peso uterino producido por el estradiol.

Todos estos datos sugieren que el mecanismo de acción del estradiol no seguiría la vía clásica de los eventos mediados por activación del receptor.

Es conocido que los estrógenos son convertidos en metabolitos inestables tipo catecol en distintos órganos como el hipotálamo (14), el hígado (178) y la hipófisis (178); y estos compuestos han demostrado un gran espectro de acción (178). El metabolismo de los estrógenos podría ser una parte integral de su mecanismo de acción y no simplemente una forma de inactivación. La configuración de los catecolestrógenos se parece a la de las catecolaminas, compuestos conocidos como estimuladores de la síntesis de PGs uterinas (131). El 2-hidroxiestradiol tiene el mismo efecto que el estradiol, disminuyendo la liberación de  $\text{PGI}_2$  por células endoteliales normales y estimuladas con bradiquinina (196). En homogenatos de útero de rata, el 2-hidroxiestradiol produjo una estimulación dosis dependiente de la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y  $\text{PGE}_2$  (139).

Por todo lo dicho parece posible que los metabolitos tipo catecol de los estrógenos estén implicados en la regulación de la síntesis de PGs por el útero de rata. Es por ello que se estudió el efecto de distintos catecolestrógenos en la producción de PGs por el útero de rata OV. De los compuestos ensayados sólo el 2-hidroxiestradiol fue capaz de modificar las PGs del útero, disminuyendo la cantidad de PG tipo E liberada al medio de incubación, cuando se lo administró en una dosis de 0.5 + 50 ug. Siendo que el 17-beta-estradiol fue el único estrógeno que tuvo efecto sobre la síntesis de PGs, y que su metabolito muestra una actividad coincidente, nos llevaría a sugerir que, al menos en parte, la acción in vivo del estradiol sobre la producción de PGs podría

estar mediada por una conversión previa a catecolestrógenos.

Se ha sugerido que la progesterona antagoniza y redirige la habilidad de las células uterinas para responder al estradiol por una disminución de la cantidad de receptores citoplasmáticos para esta hormona. Dicha reducción de los receptores citoplasmáticos provoca una disminución en el número de complejos hormona-receptor translocado al núcleo y retenido en él. Es así que la capacidad de los estrógenos de aumentar el crecimiento uterino está disminuida.(54, 130). Como estas interacciones pueden ocurrir durante el ciclo estral de la rata, probablemente constituyan un mecanismo de control básico por el cual el tracto reproductivo se transforme en cada ciclo.

Para sustanciar esta sugerencia, a los animales que recibieron el tratamiento con 17-beta-estradiol (0.5 + 1.0 ug) se los inyectó además con 2 mg de progesterona y se estudiaron las PGs liberadas al medio de incubación. La progesterona no afectó la acción estrogénica sobre la síntesis de PG tipo E. Sin embargo la administración de progesterona luego de un tratamiento con estrógenos, mostró un aumento significativo en la síntesis y liberación de PG tipo F que sólo se había observado con una dosis farmacológica (50 ug) de 17-beta-estradiol.

Son varios los autores que proponen la necesidad de un pretratamiento con progesterona para la acción estrogénica (43, 193) y suponen que como las suprarrenales de los animales OV producen progesterona en cantidades importantes (228, 245) el estrogéno estaría actuando sobre animales con un cierto tenor de progesterona. Además cuando se pretrata a las ratas con esta hormona los efectos del 17-beta-estradiol se ven

potenciados (43). Otros investigadores observan además un bloqueo de la acción del estradiol cuando también se suministra progesterona (146).

La mayoría de estos autores sostienen que la progesterona carece de acción "per se" sobre la síntesis de PGs (43, 193), pero como se observó que con la administración de ambas hormonas existe una acción sobre la PG tipo F que no se había puesto de manifiesto con el primer tratamiento estrogénico, se estudió el efecto de la progesterona sin administrar estrógenos.

Una sola dosis de 2 mg de progesterona produjo un aumento significativo en la síntesis y liberación de PG tipo F sin afectar la de PG tipo E. Estos resultados sugieren que la progesterona ejercería su efecto sobre la síntesis de PGs uterinas aumentando la producción de PG tipo F. Pareció entonces de interés estudiar si este efecto ocurría cuando se utilizaban dosis menores del citado esteroide. Se realizó una curva dosis-respuesta para progesterona, observándose que con 0.5 mg de la misma se aumentaban la síntesis y liberación de PG tipo F. Esto significaría que el efecto de la progesterona sobre las PGs sintetizadas por el útero de rata OV no es farmacológico, porque la dosis de 0.5 mg está generalmente aceptada como propia dentro de los rangos fisiológicos de esta hormona (130, 247). En todo el rango de concentraciones de progesterona utilizado en el estudio de dosis-respuesta no fue afectada la síntesis y liberación de PG tipo E.

También se observó que el período de latencia necesario para que se evidenciara la acción de la progesterona sobre la síntesis de PGs es relativamente corto, puesto que bastó una hora luego de la inyección pa

ra que ella produjera su efecto. Sin embargo 15 minutos no fueron suficientes para que se alterara la producción de PGs por el tejido uterino.

Los trabajos de Shaik y colaboradores (247) muestran que las suprarrenales de las ratas producen grandes cantidades de estrógenos con valores similares a los obtenidos en el plasma de la vena ovárica. Además los animales OV desarrollan frecuentemente tumores adrenocorticales funcionales con actividad estrogénica (234). Por todo esto no se puede decir que se está trabajando con animales libres de la influencia estrogénica. Un modelo experimental útil para deslindar los efectos de los estrógenos es el de la rata OV durante 20 días a las cuales se les extrae además las suprarrenales cinco días antes del sacrificio. (OV/SR).

La síntesis y liberación de PGs por los úteros de los animales OV/SR es significativamente menor que la de los animales meramente OV; pero la relación entre PG tipo E a PG tipo F no está alterada. La disminución de los valores basales de PGs por la suprarrenalectomía no está totalmente clara pero probablemente pueda adjudicarse a la falta de esteroides y catecolaminas de origen adrenal.

Cuando los animales OV/SR son tratados con progesterona se produce un aumento de más de ocho veces en la cantidad de PG tipo F sintetizada y liberada al medio de incubación sin alterarse la de PG tipo E; o sea se repite el efecto observado en animales OV. Esto sugiere que la progesterona per se, sin ninguna influencia estrogénica, es capaz de alterar la síntesis de PGs uterinas.

Sin embargo, pareció de interés adicional realizar exploraciones en otro modelo experimental donde el útero se encuentre bajo la mínima

influencia hormonal como es el caso de los animales prepúberes de 25 días de vida.

Al igual que en los modelos anteriores (OV y OV/SR) la producción de PG tipo E por el útero prepúber fue significativamente mayor que la de PG tipo F. Cuando estos animales son tratados con progesterona observamos un aumento significativo en la síntesis de PG tipo F sin registrarse variaciones en la de PG tipo E. Por otro lado, la administración de 17-beta-estradiol a las ratas prepúberes de 25 días mostró el efecto ya observado en animales OV; esto es una disminución en la síntesis y liberación de PG tipo E sin cambios en la de PG tipo F. En síntesis, también en este modelo se repiten los efectos de los esteroides estudiados.

Vista ya la acción de los esteroides sobre la síntesis de PGs uterinas, pareció razonable e interesante estudiar en qué lugar de la cascada del ácido araquidónico ejercen su efecto.

Generalmente se considera que los niveles de PGs en los tejidos están regulados por la disponibilidad de los ácidos grasos precursores de las mismas. De acuerdo con este concepto las enzimas encargadas de la síntesis de PGs se consideran activadas al máximo y su generación se inicia inmediatamente después de la liberación de ácidos grasos de los fosfolípidos o ésteres de la membrana. La evidencia que ello es cierto en numerosos sistemas la da el hecho que en muchos tejidos la adición de ácido araquidónico in vitro causa un aumento en los niveles de PGs (145) y que en algunos casos el agregado de ácido araquidónico dispara respuestas normalmente inducidas por PGs (248)

De todas formas en tejidos como el útero, que parece programado para producir PGs específicas cuando ello se requiere, deben existir, necesariamente, alteraciones en las enzimas implicadas en la síntesis de PGs. Aunque no conocemos razones para cuestionar que la liberación de los precursores es crítica para la síntesis de PGs, es difícil explicar las alteraciones en la relación PGF a PGE solamente por la disponibilidad de sustrato. Por otra parte si uno acepta la premisa que la PGE y la PGF tienen funciones distintas en el tracto reproductivo, debe haber otros mecanismos por los cuales esté regulada la síntesis de PGs específicas.

Para tener una idea general del perfil de las PGs sintetizadas por el útero de rata OV se exploró la radioconversión del ácido araquidónico- $^{14}\text{C}$  por este tejido. Cuantitativamente hablando el principal metabolito sintetizado por el útero de rata OV a partir del ácido araquidónico- $^{14}\text{C}$  fue la  $\text{PGI}_2$ , valorada en base a la aparición de 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ . La producción de una sustancia tipo  $\text{PGI}_2$  fue hallada en el miometrio y en la decidua incubados a temperatura ambiente, obtenidos de ratas pseudopreñadas (290) así como también en el útero humano preñado (205). La síntesis de  $\text{PGI}_2$  ha sido igualmente demostrada por medición de su metabolito (205, 268) y por bioensayo de acción antiagregante (269, 85) en úteros de ratas OV y en diversos periodos del ciclo estral natural.

El porcentaje de conversión a  $\text{PGE}_2$  fue significativamente mayor que a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , coincidiendo ello con los resultados obtenidos en la síntesis y liberación de PGs por el útero aislado.

El tratamiento de los animales OV con progesterona mostró que el principal metabolito sintetizado era la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . La conversión hacia esta PG fue significativamente mayor que la del útero proveniente de ratas OV, confirmándose lo observado en la síntesis y liberación de PGs por dicho tejido. También coincide con ello la no variación en el porcentaje de  $\text{PGE}_2$ . La administración de progesterona dio como resultado una disminución en el porcentaje de 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  formada. Trabajos realizados con úteros aislados de rata OV, incubados en buffer Krebs Ringer Bi carbonato libre de calcio, donde se midió la producción de  $\text{PGI}_2$  por su acción antiagregante, también mostraron un efecto inhibitorio de la progesterona sobre la síntesis de  $\text{PGI}_2$  (92).

Cuando se administró 17-beta-estradiol (0.5 + 1.0 ug) a las ratas OV, el porcentaje de conversión a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no se vio afectado mientras que disminuyeron los correspondientes a  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGI}_2$ . Los datos obtenidos para  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y para  $\text{PGE}_2$  son coincidentes con los de los valores de su síntesis y liberación. La disminución de la síntesis de  $\text{PGI}_2$  por estrógenos en útero de ratas fue descrita previamente (92, 268). Además una acción inhibitoria de los estrógenos sobre la síntesis de  $\text{PGI}_2$  también se detectó en otros tejidos como la aorta abdominal (217) y el pulmón (171).

En algunos tejidos las hormonas ováricas actúan sobre la ciclooxigenasa, primera enzima del camino biosintético del ácido araquidónico. Por ejemplo la  $\text{PGI}_2$  liberada por células en cultivo de músculo liso de aorta de rata (47) está aumentada por el estradiol debido a la síntesis de novo de ciclooxigenasa.

En nuestro sistema, el 17-beta-estradiol, a dosis baja, disminuye tanto la síntesis de  $\text{PGE}_2$  como la de  $\text{PGI}_2$  sin afectar la de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Ello indicaría que el estradiol podría ejercer su efecto a nivel de ciclooxigenasa inhibiendo los dos principales metabolitos del ácido araquidónico en útero de rata OV. Aunque, como los niveles de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  no se ven afectados, sería más probable una acción inhibitoria sobre la endoperóxido isomerasa y la  $\text{PGI}_2$  sintetasa. Por otro lado cuando se trata a los animales OV con una dosis mayor de este esteroide documentamos un aumento en la cantidad de PG tipo F concomitantemente con una disminución, aún más importante, de la PG tipo E. Este resultado descartaría una acción sobre la enzima ciclooxigenasa ya que ésta es común para la biosíntesis de ambas PGs. Ahora bien, el estradiol, en alta concentración, podría activar la  $\text{PGF}$  sintetasa e inhibir la endoperóxido isomerasa y la  $\text{PGI}_2$  sintetasa.

Wlodaware y colaboradores (296) muestran en homogenatos de úteros de cobayo que el 17-beta-estradiol favorece la conversión de  $\text{PGH}_2$  a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y que, en esas condiciones, no existe reducción de  $\text{PGE}_2$ . O sea, ellos proponen como sitio de acción del estrógeno a una posible endoperóxido reductasa; enzima cuya existencia también sugieren en el útero de vaca (296).

Existe, sin embargo, la posibilidad que el 17-beta-estradiol actuara en la conversión de  $\text{PGE}_2$  a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , proceso catalizado por la 9-ceto-reductasa. Aunque esta enzima no ha sido descrita en útero de rata, fue de interés estudiar su posible existencia.

La incubación de  $^3\text{H-PGE}_2$  en presencia de NADPH con homogenatos

de útero, mostró la aparición, dependiente del tiempo, de productos tritiados como  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y 13, 14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  cuando los animales se trataron con 50 ug de 17-beta-estradiol. Ni la progesterona ni una dosis baja (1.0 ug) de estradiol, fueron capaces de poner en evidencia esta conversión. Ha sido demostrado que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  es metabolizada por el tejido uterino in vitro principalmente hacia 13, 14-dihidro-15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  (5); y por esta razón parece válido suponer que la 13, 14-dihidro 15-ceto- $\text{PGF}_{2\alpha}$  hallada al incubar  $^3\text{H-PGE}_2$  con homogenatos de útero, proviene de  $^3\text{H-PGF}_{2\alpha}$  formada por la acción previa de la 9-ceto-reductasa.

La existencia de esta enzima en el útero puede explicar el amento de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  con disminución de la  $\text{PGE}_2$  en animales OV tratados con altas concentraciones de estradiol; ya que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aumentaría a expensas de la conversión de  $\text{PGE}_2$ .

Los datos de la producción de PGs uterinas mostraron que la  $\text{PGE}_2$  liberada por ratas OV era mayor que la de animales en estro natural. La incubación de  $^3\text{H-PGE}_2$  con homogenatos de úteros de ratas en estro mostró una conversión de casi el 30% a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y de un 7% a su metabolito. En otras palabras en los animales que cumplen con el ciclo estral natural, en condiciones de máxima influencia estrogénica, se pone de manifiesto un mecanismo altamente especializado de conversión de  $\text{PGE}_2$  en  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Los resultados de radioconversión al igual que los de producción de PGs por el útero aislado provenientes de animales inyectados con progesterona, muestran un aumento en los niveles de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sin existir cambios en la de  $\text{PGE}_2$ . Se observó además, que el porcentaje de conversión

a 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>, como reflejo de la producción de PGI<sub>2</sub>, está disminuido por la progesterona. El marcado incremento de la PGF<sub>2α</sub> luego del tratamiento con progesterona, sin que se altere la PGE<sub>2</sub> y acompañado por una disminución de la PGI<sub>2</sub> no puede adjudicarse a una mayor actividad de la ciclooxigenasa porque el efecto sobre los otros productos de la enzima son opuestos. Es así que, la cantidad de PGF<sub>2α</sub> sintetizada por un tejido puede incrementarse por dos pasos biosintéticos; ya sea por una activación de la 9-ceto-reductasa o por un aumento del mecanismo que convierte al PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2α</sub>, posiblemente la endoperóxido reductasa. El tratamiento de los animales OV con progesterona no dió como resultado la aparición de PGF<sub>2α</sub> tritiada ni de su metabolitos cuando se incubaron los homogenatos de útero con <sup>3</sup>H-PGE<sub>2</sub>. Ya que no existió dicha conversión, ni tampoco los niveles de PGE<sub>2</sub> se vieron disminuidos por esta hormona, podemos descartar un efecto sobre la 9-ceto-reductasa.

Todo lo dicho lleva a suponer que la progesterona actuaría sobre la conversión de PGH<sub>2</sub> a PGF<sub>2α</sub>. Este mecanismo hasta ahora no había sido descrito en útero de rata, pero sí en cambio en el cobayo y la vaca (296). En estos sistemas la conversión de <sup>3</sup>H-PGH<sub>2</sub> a <sup>3</sup>H-PGF<sub>2α</sub> es inhibible por p-hidroxí-mercuribenzoato, cosa que ha llevado a posible existencia de un compuesto catalizador con grupos sulfhidrilos.

Estos resultados tienden a sugerir la existencia de un mecanismo altamente especializado que cataliza la formación de PGF<sub>2α</sub> a partir de PGH<sub>2</sub> en el útero de rata y además dicho proceso estaría activado por la progesterona.

El efecto de la progesterona sobre la síntesis de PGF<sub>2α</sub> ha sido

observado en el útero de oveja, Harrison y colaboradores (119) mostraron que la composición química del fluido uterino durante la preñez, condición de dominancia progesterónica, tenía una gran concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Posteriormente, cuando se inyectó progesterona a ovejas no preñadas y se estudió el fluido uterino pudo comprobarse que la concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  estaba muy incrementada (8) y no así la de  $\text{PGE}_2$  ni la de 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ .

Por otro lado la disminución del porcentaje de 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  causada por la progesterona podría deberse a una acción de la hormona sobre la  $\text{PGI}_2$  sintetasa, pero debemos recordar que los úteros de animales OV usados en el estudio de radioconversión se encuentran bajo influencia de los estrógenos de la suprarrenal (245, 234). En otros términos los resultados podrían deberse a una acción de la progesterona sobre un tejido previamente influido por los estrógenos. El tratamiento de animales OV con ambas hormonas produjo una disminución de la  $\text{PGI}_2$  medida por su acción antiagregante (92). Estos datos de radioconversión no pueden descartar un efecto conjunto de ambas hormonas sobre la  $\text{PGI}_2$  sintetasa, pero sí muestran que el efecto estrogénico inhibitorio de esta enzima no es bloqueado por progesterona y que probablemente la hormona también inhiba la actividad enzimática.

La regulación de los niveles de PGs liberadas por un determinado tejido está ciertamente controlado por la síntesis de estos compuestos pero también por el metabolismo de los mismos. Cuando evaluamos la cantidad de PGs liberadas al medio de incubación por el útero aislado, esto es el resultado de dos procesos con consecuencias totalmente opuestas, la síntesis que aumenta dicha cantidad y el metabolismo que la dis-

minuye.

La 15-hidroxi-PG deshidrogenasa, primera enzima metabolizante de las PGs, es una proteína de vida corta y su velocidad de recambio está regulada por distintos compuestos (27). En placenta humana se ha descrito una inhibición de esta enzima por estrógenos y progesterona (269, 244) mientras que en el útero y el oviducto de conejo la progesterona aumenta el metabolismo de la  $PGE_2$  y la  $PGF_{2\alpha}$  sin que ello sea afectado por el estradiol (32).

En razón de todo lo que antecede se decidió estudiar la actividad de la 15-hidroxi-PG deshidrogenasa en el útero de rata OV y su posible modificación por los esteroides ováricos.

El útero de rata OV mostró tener la citada actividad enzimática sin que se presentaran diferencias para ambos sustratos. La progesterona no fue capaz de modificar dicha actividad. Cuando los animales fueron tratados con (0.5 + 1.0) ug de 17-beta-estradiol aumentó la actividad de la enzima para  $PGE_2$  sin alterarse para  $PGF_{2\alpha}$ , hecho que sucedió con una concentración mayor (50 ug) del esteroide.

El hecho que una dosis baja de estradiol muestre actividades distintas de la 15-hidroxi-PG deshidrogenasa dependiendo ello de si el sustrato es  $PGE_2$  o  $PGF_{2\alpha}$  sugiere la posibilidad de que existan dos enzimas responsables del metabolismo de las PGs.

Un hecho así tiene algunos precedentes ya que Lee y colaboradores (159) mostraron varias formas de la enzima en numerosos tejidos, y en útero de rata pseudopreñada la progesterona y los estrógenos tienen

efectos distintos sobre esta enzima según cual sea el sustrato (6).

Una dosis alta de estradiol aumentó la actividad de la 15-hidroxiprogesterona deshidrogenasa para ambas PGs. Esta hormona ya había mostrado un efecto estimulante sobre el metabolismo de la  $PGF_{2\alpha}$  ya que en la medición de la actividad de la 9-ceto-reductasa, el tratamiento de los animales OV con el esteroide mostró una aparición, tiempo dependiente, del metabolito 13, 14-dihidro-15-ceto- $PGF_{2\alpha}$ .

El tratamiento de los animales OV con 17-beta-estradiol en cualquiera de las dosis usadas, dió como resultado una disminución en la cantidad de PG tipo E liberada al medio de incubación. Como el metabolismo de esta PG está aumentado por el estradiol, ello sería otra de las posibles causas de la menor concentración de PG tipo E hallada en los animales estrogenizados.

En cambio, el aumento de PG tipo F con el tratamiento con progesterona no se puede asociar a un reducido metabolismo de la PG porque esta hormona carece de efecto sobre el mismo.

#### POSIBLE IMPLICANCIA FISIOLOGICA DE ESTE ESTUDIO

Se ha aceptado que existe una relación íntima entre el útero y el tiempo de vida del cuerpo lúteo en el ovario, y que el útero produce una sustancia luteolítica que es transportada al ovario.

En la mayoría de las especies (214, 107, 45, 176, 236), incluyendo la humana (212), se ha identificado a la  $PGF_{2\alpha}$  como la luteolisina u

terina; ello significa que la  $PGF_{2\alpha}$  sería la hormona capaz de causar la regresión histológica del cuerpo lúteo y la disminución de los niveles plasmáticos de progesterona. Se ha demostrado también que esta  $PGF_{2\alpha}$  uterina llega al ovario por un pasaje desde la vena útero-ovárica hasta la arteria ovárica (175).

Si el efecto luteolítico del útero se debe a la liberación de  $PGF_{2\alpha}$ , debería existir un mecanismo que controle dicha producción por el útero, de manera que se pueda obtener una liberación cíclica de dicha PG.

Este posible mecanismo debe implicar algún estímulo que determine el aumento de  $PGF_{2\alpha}$  antes de la luteólisis.

La síntesis de PGs está afectada por numerosos factores y los efectos de los mismos varían según el sistema estudiado.

El útero se encuentra bajo la acción de las hormonas ováricas y su efecto es determinante para la mayoría de las funciones de este órgano.

Ahora bien, en el presente trabajo observamos que la progesterona, en una dosis fisiológica, aumentaba la síntesis y liberación de la  $PGF_{2\alpha}$  por el útero de rata y que ello ocurría sin necesidad del aporte de los estrógenos. Tal efecto era rápido y el metabolismo de la PG no se veía afectado. Es decir que la progesterona produce un aumento del aporte por el útero de la  $PGF_{2\alpha}$ , en forma rápida.

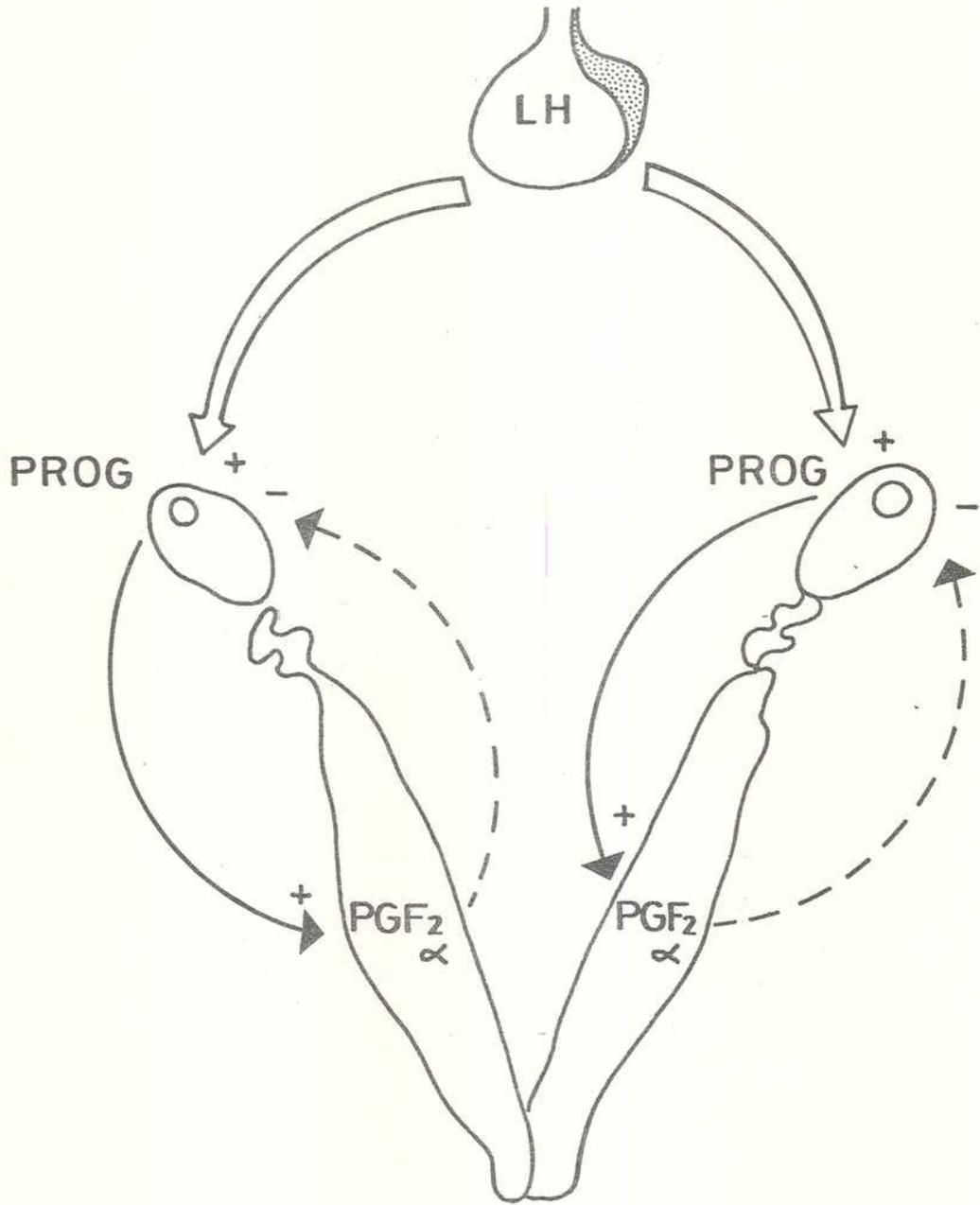
Antes de la luteólisis, el útero se halla bajo el efecto de la progesterona y es allí cuando se produce un importante aumento en la

cantidad de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  liberada por el mismo.

Podríamos entonces, proponer un mecanismo de retroalimentación negativo entre la progesterona y la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . La progesterona ovárica aumentaría la síntesis y liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uterina y ésta, inhibiría, en el ovario, la secreción de progesterona. Dicho mecanismo, que ocurriría en cada ciclo estral, permitiría explicar la causa del aumento de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  previo a la luteólisis; encontrándose así un papel fisiológico para el efecto de la progesterona sobre la síntesis uterina de PGs.

De todas formas, no se puede descartar con los presentes resultados, un efecto de los estrógenos sobre la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Se observó que dosis altas de esta hormona aumentaban la síntesis de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  y el útero, en condiciones previa a la luteólisis, se encuentra bajo una gran influencia estrogénica, (Fig. 30).

Fig. nro. 30: Posible mecanismo de retroalimentación negativa entre la progesterona y la  $PGF_2$



V - CONCLUSIONES

La síntesis y liberación de PG tipo E está disminuida por efecto del 17-beta-estradiol porque:

- a) Dosis bajas y altas de esta hormona disminuyen la síntesis y liberación de PG tipo E en úteros de ratas OV y prepúberes.
- b) La radioconversión del ácido araquidónico a  $\text{PGE}_2$  está disminuida por este esteroide.
- c) La conversión de  $^3\text{H-PGE}_2$  a  $^3\text{H-PGF}_{2\alpha}$  por homogenatos de úteros de ratas OV está favorecida por el estradiol
- d) El estradiol estimula el metabolismo de la  $\text{PGE}_2$ .

Tal disminución de la cantidad de PG tipo E liberada al medio por el 17-beta-estradiol podría deberse a:

- a) Metabolismo aumentado de esta PG: se observó un aumento de la actividad de la 15-hidroxi-PG deshidrogenasa por 17-beta-estradiol.
- b) Aumento en la actividad de la 9-ceto-reductasa: el tratamiento con estradiol puso en evidencia la actividad de esta enzima, también observada en ratas en estro natural.
- c) Disminución de la actividad de la endoperóxido isomerasa: la radioconversión del ácido araquidónico a  $\text{PGE}_2$  está disminuida por el estradiol sin que se afecte la proporción de este ácido graso metabolizado a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

El tratamiento de los animales OV y prepúberes con 17-beta-estradiol (0.5 + 1.0 ug) disminuye la cantidad de PG tipo E sin afectar

la de PG tipo F.

El mecanismo por el cual el estradiol inhibe la cantidad de PG tipo E liberada al medio no sería el clásico de la interacción hormona-receptor, sino que probablemente implicaría una previa metabolización a catecolestrógenos. Esto se basaría en:

- a) El 2-hidroxi-estradiol tienen el mismo efecto que el estradiol sobre la síntesis de PG tipo E.
- b) En condiciones de baja concentración de receptores para estrógenos, como en la rata prepúber, también se observó la acción ya mencionada del 17-beta-estradiol.
- c) Inhibidores de síntesis proteica no bloquean el efecto del estradiol sobre la síntesis de PGs (44).
- d) Bloqueantes de receptores de estrógenos no afectan la acción del estradiol sobre la síntesis de PGs (44).

El estradiol en dosis farmacológica (50 ug) aumenta la síntesis y liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Los hechos que avalan esto son:

- a) La síntesis y liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por úteros de ratas OV tratadas con 50 ug del esteroide está claramente aumentada.
- b) La conversión de  $^3\text{H-PGE}_2$  a  $^3\text{H-PGF}_{2\alpha}$  está favorecida por el estradiol (0.5 + 50 ug).

El efecto del estradiol sobre la síntesis y liberación de  $\text{PGF}_{2\alpha}$

se debería a una acción de esta hormona sobre la 9-ceto-reductasa; debido a que:

- a) El aumento en la síntesis y liberación de PG tipo F por úteros de ratas OV tratados con 50 ug de estradiol se acompaña de una disminución de la  $PGE_2$ .
- b) La conversión de la  $^3H$ - $PGE_2$  a  $^3H$ - $PGF_{2\alpha}$  está favorecida por un tratamiento con 50 ug del esteroide.

La progesterona aumenta la síntesis y liberación de la  $PGF_{2\alpha}$  sin necesidad del aporte estrogénico. Los hechos que avalan esta aseveración son:

- a) La progesterona aumenta la síntesis y liberación de PG tipo F en úteros de ratas OV, OV/SR y prepúberes.
- b) La progesterona aumenta la radioconversión del ácido araquidónico a  $PGF_{2\alpha}$ .
- c) La progesterona en dosis fisiológica (0.5 mg) aumenta la síntesis y liberación de PG tipo F por úteros de ratas OV.

Este efecto de la progesterona podría deberse a una acción de la hormona sobre el mecanismo de conversión de  $PGH_2$  a  $PGF_{2\alpha}$  porque:

- a) La hormona no afecta la actividad de la 9-ceto-reductasa.
- b) El aumento de la síntesis y liberación de PG tipo F por este esteroide no fue nunca acompañada por cambios en la PG tipo E.

- c) La progesterona favorece la radioconversión del ácido araquidónico a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  sin afectar la  $\text{PGE}_2$ .
- d) Esta hormona carece de acciones sobre el metabolismo de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Tanto el 17-beta-estradiol como la progesterona disminuyen la síntesis de  $\text{PGI}_2$ , hecho evidenciado por:

- a) La radioconversión del ácido araquidónico a 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  está disminuida por ambas hormonas.
- b) Tanto el 17-beta-estradiol como la progesterona disminuyen la síntesis y liberación de esta PG cuando se la determinó por su acción antiagregante (92).

Probablemente ello dependería de una acción sobre la  $\text{PGI}_2$  sintetasa: la influencia de estas hormonas sobre las otras PGs son opuestas por lo que se descartaría un efecto sobre la ciclooxigenasa, enzima común en el camino biosintético de las PGs.

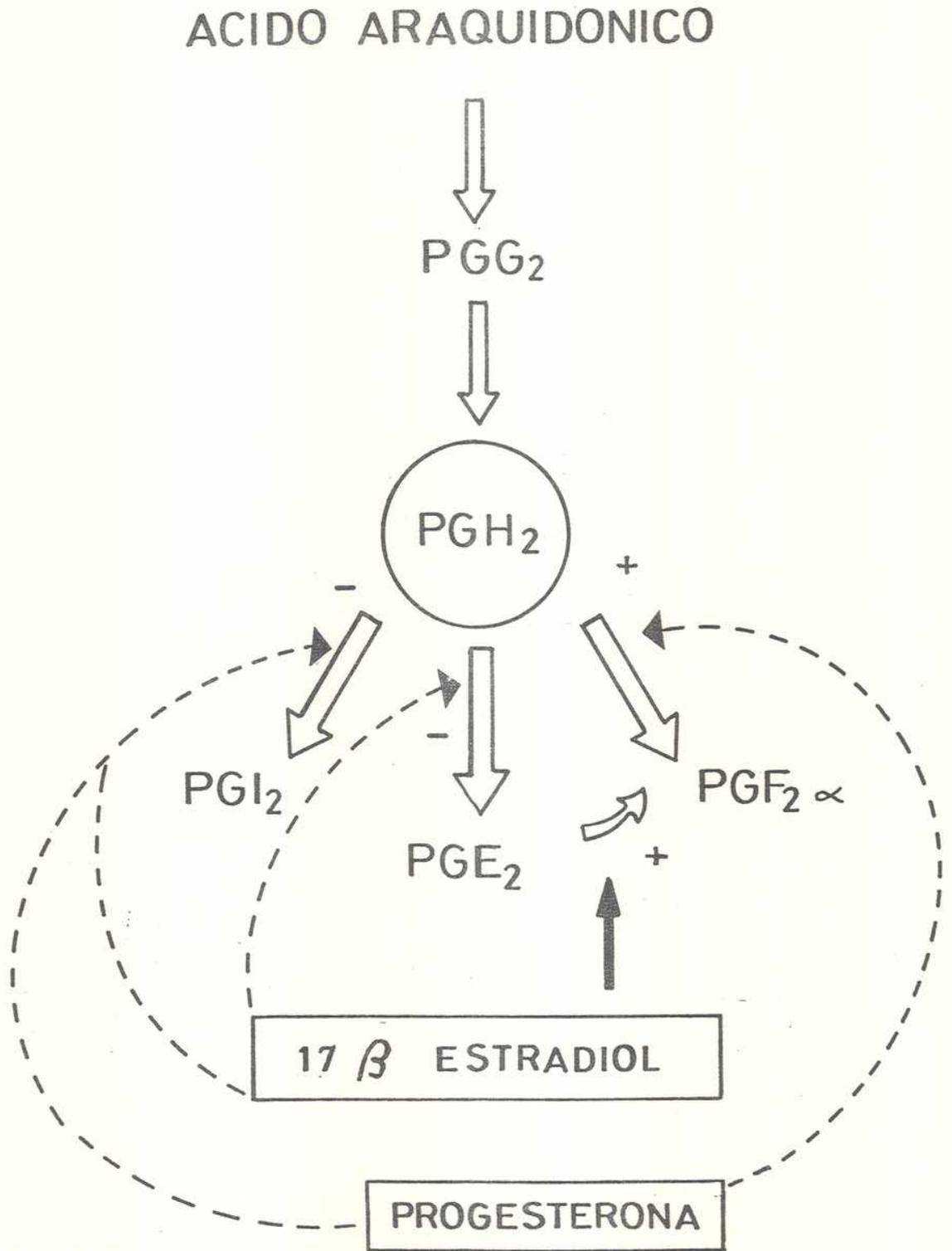


ANA MARIA FRANCHI



MARTHA F. GIMENO

Fig. nro. 31: Acción de hormonas sexuales sobre la síntesis de prostaglandinas





- 1 - Adham, N. y Schenk, E. A.  
Am. J. Obstet. Gynecol. 104: 508 (1969)
- 2 - Ahern, D. G. y Downing, D. T.  
Biochim. Biophys. Acta 210: 456 (1970)
- 3 - Aiken, J. W.  
Nature 240: 21 (1972)
- 4 - Aiken, J. W.  
En: Prostaglandin Synthetase Inhibitors, editado por H. Robinson  
y J. R. Vane. Raven Press, N. Y. pp 289 (1974)
- 5 - Aizawa, Y.; Inazu, N. y Kogo, H.  
Prostaglandins 20: 95 (1980)
- 6 - Alam, N. A.; Russell, P. T.; Tabor M. W. y Moulton, B. C.  
Endocrinology 98: 859 (1976)
- 7 - Ali, M.; Zamecnik, J.; Cerskus, A. L.; Stoesst, A. J.; Barnett,  
W. H. y Mc Donald, J. W. D.  
Prostaglandins 14: 819 (1977)
- 8 - Alwachi, S. N.; Bland, K. P. y Poyser, N. L.  
Prostaglandins and Medicine 6: 571 (1961)
- 9 - Amsworth, L.; Baker, R. D. y Armstrong, D. T.  
Prostaglandins 9: 915 (1975)
- 10 - Anggård, E.; Larsson, C. y Samuelsson, B.  
Acta Physiol. Scand. 81: 396 (1970)

- 11 - Anggård, E. y Samuelsson, B.  
Methods Enzimol. 14: 215 (1969)
- 12 - Atswood, E. B.  
Endocrinology 23: 25 (1958)
- 13 - Baker, F. D. y Kragt, C. L.  
Endocrinology 85: 522 (1969)
- 14 - Ball, P.; Haupt, M. y Knupper, R.  
Acta Endocrin. 87: 1 (1978)
- 15 - Barrett, S.; Blackey, M. A. D.; Brown, J. M.; Lumming, L. A.;  
Goding, J. R.; Mole, B. J. y Obst, J. M.  
J. Reprod. Fertility 24: 136 (1971)
- 16 - Bauminger, S.; Lieberman, M. E. y Lindner, H. R.  
Prostaglandins 9: 753 (1975)
- 17 - Bauminger, S. y Lindner, H. R.  
Prostaglandins 9: 737 (1975)
- 18 - Behrman, H. R.; Grinwich, D. L.; Hichens, M. y Macdonald, G. J.  
Endocrinology 103: 349 (1978)
- 19 - Behrman, H. R.; Ng, T. S. y Orczyk, G. P.  
En; Gonadotropins and Gonadal Functions, editada por N. R.  
Mondgal. Academic Press, N. Y. pp 332 (1974)
- 20 - Behrman, H. R.; Yoshinaga, K. y Greep, R. O.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 180: 426 (1971)

- 21 - Bergström, S.; Carlson, L. A. y Weeks, J. R.  
Pharmac. Rev. 20: 1 (1968)
- 22 - Bergström, S.; Dressler, F.; Ryhage, R.; Samuelsson, B. y  
Sjövall, J.  
Ark. Kemi. 19: 563 (1962)
- 23 - Bergström, S.; Ryhage, R.; Samuelsson, B. y Sjövall, J.  
J. Biol. Chem. 238: 3555 (1963)
- 24 - Bergström, S. y Sjövall, J.  
Acta Chem. Scand. 11: 1086 (1957)
- 25 - Blackwell, G. J.; Carnuccio, R.; Di Rosa, M.; Flower, R. J.;  
Parente, L. y Persico, P.  
Nature 287: 147 (1980)
- 26 - Blackwell, G. J.; Flower, R. J.; Russell-Smith, N.; Salmon, J.  
A.; Thorogood, P. B. y Vane, J. R.  
Br. J. Pharmacol. 64: 436 P (1978)
- 27 - Blackwell, G. J.; Flower, R. J. y Vane, J. R.  
Br. J. Pharmacol. 55: 233 (1975)
- 28 - Blatchey, F. R. y Donovan, B. T.  
Nature 221: 1065 (1969)
- 29 - Blatchey, F. R.; Donovan, B. T.; Horton, E. W. y Poyser, N. L.  
J. Physiol. (London) 228: 69 (1972)
- 30 - Blatchey, F. R.; Donovan, B. T.; Poyser, N. L.; Horton, E. W.;

- Thompson, C. J. y Lor, M.  
Nature (London) 230: 243 (1971)
- 31 - Bo, W. J.; Maraspin, L. E. y Smith, M. S.  
J. Endocrinol. 38: 33 (1967)
- 32 - Bohdke, R. R. y Harper, M. J. K.  
J. Reprod. Fert. 57: 101 (1979)
- 33 - Bowne, G.  
En: An Introduction to Functional Histology, editado por Little,  
Brown and Company, Boston (1960)
- 34 - Bozler, E.  
Biol. Symposia 3: 95 (1941)
- 35 - Brenner, R. R.  
Acta Physiol. Latinoam. 26: 453 (1976)
- 36 - Brenner, R. R.; Resko, J. A. y West, N. B.  
Endocrinology 95: 1094 (1975)
- 37 - Bromberg, S.; Goodwin, J. S.; Peake, G. T. y Messner, R. P.  
Clin. Res. 27: 36 A (1979)
- 38 - Burnstock, G. y Prosser, C. L.  
Am. J. Physiol. 198: 921 (1960)
- 39 - Caldwell, B. V.; Tillson, S.A.; Brock, W. A. y Speroff, L.  
Prostaglandins 1: 217 (1972)
- 40 - Cardinali, D. P.; Ritta, M. N.; Speziale, N.S. y Gimeno, M. F.

- Prostaglandins 18: 577 (1979)
- 41 - Carnuccio, R.; Di Rosa, M. y Persico, P.  
Br. J. Pharmacol. 68: 14 (1980)
- 42 - Carroll, W. R.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49: 50 (1942)
- 43 - Castracane, V. D. y Jordan, C.  
Biol. Reprod. 13: 587 (1975)
- 44 - Castracane, V. D. y Jordan, C.  
Prostaglandins 12: 243 (1976)
- 45 - Chaichereon, D. P.; Meckley, P. E. y Ginther, O. J.  
Am. J. Vet. Res. 35: 685 (1974)
- 46 - Chang, W. C.; Marota, S. I. y Tsurufuji, S.  
Biochem. Pharmacol. 27: 109 (1978)
- 47 - Chang, W. C.; Nakao, J.; Marota, S. y Tai, H.  
Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine 10: 33 (1983)
- 48 - Christ-Hazelhof, E. y Nugteren, D. H.  
Prostaglandins 22: 739 (1981)
- 49 - Christ-Hazelhof, E.; Nugteren, D. H. y van Dorp, D. A.  
Biochim. Biophys. Acta 450: 450 (1976)
- 50 - Chobsieng, P.; Naor, Z.; Kock, Y.; Zor, U. y Lindner, H. R.  
Neuroendocrinology 17: 12 (1975)

- 51 - Clark, J. H. y Gorski, J.  
Science 169: 76 (1970)
- 52 - Clark, M. R.; Marsh, J. M. y LeMaire, W. J.  
Prostaglandins 12: 209 (1976)
- 53 - Clark, M. R.; Marsh, J. M. y LeMaire, W. J.  
Endocrinology 102: 39 (1978)
- 54 - Clark, J. H.; Hsueh, A. J. W. y Peck Jr., E. J.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 286: 161 (1977)
- 55 - Coceani, F.; Dreifuss, J. J.; Puglisi, L. y Wolfe, L. S.  
En: Prostaglandins, Peptides and Amines, editado por P. Mantegazza  
E. W. Horton. London Academic. pp 73
- 56 - Coots, R. H.  
J. Lipid. Res. 6: 494 (1965)
- 57 - Coupland, R. E.  
J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw. 69: 1041 (1962)
- 58 - Danon, A. y Assoline, G.  
Nature 273: 552 (1978)
- 59 - Davis, A.  
Anat. Record 134: 725 (1959)
- 60 - Dawson, W.; Boot, J. R.; Cockerill, A. F.; Mallen, D. N. B. y  
Osborne, D. J.  
Nature 262: 699 (1976)

- 61 - Dayer, J. M.; Kiave, S. R.; Russel, R. G. y Robinson, D. R.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 945 (1976)
- 62 - de Deckere, E. A. M.; Nugteren, D. H. y Tenhoor, F.  
Nature 268: 160 (1977)
- 63 - Dembińska-Kieć, A.; Grodzińska, L. y Piotrowicz, J.  
Pol. J. Pharm. Pharmacol. 16: 79 (1974)
- 64 - De Paolo, L. V.; Ojeda, S. R.; Negro-Vilar, A. y Mc Cann, S. M.  
Endocrinology 110: 1999 (1982)
- 65 - Diaz-Infante, A. H.; Virutamasen, P.; Connaughton, J. F.; Wright,  
K. H. y Waloch, E. E.  
Obstetrics and Gynecology 44: 830 (1974)
- 66 - Diczfaluzi, U.; Falardeau, P. y Hammarström, S.  
Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 84: 271 (1977)
- 67 - Di Rosa, M. y Persico, F.  
Br. J. Pharmac. 66: 161 (1979)
- 68 - Döhler, K. D. y Wuttke, W.  
Endocrinology 97: 898 (1975)
- 69 - Dorflinger, L. J. y Behrman, H. R.  
Biol. Reprod. 18 (Suppl. 1): 62 A (1978)
- 70 - Dousett, M.; Eatsman, A. R.; Easty, D. M.; Powler, T. J. y  
Neville, A. M.  
Nature 263: 72 (1976)

- 71 - Dusting, G. J.; Moncada, S. y Vane, J. R.  
Prostaglandins 13: 3 (1977)
- 72 - Earthy, M.; Bishop, C. y Flack, J. D.  
J. Endocrinol. 64: 11 P (1975)
- 73 - Eccles, J. C. y Magladery, J. W.  
J. Physiol. (London) 90: 31 (1937)
- 74 - Eccles, J. C. y Magladery, J. W.  
J. Physiol. (London) 90: 68 (1937)
- 75 - Eckenfels, A. y Vane, J. R.  
Br. J. Pharmacol. 45: 451 (1972)
- 76 - Egan, R. W.; Paxton, J. y Kuehl, F. A.  
J. Biol. Chem. 251: 7329 (1976)
- 77 - Espey, L. L.; Coons, P. J.; Marsh, J. M. y LeMaire, W. J.  
Endocrinology 108: 1040 (1981)
- 78 - Faber, L. E.; Sandman, M. L. y Starely, H. E.  
J. Biol. Chem. 247: 5648 (1972)
- 79 - Fenwick, L.; Jones, R. L. y Naylor, B.  
Br. J. Pharmacol. 59: 191 (1977)
- 80 - Ferreira, S. H.; Moncada, S. y Vane, J. R.  
Nature 231: 237 (1971)
- 81 - Fischer, T. V.  
Anat. Record 350: 151 (1965)

- 82 - Flower, R. J. y Blackwell, G. J.  
Biochem. Pharmacol. 25: 285 (1976)
- 83 - Flower, R. J. y Blackwell, G. J.  
Nature 278: 456 (1979)
- 84 - Flower, R. J. y Vane, J. R.  
Nature 240: 410 (1972)
- 85 - Franchi, A. M.; Chaud, M.; Borda, E. S.; Gimeno, M. F.; Lazzari,  
M. A. y Gimeno, A. L.  
Prostaglandins 22: 637 (1981)
- 86 - Friedman, V.; Levasseur, S. y Burke, G.  
Biochim. Biophys. Acta 431: 615 (1976)
- 87 - Fucks, A.  
Acta Endocrinol. (Suppl. 221): 1
- 88 - Gänstrom, E.; Inger, U. y Samuelsson, B.  
J. Biol. Chem. 240: 457
- 89 - Gerrad, J. M.; Townsed, D.; Stodard, S.; Witkop, C. J. y White,  
J. G.  
Am. J. Phatol. 86: 99 (1977)
- 90 - Gilmore, N.; Vane, J. R. y Willie, J. M.  
Nature (London) 218: 1135 (1968)
- 91 - Gimeno, M. F.; Bedness, A. S.; Goldraj, A. y Gimeno, A. L.  
Acta Physiol. Latinoam. 20: 275 (1970)

- 92 - Gimeno, M. F.; Borda, E. S.; Lazzari, M. A. y Gimeno, A. L.  
Prostaglandins 20: 223 (1980)
- 93 - Gimeno, M. F.; Borda, E. S.; Sterin-Borda, L.; Vidal, J. M. y  
Gimeno, A. L.  
Obstetrics and Gynecology 47: 218 (1976)
- 94 - Gimeno, A. L.; Gimeno, M. F.; Goldraij, A. y Sterin-Speziale, N.  
Reproducción 3: 235 (1976)
- 95 - Gimeno, M. F.; Sterin-Speziale, N.; Landa, A. L.; Bonacossa, A. y  
Gimeno, A. L.  
Prostaglandins 17: 673 (1979)
- 96 - Goldblatt, M. W.  
J. Soc. Chem. Ind. (London) 52: 1056 (1933)
- 97 - Goldstein, I. M.; Malmsten, C. L.; Kaplan, H. B.; Kindahl, H.;  
Samuelsson, B. y Weissmann, G.  
Clin. Res. 21 (Abstr.) (1977)
- 98 - Gorman, R. R.; Bundy, G. L.; Peterson, D. C.; Sun, F. F.; Miller,  
D. V. y Fitzpatrick, F. A.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 7004 (1977)
- 99 - Grassé, P. P.  
Traité de Zoologie. Tomo XVI. Fascículo VI (Masson et Cie. Ed.)  
París (1969)
- 100 - Greaves, M. W. y Mc Donald-gibson, W. J.  
Brit. Med. J. 3: 527 (1972)

- 101 - Greene, E. C.  
Gross: Anatomy..En: The rat in laboratory investigation, editado por Griffith, J. Q. y Farris, E, J. Lippincot J. B. Co., USA pp 37 (1942)
- 102 - Grinwich, D. L.; Ham, E. A.; Hichens, M. y Behrman, H. R.  
Endocrinology 98: 146 (1976)
- 103 - Grinwich, D. L.; Hickens, M. y Behrman, H. R.  
Biol. Reprod. 14: 212 (1976)
- 104 - Gryglewski, R. J.; Bunting, S.; Moncada, S.; Flowers, R. L. y Vane, J. R.  
Prostaglandins 12: 685 (1976)
- 105 - Gryglewski, R. J.; Korbut, R. y Ocetkiewicz, A.  
Nature 273: 765 (1978)
- 106 - Gryglewski, R. J.; Panczenki, B.; Korbut, R.; Grodzinska, L. y Ocetkiewicz, A.  
Prostaglandins 10: 343 (1975)
- 107 - Gutknecht, G. D.; Cornette, J. C. y Pharriss, B. B.  
Biol. Reprod. 1: 367 (1969)
- 108 - Ham, A. W.  
Tratado de Histología (Editorial Interamericana) México (1970)
- 109 - Hamberg, M.  
Biochim. Biophys. Acta 431: (1976)

- 110 - Hamberg, M.  
Eur. J. Pharmacol. 6: 135
- 111 - Hamberg, M. y Gotthammar, B.  
Lipids 8: 737 (1973)
- 112 - Hamberg, M. y Samuelsson, B.  
J. Biol. Chem. 246: 1073 (1971)
- 113 - Hamberg, M. y Samuelsson, B.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 899 (1973)
- 114 - Hamberg, M. y Samuelsson, B.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61: 942 (1974)
- 115 - Hamberg, M.; Svensson, J. y Samuelsson, B.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3400 (1974)
- 116 - Hamberg, M.; Svensson, J.; Wakabayash, T. y Samuelsson, B.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 345 (1974)
- 117 - Hammarström, S. y Falardeau, P.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3691 (1977)
- 118 - Harms, J.  
Science 181: 760 (1973)
- 119 - Harrison, F. A.; Heap, R. B. y Poyser, N. L.  
J. Reprod. Fert. 48: 61 (1976)
- 120 - Haslam, R. y Mc Clenaghan, M.D.  
Proc. VII Int. Cong. Thromb. Hem. pp 117 (1979)

- 121 - Hemler, M.; Lands, W. E. N. y Smith, W. L.  
J. Biol. Chem. 251: 5575 (1976)
- 122 - Hensby, C. N.  
Biochem. Biophys. Acta 409: 225 (1975)
- 123 - Heptinstall, S.; Bevan, J.; Cockbill, S. P. y Parry, M. J.  
Thrombosis Research 20: 219 (1980)
- 124 - Hervaczynska-Cedro, K. y Barczak-Staszenska, J.  
Abstract of the IInd Congress of the Hungarian Pharmacological  
Society pp 19, Budapest (1974)
- 125 - Herbaczynska-Cedro, K. y Vane, J. R.  
Circ. Res. 33: 428 (1973)
- 126 - Holaday, D. A.; Volk, A. y Mandell, J.  
Am. J. Physiol. 195: 505 (1958)
- 127 - Horton, E. W.; Jones, R. y Marr, G. G.  
J. Reprod. Fert. 33: 385 (1973)
- 128 - Horton, E. W. y Poyser, N. L.  
Br. J. Pharmacol. 49: 98 (1973)
- 129 - Hsin-Hsiung, T. y Hollander, C. S.  
En: Supplementum to Advances in the Biosciences, editado por S.  
Bergström and S. Bernhard. Vol 9 pp5. International Conference on  
Prostaglandins, Vienna, Pergamon Press, Vieweg, Braunschweig  
(1973)

- 130 - Hsueh, A. J. W.; Peck Jr, E. J. y Clark, J. M.  
Endocrinology 98: 438 (1976)
- 131 - Ishikawa, M. y Fuchs, A. R.  
Prostaglandins 15: 89 (1978)
- 132 - Israelsson, U.; Hamberg, M. y Samuelsson, B.  
Eur. J. Biochem. 11: 390 (1969)
- 133 - Jessup, S. J.; Mc Donald-Gibson, W. J.; Ramwell, P. W. y Shaw, J. E.  
Fed. Proc. 29: 387 (Abstract) (1970)
- 134 - Johnson, R. A.; Morton, D. R.; Kinner, J. H.; Gorman, R. R.; Mc Guire, J. C.; Sun, F. F.; Whittaker, N.; Bunting, S.; Salmon, J.; Moncada, S. y Vane, J. R.,  
Prostaglandins 12: 915 (1976)
- 135 - Johnson, M. y Ramwell, P. J.  
Prostaglandins 3: 703 (1973)
- 136 - Jordan, S. M.  
J. Physiol. (London) 210: 115 P (1970)
- 137 - Karim, S. M. M.  
Br. Med. J. 4: 618 (1968)
- 138 - Karim, S. M. M. y Devlin, J.  
J. Obstet. Gyn. Br. Comm. 74: 230 (1967)
- 139 - Kelly, R. W. y Abel, M. M.

- Prostaglandins 28: 613 (1980)
- 140 - Kelly, R. W.; Taylor, P. L.; Hearn, J. P.; Short, R. U.; Martin, D. E. y Maston, J. H. Nature 260: 544 (1976)
- 141 - Kerly, M.  
Biochem. J. 34: 814 (1940)
- 142 - Kindahl, H.  
Prostaglandins 13: 619 (1977)
- 143 - Kröner, E. E. y Peskar, B. A.  
Experientia 32: 1114 (1976)
- 144 - Kuehl Jr., F. A.  
Prostaglandins 5: 325 (1974)
- 145 - Kuehl, R. A.; Cirillo, V. J.; Ham, E. A. y Humes, J. L.  
En: Advances in Biosciences 9. International Conference on Prostaglandins, editado por S. Bergström and S. Bernhard. Pergamon Press, Vieweg, Braunschweig. pp 155 (1973)
- 146 - Kuehl, Jr., F. A.; Cirillo, V. J.; Zanetti, M. F.; Beveridge, G. C. y Ham, E. A.  
Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research 1: 313 editado por B. Samuelson and R. Paoletti. Raven Press, N. Y. (1976)
- 147 - Kuehl, F. A. y Humes, J. L.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 480 (1972)
- 148 - Kulkarni, P. S. y Eakins, K. E.

- Prostaglandins 12: 465 (1976)
- 149 - Kunze, H. y Vogt, W.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 180: 123 (1971)
- 150 - Kurzrok, R. y Lieb, C. C.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 26: 268 (1930)
- 151 - Labhsetwar, A. P. y Watson, D. J.  
Biol. Reprod. 10: 103 (1974)
- 152 - Lands, W.; Lee, R. y Smith, W.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 108: 107 (1971)
- 153 - Labhsetwar, A.  
Prostaglandins 3: 729 (1973)
- 154 - Lands, W. E. M.; LeTellier, P. R.; Rome, L. H. y Vanderhoek, J.  
Y.  
Fed. Proc. 31: 476 A (1972)
- 155 - Lands, W. E. M.; LeTellier, P. R.; Rome, L. H. y Vanderhoek, J.  
Y.  
Advances in the Biosciences, editado por S. Bergström and S.  
Bernhard. Vol 9: 15. International Conference on Prostaglandins,  
Vienna, Pergamon, Press, Vieweg, Braunschweig (1973).
- 156 - Lapetina, E. G. y Cuatrecasa, P.  
Biochim. Biophys. Acta 73: 394 (1979)
- 157 - Le Duc, L. E.; Wyche, A. A.; Sprecher, H.; Sankarap, S. K. y

- Needleman, P.  
Mol. Pharmacol. 19: 242 (1981)
- 158 - Lee, S. C. y Levine, L.  
J. Biol. Chem. 250: 4549 (1975)
- 159 - Lee S. C. y Levine, L.  
J. Biol. Chem. 250: 548 (1975)
- 160 - Lee, S. C. y Jacobson, H. I.  
Endocrinology 88: 596 (1971)
- 161 - LeMaire, W. J.; Yang, N. S. T.; Behrman, H. R. y Marsh, J. M.  
Prostaglandins 3: 367 (1973)
- 162 - Levine, L.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47: 888 (1972)
- 163 - Levine, L. y Gutierrez-Cernosek, R. M.  
Prostaglandins 3: 785 (1973)
- 164 - Levy, G. S. y Klein, I.  
Life Science 13: 41 (1973)
- 165 - Lewis, G. P. y Matthews, J.  
J. Physiol. (London) 207: 15 (1970)
- 166 - Lewis G. P. y Piper, P. J.  
Nature 254: 308 (1975)
- 167 - Lewis, G. P. y Piper, P. J.  
En: Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research. Vol 1:

- 121, editado por B. Samuelsson and R. Paoletti. Raven Press, N. Y. (1976)
- 168 - Lima, F.; Gimeno, M. F.; Goldraij, A.; Bedners, A. S. y Gimeno, A. L.  
Life Sci. 10: (Part I) 999 (1971)
- 169 - Ljungkvist, J.  
Acta Societatis Medicorum Upsatiensis 76: 91 (1971)
- 170 - Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J.  
J. Biol. Chem. 193: 265 (1951)
- 171 - Maggi, F. M.; Tyrrell, N.; Maddox, V.; Watkins, W.; Ramey, E. R. y Ramwell, P. W.  
Prostaglandins 19: 985 (1980)
- 172 - Manni, A.; Baker, R.; Arafah, B. M. y Pearson, O. H.  
J. Endocr. 91: 281 (1981)
- 173 - Marsh, J. M.; Yang, N. S. T. y LeMaire, W. J.  
Prostaglandins 7: 269 (1974)
- 174 - Marshall, J. M.  
Am. J. Physiol. 197: 935 (1959)
- 175 - Mc Cracken, J. A.; Carbon, J. C.; Glew, M. E.; Goding, J. R.; Baird, D. T.; Green, K. y Samuelsson, B.  
Nature (New Biol.) 238: 129 (1972)
- 176 - Mc Cracken, J. A.; Glew, M. E. y Scaranuzzi, R. J.

- J. Clin. Endocrinol. Metab. 30: 544 (1970)
- 177 - Mc Guire, J. C. y Sun, F. F.  
Arch. Biochem. Biophys. 189: 92 (1978)
- 178 - Mc Lusky, N. J.; Naftolin, F.; Krey, L. C. y Franks, S.  
J. Steroid. Biochem. 15: 111 (1981)
- 179 - Meijs-Roelofs, H. M. A.; de Greef, W. J. y Uilenbroek, J. Th. J.  
J. Endocr. 64: 329 (1975)
- 180 - Meijs-Roelofs, H. M. A.; Uilenbroek, J. Th. J.; de Jongs, F. H. y  
Welschen, R.  
J. Endocr. 59: 595 (1973)
- 181 - Moncada, S.; Bunting, S.; Mullane, K.; Thorogood, P.; Vane, J. R.;  
Raz, A. y Needleman, P.  
Prostaglandins 13: 611 (1977)
- 182 - Miyamoto, T.; Ogino, N.; Yamamoto, S. y Hayaishi, O.  
J. Biol. Chem. 251: 2629 (1976)
- 183 - Miyamoto, T.; Yamamoto, S. y Hayaishi, O.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3645 (1974)
- 184 - Moncada, S.; Ferreira, H. y Vane, J. R.  
En: Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research 5: 211 e-  
ditado por J. C. Frölich Raven Press, N. Y. (1978)
- 185 - Moncada, S.; Gryglewski, R. J.; Bunting, S. y Vane, J. R.  
Nature (London) 263: 663 (1976)

- 186 - Moncada, S.; Gryglewski, R. J.; Bunting, S. y Vane, J. R.  
Prostaglandins 12: 715 (1976)
- 187 - Moncada, S. ; Korbut, R.; Bunting, S. y Vane, J. R.  
Nature 273: 767 (1978)
- 188 - Moncada, S.; Needleman, P.; Bunting, S. y Vane, J. R.  
Prostaglandins 12: 323 (1976)
- 189 - Moore, W. V. y Wolff, J.  
J. Biol. Chem. 248: 5705 (1973)
- 190 - Mustonen, T. y Teraväinen, H.  
Acta Physiol. Scand. 82: 264 (1971)
- 191 - Nagai, T. y Prosser, C. L.  
Am. J. Physiol. 204: 915 (1963)
- 192 - Nakano, J.; Anggård, E. y Samuelsson, B.  
Eur. J. Biochem. 11: 386 (1969)
- 193 - Naylor, B. y Poyser, N. L.  
Br. J. Pharmacol. 55: 229 (1975)
- 194 - Neal, H. V. y Rand, H. W.  
En: Comparative Anatomy, editado por Blakiston's son & Co, Inc.  
USA (1943)
- 195 - Needleman, P.; Moncada, S.; Bunting, S.; Vane, J. R.; Hamberg, M.  
y Samuelsson, B.  
Nature (London) 261: 558 (1976)

- 196 - Needleman, S. W. y Parks, W. M.  
Contraception 26: 317 (1982)
- 197 - Nissen, H. M. y Andersen, H.  
Histochemie 17: 241 (1969)
- 198 - Novy, M. J. y Cook, M. J.  
Am. J. Obstet. Gynecol. 117: 381 (1973)
- 199 - Nugteren, D. H.  
Biochim. Biophys. Acta 210: 171 (1970)
- 200 - Nugteren, D. H. y Hazelhof, E.  
Biochim. Biophys. Acta 326: 448 (1973)
- 201 - Dien, H. G.; Ham, E. A.; Zanetti, M. E.; Ulin, E. H. y Kuehl Jr.,  
F. A.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1107 (1976)
- 202 - Djeda, S. R.; Negro Vilar, A. y Mc Cann, S. M.  
Endocrinology 104: 617 (1979)
- 203 - Orczyk, G. P. y Behrman, H. R.  
Prostaglandins 1: 3 (1972)
- 204 - Osman, P. y Dullaart, J.  
J. Reprod. Fert. 47: 101 (1976)
- 205 - Dwini, C.; Folco, G. C.; Pasariquiklian, R.; Fano, M. y Berti, F.  
Prostaglandins 17: 113 (1979)

- 206 - Pace-Asciak, C. R.  
J. Biol. Chem. 250: 2789 (1975)
- 207 - Pace-Asciak, C. R.; Carrara, M. C. y Domazet, Z  
Biochim. Biophys. Res. Commun. 78: 115 (1977)
- 208 - Pace-Asciak, C. R.; Morasawa, K. y Wolfe, L. S.  
Biochim. Biophys. Acta 218: 288 (1970)
- 209 - Pace-Asciak, C. R. y Rangaraz G.  
Biochim. Biophys. Acta 431: 603 (1976)
- 210 - Pace-Asciak, C. R. y Wolfe, L. S.  
Biochim. Biophys. Acta 152: 784 (1968)
- 211 - Patrono, C.; Ciabattoni, G. y Grossi-Belloni, D.  
Pharmacol. Res. Commun. 6: 509 (1974)
- 212 - Patwardhan, V. V. y Lanthier, A.  
Prostaglandins 27: 465 (1984)
- 213 - Pharriss, B. B.; Cornette, J. C. y Gutknecht, G. D.  
J. Reprod. Fertil. Suppl. 10: 97 (1970)
- 214 - Pharriss, B. B. y Wyngarden, L.J.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 130: 92 (1969)
- 215 - Polet, H. y Levine, L.  
Arch. Biochem. Biophys. 168: 96 (1975)
- 216 - Polet, H. y Levine, L.  
J. Biol. Chem. 250: 351 (1975)

- 217 - Pomerantz, D.; Maddox, V.; Maggi, F.; Ramey, E. y Ramwell, P.  
Life Science 27: 1233 (1980)
- 218 - Powell, W. S.; Hammarström, S. y Samuelsson, B.  
Eur. J. Biochem. 41: 103 (1974)
- 219 - Powell, W. S.; Hammarström, S.; Samuelsson, B. y Sjöberg, B.  
Lancet 1120 (1974)
- 220 - Poyser, N. L.; Horton, E. W.; Thompon, C. J. y Los, M.  
Nature (London) 230: 226 (1971)
- 221 - Price, D.  
Anat. Record 97: 519 (1947)
- 222 - Poyser, N. L.  
En: Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research, Vol 2, e  
ditado por B. Samuelsson and R. Paoletti. Raven Press N. Y.  
(1976)
- 223 - Ramwell, P. W.; Leovey, E. M. K. y Sintetos, A. L.  
Biology of Reprod. 16: 70 (1977)
- 224 - Rao, Ch.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64: 416 (1975)
- 225 - Rao, Ch.  
Life Sci. 20: 2013
- 226 - Rao, Ch. y Harker, C. W.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85: 1054 (1978)

- 227 - Reingold, D.; Kawasaki, A. y Needleman, P.  
Biochim. Biophys. Acta 659: 179 (1981)
- 228 - Resko, J. A.  
Science 164: 70 (1969)
- 229 - Reynolds, S. R. M.  
En: Physiology of the Uterus, editado por Hafner, N. Y. pp 75  
(1969)
- 230 - Roberts, L. J. II; Sweetman, B. J.; Morgan, J. L.; Payne, N. A. y  
Dates, J. A.  
Prostaglandins 13: 631 (1977)
- 231 - Roberts, L. J. II; Sweetman, B. J.; Payne, N. A. y Dates, J. A.  
J. Biol. Chem. 252: 7415 (1977)
- 232 - Rojas, A. M. y Steinspair, J.  
Endocrinology 112: 586 (1983)
- 233 - Rome, L. H. y Lands, W. E. M.  
Prostaglandins 11: 23 (1976)
- 234 - Rosner, J. M.; Charreau, E.; Houssay, A. B. y Epper, R. C.  
Endocrinology 79: 681 (1966)
- 235 - Roth, G. J; Stanford, N. y Majerus, P. W.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3073 (1975)
- 236 - Rowson, L. E. A.; Tervit, R. y Brand, A.  
J. Reprod. Fert. 29: 145 (1972)

- 237 - Saksena, S. K. y Lau, I. F.  
Prostaglandins 3: 317 (1973)
- 238 - Samuelsson, B.  
J. Am. Chem. Soc. 85: 1878 (1963)
- 239 - Samuelsson, B.  
J. Am. Chem. Soc. 87: 3011 (1965)
- 240 - Samuelsson, B.  
En: Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research, Vol 1, e  
ditado por B. Samuelsson and R. Paoletti. Raven Press, N. Y.  
pp 1 (1976)
- 241 - Samuelsson, B.; Ganström, E.; Gréen, K. y Hamberg, M.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 180: 138 (1971)
- 242 - Samuelsson, B. y Hamberg, M.  
En: Prostaglandin Synthetase Inhibitors, editado por H. J.  
Robinson and J. R. Vane. Raven Press, pp 107 (1974)
- 243 - Sato, T.; Tayo, K.; Jyuyo, T. y Igarash, M.  
J. Reprod. Fert. 39: 33 (1975)
- 244 - Schlegel, W.; Demers, L. M.; Hildebrandt-Stark, H. E.; Behrman,  
H. R. y Greep, R. O.  
Prostaglandins 5: 417 (1974)
- 245 - Shaikh, A. A. y Shaikh, S. A.  
Endocrinology 96: 37 (1975)

- 246 - Sheldon Bivin, W.; Crawford, M. P. y Brewer, N. R.  
En: The laboratory rat, Vol 1, editado por H. J. Bakers, J.  
Russell Zindsey and S. M. Weisbroth. Academic Press, pp 92  
(1979)
- 247 - Shaikh, A. A.  
Biol. Reprod. 5: 297 (1971)
- 248 - Shemesh, M. y Hansel, W.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148: 243 (1975)
- 249 - Shemesh, M. y Hansel, W.  
Biol. Reprod. 13: 448 (1975)
- 250 - Shio, H.; Ramwell, P. W.; Andersen, N. H. y Corey, E, J.  
Experientia 26: 355 (1970)
- 251 - Silva, D. G.  
Anat. Record 158: 211 (1967)
- 252 - Silver, M. J. y Smith, J. B.  
Life Sci. 16: 1635 (1975)
- 253 - Smith, W. L. y Lands, W. E. M.  
J. Biol. Chem. 21: 6700 (1971)
- 254 - Smith, D. E. y Rickmond Grooms, A.  
Biol. of Reprod. 22: 1062 (1980)
- 255 - Smith, J. B. y Willis, A. L.  
Nature 231: 235 (1971)

- 256 - Speziale, N.; Speziale, E.; Guivernan, M.; Terragno, A. y  
Terragno, N. A.  
Fed. Proc. 39: 996 (Abstract) (1980)
- 257 - St Muijck, C. B.; Beerthius, R. K.; Pabon, H. J. J. y Dorp, D. A.  
Rec. Trav. Chim. 85: 1233 (1966)
- 258 - Sun, F. F.; Chapman, J. P. y Mc Guire, J. C.  
Prostaglandins 14: 1055 (1977)
- 259 - Sun, F. F.; Mc Giff, J. C. y Wong, P. Y. K.  
Fed. Proc. 37: 916 (1977)
- 260 - Sun, F. F. y Taylor, B. M.  
Biochemistry 17: 4096 (1978)
- 261 - Sun, F. F.; Armour, S. B.; Bockstang, V. R. y Mc Guire, J. C.  
En: Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research, Vol 1, e  
ditado por B. Samuelsson and R. Paoletti, Raven Press, N. Y.  
pp 163 (1976)
- 262 - Szego, C. M.  
En: Physiological triggers, editado por T. H. Bullock. American  
Physiological Society. Waverly Press, Inc., Baltimore (1957)
- 263 - Tachi, C.; Tachi, S. y Lidner, H. R.  
Biol. of Re<sup>u</sup>prod. 10: 404 (1974)
- 264 - Tai, H. y Yuan, B.  
Biochem. Biophys. Acta 80: 236 (1978)

- 265 - Tai, H.; Tuan, B. y Wu, A. T.  
Biochem. J. 170: 441 (1978)
- 266 - Tchernitchin, A.  
Steroids 19: 575 (1972)
- 267 - Tchernitchin, A.; Roorijick, J.; Tchernitchin, X.; Vandenhende, J. y Galand, P.  
Nature 248: 142 (1974)
- 268 - Thaler-Dao, H.; Ramonatxo, M.; Saintot, M.; Chaintreuil, J. y Crastes de Paulet, A.  
Prostaglandins 24: 149 (1982)
- 269 - Thaler-Dao, H.; Saintot, M.; Baudin, G.; Descomps, B. y Crastes de Paulet, A.  
FEBS Lett. 48: 204 (1974)
- 270 - Thaler-Dao, H.; Saintot, M.; Ramonatxo, M.; Chaves, C y Crastes de Paulet, A.  
Prostaglandins 23: 347 (1982)
- 271 - Thomas, J. P.; Dorfling, L. H. y Behrman, H.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1344 (1978)
- 272 - Thuy, L. P. y Carpenter, M. P.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 81: 322 (1978)
- 273 - Tolman, E. L.; Birnbaum, J. E.; Chicarelli, F. S.; Panagides, J. y Sloboda, A. E.  
En: Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research, Vol 1,

editado por B. Samuelsson and R. Paoletti, Raven Press, N. Y.  
pp 133 (1976)

- 274 - Tsafuri, A.; Koch, Y. y Lidner, H. R.  
Prostaglandins 3: 461 (1973)
- 275 - Tuvemo, T.; Strandberg, K.; Hamberg, M. y Samuelsson, B.  
Acta Physiol. Scand. 96: 145 (1975)
- 276 - Tyler, H. M.; Saxton, C. y Parry, M. J.  
The Lancet, March 21, : 629 (1981)
- 277 - Ui, H. y Mueller, G. C.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 50: 265 (1965)
- 278 - Vanderhoek, J. V. y Lands, W. E. M.  
Biochim. Biophys. Acta 296: 382 (1973)
- 279 - Van der Ouderao, F, J.; Buytenhek, M.; Nugteren, D. M. y van Dorp  
D. A.  
Biochim. Biophys. Acta 487: 315 (1977)
- 280 - Vane, J. R.  
Nature 231: 232 (1971)
- 281 - Vane, J. R. y Williams, K. I.  
Br. J. Pharmacol. 48: 629 (1973)
- 282 - Vesin, M. F.; Dokhoc, L. D. y Harbon, S.  
Molecular Pharmacol. 16: 823 (1979)
- 283 - Vijayakumar, R. y Waltess, W. A. W.

- Fertil. Steril. 39: 298 (1983)
- 284 - von Euler, U. S.  
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 175: 78 (1934)
- 285 - von Euler, U. S.  
J. Physiol. (London) 88: 213 (1936)
- 286 - Vuhai, M. T.; Logeat, F.; Warembourg, M. y Milgrom, E.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 286: 199 (1977)
- 287 - Wakeling A. E.; Kirton, K. T. y Wyngarden, L. J.  
Prostaglandins 4: 1 (1973)
- 288 - Warren, L.  
Endocrinology 80: 714 (1967)
- 289 - Watson, J.; Sheperd, T. S. y Dodson, K. S.  
J. Reprod. Fert. 57: 489 (1979)
- 290 - Williams, K. I.; Dembinska-Kieć, A.; Zmuda, A. y Grylewski, R. J.  
Prostaglandins 15: 343 (1978)
- 291 - Williams, K. I. y Dowring, I. J.  
Prostaglandins 14: 813 (1977)
- 292 - Williams, T. y Rogers, A. W.  
J. of Anat. 130: 867 (1980)
- 293 - Willis, A. L.; Davison, P.; Ramwell, P. W.; Bracklehurst, W. E. y  
Smith, J. B.  
En: Prostaglandins en Cellular Biology, editado por P. W. Ramwell

and B. B. Pharris, Pleumann Press N. Y.

- 294 - Wischik, C. M. y Rogers, A. W.  
J. Anat. 135: 707 (1982)
- 295 - Wladaware, P. y Hammaström, S.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 525 (1978)
- 296 - Wladaware, P.; Kindhal, H. y Hamberg, M.  
Biochim. Biophys. Acta 431: 603 (1976)
- 297 - Wolfe, L. S.; Rostworowski, K. y Marion, J.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 70: 907 (1976)
- 298 - Wong, P-Y. K.  
Biochim. Biophys. Acta 659: 169 (1981)
- 299 - Wong, P-Y. K.; Mc Giff, J. C.; Cagen, L.; Malik, K. U. y Sun, F. F.  
J. Biol. Chem. 254: 12 (1979)
- 300 - Wong, P-Y. K.; Sun, F. F. y Mc Giff, J. C.  
J. Biol. Chem. 253: 5555 (1978)
- 301 - Wong, P-Y. K.; Terragno, D. A.; Terragno, N.A. y Mc Giff, J. C.  
Prostaglandins 13: 1113 (1977)
- 302 - Wright, K.; Luborsky, J. L. y Behrman, H. R.  
Moll. Cell. Endocrinol. 13: 25 (1979)
- 303 - Yoshimoto, T.; Yamamoto, S.; Okuma, M. y Hayaish, O.  
J. Biol. Chem. 252: 5871 (1977)

- 304 - Ziboh, V. A.; Lord, J. T. y Penneys, N. S.  
J. Lipid Res. 18: 37 (1977)
- 305 - Zor, V. y Lamprecht, S. A.  
En: Biochemical Actions of Hormones, Vol 4, editado por G.  
Litwock, Academic Press, N. Y. pp 85
- 306 - Zor, V.; Strilovici, B.; Nimrod, A. y Lidner, H. R.  
Prostaglandins 14: 947 (1977)

maño pero difieren en forma y espaciamiento, estando empaquetadas de manera más estrecha al epitelio luminal y a los capilares del estroma (294). El nucléolo es pequeño y compacto, conteniendo sólo elementos fibrosos (263).

Las células del epitelio luminal son columnares bajas, con microvelocidades esparcidas en la superficie y presentan una membrana basal irregular donde se apoya una lámina basal bien marca. El núcleo es central y ocupa de un cuarto a un tercio del volumen celular (291). No se han observado diferencias entre el tamaño, forma o composición de las células del epitelio luminal (169).

El tratamiento con estradiol o progesterona produce aumento de tamaño de las células epiteliales y del núcleo (291) como así también agrandamiento del nucléolo y acumulación de material granular (263).

Los cambios bioquímicos producidos por la castración son numerosos. La inversión de los mismos por la restauración hormonal ha sido ampliamente estudiada.

Luego de seis horas de administrar estradiol a ratas ovariectomizadas se produce un aumento de peso uterino debido a la retención de agua (12). Este fenómeno al igual que el aumento de la permeabilidad vascular y la liberación de histamina producida por los estrógenos parecen estar mediados por eosinófilos que presentan receptores para esta hormona (232). Este sistema de receptores para estrógenos ha sido descrito en leucocitos eosinófilos del útero de rata (266). Tales células no existen en útero inmaduro ni en los provenientes de ratas ovariectomizadas y aparecen cinco minutos después de la administración de