

## Tesis de Posgrado

# Acción de la histamina en la regulación de la función contráctil del útero de rata preñada y no preñada

Viggiano, Juan Marcelo

1987

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](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:**

Viggiano, Juan Marcelo. (1987). Acción de la histamina en la regulación de la función contráctil del útero de rata preñada y no preñada. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2039\\_Viggiano.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2039_Viggiano.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Viggiano, Juan Marcelo. "Acción de la histamina en la regulación de la función contráctil del útero de rata preñada y no preñada". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2039\\_Viggiano.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2039_Viggiano.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Acción de la Histamina en la regulación de la  
función contráctil del útero de rata preñada  
y no preñada.

Autor: Lic. J. Marcelo Viggiano

Director de Tesis: Dra. Martha F. de Gimeno

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

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

- 1987 -

Rep. 2038

Tesis - 2039 -  
y. 2

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por haberme otorgado las becas que me permitieron investigar en este tema.

A las autoridades y personal del Centro de Estudios Farmacológicos y Principios Naturales, que me proporcionaron los medios para efectuar esta Tesis.

A la Dra. Martha F. de Gimeno, por sus consejos, orientación, y el valioso aporte de su experiencia en el campo de la investigación científica.

A Marcela Chaud, Ana María Franchi y Alicia Falletti por su inestimable colaboración técnica.

"Cuando un hombre empieza a aprender, nunca sabe lo que va a encontrar. Su propósito es deficiente; su intención es vaga. Espera recompensas que nunca llegarán, pues no sabe nada de los trabajos que cuesta aprender... El conocimiento no es nunca lo que uno espera."

(C. Castañeda, "Las enseñanzas de Don Juan".)

## ABREVIATURAS

AA	Acido Araquidónico
AAS	Acido Acetilsalicílico
AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
AL	Acido Linolénico
AM	Antimesometrial
AMPc	Adenosin 3':5' monofosfato cíclico
ATP	Adenosin Trifosfato
DAO	Diamino-oxidasa
DGLA	Acido di-homo-gama-linolénico
GLA	Acido gama-linolénico
GMPc	Guanosin 3':5' monofosfato cíclico
HA	Histamina
HETE	Acido L-hidroxi-eicosatetraenoico
HPETE	Acido L-hidroperoxi-eicosatetraenoico
IgE	Inmunoglobulina E
KRB	Krebs
LH	Hormona Luteinizante
M	Mesometrial
MAO	Mono-amino-oxidasa
OV	Ovariectomizada
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
pg	picograma
PG's	Prostaglandinas

**TCI**

**Acido Tricloroacético**

**ug**

**microgramo**

**ul**

**microlitro**

- INDICE -

I. INTRODUCCION

A. El útero de rata.

1. <u>Generalidades</u> .....	1
a. El ciclo estral.....	3
b. Implantación, gestación y parto.....	7
2. <u>Motilidad uterina</u> .....	12
a. Características electrofisiológicas.....	12
b. Eventos moleculares de la contracción muscular.....	13
c. Regulación de la motilidad uterina.....	16

B. Histamina.

1. <u>Generalidades</u> .....	30
2. <u>Estructura química</u> .....	32
3. <u>Origen, síntesis y almacenamiento</u> .....	35
4. <u>Metabolismo</u> .....	37
5. <u>Funciones de la Histamina endógena</u> .....	41
a. Anafilaxis y alergia.....	41
b. Regulación de la microcirculación.....	42
c. Secreción ácida gástrica.....	42
d. Sistema nervioso central.....	43
e. Crecimiento tisular.....	44
f. Aparato reproductor femenino.....	45

### C. Prostaglandinas

1. <u>Generalidades</u> .....	47
2. <u>Biosíntesis</u> .....	49
3. <u>Metabolismo</u> .....	54
4. <u>Interconversión de PG's</u> .....	57
5. <u>Regulación de la síntesis de PG's</u> .....	58
6. <u>Mecanismo de acción</u> .....	62
7. <u>Funciones de las PG's endógenas</u> .....	65

<u>D. Objetivos</u> .....	67
---------------------------	----

## II. MATERIALES & METODOS

### A. Materiales.

1. <u>Animales utilizados</u> .....	68
2. <u>Drogas utilizadas</u> .....	69

### B. Métodos.

1. <u>Tratamientos hormonales</u> .....	72
2. <u>Determinación de la motilidad uterina del útero de rata aislado</u> .....	72
3. <u>Determinación de la presión intrauterina "in vivo"</u> .....	76
4. <u>Determinación de PG's tipo E y F</u> .....	77
5. <u>Actividad de la 9-ceto reductasa</u> .....	80

6. <u>Determinación de la Histamina</u> .....	82
7. <u>Determinación del AMPc</u> .....	83
8. <u>Estadística</u> .....	85

### III. RESULTADOS

A. <u>Papel de la HA en la regulación de la motilidad uterina y su relación con los efectos estrogénicos sobre la síntesis de PG's en la rata no preñada.</u>	
1. Efecto de la HA sobre las contracciones espontáneas de segmentos uterinos aislados en diferentes estadios del ciclo sexual.....	86
2. Acción de antagonistas histaminérgicos administrados "in vivo" sobre la motilidad espontánea de segmentos uterinos aislados de ratas OV y OV estrogeneizadas.....	86
3. Efecto de antagonistas histaminérgicos administrados "in vivo" sobre otras variables uterinas en ratas OV y OV estrogeneizadas.....	88
4. Efecto de la HA sobre la actividad espontánea del útero de rata "in vivo", acción de la cimetidina.....	91
5. Efecto del 17-beta-estradiol sobre la actividad espontánea del útero de rata "in vivo", acción de la cimetidina.....	91

6. Efecto de la HA sobre los niveles uterinos de AMPc en la rata OV, acción de la cimetidina.....	94
7. Efecto del 17-beta-estradiol sobre los niveles uterinos de AMPc en la rata OV, acción de la cimetidina.....	97
8. Efecto de la HA sobre la síntesis y liberación de PG's en el útero de rata en diestro, acción de antagonistas H <sub>2</sub> .....	97
9. Efecto de la HA y del dibutiril-AMPc sobre la actividad de la 9- ceto reductasa en el útero de rata en diestro.....	100
B. <u>Efecto de la HA sobre la motilidad del útero de rata preñada y su relación con la síntesis de PG's.</u>	
1. Efecto de la HA sobre las contracciones espontáneas de segmentos uterinos aislados de ratas en diferentes estadios de la preñez.....	103
2. Determinación del contenido de HA en el útero de rata en diferentes estadios de la preñez.....	105
3. Efecto de un agonista H <sub>1</sub> y de antagonistas H <sub>1</sub> en segmentos mesometriales aislados de ratas en el día 16º de preñez.....	105

4. Acción del ácido acetil salicílico y del mepacrine sobre el efecto inotrópico positivo de la HA en el útero aislado de rata preñada.....	108
5. Efecto de la HA sobre la síntesis y liberación de PG's en el útero aislado de rata preñada, acción de antihistamínicos H <sub>1</sub> .....	111
<u>IV. DISCUSION</u> .....	113
<u>V. CONCLUSIONES</u> .....	126
<u>VI. BIBLIOGRAFIA</u> .....	130

## I. INTRODUCCION

### A. El útero de rata.

#### 1. Generalidades:

En todos los mamíferos hay un par de conductos de Müller, diferenciados en regiones, que pueden presentar distintos grados de fusiónamiento. Excepto en los monotremas, los conductos de Müller se diferencian en tres regiones distintas: las trompas de Falopio u oviductos, el útero y la vagina (292). Las porciones uterinas de los conductos de Müller pueden presentar diversos grados de fusiónamiento, dando lugar a diferentes tipos de úteros: doble, bipartido, bicorne o simple. El útero de rata (fig. 1) ha sido clasificado como doble o bipartido (95).

La pared del útero está integrada por tres capas: la serosa o cubierta peritoneal de órgano; una capa de músculo liso llamada miometrio, que constituye la mayor parte del espesor del útero, y por último el endometrio o membrana mucosa glandular que tapiza su luz (223).

La capa muscular está compuesta por una capa longitudinal externa, una zona vascular y una capa circular interna (223).

El endometrio está formado por un epitelio superficial cilíndrico simple que sufre invaginaciones, originando numerosas glándulas uterinas tubulares que se prolongan hacia una lámina propia

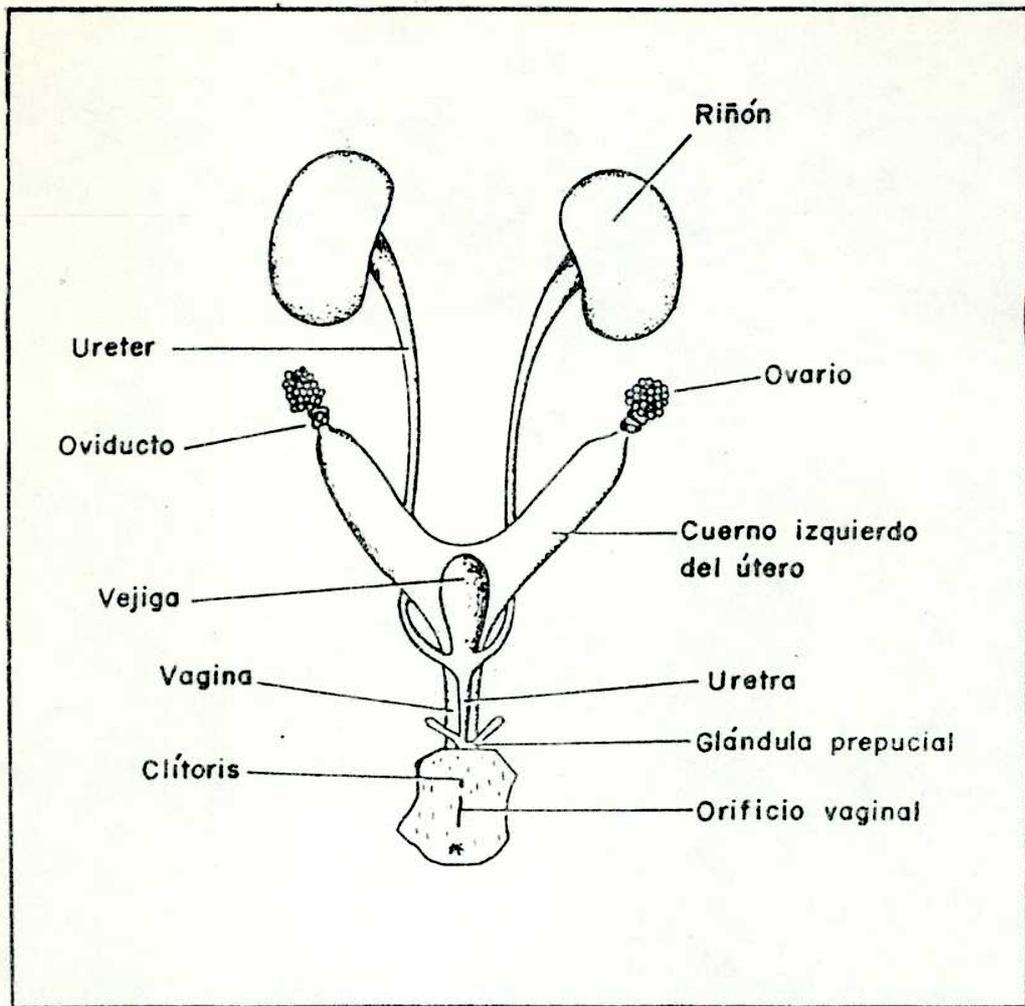


Fig. 1: Aparato urogenital de la rata hembra.

muy gruesa llamada estroma.

Dentro del miometrio corren circunferencialmente hacia la línea media, donde se anastomosan, las arterias arciformes. Ramas de estas arterias alcanzan el endometrio, desprendiendo otras arterias llamadas arterias basales. Estas últimas se hacen contorneadas al penetrar en la capa más gruesa o funcional y se ramifican para formar un rico lecho vascular en la superficie del endometrio. Durante el ciclo sexual, las arterias se contraen y dilatan rítmicamente, de modo que la superficie del endometrio enrojece y empalidece alternadamente (25).

a. El ciclo estral:

Las ratas y los ratones presentan un ciclo estral de 4 ó 5 días. En su transcurso, el endometrio y la vagina sufren modificaciones morfológicas y funcionales. Long y Evans (173) idearon un método para diagnosticar rápidamente las fases del ciclo estral sobre la base de los diferentes tipos de células presentes en los frotis vaginales de rata.

Durante el estro o período de celo, se produce la ovulación. El útero se alarga, haciéndose edematoso, y las glándulas uterinas se activan en preparación para la implantación. La mucosa vaginal prolifera y las capas epiteliales superficiales se hacen escamosas

y cornificadas, adecuándose a la copulación. Los frotis vaginales realizados en esta etapa contienen células escamosas características que diagnostican la fase estral del ciclo.

Durante el metaestro el diámetro de los cuernos se reduce, el epitelio toma aspecto pseudo estratificado, disminuye la vascularización y la actividad de las glándulas uterinas. Los extendidos vaginales presentan leucocitos junto con células escamosas, indicando la gran delgadez de la mucosa y la migración de leucocitos a través de ella.

En proestro, que es una etapa de preparación para el próximo estro, el útero comienza a llenarse de fluido y entran en actividad las glándulas uterinas. En los frotis vaginales se observan células epiteliales nucleadas (no cornificadas) que pueden soltarse aisladamente o en bandas (116).

Se han propuesto tres explicaciones diferentes para la etiología del ciclo sexual (7, 244). La primera postula que los estrógenos disparan el aumento de hormona luteinizante (LH); la segunda sostiene que tanto la secreción de progesterona como de estrógeno deben preceder al aumento de LH; por último, se postula que la progesterona bloquea el inicio del aumento de LH.

Lo cierto es que los esteroides sexuales que circulan en plasma varían marcadamente a lo largo del ciclo estral. Las medicio

nes realizadas en la rata (203, 205) muestran que los niveles plasmáticos de estradiol comienzan a elevarse progresivamente a partir de las 17 hs. del diestro y llegan a un máximo en la mañana del proestro, luego del cual descienden para alcanzar niveles basales en el estro, después de la ovulación.

En cuanto a la progesterona (fig. 2) se observa que sus niveles aumentan rápidamente a partir de las 13 hs. del proestro hasta alcanzar el máximo a las 17 hs. del mismo estadio, luego de lo cual sus niveles plasmáticos descienden para retornar a basales en la mañana del estro.

Durante el metaestro, el cuerpo lúteo funcionante, aunque de vida fugaz en la rata, secreta progesterona, por lo tanto, durante este período los niveles plasmáticos de la hormona también están algo elevados.

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

Los estrógenos promueven respuestas uterotróficas denominadas tempranas y tardías (145). Son reconocidas como respuestas tempranas la síntesis de una proteína llamada inductora (145), el aumento de la oxidación de glucosa (287), el incremento de la actividad

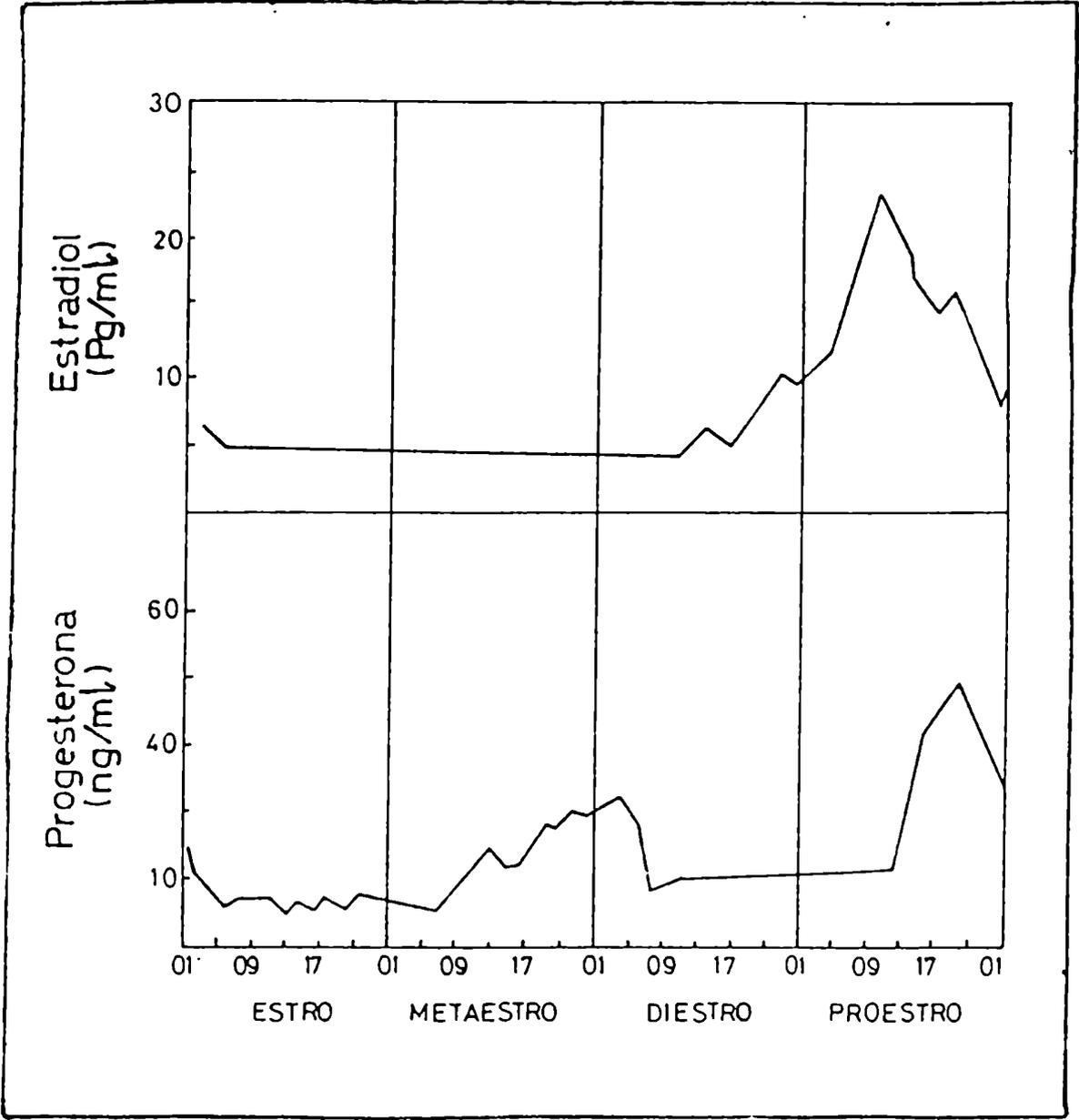


Fig. 2: Niveles séricos de esteroides sexuales en la rata durante el ciclo estral.

de la RNA polimerasa II (105), la síntesis de RNA y proteínas y el aumento del contenido de agua uterino. Estas respuestas se detectan después de 6 horas de una inyección de estradiol a ratas adultas (145).

Aproximadamente 20 horas después de un tratamiento estrogénico se manifiestan las respuestas llamadas tardías: síntesis de DNA e incremento del peso uterino (164).

b. Implantación, gestación y parto:

En los mamíferos con ciclos cortos, como la rata y el ratón, la fase luteal es tan breve que el útero no sufre los cambios usualmente asociados a la acción de la progesterona. Más aún, en estos roedores los embriones tardan alrededor de tres días en llegar al útero, de manera que llegarían en el momento en que el animal estaría preparándose para la próxima ovulación, cuando el útero no se encuentra ya en condiciones de recibirlos.

Esto, sin embargo, no ocurre, por cuanto la estimulación cervical que se produce durante el coito provoca el mantenimiento del cuerpo lúteo de la última ovulación durante un período que dura aproximadamente la mitad de una preñez normal; este estado se denomina pseudo preñez. Si el apareamiento resulta infértil y no se produce preñez, el cuerpo lúteo regresa en unos doce días y se reestablece el ciclo estral.

Si como consecuencia del apareamiento se produce la fertilización de los óvulos, las primera divisiones de los mismos tienen lugar en el oviducto y los embriones llegan al útero en el estado de blastocisto, en el cuarto día después de la ovulación, cuando han alcanzado un tamaño de 8 a 16 células (201). El blastocisto retiene la zona pelúcida hasta el medio día del quinto día.

Al igual que en las demás especies de mamíferos estudiadas la implantación en la rata es precedida por un aumento de la permeabilidad de los capilares del endometrio en los sitios donde se encuentran presentes los blastocistos (222). Esta permeabilidad aumentada puede ser demostrada en la rata a partir de la tarde del día 5 de preñez, y tiene lugar de 20 a 24 horas antes de que se observe alguna evidencia de implantación. Se cree que el aumento de permeabilidad es esencial para la subsiguiente formación de tejido decidual, pero la identidad y el origen de los factores responsables de estos procesos son inciertos (147). Son muchas las sustancias que producen reacción decidual, entre otras, la histamina, prostaglandinas (235) y bradiquinina (221).

En la rata los blastocistos se distribuyen más o menos regularmente a lo largo de cada cuerno uterino, la implantación siempre se inicia en el borde antimesometrial de la cavidad uterina y el disco embrionario de cada blastocisto siempre se orienta hacia el mesometrio (73). Los mecanismos responsables de la distribución,

ubicación y orientación de los blastocistos a lo largo de cada cuerno uterino son poco conocidos (231).

La implantación en la rata es de tipo excéntrica, esto es, el blastocisto se aloja en alguno de los pliegues de la cavidad uterina. En este tipo de implantación hay cierta erosión de las células epiteliales que entran en contacto con el trofoblasto. De acuerdo con la clasificación de Grosser (201), la placenta de la rata es de tipo hemoendotelial, con una íntima conexión entre los tejidos maternos y fetales; y presenta forma discoide. La gestación de la rata dura unos 22 días.

En la rata y el ratón se presenta un estro, con ovulación incluida, dentro de las 24 horas después del alumbramiento. Si se produce un apareamiento durante este estro, la siguiente gestación se alarga considerablemente y el nacimiento puede producirse hasta 50 días después de la cópula. Si la hembra es separada de sus primeras crías, la gestación tiene una duración normal. Los óvulos fertilizados durante el estro post-parto son normales, pero los blastocistos que se producen no se implantan enseguida sino que quedan flotando en la cavidad uterina. El fenómeno se conoce como "implantación retrasada".

En la rata, así como en otros roedores y lagomorfos, la presencia del ovario es esencial durante la preñez y la castración, aún 5 ó 6 días antes de la fecha esperada de alumbramiento, produce

aborto (201). Este efecto puede ser evitado mediante la administración de progesterona exógena (53, 157). En la rata los niveles séricos de progesterona decrecen significativamente entre los días 18 y 19 de la preñez, y permanecen bajos durante el resto de la gestación, hasta el día 3 de lactancia. La concentración de estradiol sérico (fig. 3), en cambio, aumenta significativamente 3 días después del descenso de la progesterona, alcanzando un pico en el día 22.

El proceso de parto es precipitado por un aumento de la motilidad uterina. Es probable que el proceso sea iniciado por una combinación de factores que conducen a una sensibilidad aumentada del miometrio a los agentes estimulantes de la contractilidad (201).

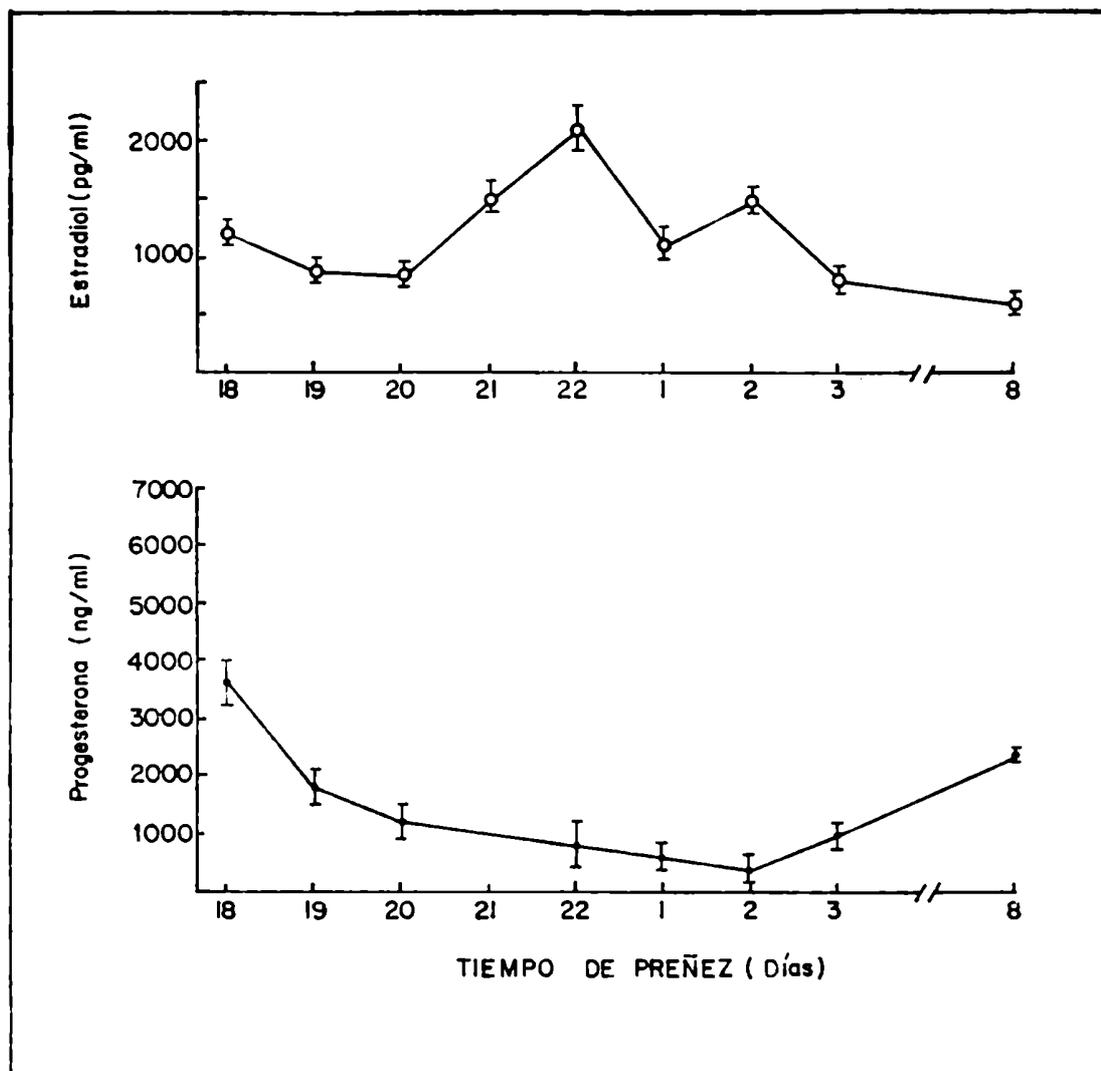


Fig. 3: Niveles séricos de esteroides sexuales durante la última fase de la preñez y el comienzo de la lactancia, según Labhsetwar & Watson (163).

## 2. Motilidad uterina:

### a. Características electrofisiológicas:

El miometrio pertenece a la categoría de músculos lisos denominados "unitarios" por Bozler (30). Estos se caracterizan por poseer una actividad espontánea, la cual se inicia en algunas áreas especializadas del tejido o "marcapasos". Las contracciones en este tipo de músculos no son necesariamente iniciadas por un impulso nervioso, aunque pueden ser reguladas y coordinadas por mediación nerviosa.

La actividad espontánea del miometrio es precedida por la actividad eléctrica desarrollada en forma de descargas periódicas de potenciales de acción de tipo espiga (51). Se puede verificar en ciertas células y a diferentes tiempos una lenta despolarización previa a la descarga de potenciales de acción. Este fenómeno sería responsable de la actividad marcapaso (181). El marcapaso uterino no está restringido a una zona especializada del tejido como sucede con el músculo cardíaco, sino que en él todas sus células musculares pueden presentar actividad marcapaso. El miometrio actúa como un sincio eléctrico que propaga los potenciales de acción (51, 118). Experimentos realizados con microelectrodos intracelulares indican que la estimulación de una célula produce una despolarización localizada en las células adyacentes (200). Sin embargo, se ha observado po

ca sincronización de las espigas individuales (51).

La frecuencia, la amplitud y la duración de las contracciones están gobernadas por la frecuencia con que se descargan los potenciales de acción, por la duración de la serie de potenciales de acción originados en la célula muscular y por el número total de células estimuladas y sincrónicamente activas (117).

b. Eventos moleculares de la contracción muscular:

Wilkie (294) sugirió la existencia de una serie de componentes celulares elásticos (de estructura y naturaleza química desconocidas) a partir de sus estudios sobre las propiedades mecánicas del músculo liso.

Actualmente se sabe que los músculos lisos presentan mioquina dispuesta en forma de agregados constituyendo los filamentos gruesos y monómeros globulares de actina, que se asocian entre sí formando largas cadenas enrolladas helicoidalmente de a pares, visualizadas como filamentos finos (199). Estos filamentos finos poseen tropomiosina además de actina, aunque está ausente la troponina presente en los filamentos finos del músculo estriado (106).

El músculo liso se caracteriza por carecer de unidades sarcoméricas del tipo encontrado en los músculos esqueléticos (13).

Los filamentos están adheridos a los llamados cuerpos densos y a ciertas estructuras de la membrana o sarcolema.

Durante la actividad de los músculos estriados, los filamentos de actina se desplazan desde cada extremo del sarcómero hacia el centro, entre los filamentos de miosina (199). La repetición de muchos de estos movimientos microscópicos conduce a una contracción macroscópica de la fibra. Estos eventos moleculares ocurren también en el músculo liso (fig. 4) (251).

El suplemento energético para el desplazamiento de los filamentos proviene de la hidrólisis de ATP por la actividad ATPásica característica de la miosina (106, 239).

En todas las células musculares la contracción es iniciada por un incremento de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  libre, pero el mecanismo de activación por el  $\text{Ca}^{2+}$  varía de acuerdo con el tipo muscular (2).

En los músculos no sarcoméricos se ha encontrado que una proteína quinasa específica fosforila la cadena liviana de la miosina (239). Esta proteína quinasa (miosina quinasa) es activada por otra proteína llamada calmodulina (homóloga a la subunidad C de la troponina) unida al  $\text{Ca}^{2+}$  cuando los niveles en citosol son elevados (110, 94). Una vez fosforilada la miosina, se incrementa la afinidad de la misma por la actina y sobreviene la contracción (fig. 5).

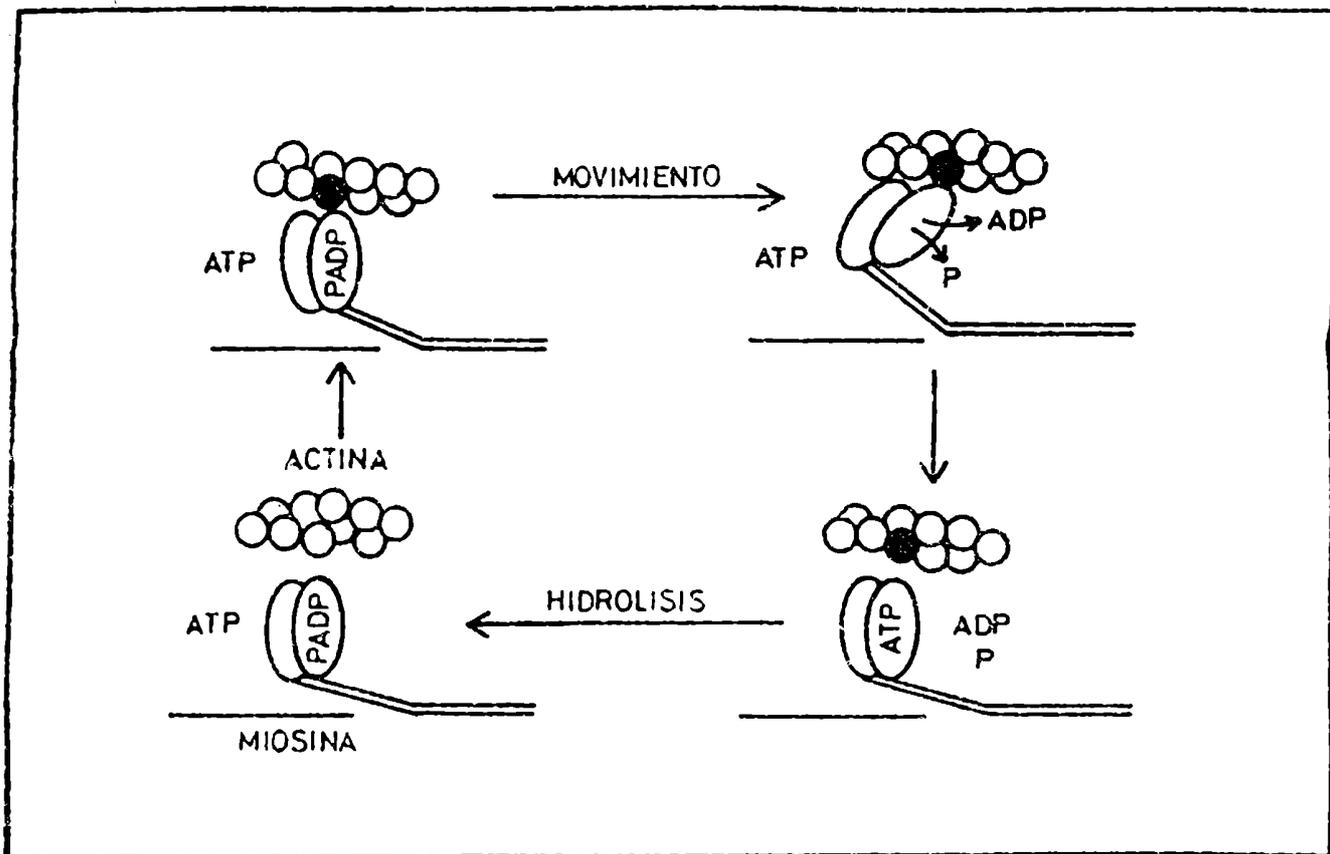


Fig. 4: Eventos moleculares de la contracción muscular.

La relajación se produce cuando disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y como consecuencia la calmodulina queda libre de  $\text{Ca}^{2+}$  y se disocia del componente catalítico de la quinasa descrita, lo cual ocasiona su inactivación.

Existen procesos capaces de modular este mecanismo de contracción - relajación vía  $\text{Ca}^{2+}$  - calmodulina, que implican fosforilaciones proteicas reversibles mediadas por la estimulación del sistema de la adenil - ciclasa (242). La estimulación de esta enzima incrementa los niveles de AMP cíclico (AMPC) intracelular. Este nucleótido activa a una proteína quinasa dependiente de AMPC, la cual fosforilaría a la miosina quinasa. Así fosforilada, ésta es incapaz de ser activada por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$  - calmodulina. Tal secuencia de procesos celulares lleva a la relajación del músculo (fig. 5) (242).

### c. Regulación de la motilidad uterina:

El control de la función uterina es por fuerza complejo, ya que el mismo órgano debe proveer en forma secuencial las condiciones óptimas para la implantación del blastocisto, el crecimiento fetal y el parto. Estos requerimientos exigen la coordinación de las respuestas fisiológicas de los dos principales tejidos del útero: endometrio y miometrio. Es tal vez en el miometrio donde las complejes interacciones entre efectores esteroideos (estrógenos y progesterona) y no esteroideos (hormonas peptídicas, neurotransmisores y

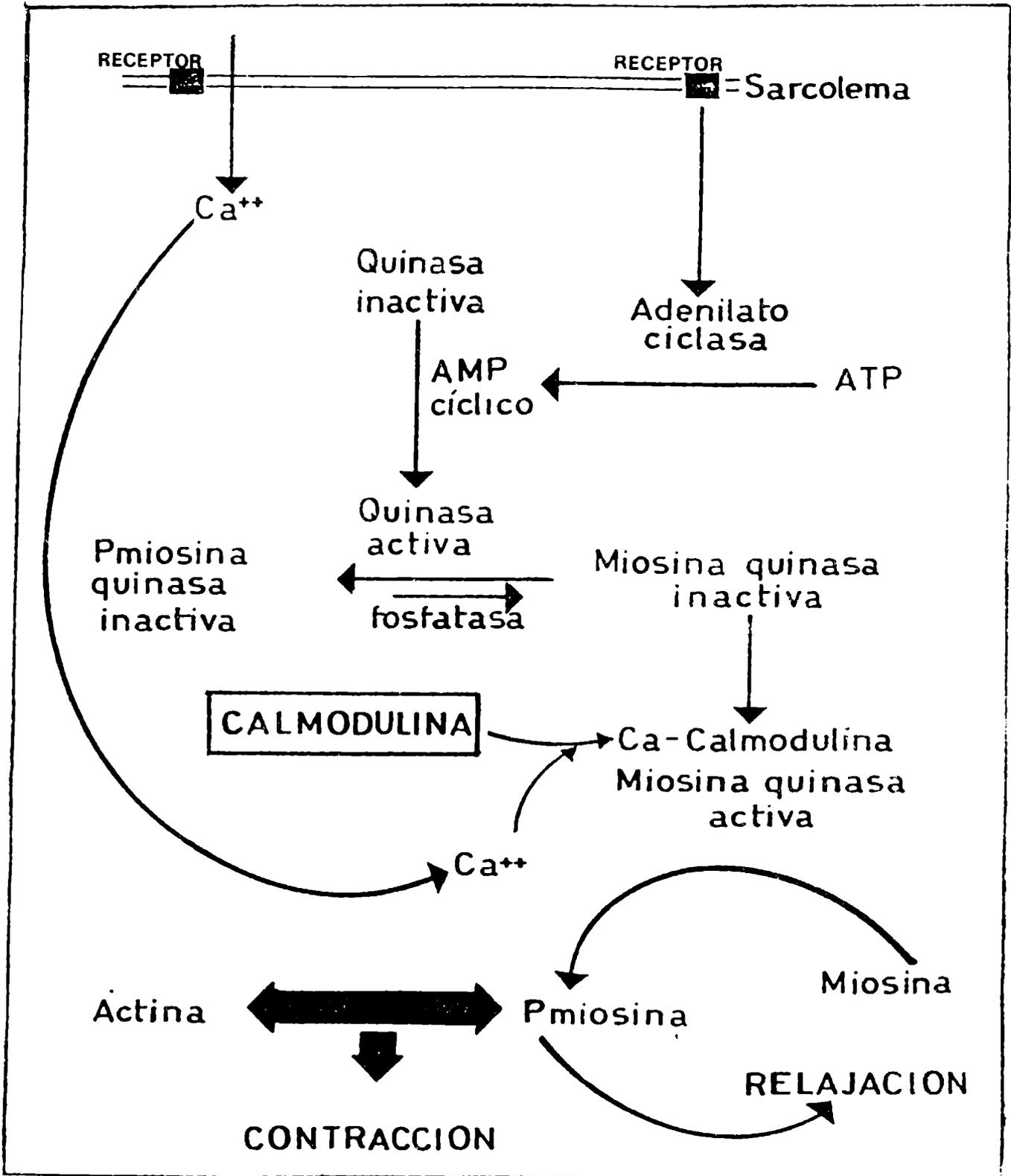


Fig. 5: Procesos que participan en la contracción y la relajación del músculo.

autacoides) pueden analizarse mejor, ya que los mecanismos de regulación estén dirigidos hacia un único proceso: la contractilidad (156). También, dado que la bioquímica de la contractilidad es conocida, se hace posible el análisis de los eventos a nivel molecular.

#### Hormonas esteroideas:

Bozler (31) descubrió que la administración de estradiol a ratas castradas aumentaba la motilidad espontánea y la excitabilidad eléctrica, y alteraba el potencial de membrana del útero. Posteriormente extendió sus estudios a otros mamíferos como el cobayo y el conejo con similares resultados similares. Estas investigaciones dieron origen, junto a las de Frank (81) y Reynolds (227), a la teoría iónica de la excitabilidad miometrial, que se basa en los cambios observados en la conductancia iónica de la membrana, asociados a la actividad miometrial (143).

Sin embargo, los datos más recientes demuestran, en conjunto, que los estrógenos inhiben la actividad miometrial tanto in vivo (66, 125) como in vitro (16, 257).

Teniendo en cuenta que los principales cambios bioquímicos y morfológicos inducidos por los estrógenos parecen estar mediados por los receptores intracelulares, varios estudios evidencian que el AMPc puede actuar como segundo mensajero en la acción estrogénica (17, 262). De hecho, dosis fisiológicas de estrógenos activan el aumento de los niveles intracelulares de AMPc, mientras que la cae

tracción los reduce (264).

No existe aún una interpretación inequívoca acerca del mecanismo mediante el cual los estrógenos provocan el aumento agudo del AMPc uterino. Teniendo en cuenta que los estrógenos producen la descarga de aminas en el útero de rata (186), es posible que dicho aumento ocurre como efecto secundario producido por la liberación de catecolaminas o histamina (264). No se han hallado evidencias que apoyen la hipótesis de la mediación por catecolaminas, pues la denervación o la depleción de las mismas mediante el tratamiento con 6 - hidroxil dopamina no interfiere con el efecto estrogénico sobre el útero de rata (254). Tampoco se han observado efectos con la administración del bloqueante beta - adrenérgico propanolol, si bien a dosis altas actúa como estabilizador de la membrana e impide la activación de la adenil - ciclasa (265).

Por otro lado, Szego y col. (263) han postulado la existencia de receptores para estrógenos en la membrana plasmática acoplados a una adenil - ciclasa, pero la evidencia que apoya esta hipótesis es aún incierta (17).

Durante el último período de la gestación y los primeros días de lactancia la motilidad uterina está aumentada y la condición es conocida como "útero dominado por el efecto estrogénico". Suzuki y Kuriyama (261) mostraron que la sensibilidad del miometrio de ratón

a la ocitocina aumentaba sólo durante el último estadio de la gestación, mientras que la sensibilidad a la prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) aumentaba gradualmente a partir de la mitad de la gestación. Resultados similares fueron obtenidos en la rata (160), sugiriendo que los cambios hormonales observados hacia el final de la preñez influyen en la sensibilidad del miometrio a la ocitocina y a la  $PGE_2$ .

En cambio, durante las fases tempranas e intermedias de la preñez el útero está dominado por el efecto de la progesterona (65, 85). Durante este período se producen muy pocas o ninguna contracciones; esta depresión de la motilidad uterina observada durante la preñez es conocida como "inactivación" o "bloqueo por progesterona" (52).

No obstante, la progesterona es incapaz de prolongar la preñez en algunas especies examinadas (54, 220). Además, los estrógenos suministrados junto con la progesterona aumentan la efectividad de la misma para mantener la preñez en la rata y el ratón ovariectomizados (157, 305). Este efecto sinérgico puede deberse a que la síntesis de receptores para progesterona requiere de estradiol (127). Estos resultados hablan en favor de la existencia de mecanismos e interacciones complejas en la modulación de la motilidad uterina por hormonas esteroideas (156).

#### Catecolaminas:

La inervación adrenérgica del útero de rata se halla aso

ciada a vasos sanguíneos y células musculares (206). Está constituida por las típicas neuronas post ganglionares largas, cuyos cuerpos celulares están en los ganglios lumbar y mesentérico; y por neuronas post ganglionares cortas, que tienen su origen en los ganglios pélvicos localizados en o cerca del órgano efector (113). Las neuronas adrenérgicas cortas parecen ser además características y abundantes en otras zonas del tracto reproductivo de la mayoría de los mamíferos, tales como las regiones ístmicas y ampulares de los oviductos (182).

En el miometrio se encuentran presentes receptores adrenérgicos de tipo alfa y beta. La estimulación beta adrenérgica produce relajación, mientras que la alfa adrenérgica provoca estimulación de la actividad miométrial (156). La "reversión adrenérgica", esto es, el cambio de una respuesta beta inhibitoria a una alfa estimulante, se observa en diversas especies y ha sido asociado a la influencia de hormonas esteroides (183). En el útero de rata preñada y no preñada se observa una respuesta beta inhibitoria, con una reversión hacia una respuesta alfa estimulante hacia el final de la gestación (27, 150, 177).

Es probable que los agonistas beta adrenérgicos ejerzan su efecto únicamente a través de la estimulación de una adenil - ciclasa (57).

Ludzik y col. observaron que la ovariectomía disminuye el

contenido de catecolaminas en el útero, mientras que la administración de estrógenos la aumenta (234); sin embargo, Mc Kercher y col, informan que el contenido de norepinefrina disminuye rápidamente después de la inyección de estradiol a ratas castradas, particularmente en los terminales adrenérgicos periarteriales (186). Existe además un cúmulo de evidencias de que las hormonas esteroides disminuyen la recaptación de catecolaminas en el útero de rata (29, 43).

El significado funcional de los efectos estrogénicos sobre el contenido o la recaptación de catecolaminas uterinas no ha sido aclarado. No existen indicios de que el útero necesite de las catecolaminas (ni aún del sistema nervioso periférico) para cumplir sus funciones normalmente: la denervación del útero no interfiere con los cambios observados durante el ciclo estral o la gestación (15), tampoco lo hace la depleción total de la norepinefrina uterina con 6-hidroxi dopamina (253). Por otro lado, en casi todas las especies estudiadas, el parto puede tener lugar después de un seccionamiento espinal completo (20).

#### Acetilcolina:

Garfield (84) ha demostrado la presencia de terminales nerviosos que contienen acetil colinesterasa en el útero de rata. En vista de que la presencia de acetil colinesterasa no es exclusiva de los terminales colinérgicos, este autor prefiere denominar "no adrenérgicos" a los terminales que contienen esta enzima. Los terminales

"no adrenérgicos" podrían contener también péptidos vasoactivos (VIP) o sustancia P (26, 277), aunque esta última no se encuentra presente en el útero de rata (6).

Los terminales que contienen acetilcolinesterasa se diferencian de los terminales adrenérgicos por su distribución y origen: provienen del ganglio cervical y se asocian a vasos sanguíneos y células musculares de la pared uterina, estando ausentes en el mesenterio (84). La inervación es de baja densidad.

La acetilcolina estimula las contracciones del útero (267), pero aún no ha sido demostrada su importancia fisiológica (84). Diamond y Hartle (63) estudiaron el papel del GMP cíclico (GMPC) en la respuesta colinérgica de la rata y el cobayo. En el útero de rata no se observaron variaciones en los niveles intracelulares de GMPC, mientras que en cobayo se observó un aumento del 120 % , que se presenta después de haberse obtenido la máxima respuesta contráctil.

Las evidencias acerca de la posible función de la acetilcolina como mediadora de la respuesta vascular del útero a los estrógenos distan mucho de ser concluyentes (254).

#### Ocitocina:

La ocitocina y otros octapéptidos relacionados son potentes agentes contráctiles en el útero. Apesar de que se han llevado

a cabo una gran cantidad de estudios, el papel de la ocitocina endógena en el proceso de parto normal de los mamíferos no está bien aclarado (228).

La sensibilidad del miometrio a la ocitocina varía con la concentración de esteroides circulantes: se ha demostrado que los estrógenos aumentan la respuesta, mientras que la progesterona la inhibe. La sensibilidad a la ocitocina aumenta durante la gestación en forma paralela a los niveles de estrógenos circulantes, y alcanza el máximo en el momento del parto (83, 208). Estas variaciones están asociadas con la concentración de sitios receptores específicos para ocitocina en el útero (228).

Varios autores han demostrado que la ocitocina estimula la liberación de prostaglandinas (PG's) por el útero, tanto in vivo (246) como in vitro (230). En particular, la ocitocina aumenta la liberación de PGF<sub>2</sub> alfa en el endometrio ovino (230). La ocitocina inhibe la unión del Ca<sup>2+</sup> al retículo sarcoplasmático (39) y evita el aumento de AMPc inducido por agonistas beta adrenérgicos (253).

Si bien el trabajo de parto puede ser iniciado y completado en ausencia de la glándula pituitaria y sin que sea necesaria la restitución hormonal con ocitocina (124), este péptido contribuye a completar el parto normal, y es responsable de los reflejos de dilatación del canal cervical y de la eyección de leche (91, 223).

### Angiotensina II:

La Angiotensina II (A II) es un octapéptido capaz de estimular las contracciones del músculo liso vascular y visceral (148, 225) y se ha revelado como un potente agente estimulador de las contracciones uterinas in vitro (214).

Se considera que el principal sitio de conversión de AI a AII es el pulmón (207), sin embargo, hay evidencias de que esta transformación puede ocurrir también en el útero (37).

Chaud y col. (44) demostraron que la respuesta contráctil del útero de rata a la AII depende parcialmente de la síntesis de PG's, y que la relación entre el efecto inotrópico de la AII y las PG's depende de los niveles estrogénicos, ejemplificando la compleja interacción de factores que existe en la regulación de la motilidad uterina.

### Prostaglandinas:

Son bien conocidos los potentes efectos estimulantes de las PG's sobre la motilidad uterina, aunque su importancia fisiológica no ha sido aún bien establecida.

El uso de inhibidores de la síntesis de PG's como la aspirina y la indometacina, prolonga la gestación (9) y anula las contracciones espontáneas in vitro y la liberación de PGF del útero de

rata aislado (296). También se observa un aumento en la sensibilidad a la  $\text{PGF}_2$  alfa a partir del día 19 de gestación (226); como, además, la liberación de PGF por el endometrio de rata aumenta gradualmente durante los últimos días de la gestación, alcanzando un pico en el día 22 (107, 281), es probable que esta PG tenga un papel preponderante o al menos coadyudante en la inducción del parto (172). El uso clínico de estos autacoides en la inducción del parto o el aborto es ampliamente conocido y está bien documentado (212).

Una importante característica de la síntesis de PG's es su regulación por hormonas esteroideas. Lima y col. (172) demostraron la presencia de mayores cantidades de material tipo PG's en extractos uterinos de ratas ovariectomizadas (OV) que en los de ratas en estro u OV tratadas con altas dosis de 17- beta- estradiol. A pesar de que el control hormonal de la síntesis y liberación de las PG's no está bien comprendido, parece involucrar tanto a los estrógenos como a la progesterona (14, 40, 102).

Cuando se examinó la influencia del estradiol y la progesterona sobre la generación de PG's del útero de rata no preñada en relación al perfil contráctil, se halló que los estados hormonales que presentaban mayor actividad espontánea eran simultáneamente los que generaban las más altas concentraciones de PG's tipo E (78). Durante el estro y el proestro se observa una liberación reducida de  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGI}_2$  que coincide con una disminución del nivel contráctil

y de la frecuencia de las contracciones (89), mientras que las con  
tracciones aumentadas y sostenidas que se detectan durante el di  
estro se correlacionan con un aumento de ambos autacoides. Los niveles  
de material tipo PGF también varían a lo largo del ciclo, pero su  
aumento en estro y no en proestro está acompañado de niveles contrácti  
les similares.

Por otro lado, la castración mejora la actividad espontá  
nea del útero de rata in vitro y aumenta la cantidad de PGE libera  
da al medio, mientras que la restitución hormonal con estrógenos re  
duce ambos parámetros (257).

Todos estos resultados indican que el control de la moti  
lidad uterina en la rata no preñada depende más de la liberación de  
la PGE<sub>2</sub> que de la PGF<sub>2</sub> alfa (257) (fig. 6).

#### Histamina:

La histamina (HA) ha sido relacionada con varias funciones  
reproductoras (62, 152). Se ha postulado que esta amina media algu  
nos de los efectos de los estrógenos en el tejido uterino (256, 262).  
La concentración de HA uterina se encuentra bajo control hormonal,  
variando en forma inversa a los niveles de estrógenos: está bien do  
cumentado que la administración de 17- beta- estradiol y análogos  
a ratas castradas produce depleción de la HA uterina en forma espe  
cífica (1, 255), y que los niveles del contenido de HA varían duran

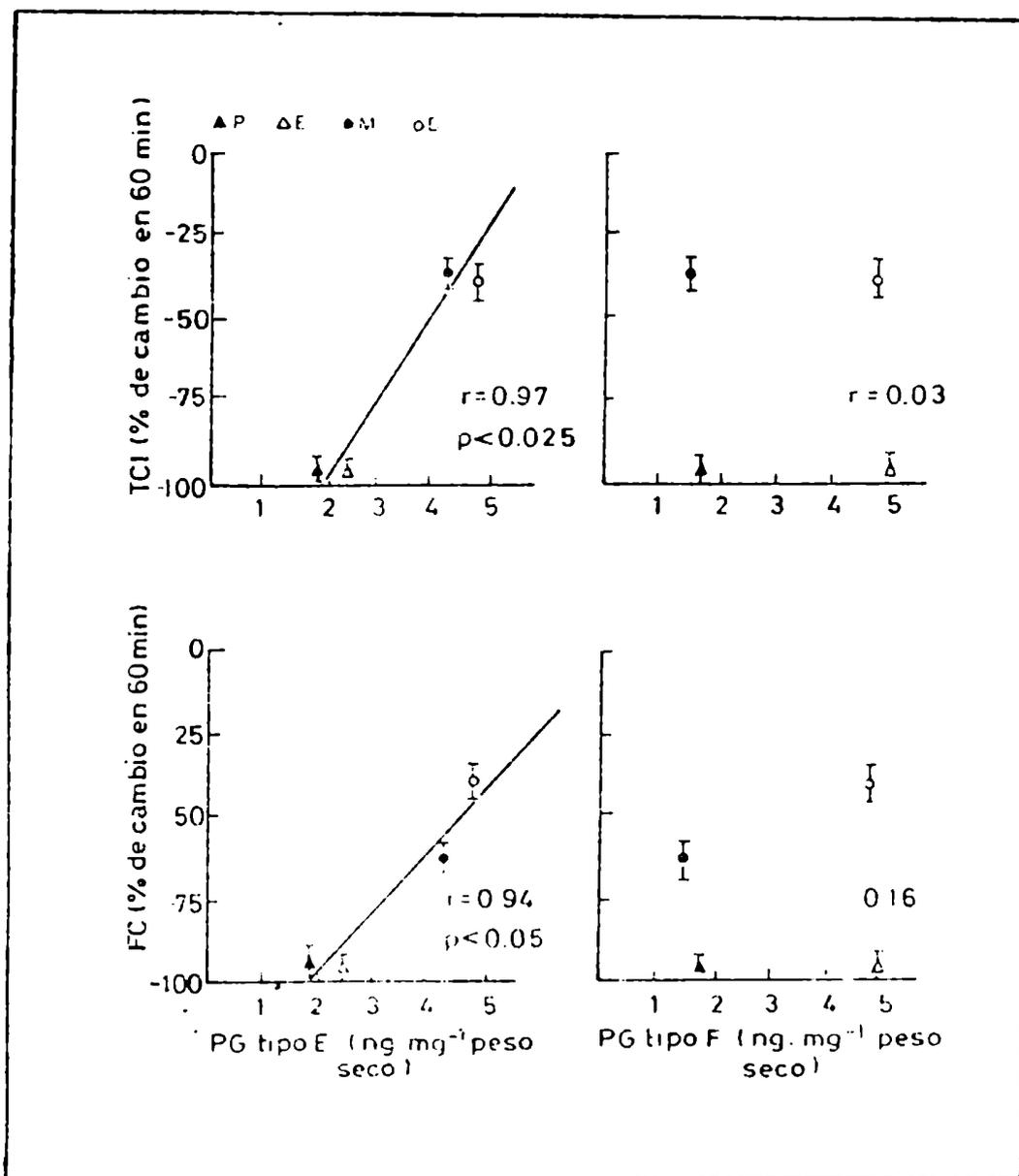


Fig. 6: Correlación entre los niveles de PG's liberados al medio y parámetros de la motilidad uterina. r: coeficiente de correlación lineal; FC: frecuencia de las contracciones; P: proestro; E: estro; M: metaestro y D: diestro. Tomado de Chaud (43).

te el ciclo estrol, siendo mínimos en el estro y máximos durante el diestro (144).

El mecanismo por el cual los estrógenos liberan la HA uterina es desconocido; parecen estar implicados los mastocitos (86) y el aumento de eosinofilia descrito por Tchernitchin (133) como respuesta temprana a la acción estrogénica en el útero (272).

La HA administrada in vivo aumenta la captación de estrógenos el útero de rata, sin modificar la captación de otros órganos efectores como la hipófisis o la vagina. Este efecto no se observa bajo condiciones in vitro, sugiriendo un mecanismo vascular (232).

La activación de los receptores histaminérgicos de tipo  $H_2$  inhibe la actividad miometrial tanto in vitro (11, 285) como in vivo (49, 139), y aumenta los niveles intracelulares de AMPc (187). Por otro lado, la HA aumenta la captación intracelular de  $Ca^{2+}$  en el útero de rata (26).

Aunque la mayor parte de estos hechos son conocidos hace tiempo, el significado fisiológico de la liberación de HA en el útero no ha sido estudiado en relación a la regulación de la motilidad de este órgano.

## 8. Histamina.

### 1. Generalidades:

La histamina (HA) es una imidazolamina ampliamente distribuida en los distintos tejidos animales (71). Entre sus principales efectos farmacológicos se encuentra la contracción o relajación del músculo liso, la estimulación de la secreción ácida gástrica y de otras secreciones exocrinas (91). Algunos de estos efectos, como la broncoconstricción y la contracción del intestino, pueden ser antagonizados por los antihistamínicos clásicos como la pirilamina, y se considera que estas respuestas están mediadas por la activación de receptores histaminérgicos de tipo  $H_1$ . Otros efectos, principalmente la secreción ácida gástrica y la relajación del útero de rata, no pueden ser bloqueados por aquellos antagonistas, pero sí por otros de desarrollo más reciente, como la cimetidina (33) y la ranitidina (50, 218); y se dice que estos efectos están mediados por la activación de receptores de tipo  $H_2$ .

Existen aún otros efectos, como la hipotensión debida a dilatación vascular, que parecen estar mediados por la activación de ambos tipos de receptores (153), ya que sólo pueden ser bloqueados por una combinación de antagonistas  $H_1$  y  $H_2$  (243). Por último, se ha sugerido la posibilidad de que existan subtipos del receptor  $H_2$  farmacológicamente discernibles (213); y receptores  $H_3$  presinápticos (9).

Muchas de las respuestas a la HA pueden ser claramente atribuidas a un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática que permite el flujo de iones inorgánicos (principalmente cationes) según gradientes electroquímicos, alterando así el potencial de membrana. Este mecanismo explica los efectos estimulantes de la HA en terminales nerviosos y células ganglionares (85). Por un mecanismo esencialmente similar se explica también la acción secretagoga de la HA sobre las células cromafines de la médula adrenal (64); y es probable que los efectos estimulantes del autacoide sobre el músculo liso se deban también a una acción sobre la membrana plasmática tal que facilite la entrada de  $Ca^{2+}$  (135).

El mecanismo de acción de la HA involucrado en la relajación del músculo liso no ha sido aún dilucidado. Está demostrado que la acción relajante de la HA sobre el útero de rata aislado persiste aún cuando la membrana es despolarizada en una solución Ringer-potasio (26). Parece probable, pues, que el efecto de la HA sobre la membrana sea independiente de la polarización de la misma. La HA interferiría con el flujo o las funciones normales del  $Ca^{2+}$ , aunque la reducción de la entrada de  $Ca^{2+}$  podría estar solamente acompañando alguna otra acción de la HA, y podría no ser el principal mecanismo responsable de la relajación (26).

También ha sido estudiada la relación entre los receptores  $H_2$  y la actividad de una adenil-ciclasa (187), hallándose en el caso de la secreción ácida gástrica (188), en el parénquima pulmonar de

cobayo (78), en homogenatos de cerebro de mamífero (111), en el músculo cardíaco (58), en el útero de rata (187) y en la inducción de la lipólisis en células adiposas (99) una estrecha correlación entre los niveles intracelulares de AMPc y la activación de los receptores  $H_2$ .

## 2. Estructura química:

La HA (5-(2-aminoetil)-imidazol, o beta imidazoletilamina), puede formarse por descarboxilación del aminoácido histidina (fig. 9).

Los compuestos con actividad histaminérgica consisten en pequeños anillos heterocíclicos que contienen nitrógeno, a los cuales se unen cadenas laterales 2- aminoéticas. Black y col. (23) estudiaron la actividad de los metil-derivados de la HA, en preparaciones con respuesta  $H_1$  ó  $H_2$  (fig.7). La metilación del amino terminal tiene poco efecto; la metilación de los carbonos alfa y beta y la sustitución de los nitrógenos 1 ó 3 del anillo da lugar a compuestos inactivos; mientras que la metilación del anillo en posición 2 ó 4 tiene efectos diferenciales sobre la actividad. La metilación en 2 anula el efecto  $H_2$ , mientras que la metilación en 4 anula el efecto  $H_1$ .

A partir de estos resultados, Black y col. desarrollaron los antagonistas  $H_2$  específicos burimamida, metiamida y cimetidina (fig. 8). La estructura básica de todos ellos es similar a la de la

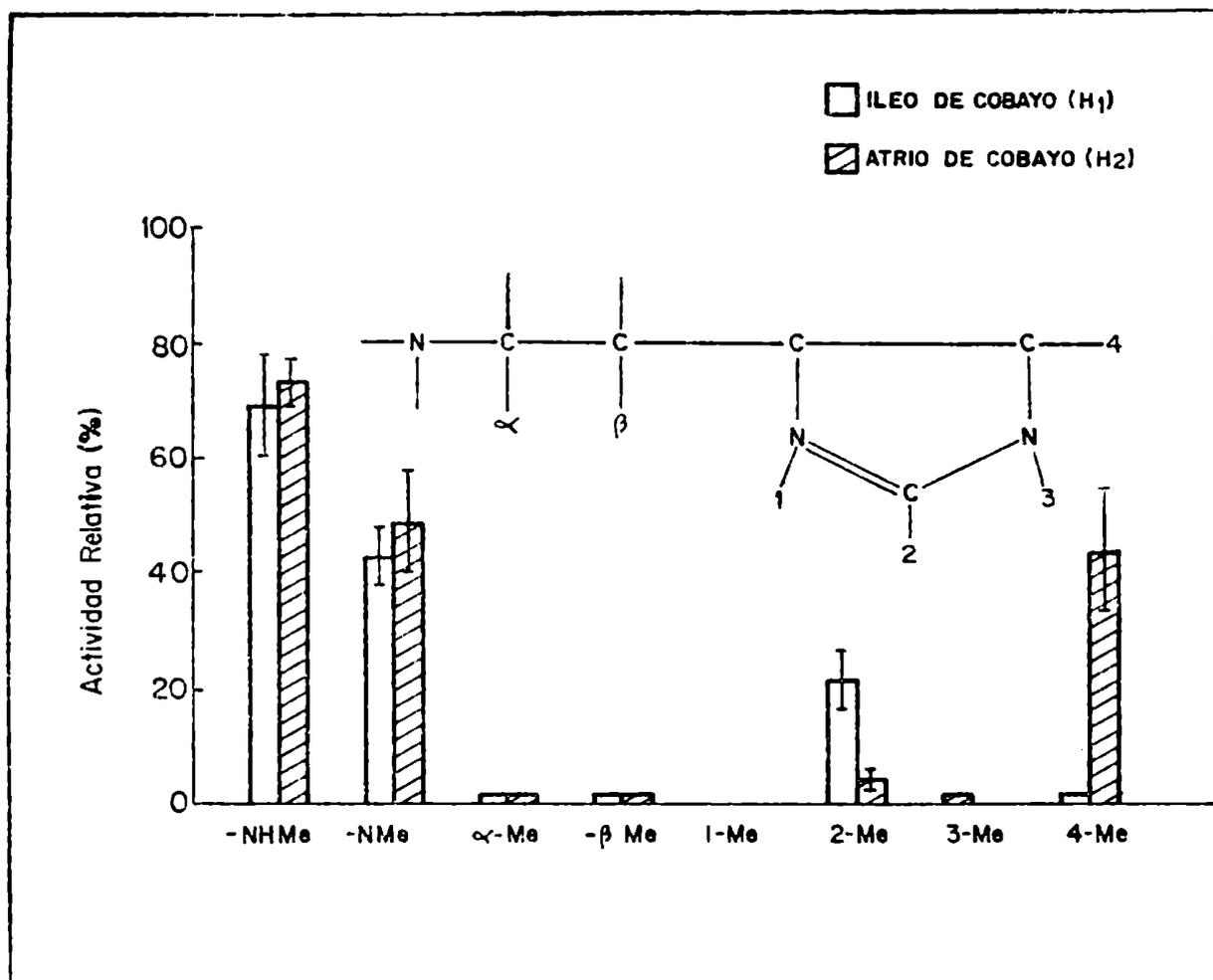


Fig.7: Actividad comparada de algunos metil-derivados de la HA (tomado de Black y col. (23)).

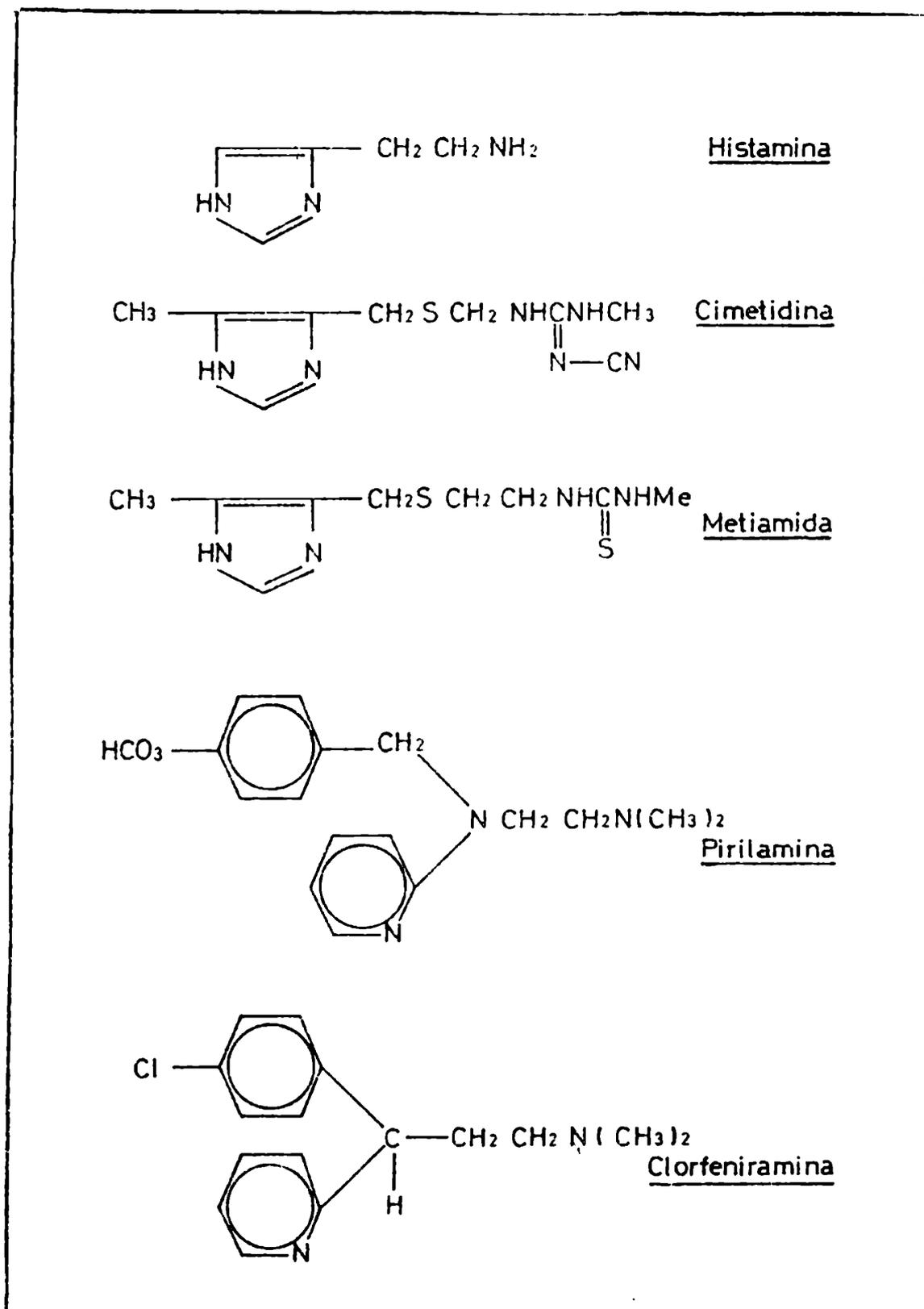


Fig. 8: Estructura de la HA y de antagonistas  $H_1$  y  $H_2$ .

HA, pero se caracterizan por el alargamiento de la cadena lateral y la presencia de puentes disulfuro y otros sustituyentes en el caso de la metilamida y la cimetidina (33).

Los antihistamínicos clásicos ( $H_1$ ) tienen una estructura fundamental característica, formada por una etilamina suatituida (179). En ella, los hidrógenos del grupo amino están generalmente reemplazados por metilos, mientras que en el otro extremo se encuentran en general dos grupos cíclicos, generalmente benceno o piridina, que a su vez pueden presentar sustituciones. Según el tipo de la unión de estos grupos cíclicos y el etilo de la amina, los antihistamínicos se pueden clasificar en cinco grupos, cada uno de los cuales tiene una característica farmacológica común.

Estos grupos son:

- 1) Derivados de la etanilamina (difenhidramina).
- 2) Derivados de la etilendiamina (pirilamina, fig.8).
- 3) Derivados de la piperazina (clorociclizina).
- 4) Derivados de la fenotiazina (prometazina).
- 5) Alquileminas (clorfentemina, fig. 8).

### 3. Origen, síntesis y almacenamiento:

En los mamíferos, todos los tejidos que contienen HA son capaces de sintetizarla a partir de la histidina (fig. 9), incluso

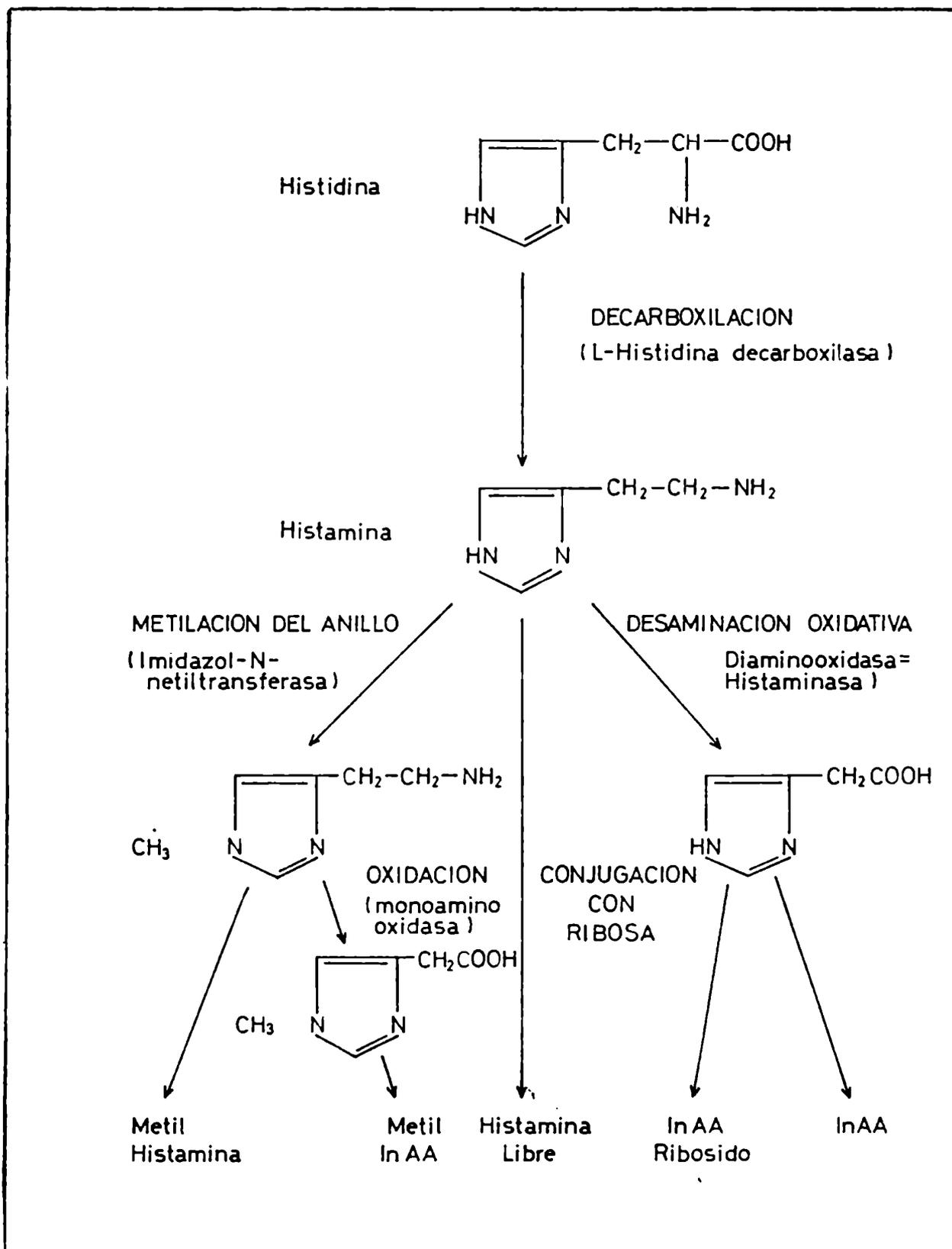


Fig. 9: Vías de síntesis y metabolismo de la HA.

ve los glóbulos blancos. En el proceso in vivo la enzima más importante es la histidina decarboxilasa, específica para el sustrato L-histidina. In vitro la conversión de HA puede ser catalizada por la DBPA-decarboxilasa.

En la mayoría de los tejidos la HA se encuentra almacenada en los mastocitos y, en el caso de la sangre, en las células basófilas. Estas células sintetizan HA y la almacenan, junto con otras sustancias mediadoras preformadas (tabla 1) (249). Un esquema hipotético de los mecanismos involucrados en la liberación de estos mediadores se muestra en la fig. 10. El "turnover" de la HA preformada es lento; cuando un tejido rico en HA es depletado, puede tardar días en reponer sus reservas (229).

Los mastocitos y basófilos no son de ninguna manera la única fuente de HA. Esta amina está presente en cantidades sustanciales en la epidermis humana, el sistema nervioso central y la mucosa gastrointestinal. En estos sitios, al contrario de lo que ocurre con los mastocitos, el turnover de la HA es rápido y ésta es liberada más que almacenada. Como la L-histidina decarboxilasa es una enzima inducible, la capacidad de síntesis de HA de estos tejidos podría estar sujeta a regulación (136).

#### 4. Metabolismo:

En el hombre existen dos vías principales para el metabo

---

- TABLA 1 -

---

MEDIADORES PREFORMADOS	MEDIADORES SECUNDARIOS
_ Histamina	_ PGD <sub>2</sub>
_ Serotonina	_ Leucotrienos C, D, E
_ Factores quimiotécticos de eosinófilos y neutrófilos	(SRb - A)
_ Enzimas lisozomales	_ Factor activador de plaquetas (PAF)
Proteolíticas	
Exoglicosidasas	
Arilsulfatasas	
_ Heparina	

---

Tabla 1: Mediadores liberados por los mastocitos.

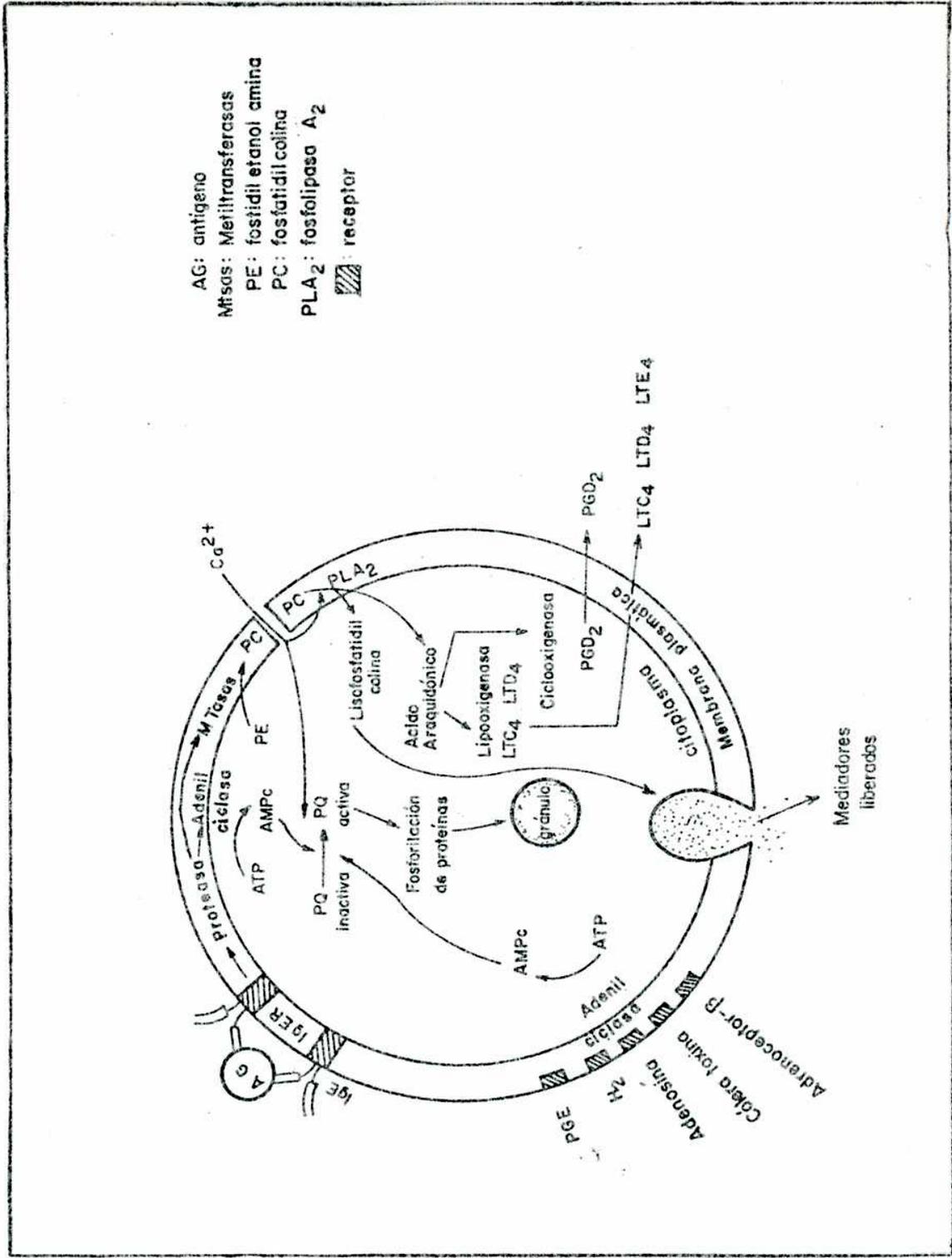


Fig. 10: Esquema hipotético de la liberación de HA de los mastocitos (tomado de Siraganian, (249)).

lismo de la HA (fig. 9). La más importante de ellas requiere la metilación del anillo, catalizada por la histamina- N- metiltransferasa (Imidazol- N- metiltransferasa). La mayor parte de la metilhistamina producida es convertida por la mono- aminooxidasa (MAO) en ácido metilimidazol acético.

En la otra vía, la HA sufre una deaminación oxidativa catalizada por la diamono-oxidasa (DAO), también llamada histaminasa, que es en realidad un conjunto de enzimas no específicas presentes en la mayoría de los tejidos, que deaminan aminas alifáticas o aromáticas. Los productos de esta vía son el ácido imidazol acético y eventualmente su ribósido.

Los metabolitos de la HA, de actividad biológica escasa o nula, son excretados por la orina. En general, la inactivación de la HA en el organismo es muy rápida, lo cual explica la fugacidad de su acción cuando se administra por vía parenteral y su escasa actividad por vía digestiva.

La actividad de la DAO aumenta marcadamente durante el primer tercio de la preñez y permanece alta hasta el parto. Se origina en la placenta, pero su función es incierta (275). Niveles altos de la enzima acompañan también al carcinoma medular tiroideo (18).

## 5. Funciones de la Histamina endógena:

### a. Anafilaxis y alergia:

La HA es una de las principales sustancias mediadoras de las reacciones de hipersensibilidad inmediata. La reacción se inicia con la unión de un antígeno específico a una inmunoglobulina E (IgE) unida a la membrana plasmática de mastocitos o basófilos; el antígeno interactúa luego con otra IgE, produciendo como resultado el acople de dos moléculas (fig. 10). La agregación de los receptores para IgE activa las enzimas transmetilantes que producen la metilación de los fosfolípidos y la formación de fosfatidilcolina. Como resultado de este proceso se abren los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  activa a una fosfolipasa  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) que libera ácido araquidónico y lisolecitina de la fosfatidilcolina o el fosfatidilinositol. La lisolecitina actuaría como fusógeno, promoviendo la fusión de la membrana y con ello la liberación de los gránulos de HA.

El ácido araquidónico liberado en el proceso es metabolizado para producir PG's (principalmente PGD<sub>2</sub> en el caso de los mastocitos) y leucotrienos (sustancias de reacción lenta de la anafilaxis).

La HA liberada actúa sobre receptores específicos locali

zados en la membrana plasmática de las células endoteliales, especialmente a lo largo de vénulas post-capilares de 20 - 30  $\mu$ m de diámetro (10). La HA produce contracción de las células endoteliales, estableciéndose así un espacio entre las células adyacentes que permite al plasma filtrarse hacia el tejido circundante. Junto con la HA, son responsables de los fenómenos fisiológicos asociados a la reacción de anafilaxis (vasodilatación, picazón y formación de edema) los derivados del ácido araquidónico y quizás también otros autacoides (306).

#### b. Regulación de la microcirculación:

Schayer (240) ha sugerido que la HA inducida (la cual no es almacenada en mastocitos o basófilos sino que es sintetizada e inmediatamente liberada) puede ser el agente vasodilatador en las reacciones de hiperemia, hiperemia debida al ejercicio o la calentamiento moderado de un tejido; de la vasomotilidad espontánea (apertura y cierre de esfínteres precapilares y otros músculos lisos) y de las respuestas lentas de vasodilatación observadas en situaciones de stress y en la fase lenta de la respuesta inflamatoria.

Esta hipótesis está sujeta a controversia, y los factores que regulan la microcirculación son aún un enigma complejo (307).

#### c. Secreción ácida gástrica:

La naturaleza e importancia de la HA como mediadora fisiol

lógica de la estimulación de la secreción ácida gástrica ha sido objeto de intensos debates y controversias. El advenimiento de los bloqueantes  $H_2$  ha permitido acumular nuevas evidencias: estas drogas son capaces de reducir la secreción ácida gástrica no sólo en respuesta a la HA sino también cuando es estimulada por la ingesta o la pentagastrina (23).

La información disponible acerca de la naturaleza de las células que contienen o producen la HA y sus relaciones con las células parietales productoras de ácido es aún incompleta (101).

d. Sistema nervioso central:

Con excepción de ciertas áreas, los mastocitos están ausentes en el sistema nervioso central, y la HA allí presente debe residir en algún otro componente. La distribución de la HA en el cerebro es muy irregular y recuerda a la de otras aminas endógenas: la concentración es mayor en el hipotálamo, intermedia en el cerebro medio y baja en la corteza y la materia blanca. La distribución subcelular indica la presencia de esta imidazolamina en terminales nerviosos.

En el cerebro están presentes las enzimas para la formación (L- histidina decarboxilasa) y la inactivación (N- metil transferasa y MAO) de la HA (241). También, la HA puede ser liberada en el tejido cerebral mediante estímulos despolarizantes (270), y este e

fecto requiere la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas observaciones, sumadas al hecho de que la HA introducida en el cerebro posee una variedad de efectos y de que varios antihistamínicos poseen evidentes acciones a nivel central (151), sugieren que la HA puede ser un neurotransmisor en el sistema nervioso central.

e. Crecimiento tisular:

Kahlson y col. (137) observaron que la inhibición de la L-histidina decarboxilasa detiene el desarrollo fetal en la rata y, a la inversa, las drogas que aumentan la capacidad de síntesis de HA en los tejidos aceleran la curación de las heridas. Muchos tejidos sujetos a crecimiento rápido o reparación (como los tejidos embrionarios, el hígado y la médula ósea) presentan una elevada capacidad de síntesis del autacoide, lo cual ha conducido a estos autores a sugerir que la HA inducida o "naciente" podría jugar algún papel en los procesos anabólicos.

Sin embargo, resultados acumulados en trabajos posteriores evidencian que esta función no sería general, por cuanto los fetos de ratón, conejo, hamster, gato, vaca y cerdo forman poco o nada de HA (140).

Ultimamente se ha sugerido la existencia de una relación entre los tumores malignos y la HA (245).

f. Aparato reproductor femenino:

Szego y col. (262) llevaron a cabo una extensa serie de experimentos tendientes a demostrar que la liberación local de HA en el útero y el ovario media los efectos de los estrógenos y la LH respectivamente sobre éstos órganos. Observaron que la liberación de HA era un paso obligatorio para que se presentara la hiperemia inducida por los estrógenos en el útero de rata OV; y que efectos metabólicos atribuibles a la acción estrogénica, como la incorporación de aminoácidos marcados y la estimulación de la actividad mitótica, podían ser reproducidos mediante la administración intraluminal de HA.

Basándose en que la administración intravenosa de LH a ratas inmaduras producía también la liberación local de HA en los ovarios (266), estos autores sugirieron que la liberación de aminas vasoactivas en los órganos blanco era un mecanismo generalizado, común tanto a hormonas de naturaleza peptídica como lipídica.

Independientemente de la validez de esta hipótesis, la HA es reconocida como un importante mediador en el proceso de ovulación (69), por cuanto los antihistamínicos de tipo  $H_1$  son capaces de inhibir la ovulación en el conejo, tanto in vivo como in vitro (288).

También existen evidencias de que la HA endógena juega un papel importante en la implantación del blastocisto. El útero exhibe una permeabilidad vascular aumentada en el sitio de implantación,

que parece deberse a la acción de HA y PG's. En el conejo, la implan  
tación puede ser inhibida por el bloqueo de la L- histidina decarboxi  
lase (60) o por la depleción previa de los mastocitos (62). Además,  
se encuentran receptores para HA tanto en los blastocistos como en  
la membrana endometrial (61), y el blastocisto de conejo posee la  
capacidad de sintetizar el autacoide (60).

## C. Prostaglandinas.

### 1. Generalidades:

Las prostaglandinas son ácidos grasos insaturados, producidos por todas las células de mamíferos con la posible excepción de los glóbulos rojos maduros (120). Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino animal (198) y pueden estar presentes también en vegetales (38). Al igual que el calcio y los nucleótidos cíclicos, pueden ser moléculas reguladoras de fundamental importancia en la mayoría de las formas de vida. Se las denomina prostaglandinas (PGs) debido a que fueron descubiertas por von Euler en el plasma seminal humano (238).

Las PGs son derivados de una sustancia hipotética, el ácido prostanoico (fig.11). Cada compuesto posee un anillo ciclopentano y dos cadenas laterales. Las PGs naturales se dividen en dos familias principales. La serie 1, con un doble enlace en una de las cadenas laterales, deriva del ácido dihomogamalinolénico (DGLA); (ácido 8,11,14-eicosatrienoico). La serie 2, con dos dobles enlaces en la cadena lateral, se deriva del ácido araquidónico (AA); (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico). Existe también una tercer serie derivada del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentenoico, pero hasta el momento se sabe muy poco sobre su relevancia (74).

La estructura del anillo sirve de base para otro sistema

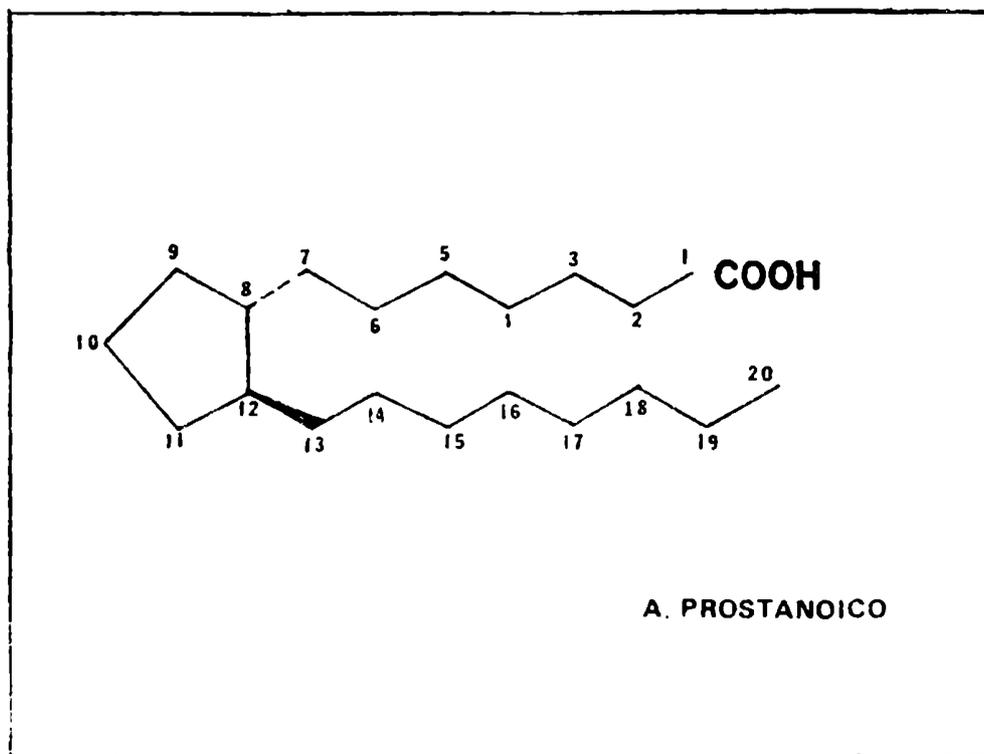


Fig. 11: El ácido prostanoico, hipotético precursor de las PG's.

de clasificación de las PG's. Existen seis grupos clásicos de PG's clasificados en base a los sustituyentes del ciclopentano; A, B, C, D, E, y F (fig. 12). Además, se han descrito recientemente otras tres clases de prostanoïdes:

\_ Endoperóxidos: Presentan dos átomos de oxígeno derivados de la misma molécula de oxígeno, unidos en posición 9 y 11 del ciclopentano. La PGH<sub>2</sub> (también llamada PGR<sub>2</sub>) tiene cadenas laterales similares a las de las PGs clásicas, mientras que la PGG<sub>2</sub> tiene un oxígeno extra entre el carbono 15 y el grupo hidroxilo (103,236).

\_ Tromboxanos: Se derivan de los endoperóxidos y tienen un átomo de oxígeno inserto en el anillo (104).

\_ Prostaciclina: En este compuesto hay un puente de oxígeno entre el carbono 9 y el 6 de la cadena lateral (131,195).

## 2. Biosíntesis:

La fig. 13 muestra la estructura de los principales prostanoïdes, mientras que la fig. 14 esquematiza las vías de biosíntesis. Las PGs derivan de ácidos grasos esenciales de la familia del ácido linolénico (AL). El AL, el ácido gama linolénico (GLA) y el AA son ácidos grasos esenciales que deben suministrarse en la dieta para evitar trastornos funcionales (32).

El LA puede sufrir desaturación a GLA y éste a su vez elongación a DGLA. Este último se convierte en AA por acción de una

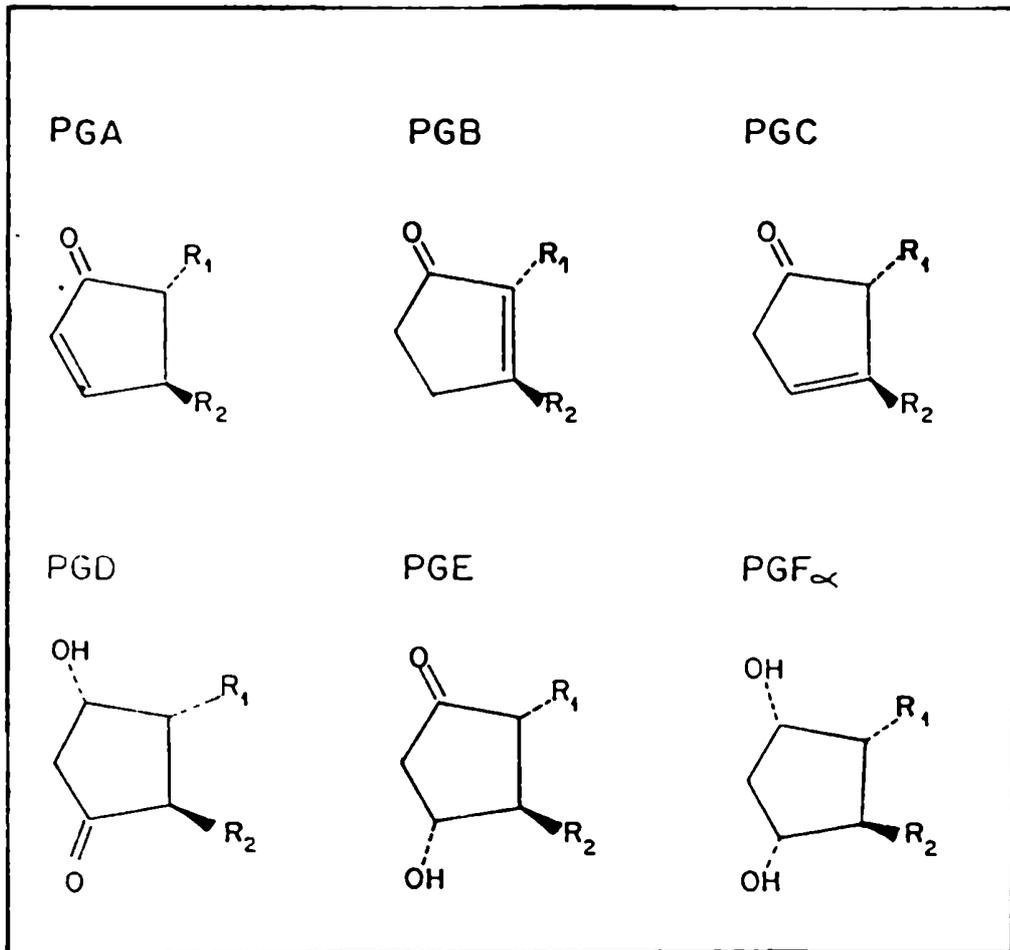


Fig. 12: Ciclopentanos de las distintas PG's.

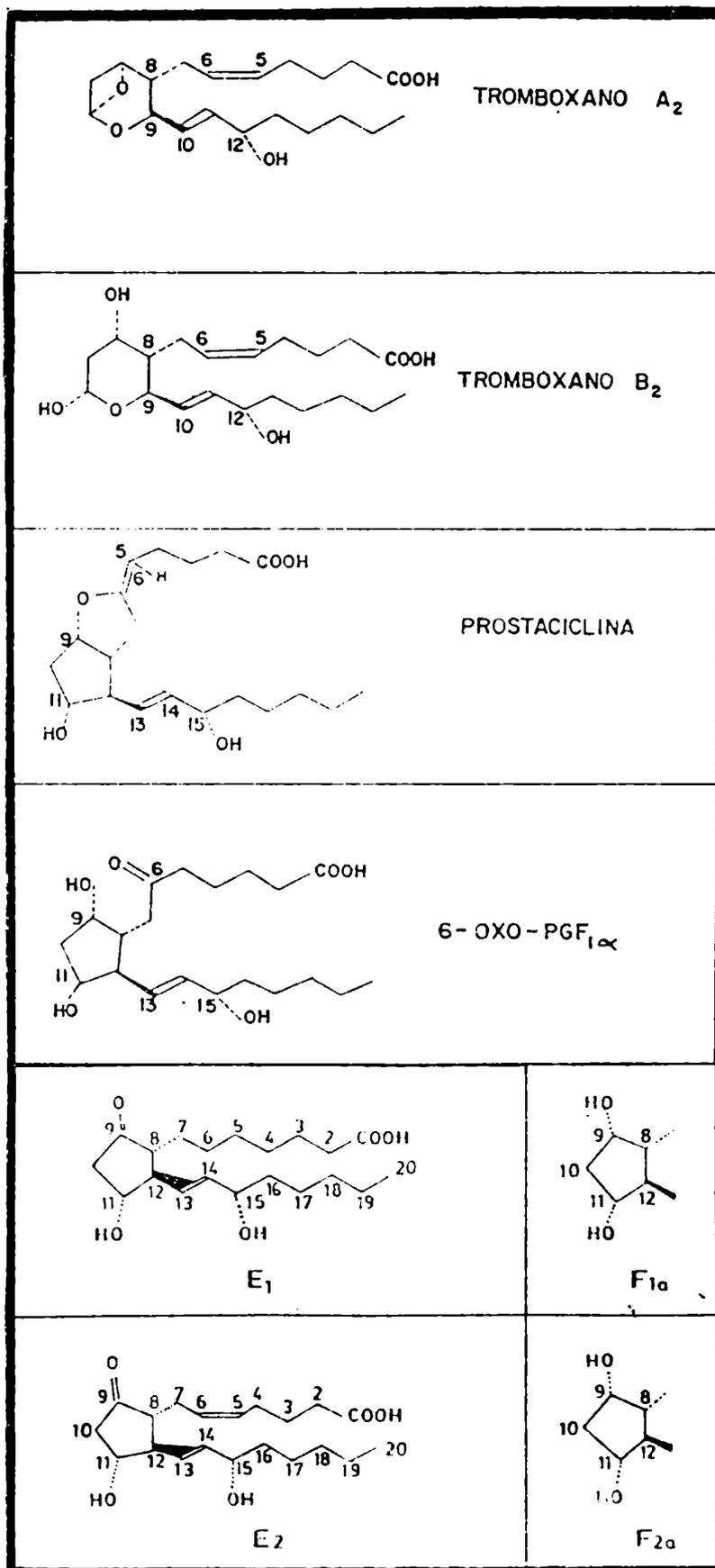


Fig. 13: Estructura de los principales prostanoides.

delta 5- 6 desaturasa (224).

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 (78). Por lo tanto, para que suceda la síntesis de PG's es necesario liberar el sustrato, reacción que es catalizada por un grupo de enzimas acilhidrolasas, como la fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ) y la triglicérido lipasa (161).

El primer paso en la metabolización del  $\Delta$ GLA o el AA es la conversión al endoperóxido PGG. Esto requiere dehidrogenación, ciclización, formación del puente de oxígeno e hidroperoxidación en el carbono 15. El último paso es catalizado por una lipoxigenasa y los tres primeros por un complejo enzimático llamado cicloxigenasa (194). No se sabe si el complejo cicloxigenasa está compuesto por varias enzimas o si se trata de una única enzima con múltiples sitios. La PGG puede ser convertida a PGH por otra enzima, la PGG - PGH reductasa. Los endoperóxidos son compuestos altamente inestables y sus interrelaciones no están aún bien aclaradas.

Hay por lo menos siete prostanoídes de la serie 2 que pueden formarse a partir de los endoperóxidos, y aparentemente éste es un punto crítico en la síntesis de PG's. Los compuestos de la serie 1 no están todavía bien caracterizados. Los principales compuestos

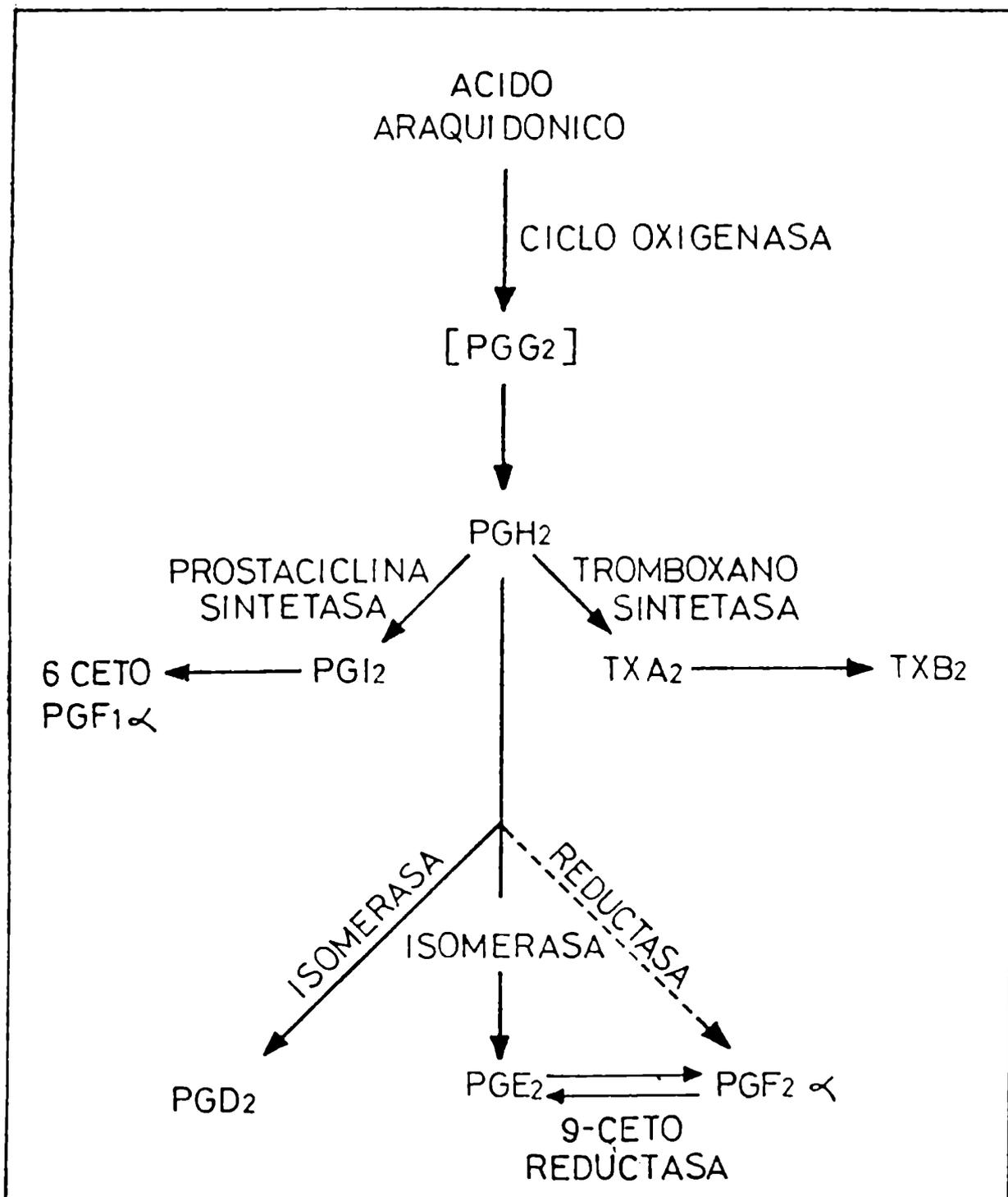


Fig. 14: Cascada del ácido araquidónico.

de la serie 2 son:

- \_  $\text{PGE}_2$  : se forma enzimáticamente (194).
- \_  $\text{PGF}_2$  alfa : Probablemente se forma de manera no enzimática (120); sin embargo, Watanabe (289) y Wong (300), trabajando independientemente, aislaron una enzima que cataliza la conversión de  $\text{PGD}_2$  a  $\text{PGF}_2$  alfa y que está presente en el pulmón de la rata y la vaca, y también en el hígado de conejo. La enzima, denominada  $\text{PGD}_2$  11-ceto reductasa o  $\text{PGF}$  sintetasa, puede catalizar también la conversión de  $\text{PGH}_2$  a  $\text{PGF}_2$  alfa (290).
- \_  $\text{PGD}_2$  : se forma enzimáticamente.
- \_ Prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) : formada por la  $\text{PGI}_2$  sintetasa (67, 72).
- \_ Tromboxano  $\text{A}_2$  ( $\text{TXA}_2$ ) : formado por la  $\text{TXA}_2$  sintetasa (197, 202).
- \_ Malondialdehído (MDA) : Deriva en parte de la  $\text{PGH}_2$  y en parte del  $\text{TXA}_2$ , pero el modo en que se forma no está totalmente aclarado (299).
- \_ Ácido 12 L-hidroxi- 5, 8, 11-heptadecatrienoico (HHT) (299).

La conversión a endoperóxidos no es la única vía para el metabolismo del AA. Una fracción sustancial puede ser metabolizada por la vía de la lipoxigenasa, primero a ácido 12 L-hidroperoxi-5, 8, 11, 14-eicosatetraenoico y luego a ácido 12 L-hidroxi- 5, 8, 11, 14- eicosatetraenoico (HETE) (120).

### 3. Metabolismo:

Se han descrito un gran número de vías metabólicas. Las más relevantes son las siguientes (fig. 15) :

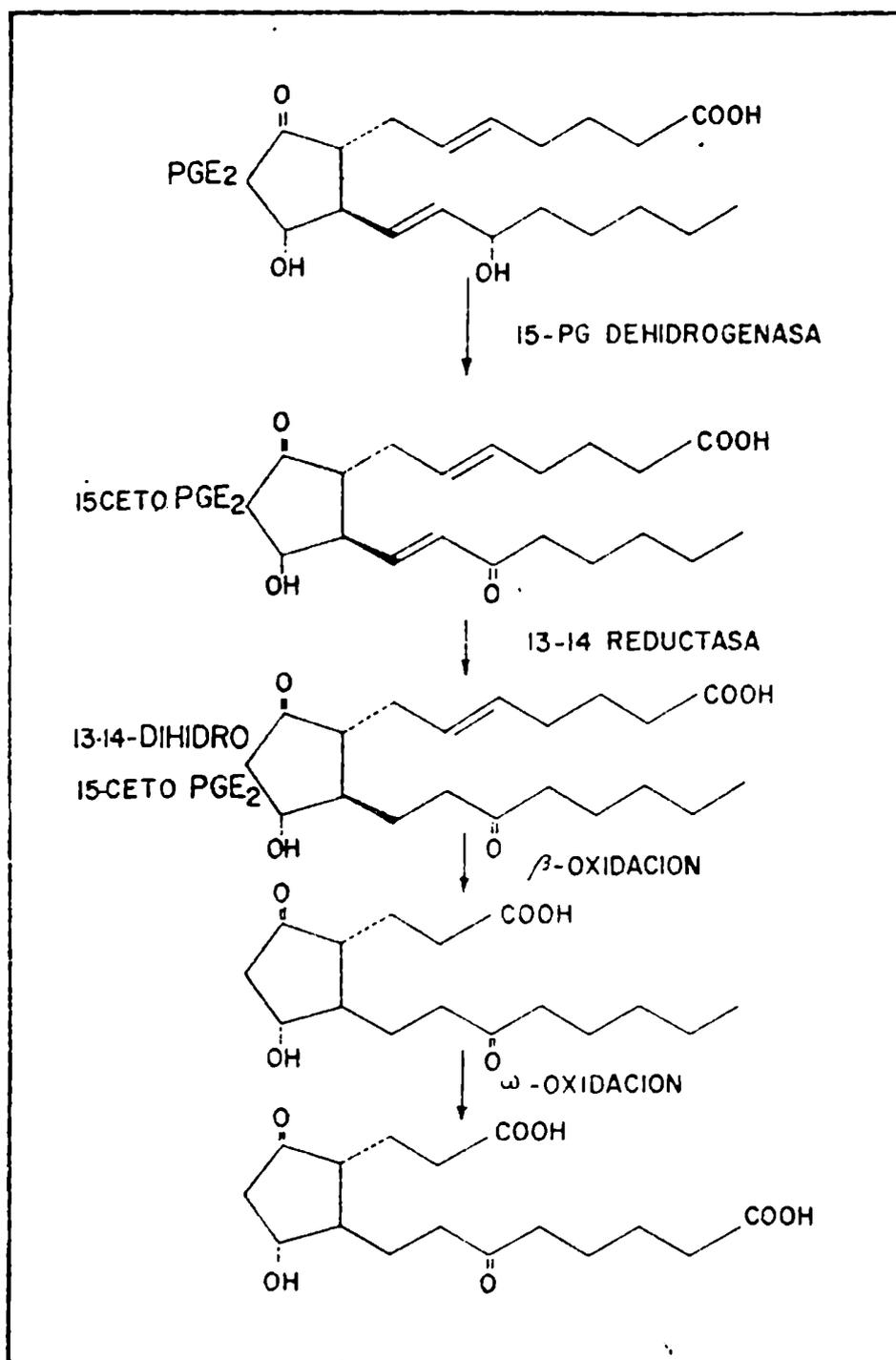


Fig. 15: Vías metabólicas de las PG's.

1) Deshidrogenación del grupo hidroxilo C 15 para dar compuestos 15-ceto por la 15-hidroxi dehidrogenasa: esta enzima está ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos y requiere NAD o NADP como coenzima (167). Es quizá la principal responsable de la extremadamente eficaz destrucción de la actividad biológica de las PG's E y F en el pulmón, aunque también se encuentra en concentraciones altas en el hígado y riñón.

2) Reducción del doble enlace C 13 por la PG delta 13-reductasa: en muchas ocasiones esta reducción sigue a la deshidrogenación, a pesar de que no siempre ocurre así. Como resultado de la reducción se forman dihidrocetoderivados, los más importantes metabolitos en la circulación periférica (237).

3) Beta oxidación: consiste en la eliminación no específica de dos fragmentos de 2 carbonos del extremo carboxílico de la molécula, que puede ocurrir en cualquier ácido graso (189). La eliminación de un fragmento de un dinor derivado, mientras que la eliminación de dos fragmentos da un tetranor derivado. Por lo general, esta reacción sigue a la 1 y/o la 2.

4) Omega hidroxilación : sigue generalmente a la beta oxidación. Consiste en la inserción de un grupo hidroxilo en el extremo omega de la molécula. Los omega hidroxiderivados son los metabolitos de mayor concentración en la orina (126).

5) El  $\text{TXA}_2$  es una sustancia altamente inestable, de una vida media de aproximadamente 30 segundos en soluciones buffer. Se convierte de manera no enzimática en  $\text{TXB}_2$ , mucho más estable pero relativamente inerte. Se excreta en parte como  $\text{TXB}_2$  y en parte como dinor  $\text{TXB}_2$  (149).

6) La  $\text{PGI}_2$  es también inestable y se convierte, en parte por la acción de la 15-hidroxi-PG deshidrogenasa, en 6-ceto  $\text{PGF}_1$  alfa (273). No obstante, la 6-ceto  $\text{PGF}_1$  alfa no es el principal metabolito de la  $\text{PGI}_2$ , sino que aquel sería un producto de degradación química. En el riñón, el producto principal es el ácido 4, 13- diceto -7,9- dihidroxidiorprostanico, formado por la acción sucesiva de la 15- hidroxi- PG deshidrogenasa, la PG delta-13-reductasa y las beta oxidasas (154). Una pequeña cantidad es convertida en dinor 6-ceto  $\text{PGF}_1$  alfa, mientras que en los vasos sanguíneos el único producto identificado hasta ahora es el 6, 15-ceto  $\text{PGF}_1$  alfa, formado por acción de la 15-dihidroxi-PG deshidrogenasa (302).

#### 4. Interconversión de PG's:

Las PG's pueden convertirse unas en otras, mediante reacciones catalizadas enzimáticamente o no. La interconversión más importante es la de PGE a  $\text{PGF}_1$  alfa, a través de la acción de una 9-ceto-reductasa NADPH dependiente. La reacción es potencialmente reversible; y la enzima parece ser estimulada por bradiquinina (168, 303).

Franchi y col. (80) demostraron la presencia de la enzima en el útero de rata: en este sistema la actividad de la 9-ceto-reductasa puede ser aumentada mediante la administración de dosis farmacológicas de 17-beta-estradiol.

##### 5. Regulación de la síntesis de PG's :

Los precursores de las PG's, el AA y el DGLA, se encuentran esterificados en distintos tipos de lípidos; son especialmente importantes los fosfolípidos. El complejo enzimático de la ciclooxigenasa no puede actuar sobre los ésteres, de modo que los ácidos grasos deben ser primero liberados. La fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) tiene un papel preponderante en la síntesis de PG's porque los fosfolípidos son la principal fuente de AA. Sin embargo, no sólo la PLA<sub>2</sub> libera AA. En ovario, por ejemplo, hay una colesterol esterasa estimulada por LH que libera araquidonato (158).

Existe también un mecanismo secuencial de liberación del AA en plaquetas, que consiste en la estimulación de una fosfolipasa C, que fosforila a un diglicérido, resultando la formación de un ácido fosfatídico que sería el activador de la PLA<sub>2</sub> (166).

Es probable que el factor crítico en la regulación de la actividad de PLA<sub>2</sub> sea la disponibilidad de Ca<sup>2+</sup>. Los ionóforos de Ca<sup>2+</sup> son potentes estimuladores de la actividad de la PLA<sub>2</sub> y es po

sible que muchos de los efectos evocados por estos agentes estén relacionados con una síntesis aumentada de PG's (70, 209, 216). Es interesante constatar que los fosfolípidos ricos en AA parecen estar concentrados principalmente en el lado interno de la membrana plasmática (216).

Los agentes con acción anestésica local que pueden desplazar al  $\text{Ca}^{2+}$  de sus sitios de unión de manera competitiva, son al mismo tiempo capaces de inhibir a la  $\text{PLA}_2$ . Entre éstos se encuentra el mepacrine (quinacrina), la clorpromazina, dibucaína y cocaína (70). Si bien estas drogas actúan a concentraciones del orden de  $10^{-3}$  molar, no son capaces de bloquear la síntesis de PG's a partir de AA sino a concentraciones aún más altas. El bromuro de bromofenacilo también puede bloquear a la  $\text{PLA}_2$ , pero este compuesto afecta también la actividad de la ciclooxigenasa (191).

En todos los tejidos el AA puede ser convertido a PG's por la ciclooxigenasa o a HPETE por la lipoxigenasa. Ambas vías pueden ser bloqueadas por ciertos análogos del AA (165); sin embargo, sólo la vía de la ciclooxigenasa es inhibida por aspirina (ácido acetilsalicílico, AAS), indometacina (59), y drogas antiinflamatorias con propiedades similares (como por ejemplo, el paracetamol y la quinidina). Por esta razón, estos compuestos son ampliamente usados en la investigación del metabolismo del AA a PG's.

Las distintas vías de los endoperóxidos pueden ser también

bloqueadas selectivamente. El imidazol y otros compuestos pueden bloquear la  $TXA_2$  sintetasa (193), el ácido 15-hidroperoxi-araquidónico inhibe a la  $PGI_2$  sintetasa (195), el glutatión activa a la  $PGE_2$  isomerasa y el cloruro de estaño facilita la formación no enzimática de  $PGF_2$  alfa.

#### Regulación por hormonas esteroides:

Los glucocorticoides pueden regular la síntesis de PG's inhibiendo la acción de la  $PLA_2$ . Posiblemente, los glucocorticoides inhiben la síntesis a nivel de la ciclooxigenasa también, pero este efecto se presenta sólo a muy altas concentraciones, carentes de significado clínico o fisiológico (96). En cambio, existen abundantes evidencias de que el cortisol a concentraciones más bajas puede bloquear la síntesis de PG's inducida por la bradiquinina, la trombina y el suero en cultivos de células aisladas (119, 142, 269).

Chandrabose y col. (42) han propuesto recientemente que la inhibición de la  $PLA_2$  debida a los esteroides puede ser indirecta, mediada por la producción de una PG desconocida, posiblemente la  $PGI_2$ . Esta inhibiría a la  $PLA_2$ , por un mecanismo en el que estaría implicado el AMPc.

Flower y col. (75) descubrieron un factor inducido por esteroides que mimetizaba los efectos antifosfolipásicos de los agentes

tes antiinflamatorios. Propusieron que ese factor era de naturaleza peptídica y lo denominaron macrocortina. Se observó que su síntesis era estimulada por glucocorticoides y que ésta era capaz de inhibir la actividad de la fosfolipasa.

Hirata (114) demostró que la fosforilación de la lipomodulina o macrocortina por una proteína quinasa dependiente de AMPc causaba una disminución de su actividad inhibitoria sobre la  $PLA_2$ .

La influencia de los esteroides sexuales sobre la biosíntesis de PG's por el útero ha sido ampliamente explorada y aceptada, aunque existen resultados contradictorios. Los estrógenos pueden estimular la producción de  $PGF_2$  alfa en el útero (14, 40, 102, 132). La causa de este efecto no ha podido ser localizada aún, y podría encontrarse en múltiples niveles, afectando a las lipasas, ciclooxigenasa, endoperóxido reductasa y 9-ceto reductasa (80).

Por otro lado, Franchi y col. (77) describieron un efecto estimulante de la progesterona sobre la producción de PGF uterina en la rata OV, el cual era disminuído por acción del 17-beta-estradiol.

En vista de que los estrógenos son activadores de la síntesis proteica, se postuló que ésta podría estar mediando las acciones del estradiol sobre la síntesis de PG's, a través de alguna in

ducción enzimática. Sin embargo, Horton y col. (122) observaron que el incremento de la síntesis de PGF inducido por los estrógenos se manifestaba mucho antes de que la síntesis proteica tuviera lugar. Además, Castracane y col. (40) mostraron que la administración simultánea de inhibidores de la síntesis proteica o de sustancias antiestrogénicas, junto con los estrógenos, no afectaba la acción de éstos sobre la producción uterina de PG's.

#### 6. Mecanismo de acción:

La naturaleza lipídica de las PG's las ubica en una categoría única entre los autacoides, y plantea el interrogante de si sus diversas acciones son mediadas por la unión a receptores de membrana del tipo de los postulados para aminas o péptidos biógenos, o no. Se acepta que tales receptores existen para las PG's (291), y es evidente que existen distintas clases de los mismos. Las diferentes PG's tienen efectos dispares; por ejemplo, no es raro que la PGE y la PGF ejerzan acciones opuestas. El grado de saturación de las cadenas laterales suele afectar la potencia, pero a veces conduce a efectos diametralmente opuestos, como es el caso de la PGE<sub>1</sub> y PGE<sub>2</sub> en las plaquetas.

Existen antagonistas de PG's de acción selectiva, por ejemplo el polifloretil trisfosfato (PPP) es capaz de bloquear selectivamente el efecto estimulante de las PG's E y F sobre el músculo liso (175); más aún, el uso de tales antagonistas ha permitido distinguir

los receptores para PG's de los de los demás autacoides.

Las PG's, ampliamente distribuidas en los distintos órganos de los seres vivos, participan en múltiples y diversas acciones biológicas. Sylver y col. (248) clasificaron a las PG's según sus funciones en :

\_ Hormonas clásicas: La infusión intravenosa de  $PGA_1$  y  $PGA_2$  disminuye la presión sanguínea. Se propuso que estas PG's podían ser liberadas por el riñón y por lo tanto actuar como hormonas clásicas regulando la presión sanguínea (112). Sin embargo, más tarde se comprobó que estas PG's eran productos de degradación de la  $PGE_1$  y la  $PGE_2$  respectivamente.

Gryglewsky (100) y Moncada (196) sugirieron que la  $PGI_2$  era una hormona circulante liberada continuamente por el pulmón, que funcionaba en este aspecto como un órgano endocrino y producía la inhibición de la agregación plaquetaria. Estudios posteriores llevados a cabo con métodos más precisos demostraron que la  $PGI_2$  debe ser considerada como una hormona local que inhibe la agregación plaquetaria solamente en lugares cercanos a los de su formación (108).

\_ Hormonas locales: La PGE producida en la médula renal va a la corteza, donde disminuye la resistencia preglomerular y de esta forma se autorregula el flujo sanguíneo renal (112).

La  $PGF_2$  alfa producida por el útero de la oveja es trans

ferida desde la vena uterina hacia la arteria ovárica, y en éste órgano produce luteólisis (185). Por otro lado, la  $PGE_2$  presente en exudados inflamatorios aumenta la permeabilidad vascular (298).

\_ Mensajeros intracelulares: Las PG's sintetizadas por una célula podrían actuar en la misma antes de ser liberadas, comportándose como mensajeros intracelulares. Estas PG's podrían regular los niveles de otras sustancias biológicamente activas, o modular algunas actividades enzimáticas.

Las PG's  $E_1$  y  $E_2$  modifican la actividad de la  $Na^+/K^+$  ATP-asa  $Mg^{2+}$  dependiente, y de la adenilato ciclasa en eritrocitos y plaquetas humanas, también en mitocondrias de hígado de rata y en el músculo esquelético del conejo (130). En la piel de rana (128) y en el fondo del estómago de rata (185) la estimulación del influjo de  $Na^+$  por  $PGE_1$  es precedida por una remoción del  $Ca^{2+}$  de la membrana.

En plaquetas, el  $TXA_2$  actúa como ionóforo de  $Ca^{2+}$ , translocándolo desde sus sitios de fijación en el sistema tubular denso hacia el citoplasma (47).

Las PG's de tipo E aumentan o disminuyen el AMPC intracelular, mientras que la  $PGF_2$  alfa es capaz de aumentar hasta cuatro veces los niveles de GMPC en 45 segundos, en el útero de rata (87).

## 7. Funciones de las PG's endógenas:

Tal vez el área de mayor interés en el estudio del papel fisiológico de las PG's sea el de la reproducción (19, 172). Las PG's se encuentran en altas concentraciones en el semen humano, y existe una absorción sustancial de estos autacoides por la vagina; estos hechos llevan a suponer que las PG's depositadas durante el coito podrían facilitar la concepción actuando sobre el cérvix, el útero, las trompas de Falopio y el transporte del semen. Sin embargo, las PG's son escasas o faltan en el semen de algunas especies. Más aún, algunas PG's interfieren con los procesos de implantación y transporte de óvulos. A pesar de que existe cierta correlación entre los niveles seminales de PG's y algunos casos de infertilidad masculina, el papel de estos autacoides en el semen no está aclarado.

En hembras subprimates se ha sugerido que la  $PGF_2$  alfa liberada por el endometrio uterino funcionaría como hormona luteolítica (121, 215), pero en humanos no ha podido demostrarse una influencia clara de la  $PGF_2$  alfa sobre la regresión del cuerpo lúteo.

Como señaló anteriormente, las PG's pueden participar en el proceso de parto, el aborto habitual y en la constricción de la vena y la arteria umbilical después del parto.

También se señaló ya el papel de las PG's en la autorregulación del flujo sanguíneo renal y la presión sanguínea. Además, mo

dulan los efectos intrarrenales del sistema renina-angiotensina (4).

Los prostanoides liberados por las plaquetas contribuyen a la segunda fase de la agregación plaquetaria y por ende a la formación de trombos (5).

Las PG's son liberadas en respuesta a una variedad de estímulos, ya sea térmicos, químicos, bacterianos y otros. Se cree que contribuyen en los procesos inflamatorios, particularmente en las fases de desarrollo más lento y persistente (306). Son especialmente importantes en las inflamaciones oculares (293); y son abundantes en las articulaciones artríticas. En algunos pacientes, la liberación de estos autacoides participa de los ataques asmáticos (306). Se sabe que algunos tumores malignos liberan PG's, entre ellos los carcinomas medulares y tiroideos, y puede ser que las PG's liberadas contribuyan a los síntomas de diarrea e hipercalcemia (238, 268).

En la neurotransmisión simpática, las PG's ejercen un efecto regulador, también en la secreción ácida gástrica y en la lipólisis. Por último, las PG's pueden ser importantes a nivel del sistema nervioso central, en los procesos de control de la temperatura y la fiebre (291).

#### D. Objetivos.

El presente trabajo de tesis examina diversos aspectos de la relación existente entre la histamina y la función contráctil del útero de rata. Los experimentos presentados a continuación están destinados a clarificar:

\_ El papel de la histamina en la regulación de la motilidad uterina y su relación con los efectos estrogénicos sobre la síntesis de PG's en la rata no preñada.

\_ El efecto de la histamina sobre la motilidad del útero de rata preñada y la relación de su mecanismo de acción con la síntesis de PG's.

## II. MATERIALES & METODOS

### A. Materiales.

#### 1. Animales utilizados:

En todos los casos se usaron ratas hembra adultas de la cepa "Wistar", cuyo peso osciló entre 180 y 200 g. Los animales fueron mantenidos en grupos de 6 ejemplares, con un régimen de luz diaria de 14 horas (0700 a 2100 hs.), en ambiente climatizado-( $22 \pm 2$  °C) y alimentadas con alimento balanceado Purina y agua ad libitum.

El estadio del ciclo sexual (proestro, estro, metaestro y diestro) se determinó mediante extendidos vaginales realizados diariamente entre las 0900 y las 1100 hs. En todos los casos, el sacrificio se llevó a cabo mediante un golpe en la cabeza seguido de dislocación cervical.

Para la obtención de ratas preñadas se aparearon hembras en proestro con machos de peso similar y de comprobada fertilidad, verificándose al día siguiente si la cópula había tenido lugar mediante el examen del extendido vaginal: si podían verse espermatozoides y células cornificadas ese día era considerado como día 1 de preñez. En las condiciones mencionadas, el parto ocurría normalmente en el día 22.

En los casos en que se utilizaron ratas ovariectomizadas (OV), la ovariectomía bilateral se realizó de 20 a 30 días antes del

sacrificio. Bajo anestesia etérea, se ubicaron los ovarios mediante incisiones longitudinales medio laterales; después de practicar una ligadura sobre el útero a unos 3mm del extremo oviductal, se cortó el cuerno uterino por encima de la ligadura, extrayéndose el ovario, el oviducto, y una pequeña porción de tejido uterino.

## 2. Drogas utilizadas:

\_ Dow Corning Corp.

plancha Silastic 500-5

tubo Silastic 602-155

\_ Merck Co.

placas cromatográficas de Silica gel G

\_ Parke - Davis

Ketalar (clorhidrato de ketamina) 50 mg/ml

\_ P.L. Rivero & Cia.

Tubo polietileno PR-80

\_ New England Nuclear, Mass EEUU

PGE<sub>2</sub> (5,6,8,11,12,14,15 <sup>3</sup>H (N) ) (AE 200 Ci/mmol)

AMP<sub>o</sub> (2,8 <sup>3</sup>H) (AE 30,3 Ci/mmol)

Adenosil-L-metionina, S-(metil-<sup>3</sup>H) (AE 5-15 Ci/mmol)

**\_ Sigma Chemical Co.**

**PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> alfa, PGE<sub>1</sub>**

**N<sup>6</sup>-2'-O-Dibutiriladenosina 3':5'-Monofosfato cíclico**

**Adenosina 3':5'-Monofosfato cíclico**

**Histamina**

**Pirilamina**

**Folin-Ciocalteus**

**Albúmina Bovina fracción V**

**Acido acetil salicílico**

**PPQ**

**POPOP**

**Teofilina**

**Mepacrine (quinacrina)**

**Beta-NADPH**

**2-Mercaptoetanol**

**Acido tricloroacético**

**Atropina**

**Propanolol**

**Indometacina**

**17-beta-estradiol**

**TRIZMA base**

**\_ Fisher Scientific Co.**

**Carbón activado**

\_ Smith, Kline y French Labs.

Cimetidina

Clorfeniramina

Metiamida

2-(2-aminoetil) Tiazol (SK&F 71481-A<sub>2</sub>)

\_ CIBA Co

Regitina

Las sales y solventes utilizados fueron de grado analítico (Carlo Erba, Mallinckrodt, Merck).

## 8. Métodos.

### 1. Tratamientos hormonales:

El 17-beta-estradiol fue disuelto originalmente en etanol absoluto, en una concentración de 1 mg/ml. De allí se hicieron sucesivas diluciones 1:10 hasta obtener una de 10 ug/ml de agua. De ésta se inyectaron 0,1 ml por vía intraperitoneal. En los experimentos "in vivo" se inyectó el mismo volumen por vía endovenosa, en este caso la dilución final se llevó a cabo en solución fisiológica.

Los antihistamínicos utilizados se disolvieron en solución fisiológica, ajustando la concentración a fin de inyectar 0,5 ml de vehículo por vía intraperitoneal. Para disolver la cimetidina se preparó una solución madre 100 mM, según lo recomendado por Brimblecombe y col. (33). Cuando los antihistamínicos o la histamina se inyectaron por vía endovenosa, fueron disueltos en 0,1 ml de solución fisiológica.

### 2. Determinación de la motilidad uterina del útero de rata aislado:

Los estudios "in vitro" se llevaron a cabo utilizando segmentos de cuernos uterinos aislados. Los úteros, extraídos a través de una incisión longitudinal medio-ventral, fueron cosechados en cápsulas de Petri conteniendo una solución de Krebs-Ringer bicarbonato modificado (KRB), a temperatura ambiente y gaseada con carbógeno (CO<sub>2</sub> al 5% y O<sub>2</sub> 95%). Los cuernos uterinos se abrieron longitudinalmente

siguiendo la línea del mesometrio, se cortaron fragmentos de 10-15 mm y se cosieron los extremos con aguja e hilo de algodón.

En el caso de los úteros extraídos de ratas preñadas, se expulsaron las unidades fetoplacentarias por los extremos del cuerno uterino y luego se separaron segmentos de unos 3 x 15 mm de las zonas mesometrial (M) y antimesometrial (AM).

Los segmentos uterinos se montaron longitudinalmente sujetando uno de sus extremos a un soporte de vidrio en forma de "L", ubicado dentro de un baño tisular de doble pared (fig. 16). A través de la cámara exterior circulaba agua termostatzada a 37°C, impulsada por una bomba Edmund BÖler UKT 2; la cavidad interior, de un volumen aproximado de 30 ml, contenía 10-20 ml de solución buffer KRB a pH 7,4, con glucosa como sustrato metabólico. La solución KRB era gaseada con carbógeno y tenía la siguiente composición:

Na <sup>+</sup>	145 mM
K <sup>+</sup>	5,9 mM
Ca <sup>2+</sup>	2,2 mM
Mg <sup>2+</sup>	1,2 mM
Cl <sup>-</sup>	127 mM
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25 mM
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,2 mM
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1,2 mM

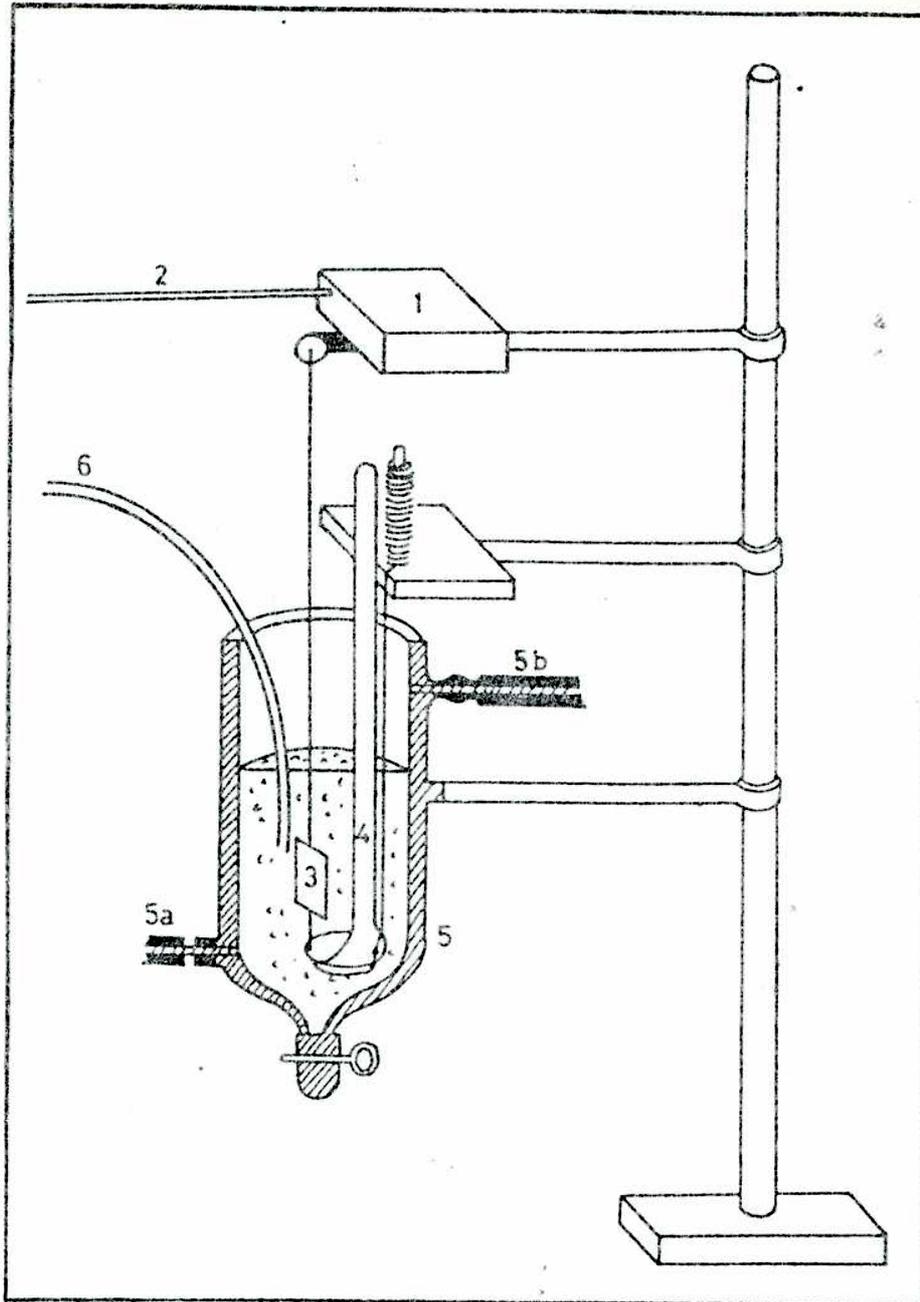


Fig. 16: Dispositivo para la medición de la tensión contráctil isométrica de un tejido aislado. 1) transductor; 2) cable conector del transductor con el sistema amplificador-registrador; 3) tejido; 4) soporte tisular; 5) cámara tisular, a) boca de entrada del agua circulante externa, b) boca de salida; 6) burbujeador

Los segmentos uterinos se conectaron por el otro extremo a un transductor Statham o TMI BHL, mediante un hilo de algodón de 15-20 cm de longitud. Los transductores se encontraban montados sobre dispositivos micrométricos y registraron la tensión contráctil isométrica (TCI) desarrollada por el tejido, transformándola en una señal eléctrica que luego era magnificada por un amplificador SAN-EI acoplado a un polígrafo de la misma marca, provisto de plumas inscriptoras encargadas de registrar la actividad mecánica del tejido (24).

Una vez montado, se aplicó al segmento una tensión basal de 1 g mediante el dispositivo micrométrico, a fin de evocar la actividad contráctil espontánea. En todos los casos, se permitió que las preparaciones tisulares se estabilizaran durante los primeros 4 minutos de actividad; el promedio de las contracciones de los siguientes 5 minutos se consideró como el valor control de dicha actividad. En algunos casos, se permitió al segmento uterino contraerse espontáneamente por un período de 40 minutos, las variaciones observadas durante el tiempo de experimentación se cuantificaron en períodos de 5 minutos y se expresaron como porcentajes de cambio con respecto al control.

Para estudiar la reactividad de las preparaciones tisulares frente a diversos agentes, se construyeron curvas dosis-respuesta de tipo acumulativo de acuerdo al procedimiento descrito por Van

Rossum (282). Todas las drogas se administraron disueltas en un volumen de 0,1-0,2 ml (de acuerdo al volumen total del baño) a intervalos de 5 minutos, en los casos en que se puso a prueba el efecto de antagonistas, éstos fueron agregados al baño de 15 a 30 minutos antes que los agonistas. La respuesta contráctil se calculó tomando la amplitud de la contracción 1 minuto después del agregado de la droga.

Una vez finalizados los experimentos, los segmentos uterinos fueron secados dos veces sobre papel de filtro y pesados (peso húmedo); después de permanecer 48 horas en estufa a 60°C se determinaron los pesos secos. El contenido de agua se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso húmedo}} \times 100$$

### 3. Determinación de la presión intrauterina "in vivo" :

Se utilizó el procedimiento descrito por Fuchs (259), modificado. Los animales se mantuvieron anestesiados con Ketalar (60 mg/kg i.p.) durante todo el experimento. Mediante una incisión longitudinal medio-ventral se abrió la cavidad abdominal y se expuso un cuerno uterino (se utilizaron indistintamente los cuernos derecho o izquierdo). A través de una pequeña incisión practicada en el extremo cervical, se insertó en el cuerno seleccionado un tubo de po

lietileno (Rivero PR-80), sujetádoselo firmemente con hilo de algodón. El tubo de polietileno, lleno de solución fisiológica KRB a temperatura ambiente, estaba unido a un transductor de presión SAN-EI tipo LPU 0,1/360, acoplado a un amplificador y polígrafo SAN-EI encargados de registrar las variaciones de la presión intrauterina. Mediante una jeringa de 1 ml acoplada a una válvula de tres vías (fig. 17) se inyectaban dentro del cuerno uterino 0,02-0,05 ml de solución KRB a fin de evocar la actividad contráctil espontánea del mismo.

Las drogas se administraron por vía endovenosa, a través de una cánula de Silastic inserta en la vena yugular derecha, disueltas en todos los casos en 0,1 ml de solución fisiológica.

#### 4. Determinación de PG's tipo E y F :

Con el propósito de estimar la liberación al medio de  $PGE_1$ ,  $PGE_2$  y  $PGF_2$  alfa de segmentos uterinos aislados, éstos fueron incubados en frascos conteniendo 10 ml de solución KRB a 37°C, ubicados en un agitador "Dubnoff" bajo atmósfera de carbógeno. Al cabo de 60 minutos de incubación, se retiraba el medio nutriente y se lo guardaba a -20°C para la posterior extracción de PG's. Las preparaciones tisulares fueron secadas dos veces sobre papel de filtro y se determinaron sus pesos húmedos y secos del modo previamente descrito.

Para la extracción de las PG's se acidificaron los medios

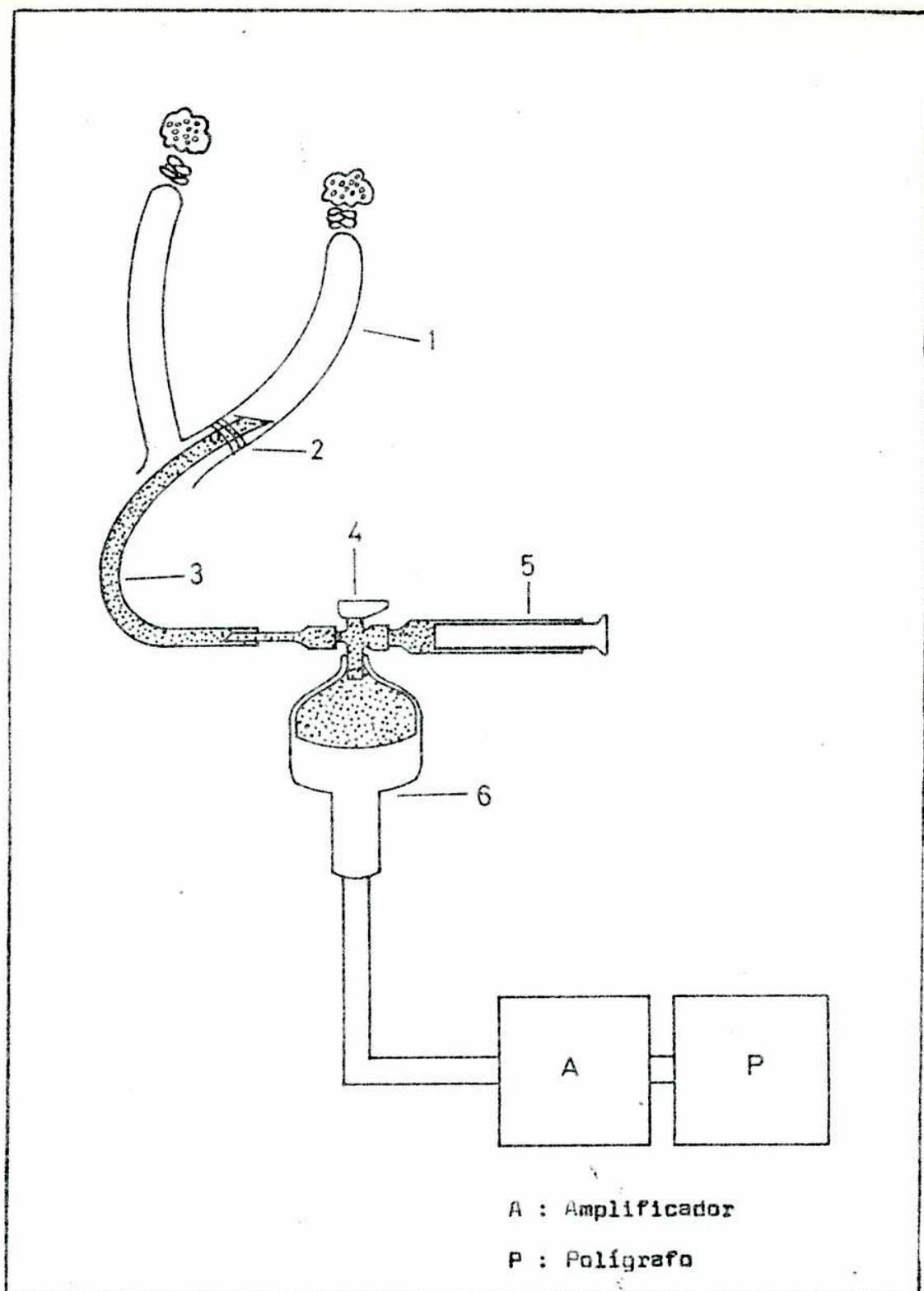


Fig. 17: Dispositivo para la medición de la presión intrauterina "in vivo". 1) cuerno uterino; 2) ligadura; 3) tubo de polietileno; 4) válvula; 5) jeringa; 6) transductor de presión. El punteado indica las cavidades con sol. fisiológica.

de incubación a pH 3 con ClH 1N y se extrajeron tres veces con un volumen de acetato de etilo, el cual era luego evaporado por vacío en un evaporador rotatorio a 40°C. El residuo era resuspendido en 10 ml de cloroformo-metanol (4:1 v/v), trasladado a frascos de 20 ml de volumen y evaporado en vacío a 40°C.

El residuo, redisolto en metanol, se sembraba en el origen de una placa de cromatografía (TCL placas de aluminio, recubiertas con sílica gel 60F<sub>2.4</sub>). P evientemente, las placas habían sido saturadas con AgNO<sub>3</sub> etanólico y secadas completamente (297). La cromatografía se desarrolló en un sistema de solventes acetato de etilo-metanol-agua (16:4:1 v/v), corriéndose paralelamente placas con PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> alfa auténticas como testigos. La posición de las PG's de referencia fue visualizada luego de rociar las placas con ácido fosfomolibdico al 10% en etanol y someterlas a 120°C durante 15 min. Los valores de R<sub>F</sub> para PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> alfa fueron 0,79; 0,54; y 0,26 respectivamente. Las zonas en las placas correspondientes a los valores de R<sub>F</sub> de los testigos se rasparon, se eluyeron con cloroformo-metanol (4:1 v/v), y se llevaron a sequedad bajo vacío.

La actividad tipo PG fue estimada median e el bioensayo descrito por Vane (278). Los eluidos cromatográficos se tomaron en 0,2 ml de solución KRB y se ensayaron sobre segmentos de fondo de estómago de rata, sometidos a superfusión con una solución de KRB conteniendo una batería de inhibidores que hacían al tejido insensu

ble a acetilcolina, serotonina, catecolaminas o histamina (87). También se añadió indometacina (1mg/ml) a fin de inhibir la producción endógena de PG's y mejorar así la precisión del método (68). Las contracciones musculares provocadas por el agregado de la muestra fueron registradas mediante un sistema idéntico al descrito para los estudios de las contracciones "in vitro" del útero de rata, esto es, un transductor de tensión contráctil isométrica, un amplificador y un polígrafo inscriptor.

Los bioensayos entre corchetes se llevaron a cabo utilizando PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> alfa auténticas como testigos y la actividad tipo PG se expresó como un equivalente de PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> o PGF<sub>2</sub> alfa (ng. mg<sup>-1</sup> de peso seco). Todos los valores de bioensayo se corrigieron por las pérdidas de actividad en los pasos de extracción y cromatografía, determinados por un ensayo de recuperación paralelo. Las recuperaciones oscilaron entre un 40-50% y los coeficientes de variación dentro y entre los ensayos fueron menores del 12% y 10%, respectivamente.

##### 5. Actividad de la 9-ceto reductasa:

La medición de la actividad de esta enzima se basa en la incubación de un homogenato de tejido uterino en presencia de PGE<sub>2</sub> marcada, y la determinación de la existencia de PGF<sub>2</sub> alfa o alguno de sus metabolitos, por medio de la cromatografía en placa delgada.

Se utilizaron úteros aislados de ratas en diestro. Los úteros, libres de todo material graso, fueron preincubados en 10 ml de solución KRB, a 37°C, ubicados en un agitador "Dubnoff" bajo atmósfera de carbógeno, en presencia de histamina  $10^{-4}$ M ó AMP<sub>c</sub>  $10^{-5}$  ó  $10^{-3}$ M. Al cabo de 30 minutos los úteros, aproximadamente 400 mg de tejido, fueron homogeneizados con un homogenizador de vidrio "Corning", en un volumen de 2 ml de buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 mM (pH 7,4) por cada útero.

El homogenato así obtenido fue centrifugado durante 15 minututos a 15000 rpm y a 5°C. El sobrenadante de esta centrifugación se usó para medir la actividad enzimática siguiendo la técnica de Wong y col. (303), con algunas modificaciones.

El sistema de reacción contiene  $\text{PGE}_2$  ( $8 \cdot 10^{-7}$ M), NADPH (4mM),  $^3\text{H-PGE}_2$  ( $10^{-9}$ M, 200 Ci/mmol) y 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. A los tiempos requeridos (0, 5, 30 y 60 minutos) se extrajeron alícuotas de 0,2 ml y se trasladaron a frascos conteniendo 1 ml de buffer acidificado a pH 3 para detener la reacción. Se agregaron 3 volúmenes de cloroformo y se dejó en contacto durante 16 horas. Se realizaron dos extracciones más con 2 ml de cloroformo y los extractos orgánicos se llevaron a sequedad en estufa bajo presión reducida a 40°C.

El residuo fue eluido con una mezcla de cloroformo-metanol

(4:1 v/v) y sembrado en placas cromatográficas (sílica gel 60F 654 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). Junto a las muestras se sembraron testigos auténticos de  $\text{PGF}_2$  alfa,  $\text{PGE}_2$  y 15-ceto-13, 14-dihidro- $\text{PGF}_2$  alfa siendo sus  $R_f$  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  $R_f$  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 por útero.

#### 6. Determinación de la Histamina:

Se utilizó el método de microensayo isotópico de Taylor y Snider (271). Segmentos de tejido uterino aislados de ratas en estro o en diferentes estadios de la preñez (7, 16 y 22 días) fueron homogeneizados en 40 volúmenes de una solución buffer que contenía  $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$  0,01 M (pH 7,9). Del homogenato se separaron 5  $\mu\text{l}$  para la determinación de proteínas por el método de Lowry (174). El resto fue colocado en agua hirviendo durante 10 minutos y luego centrifugado a 4000 rpm durante 20 minutos.

Se tomaron 10 ul del sobrenadante y se pasaron a tubos ependorf, agregándose 2 ul de buffer  $\text{PO}_4\text{Na}$  0,01M con o sin histamina (300 pg). La incubación se inició con 10 ul de la siguiente solución reactante: 8,5 ul  $\text{PO}_4\text{Na}$  0,05M (pH 7,9); 0,5 ul de adenosil-L-metionina, S-(metil- $^3\text{H}$ ) y 4 ul de histamina-N-metil transferasa (parcialmente purificada) (36). La incubación se prolongó durante 14 horas a 50C (48).

La extracción se llevó a cabo agregando 5 ul de NaOH 1M saturado con  $\text{ClNa}$  y 250 ul de cloroformo. Luego de agitar en vórtex durante 30 segundos, se centrifugó 1 minuto a 2000 rpm y se aspiró la fase acuosa. Se lavó el cloroformo con 100 ul de NaOH 1M, agitando y centrifugándose nuevamente. Se volvió a aspirar la fase acuosa y se evaporó a sequedad en vacío. Se llevó al contador de centelleo previo agregado de 2 ml de solución centelleante.

#### 7. Determinación de AMPc :

Se determinó el efecto de distintos agentes sobre los niveles uterinos de AMPc. En una serie de experimentos llevados a cabo "in vivo", los animales, anestesiados con Ketalar (60 mg/kg i.p.), recibieron 17-beta-estradiol (1 ug) y/o cimetidina (0,5 mg), o vehículo, a través de una cánula de Silastic insertada en la vena yugular derecha, disueltas en todos los casos en 0,1 ml de solución KRB. En otra serie de experimentos llevados a cabo "in vitro", segmentos

uterinos aislados de ratas OV fueron preincubados durante 30 minutos en 1,5 ml de solución KRB a 37°C, ubicados en un agitador "Dubnoff" bajo atmósfera de carbógeno, en presencia o ausencia de cimetidina  $10^{-5}$ M. Posteriormente, los segmentos uterinos fueron incubados en idénticas condiciones, aunque esta vez en presencia de PGE<sub>1</sub> ( $10^{-6}$ M), o histamina ( $10^{-4}$ M).

A los tiempos requeridos se diseccionaron los cuernos uterinos (en el caso de los experimentos "in vivo") y se homogeneizaron segmentos en 0,4 ml de ácido tricloroacético al 10%. El homogenato se centrifugó a 1000g durante 20 minutos a 0°C, el precipitado se separó para la determinación de proteínas; y el sobrenadante se lavó 4 veces con 5 ml de dietiléter saturado en H<sub>2</sub>O a fin de eliminar el ácido tricloroacético.

El AMPc se estimó directamente en la fase acuosa libre de ácido tricloroacético, por triplicado, de acuerdo con la técnica de Brown (35). La quinasa de proteínas fue aislada de glándulas adrenales bovinas. Luego de la separación de la médula, las cortezas adrenales fueron homogeneizadas en un homogenizador tipo "Politron" (Bickmann) a 0°C, con 1,5 volúmenes de buffer Tris-ClH 50 mM (pH 7,4); conteniendo sacarosa 0,25 M, KCl 2,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM. Este homogenato fue centrifugado a 5000g durante 30 minutos. El sobrenadante se fraccionó en alícuotas de 0,5 ml que se almacenaron a -20°C. Esta preparación fue descongelada y diluida con el buffer de ensayo (Tris

50 mM, pH 7,4; conteniendo teofilina 8mM y 2-mercaptoetanol 6mM, en el momento de cada determinación. Este mismo buffer se utilizó en todos los pasos posteriores.

Los ensayos se llevaron a cabo en un volumen total de 200 ul. Cada tubo contenía 50 ul de la dilución apropiada de la enzima (1:6), 100 ul de una cantidad conocida de AMPc (de 0,078 a 20 pmoles) o de homogenato de tejido y 50 ul de AMPc-<sup>3</sup>H (aproximadamente 3000 cpm). La cantidad de enzima era tal que unía aproximadamente el 40% del AMPc marcado. La incubación se realizó a 40C durante 90 minutos. El AMPc libre se separó por el agregado de 200 ul de una suspensión de carbón BSA para 10 ml de buffer de ensayo.

La radioactividad se determinó por espectrometría de centelleo líquido con Tritón X-100. Los resultados se expresaron en g. mg<sup>-1</sup> de proteína, estos últimos determinados mediante el método de Lowry (174)..

#### 8. Estadística :

Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba de la "t" de Student en el caso de dos tratamientos y el análisis de la varianza en el caso de tratamientos múltiples (252). En este último caso, las comparaciones simultáneas control vs. tratamiento se llevaron a cabo mediante la prueba de la "t" de Dunnett (45). Las diferencias se consideraron significativas cuando P=0,05 o menor.

### III. RESULTADOS

#### A. Papel de la HA en la regulación de la motilidad uterina y su relación con los efectos estrogénicos sobre la síntesis de PG's en la rata no preñada.

##### 1. Efecto de la HA sobre las contracciones espontáneas de segmentos uterinos aislados de ratas en diferentes estadios del ciclo sexual:

A fin de determinar la sensibilidad de la respuesta inotrópica del útero de rata aislado a la HA, se construyeron curvas dosis respuesta acumulativas en los distintos estadios del ciclo sexual. En todos los casos, la HA inhibió las contracciones espontáneas (fig. 18).

La tabla 2 muestra los valores de  $EC_{50}$  para el efecto inotrópico negativo de la HA. La  $EC_{50}$  fue significativamente mayor en segmentos uterinos provenientes de ratas en metaestro y diestro. Además, la máxima inhibición provocada por la HA fue del 100% durante el estro y el proestro, mientras que en metaestro y diestro fue sólo del orden del 85% y 75% respectivamente; es decir, que en estos estadios la HA no fue capaz de abolir por completo las contracciones espontáneas.

##### 2. Acción de antagonistas histaminérgicos administrados "in vivo" sobre la motilidad espontánea de segmentos uterinos aislados de ratas OV y OV estrogeneizadas:

ESTADIO DEL CICLO SEXUAL	HISTAMINA *	
	(EC	50)
PROESTRO	1,3 ± 0,1 (n=6)	(10 <sup>-6</sup> M)
ESTRO	2,8 ± 1,0 (n=8)	(10 <sup>-6</sup> M)
METAESTRO	1,1 ± 0,1 (n=6)	(10 <sup>-5</sup> M) **
DIESTRO	2,85 ± 0,6 (n=10)	(10 <sup>-5</sup> M) ***

\*  $\bar{X}$  D.E.M

\*\*  $P < 0,05$  ( Metaestro vs Estro)

\*\*\*  $P < 0,001$  ( Diestro vs Estro)

Tabla 2: Valores de  $EC_{50}$  para el efecto inotrópico de la HA sobre la actividad espontánea del útero aislado de rata en diferentes estadios del ciclo sexual.

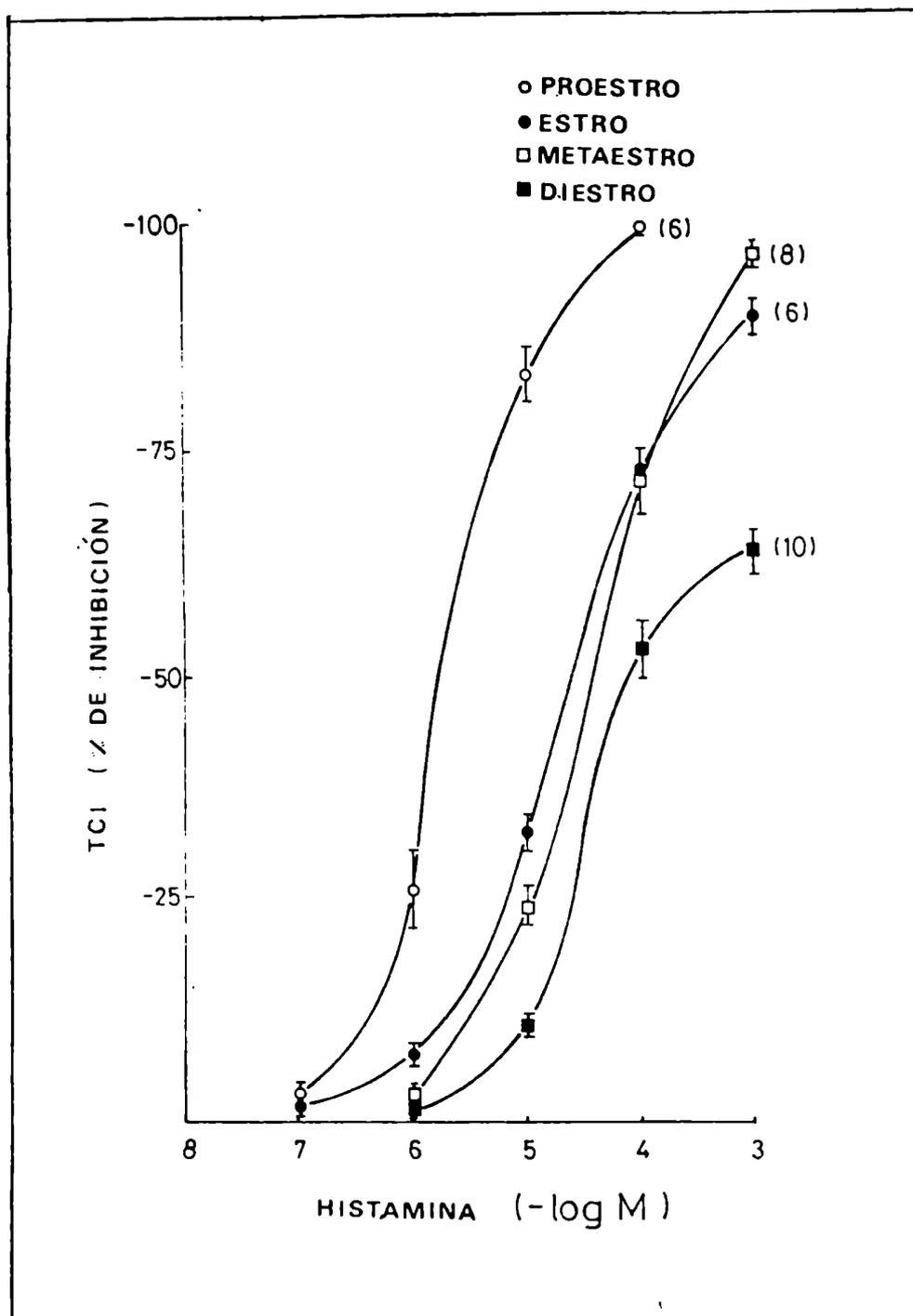


Fig. 18 : Efecto inotrópico negativo de la HA en los diferentes estadios del ciclo sexual.

Los segmentos uterinos aislados de ratas OV muestran una actividad espontánea estable, observándose una disminución de la TCI desarrollada menor al 20% después de permanecer durante 40 minutos en el baño tisular. En cambio, cuando se administra 1ug de 17-beta-estradiol 24 horas antes del sacrificio, la depresión observada a los 40 minutos es significativamente mayor (fig. 19).

Con el fin de establecer la participación de la activación de los receptores  $H_2$  inhibitorios en este fenómeno, los animales recibieron 45 mg/kg de antihistamínicos ( $H_1$  ó  $H_2$ ) divididos en tres dosis: dos horas antes, junto con y dos horas después de la administración de 17-beta-estradiol. Se observó que la cimetidina era capaz de bloquear parcialmente la depresión de la motilidad uterina provocada por los estrógenos, mientras que la pirilamina fue ineficaz en este aspecto (fig. 20). Por otro lado, la cimetidina administrada sola a ratas OV produce una ligera mejora en la estabilidad de la actividad contráctil espontánea (fig. 19).

### 3. Efecto de antagonistas histaminérgicos administrados "in vivo" sobre otras variables uterinas en ratas OV y OV estrogeneizadas:

Con el propósito de comprobar si los antihistamínicos utilizados estaban interfiriendo con otras acciones estrogénicas, se midió el contenido de  $H_2O$  y el aumento de peso de los úteros utilizados en el experimento anterior. Tanto la cimetidina como la piri

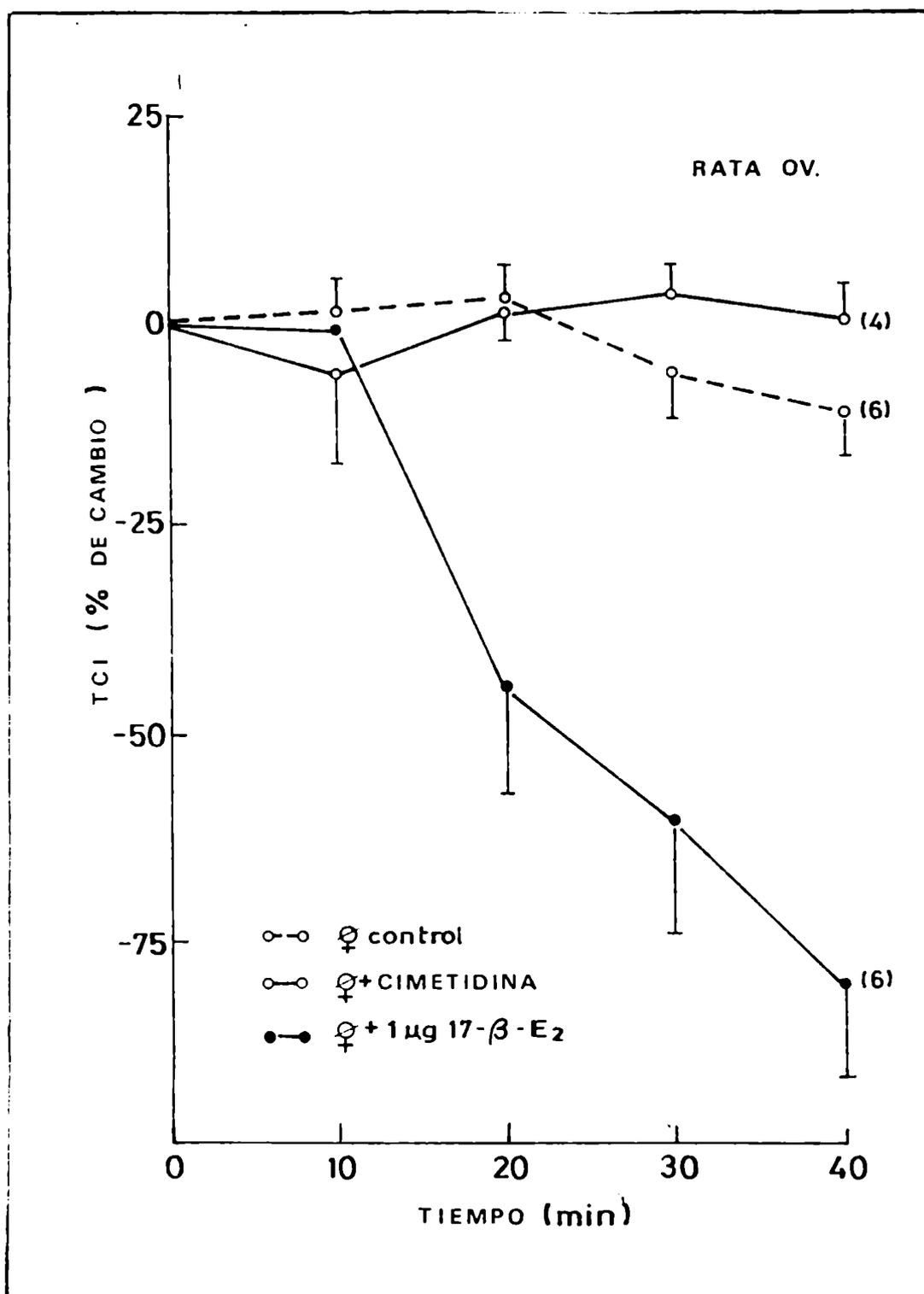


Fig. 19: Constancia de la TCI desarrollada por segmentos uterinos aislados de ratas OV, tratadas con cimetidina (45 mg/kg) o 17-beta-estradiol (1  $\mu$ g).

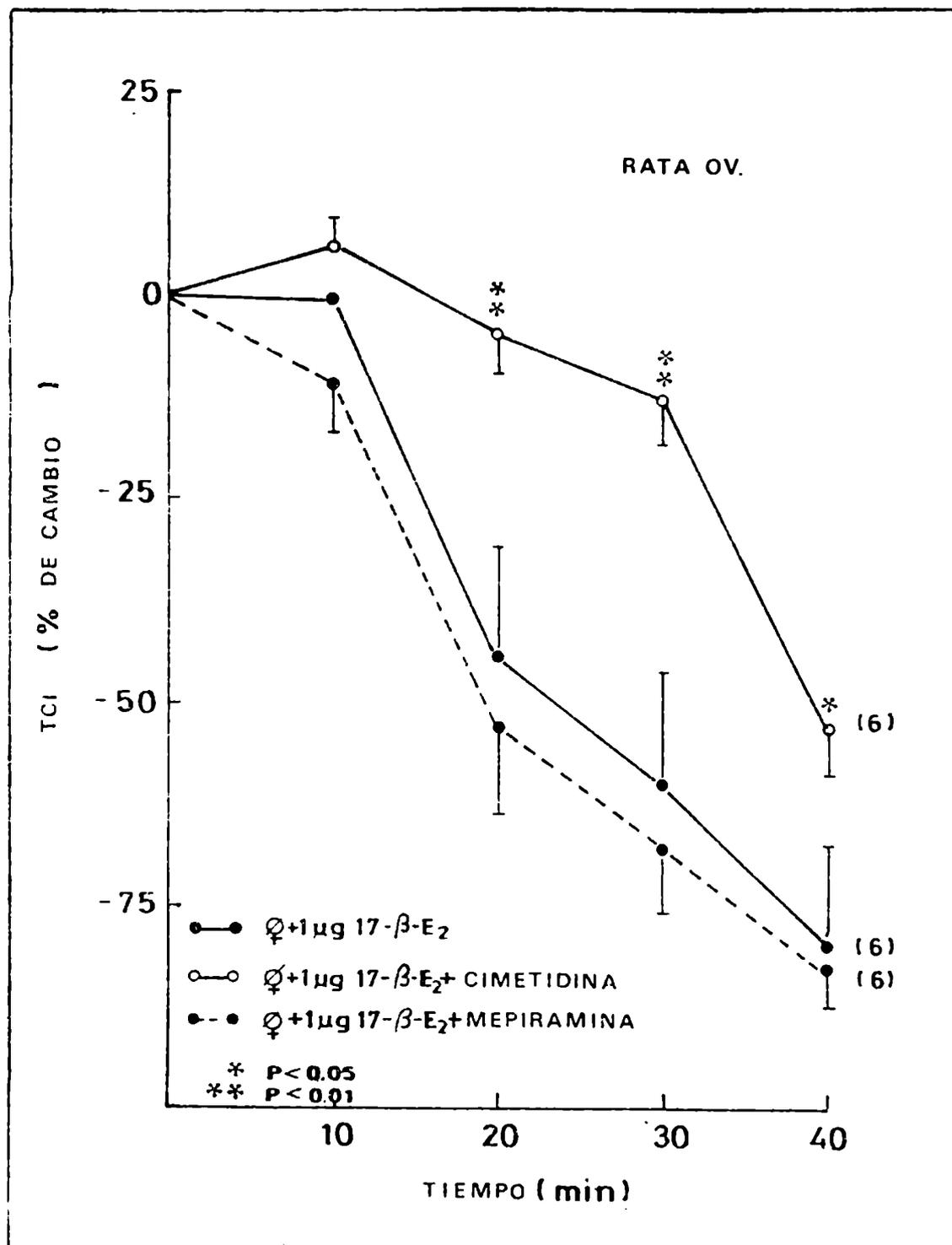


Fig. 20: Constancia de la TCI desarrollada por segmentos uterinos de ratas OV estrogeneizadas, acción del tratamiento con cimetidina (45 mg/kg) o mepiramina (45 mg/kg).

lamina disminuyeron ligeramente el contenido de  $H_2O$  del útero (fig. 21); por otra parte, la cimetidina no tuvo efecto sobre el aumento de peso uterino producido por el estradiol (fig.22).

4. Efecto de la HA sobre la actividad espontánea del útero de rata "in vivo", acción de la cimetidina:

Los estudios "in vivo" se llevaron a cabo en ratas en diestro natural. El sistema utilizado permite registrar las variaciones de la presión intrauterina; la magnitud y la frecuencia de estas variaciones se mantuvieron regulares durante por lo menos 60 minutos en los animales control (fig. 23, a).

La HA administrada por vía endovenosa inhibió la actividad uterina, dicho efecto fue antagonizado por una dosis de cimetidina administrada previamente por la misma vía (fig. 23, b y c). La cimetidina administrada sola no tuvo efecto (fig. 23, d).

5. Efecto del 17-beta-estradiol sobre la actividad espontánea del útero de rata "in vivo", acción de la cimetidina:

El 17-beta-estradiol, administrado por vía endovenosa, aboló por completo la actividad espontánea del útero de rata "in vivo". Dicho efecto comienza a evidenciarse a los 8 minutos y alcanza su máximo 30 minutos después de la administración (fig. 24, a). La cimetidina, en dosis idéntica a la necesaria para bloquear el efec

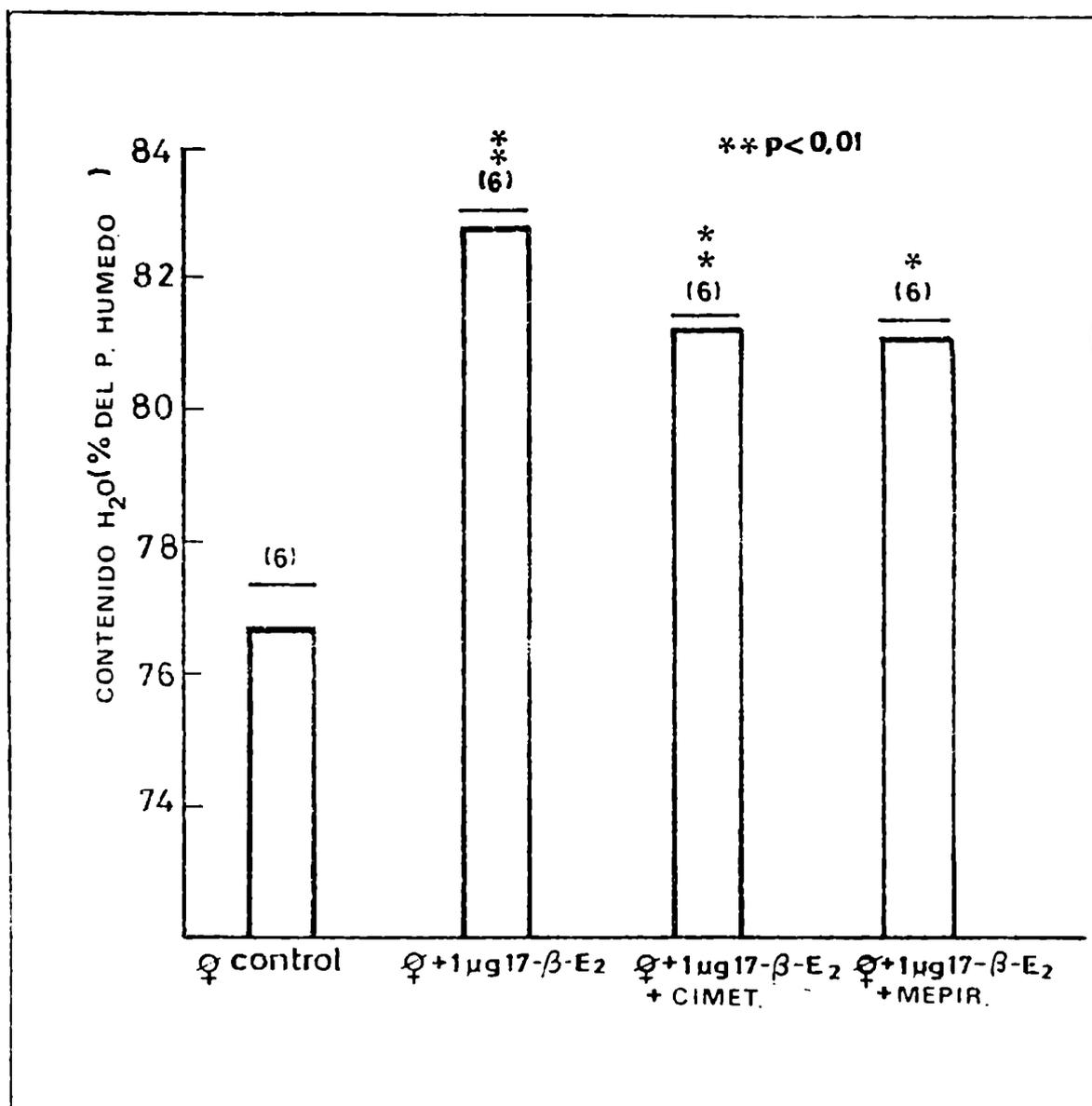


Fig. 21: Efecto de antagonistas  $H_1$  y  $H_2$  sobre el aumento del contenido de agua producido por 1  $\mu$ g de 17-beta-estradiol.  
CIMET: cimetidina; MEPIR: mepiramina.

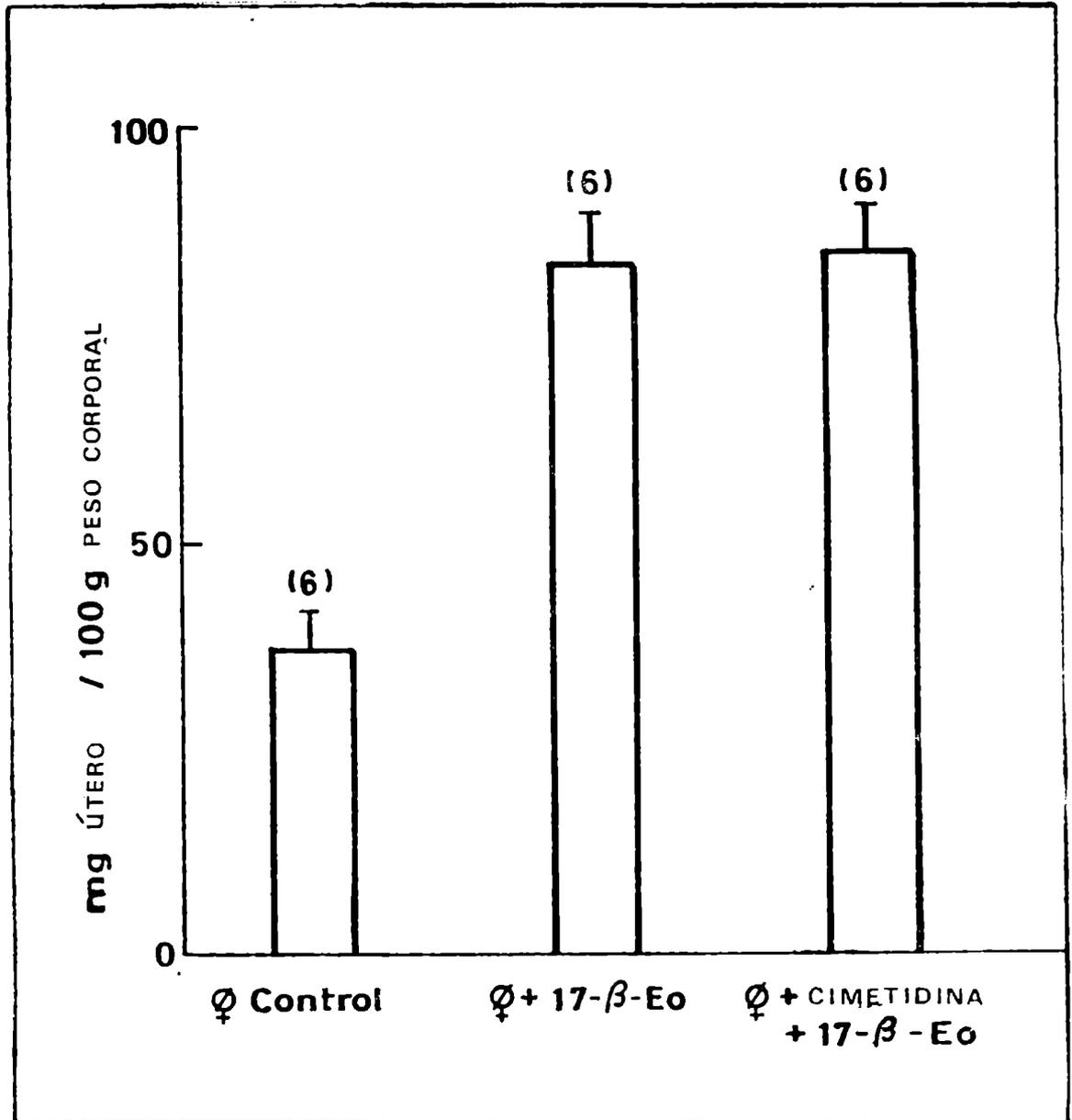


Fig. 22: Efecto de la cimetidina sobre el aumento de peso uterino producido por el 17-beta-estradiol en la rata castrada.

to de la HA, antagonizó parcialmente el efecto del 17-beta-estradiol. Como en el caso anterior, el efecto inhibitorio comenzó a manifestarse a los 8 minutos, si bien a los 30 minutos se observa una recuperación en la presión intrauterina desarrollada, la frecuencia de las contracciones permanece disminuída (fig. 24, b).

Cuando se administró 17-beta-estradiol a una rata en estro natural, el efecto sobre la presión intrauterina fue mucho menos marcado (fig. 24, c).

6. Efecto de la HA sobre los niveles uterinos de AMPc en la rata OV, acción de la cimetidina:

La presencia de HA  $10^{-4}$ M en el medio de incubación produjo un aumento del orden del 100% del AMPc intracelular en segmentos uterinos aislados de ratas OV. La cimetidina, presente en una concentración  $10^{-5}$ M, bloqueó completamente este efecto. (fig. 25).

A fin de comprobar si la acción de la cimetidina sobre el aumento de AMPc era independiente del agente estimulador, se puso a prueba su acción sobre el aumento del nucleótido cíclico evocado por una concentración  $10^{-6}$ M de PGE<sub>1</sub>, que es del mismo orden que la que produce la HA  $10^{-4}$ M. En este caso, la cimetidina fue ineficaz (fig. 25).

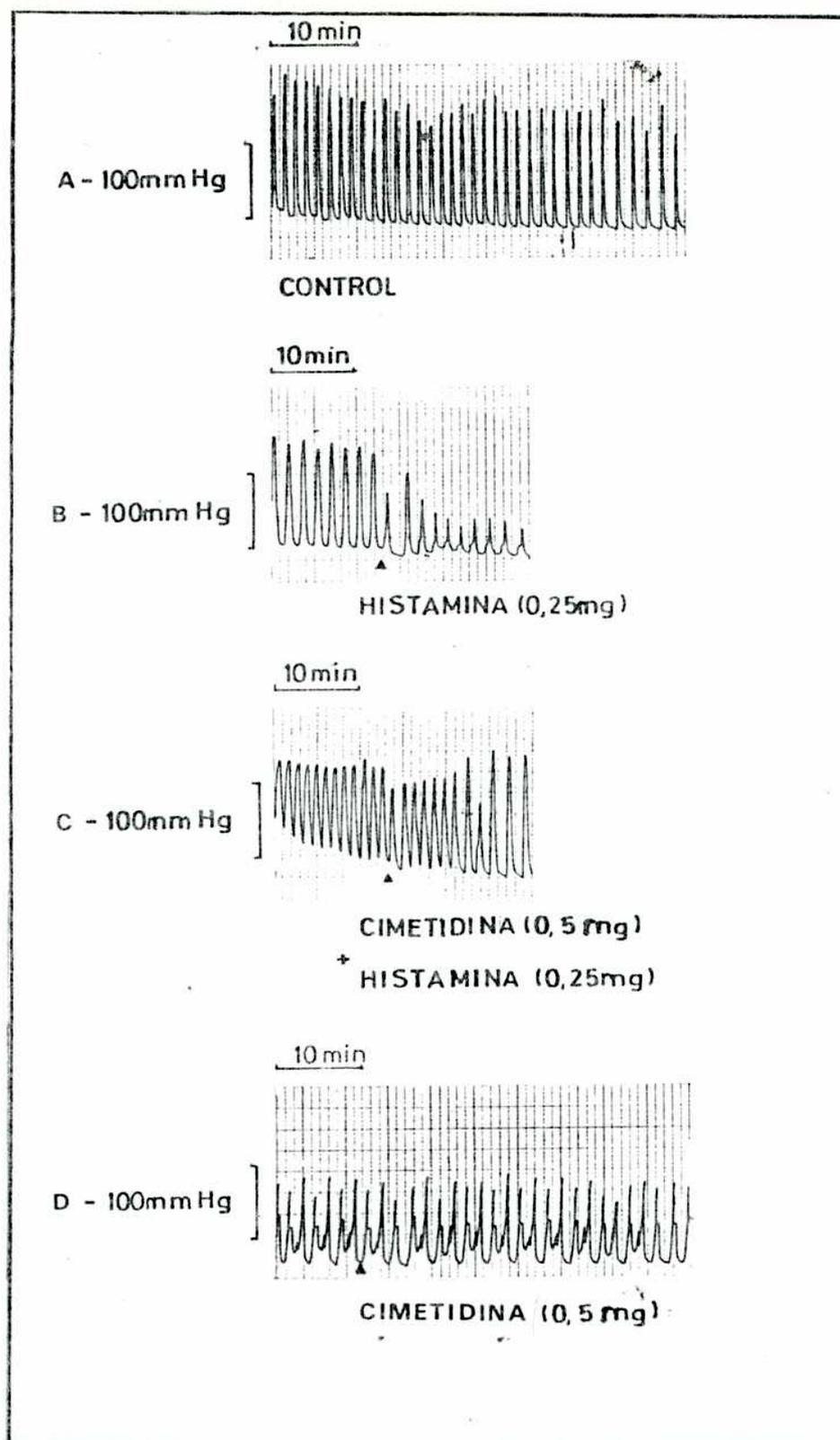


Fig. 23: Registros de presión intrauterina desarrollada por el útero de rata en diestro, efecto de la HA y la cimetidina.

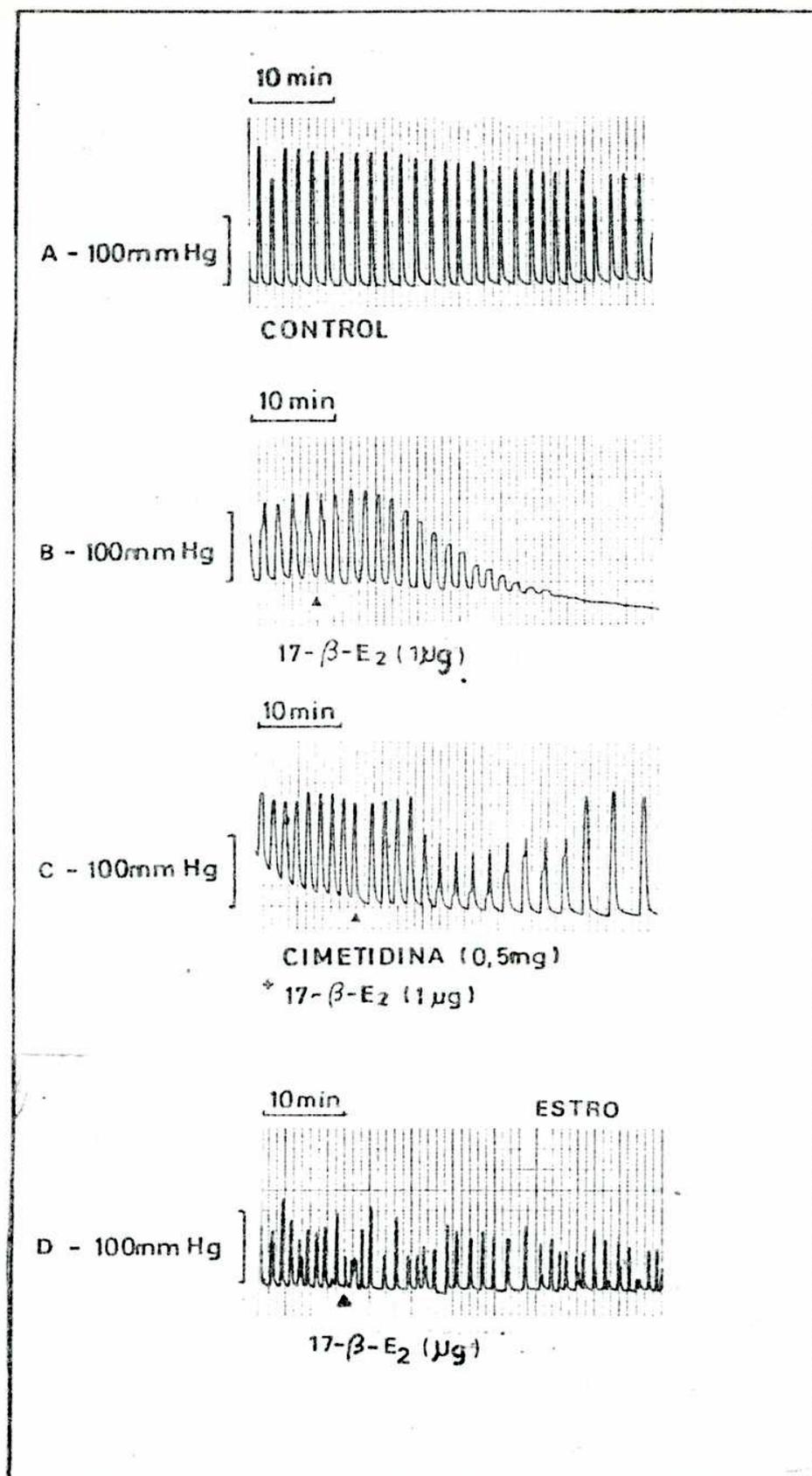


Fig. 24: Registros de presión intrauterina desarrollada por el útero de rata en diestro o estro. Efecto del estradiol.

7. Efecto del 17-beta-estradiol sobre los niveles uterinos de AMPc en la rata OV, acción de la cimetidina:

La administración de 17-beta-estradiol a ratas castradas es capaz de evocar, 1 minuto después, un aumento del AMPc uterino del orden del 70%. Esta variación ya no se observa a los 30 minutos (fig. 26).

Cuando se administró previamente cimetidina por vía intravenosa en una dosis similar a la que antagoniza el efecto estrogénico sobre la actividad uterina "in vivo", se bloqueó también el aumento de AMPc inducido por los estrógenos.

8. Efecto de la HA sobre la síntesis y liberación de PG's en el útero de rata en diestro, acción de antagonistas  $H_2$ .

Con el propósito de comprobar si las variaciones de la motilidad uterina evocadas por la HA estaban asociadas a una modificación de la síntesis y liberación de PG's, se expusieron segmentos uterinos aislados de ratas en diestro a una concentración submáxima de HA, capaz de reducir a un 50% la amplitud de las contracciones espontáneas "in vitro" de un segmento uterino de similares características.

Se observó un incremento en los niveles de  $PGF_2$  alfa libe

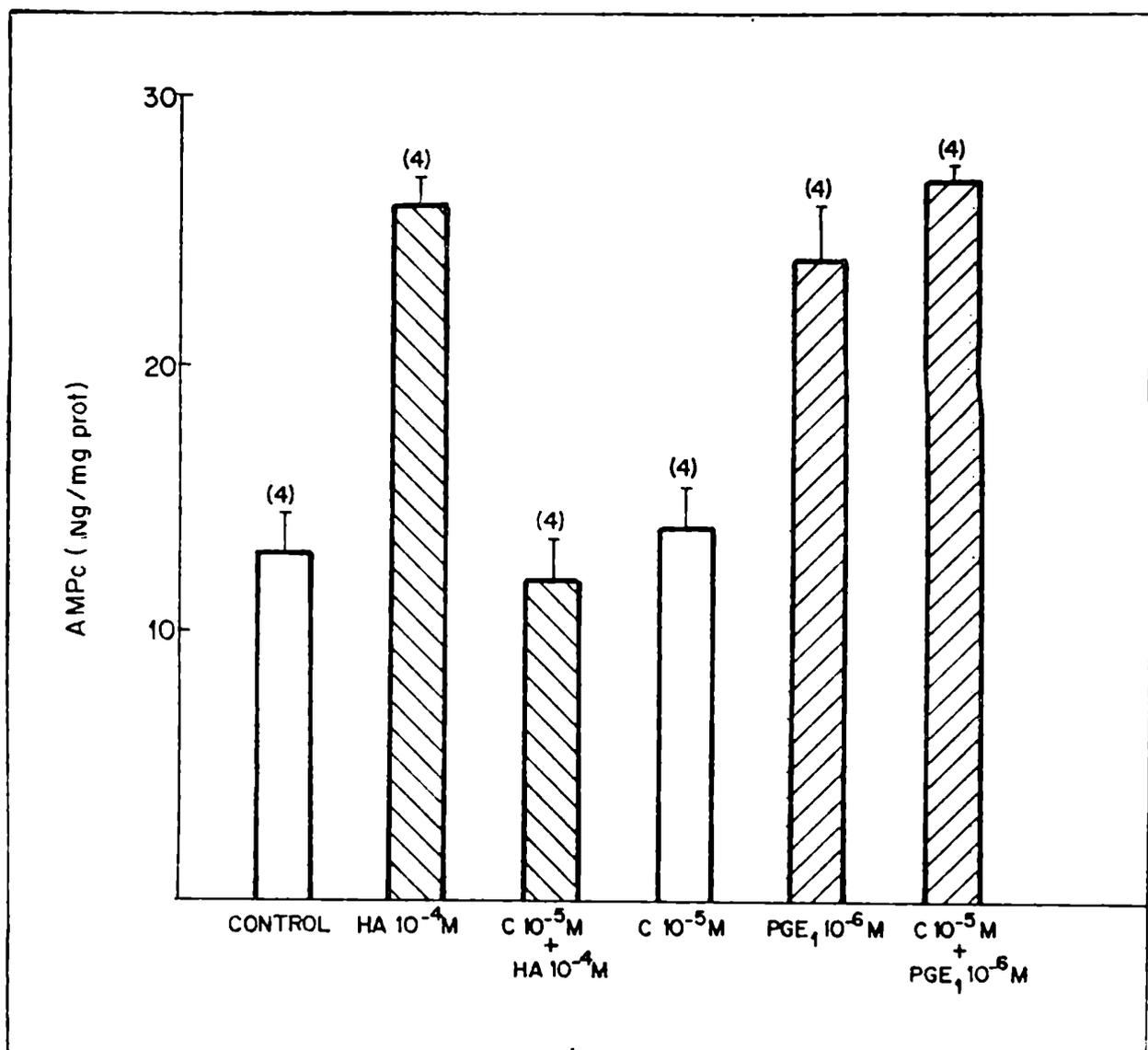


Fig. 25: Efecto de la HA y la cimetidina (C) sobre los niveles de AMPc del útero de rata OV.

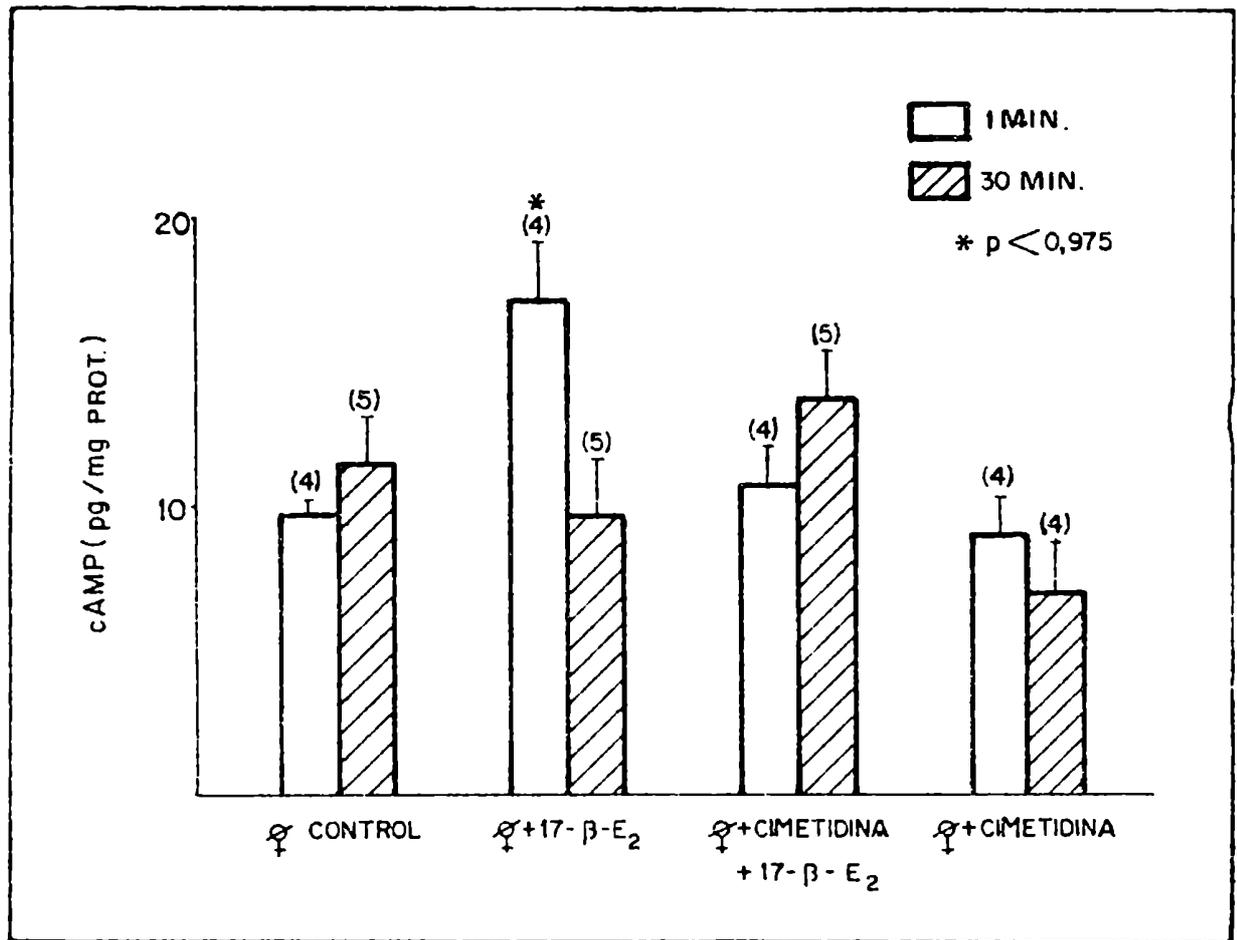


Fig. 26: Efecto del 17-beta-estradiol y de la cimetidina sobre los niveles de AMPc del útero de rata OV.

rada al medio y una disminución de los de  $\text{PGE}_2$ , mientras que la  $\text{PGE}_1$  no resultó afectada (fig. 27).

La cimetidina  $10^{-5}\text{M}$  revierte el efecto sobre los niveles de PG's tipo F, aunque aumenta por sí misma los niveles de  $\text{PGE}_2$ . Cuando se intentó bloquear el efecto de la HA sobre la síntesis y liberación de PG's con metiamida, otro antagonista  $\text{H}_2$ , los niveles de PG's fueron revertidos a sus valores control (fig. 27).

9. Efecto de la HA y del dibutiril-AMPC sobre la actividad de la 9-ceto reductasa en el útero de rata en diestro:

A fin de aclarar el mecanismo por el cual la HA modifica el perfil de síntesis de PG's en el útero de rata en diestro, se estudió el efecto de una concentración submáxima de HA y de dos concentraciones de dibutiril-AMPC ( $10^{-5}$  y  $10^{-3}\text{M}$ ), sobre la conversión de  $\text{PGE}_2$ - $^3\text{H}$  a  $\text{PGF}_2$  alfa- $^3\text{H}$ , conversión catalizada por la enzima 9-ceto reductasa.

El pretratamiento con HA  $10^{-4}\text{M}$  aumentó significativamente la conversión a  $\text{PGF}_2$  alfa- $^3\text{H}$  después de 60 minutos de incubación. Por su parte, el dibutiril-AMPC no dió valores significativamente diferentes del control, pero a una concentración  $10^{-3}\text{M}$  produjo un aumento de la misma magnitud que el observado para la HA (fig. 28).

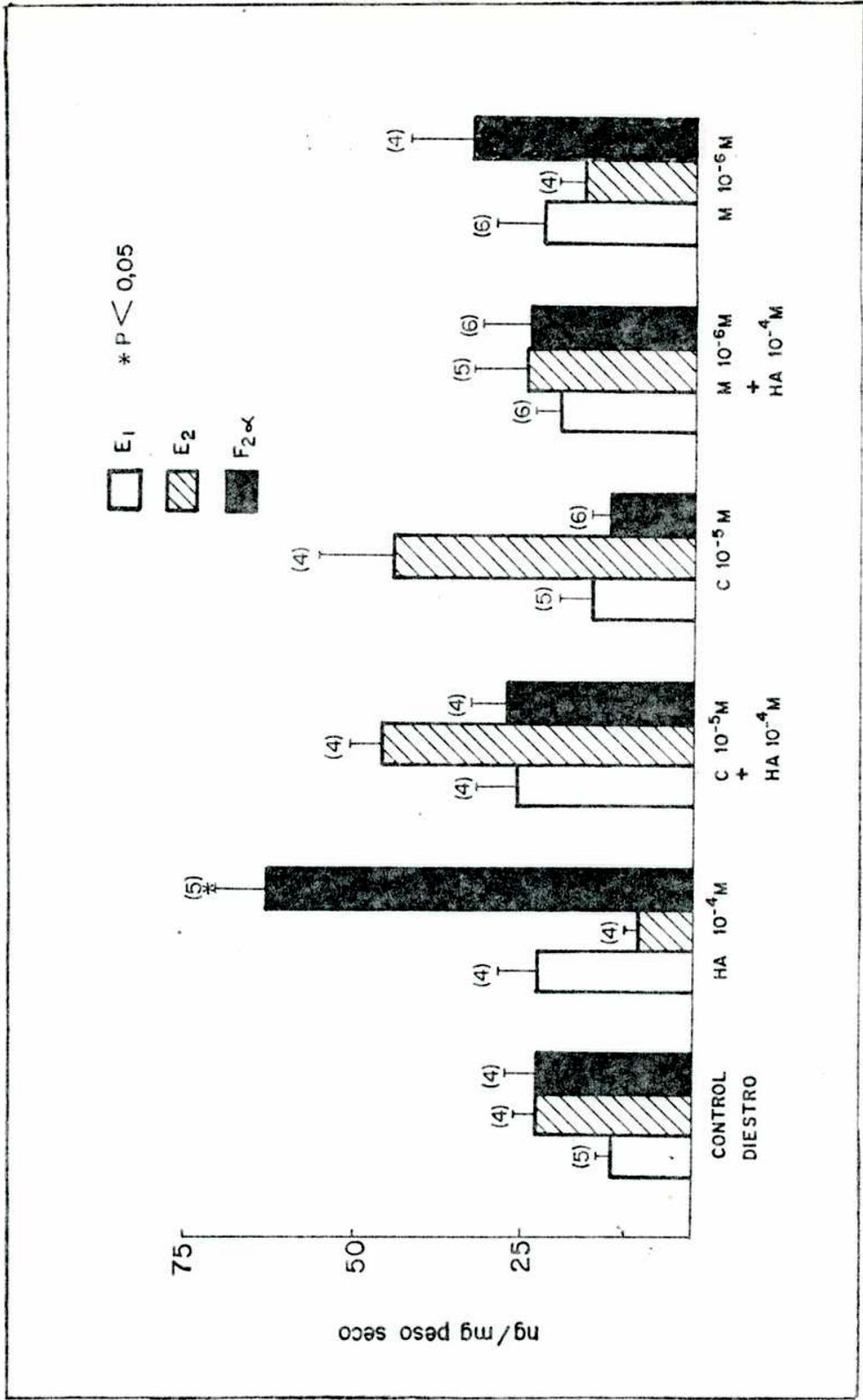


Fig. 27: Efecto de la HA y de antagonistas H<sub>2</sub> sobre el perfil de síntesis de PG's del útero de rata aislado en diestro. C: Cimetidina; M: Metiamida.

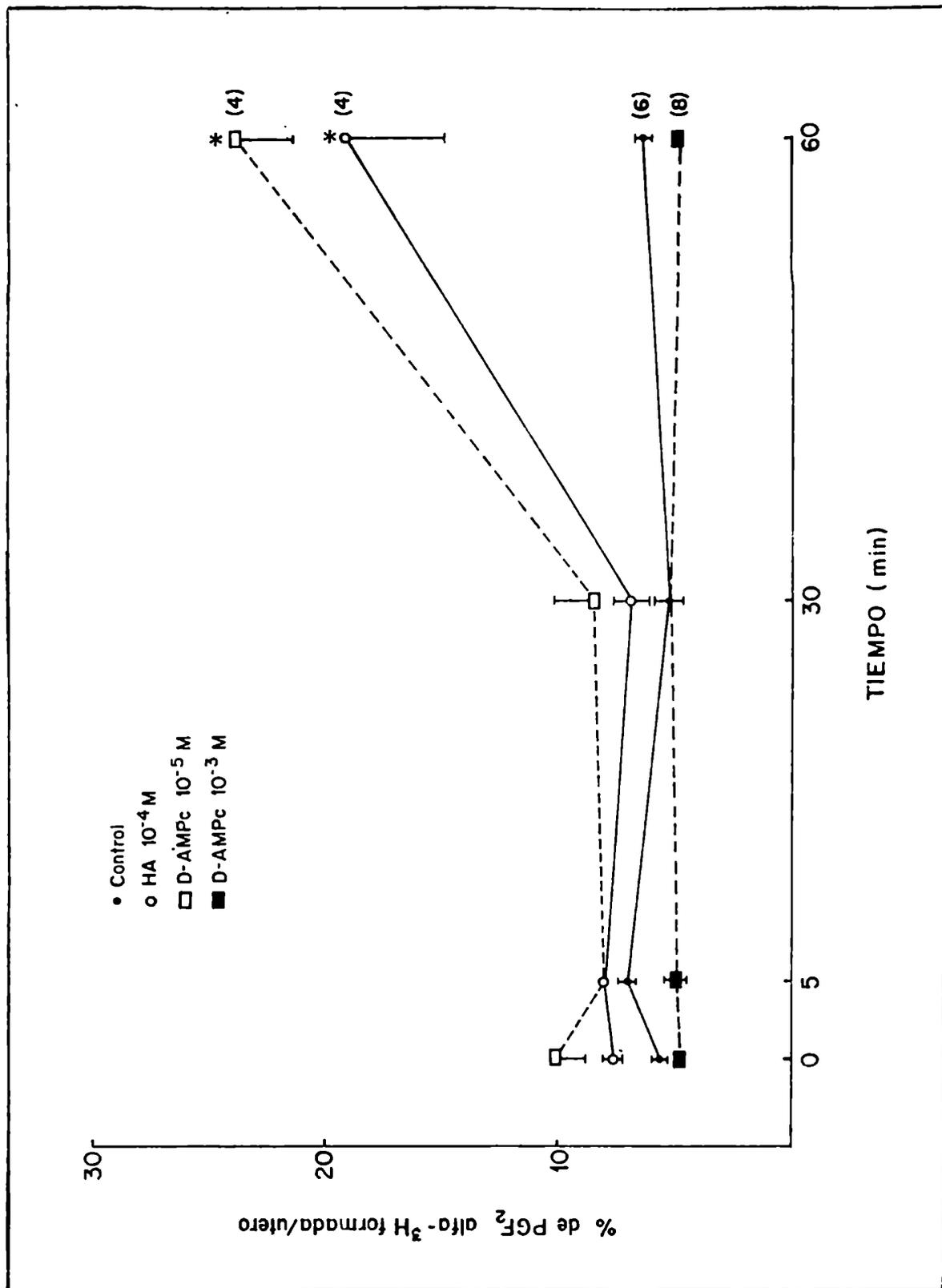


Fig. 28: Acción de la HA y el dibutiril-AMPc sobre la formación de  $^3$ H-PGF<sub>2</sub> alfa por el útero de

B. Efecto de la HA sobre la motilidad del útero de rata preñada y su relación con la síntesis de PG's.

1. Efecto de la HA sobre las contracciones espontáneas de segmentos uterinos aislados de ratas en diferentes estadios de la preñez:

Se construyeron curvas dosis-respuesta acumulativas para las respuestas contráctiles inducidas por la HA en las regiones mesometrial y antimesometrial (M y AM respectivamente) de cuernos aislados de ratas en los días 7<sup>o</sup>, 16<sup>o</sup> y 22<sup>o</sup> de preñez. La fig. 29 a muestra que la HA inhibió en forma dosis-dependiente la TCI desarrollada por segmentos M y AM obtenidos en el día 7 de preñez. El efecto inotrópico negativo de una dosis submáxima de HA se ilustra en la fig. 30, que también muestra cómo la cimetidina  $10^{-5}$  M bloquea completamente esta acción.

Por otro lado, la HA, en el mismo rango de concentraciones, estimuló las contracciones espontáneas de la región M en el día 16 de la preñez, pero no tuvo influencia sobre los segmentos AM (fig. 29, b). En el día 22 de preñez la HA también estimuló los segmentos M y no tuvo efectos significativos sobre la región AM de los cuernos uterinos (fig. 29, c). La fig. 30 muestra registros típicos obtenidos en los días 16<sup>o</sup> y 22<sup>o</sup> de preñez, y el efecto inotrópico positivo de dosis submáximas de HA.

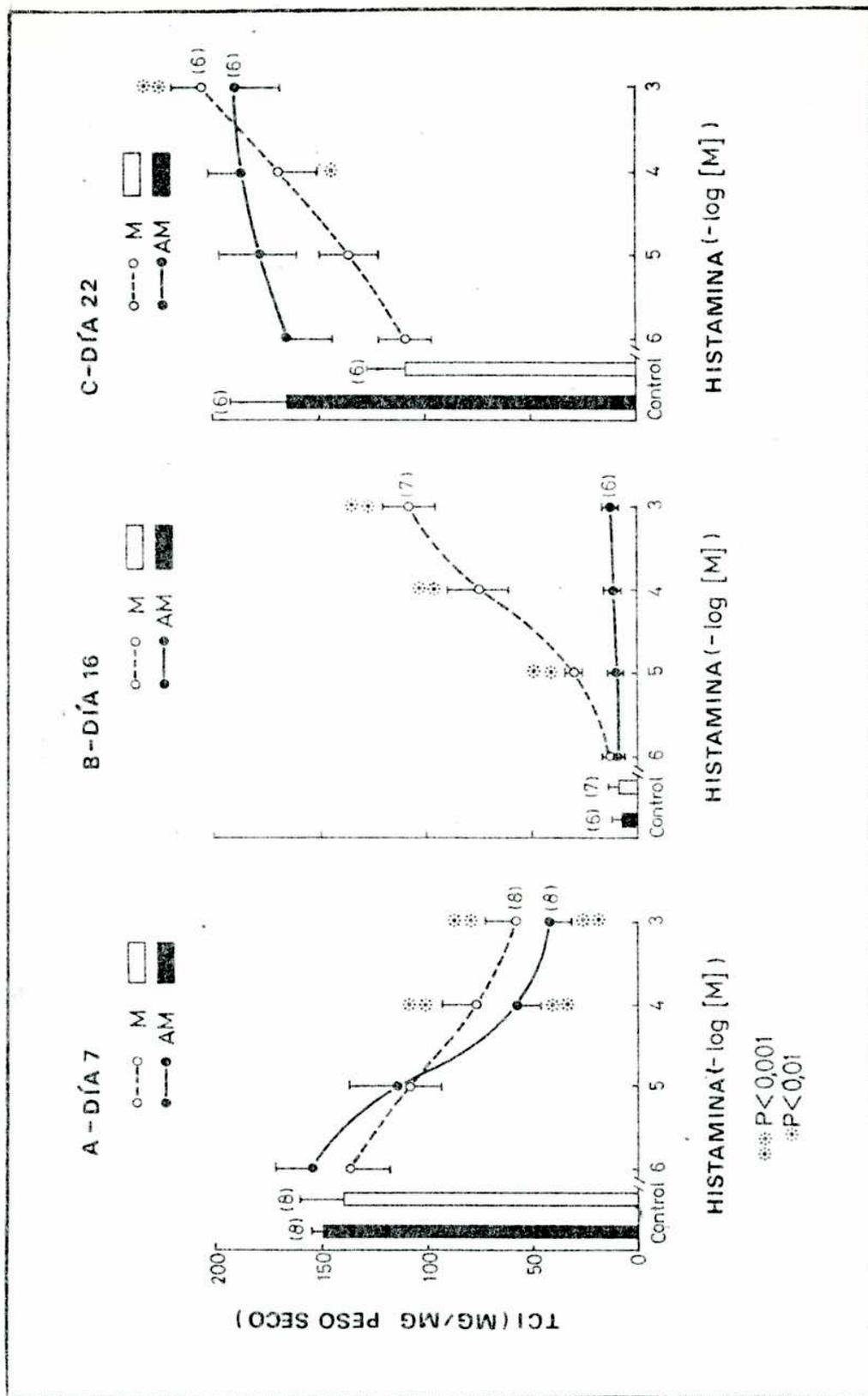


Fig. 29: Efecto inotrópico de la HA en diferentes estadios de la preñez.

\* = P = 0,05; \*\* = P = 0,01.

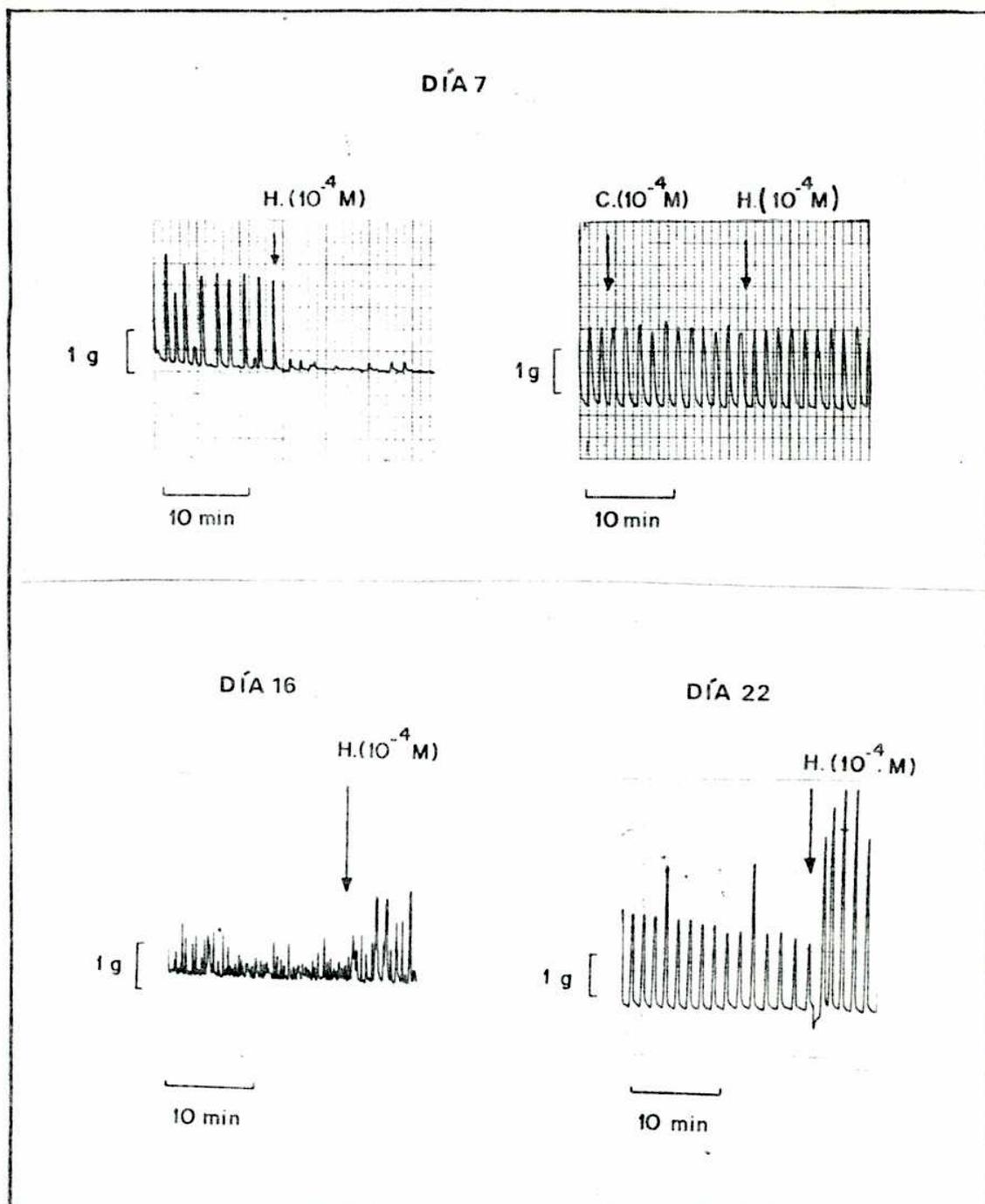


Fig. 30: Actividad espontánea de segmentos uterinos aislados en diferentes días de la preñez; acción de la histamina (H) y cimetidina (C).

## 2. Determinación del contenido de HA en el útero de rata en diferentes estadios de la preñez:

Se determinó el contenido de HA uterina en los días 7º, 16º y 22º de la preñez. También se determinaron los niveles de HA en el útero de rata en estro, para contar con un elemento de referencia. En todos los casos se separaron las regiones M y AM.

El contenido de HA es mayor en la región M tanto en el estro como a los 7 y 16 días de la gestación. En ambas regiones se verifica una disminución del contenido de HA a medida que progresa la preñez, sin embargo, la caída del contenido de HA es más marcada en la región M, puesto que en el día 22º los niveles de HA medidos en ambas zonas no difieren significativamente (fig. 31).

## 3. Efecto de un agonista $H_1$ y de antagonistas $H_1$ en segmentos mesometriales aislados de ratas en el día 16º de preñez:

Para los estudios subsiguientes se escogió la región M del útero de rata en el día 16 de preñez, por ser la que presentaba la respuesta contráctil más nítida. Se estudió la respuesta contráctil al 2-(2-aminoetil) tiazol (SK&F 71481- $A_2$ ), un agonista  $H_1$ , a fin de caracterizar farmacológicamente la respuesta histaminérgica observada. La fig. 32 muestra que tanto la HA como el agonista  $H_1$  puesto a prueba presentan aproximadamente la misma potencia y eficacia cuan

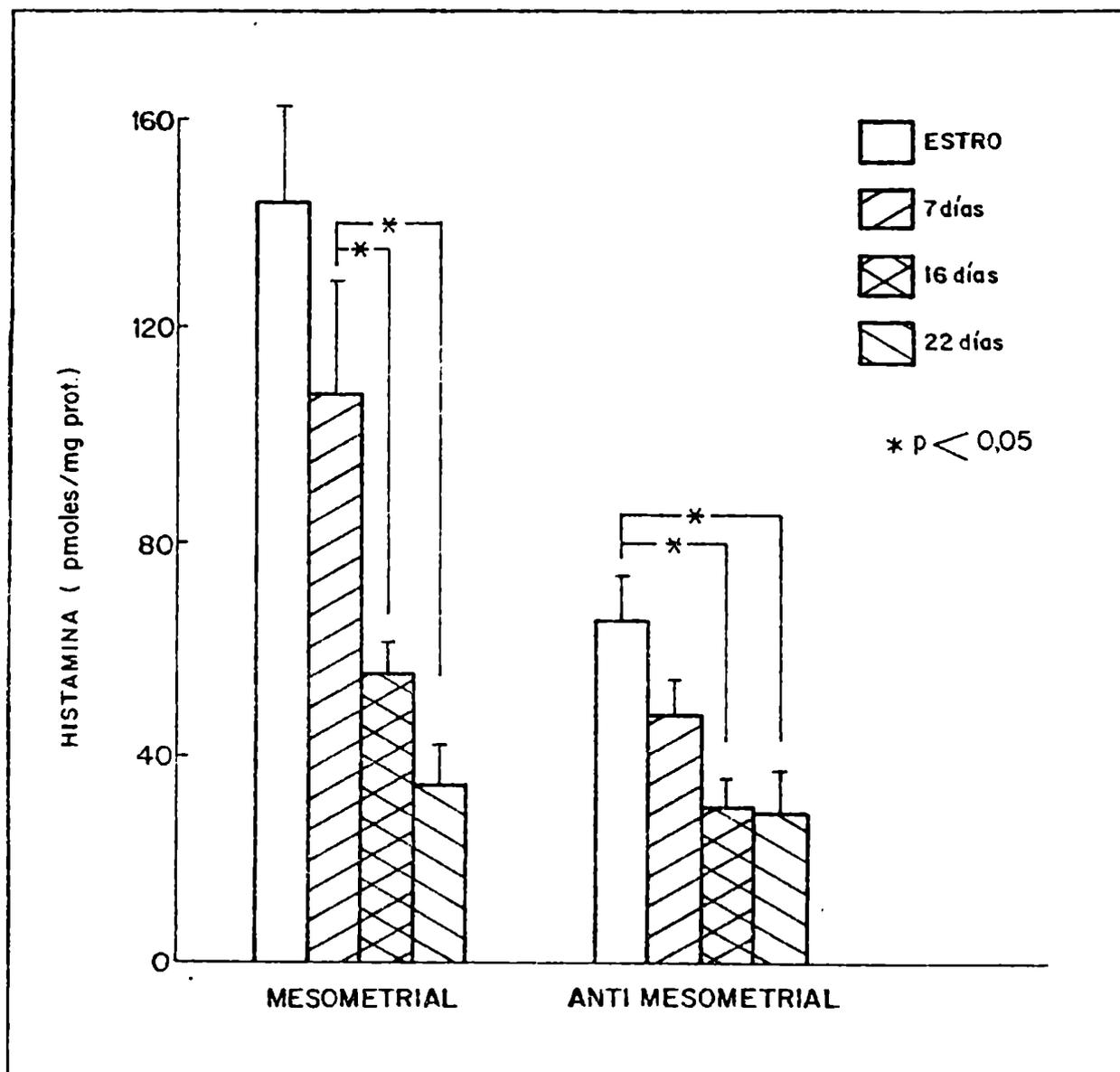


Fig. 31: Contenido de HA en el útero de rata en diferentes estadios de la preñez.

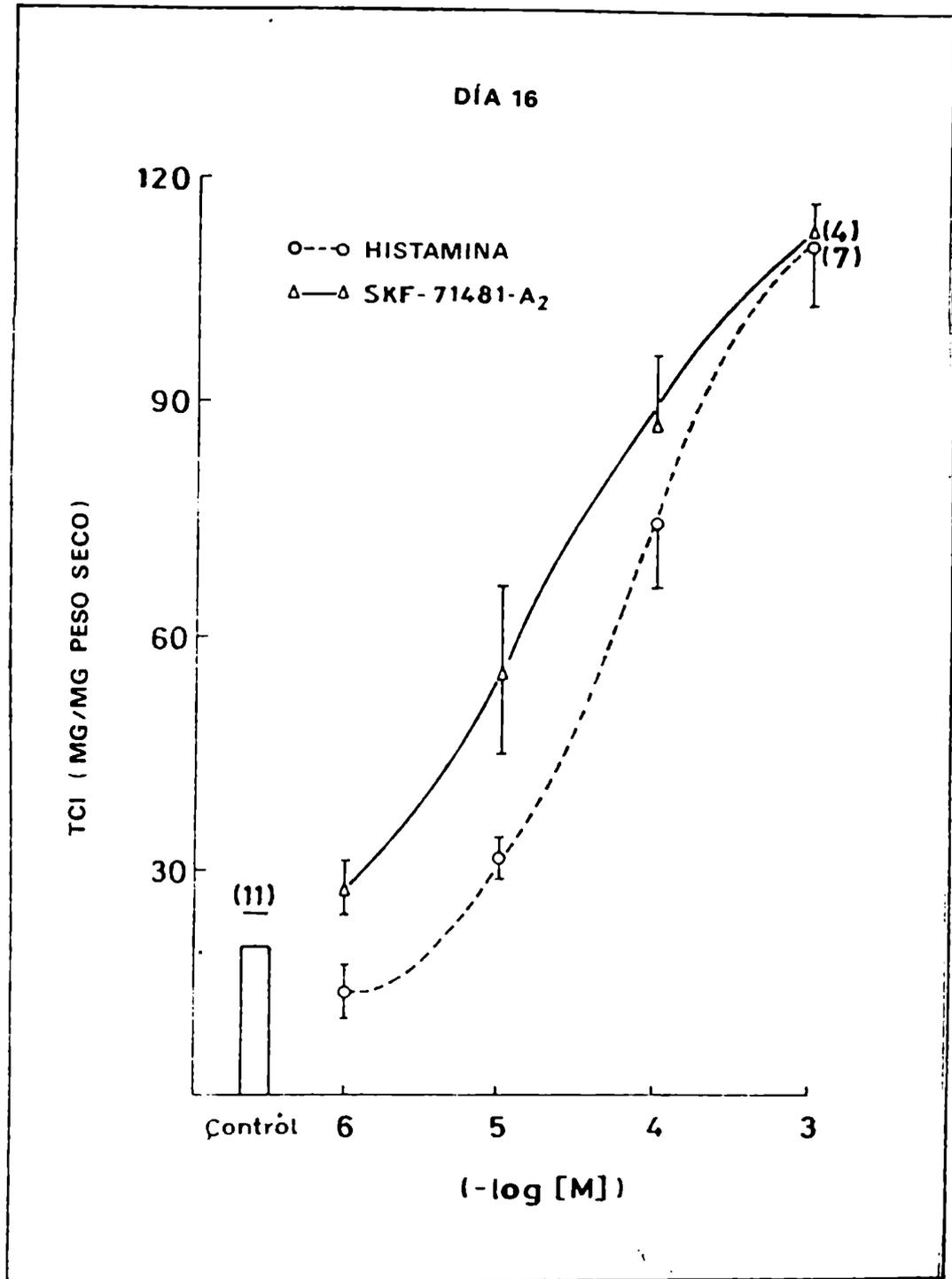


Fig. 32: Efecto de un agonista  $H_1$  sobre la actividad espontánea de segmentos uterinos M aislados en el día 16 de preñez.

do se construyen curvas dosis respuesta para el efecto inotrópico sobre la TCI desarrollada por los segmentos uterinos aislados.

Por otro lado, la pirilamina (un antagonista  $H_1$ ) agregada al medio de incubación antes que la HA, desplazó la curva dosis respuesta hacia la derecha, siendo el aumento de la TCI observada significativamente menor que el de la curva control (fig. 33). Dado que la concentración de pirilamina necesaria para obtener un desplazamiento de la curva dosis respuesta es alta, se estudió también el efecto de la clorfeniramina, un antihistamínico estructuralmente diferente de la pirilamina, ya que se trata de una alquilamina. La clorfeniramina fue capaz de producir un efecto antagónico similar al de la pirilamina  $10^{-4}M$  a una concentración  $10^{-6}M$ .

#### 4. Acción del ácido acetil salicílico (AAS) y del mepacrine sobre el efecto inotrópico positivo de la HA en el útero aislado de rata preñada:

A fin de establecer la participación de los productos de la ciclooxigenasa en la respuesta inotrópica positiva del útero de rata preñada a la HA, se incubaron segmentos M aislados de animales en el día 160 de la preñez con AAS, un inhibidor de aquella enzima. Cuando se realizó la curva dosis respuesta para HA en tejidos pretratados con AAS, el efecto estimulador sobre la actividad espontánea fue completamente abolido (fig. 34).

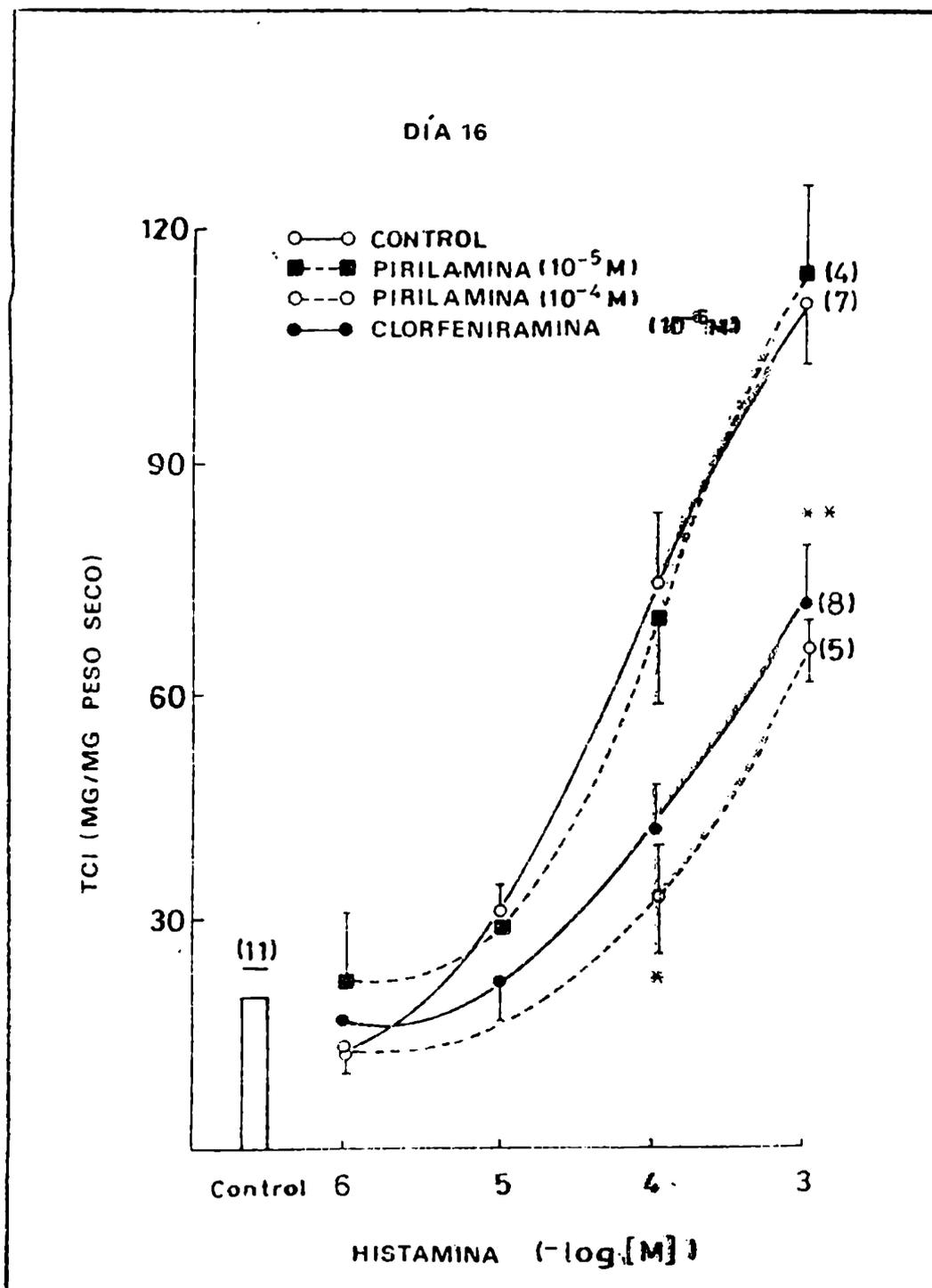


Fig. 33: Acción de antihistamínicos  $H_1$  sobre la respuesta inotrópica positiva de la HA en la región M del útero de rata aislado en el día 16 de preñez. \* =  $P=0,01$ ; \*\* =  $P=0,001$ .

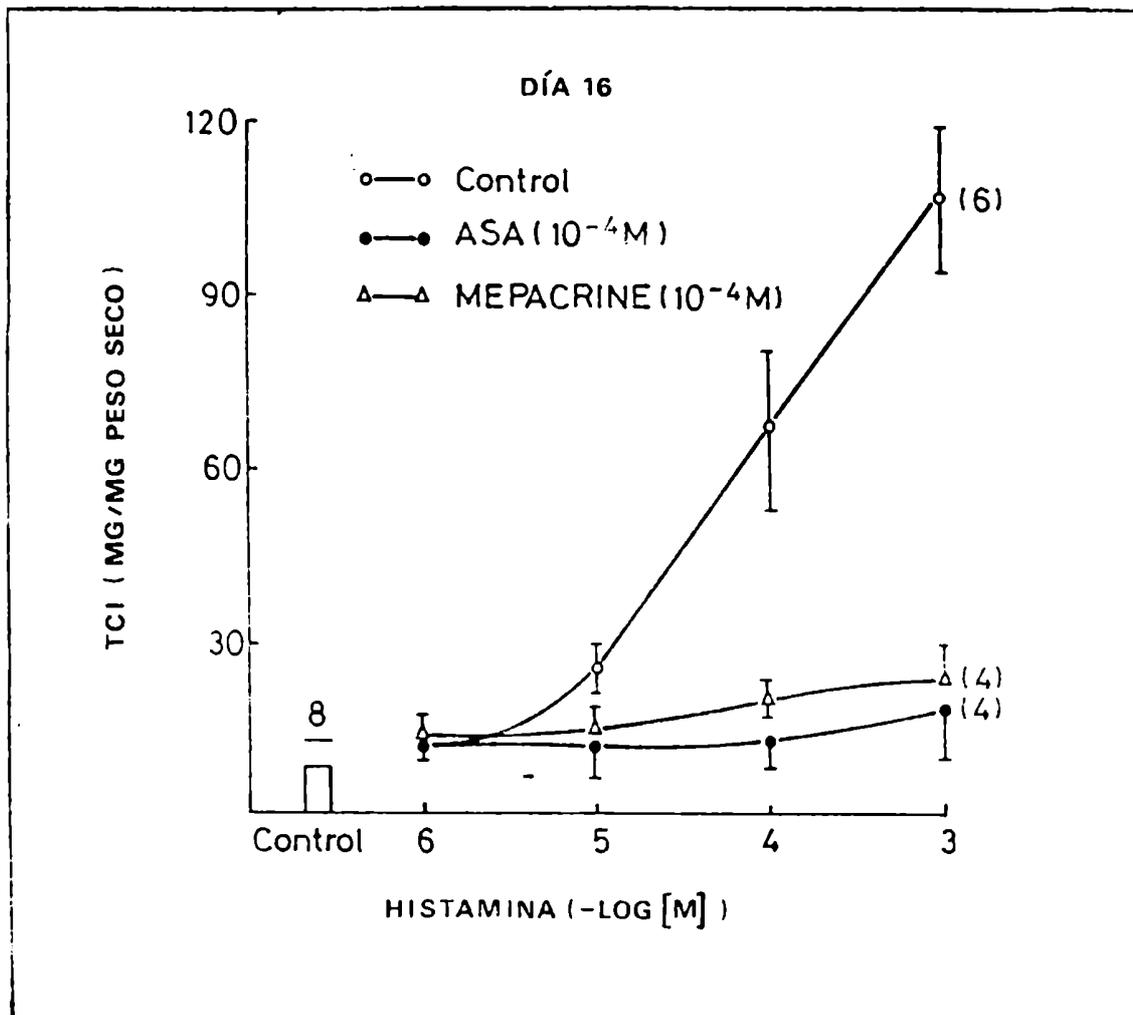


Fig. 34: Acción del ASA y el mepacrine sobre el efecto inotrópico positivo de la HA en la región M del útero de rata aislado en el día 16 de preñez.

Dei mismo modo, el pretratamiento con mepacrine, que inhibe la fosfolipasa  $A_2$  y la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula, anula el efecto inotrópico positivo de la HA (fig. 34).

5. Efecto de la HA sobre la síntesis y liberación de PG's en el útero aislado de rata preñada, acción de antihistamínicos  $H_1$  :

Cuando se expusieron segmentos M aislados de ratas en el día 16º de preñez a una dosis de HA capaz de producir una estimulación submáxima de la actividad miométrial espontánea, se observó un marcado incremento en los niveles de las PG's de la serie 2 ( $PGI_2$  y  $PGF_2$  alfa).

Este efecto pudo ser revertido por la pirilamina y la clorfeniramina, suministrados a las concentraciones capaces de antagonizar el efecto contráctil de la HA (fig. 35).

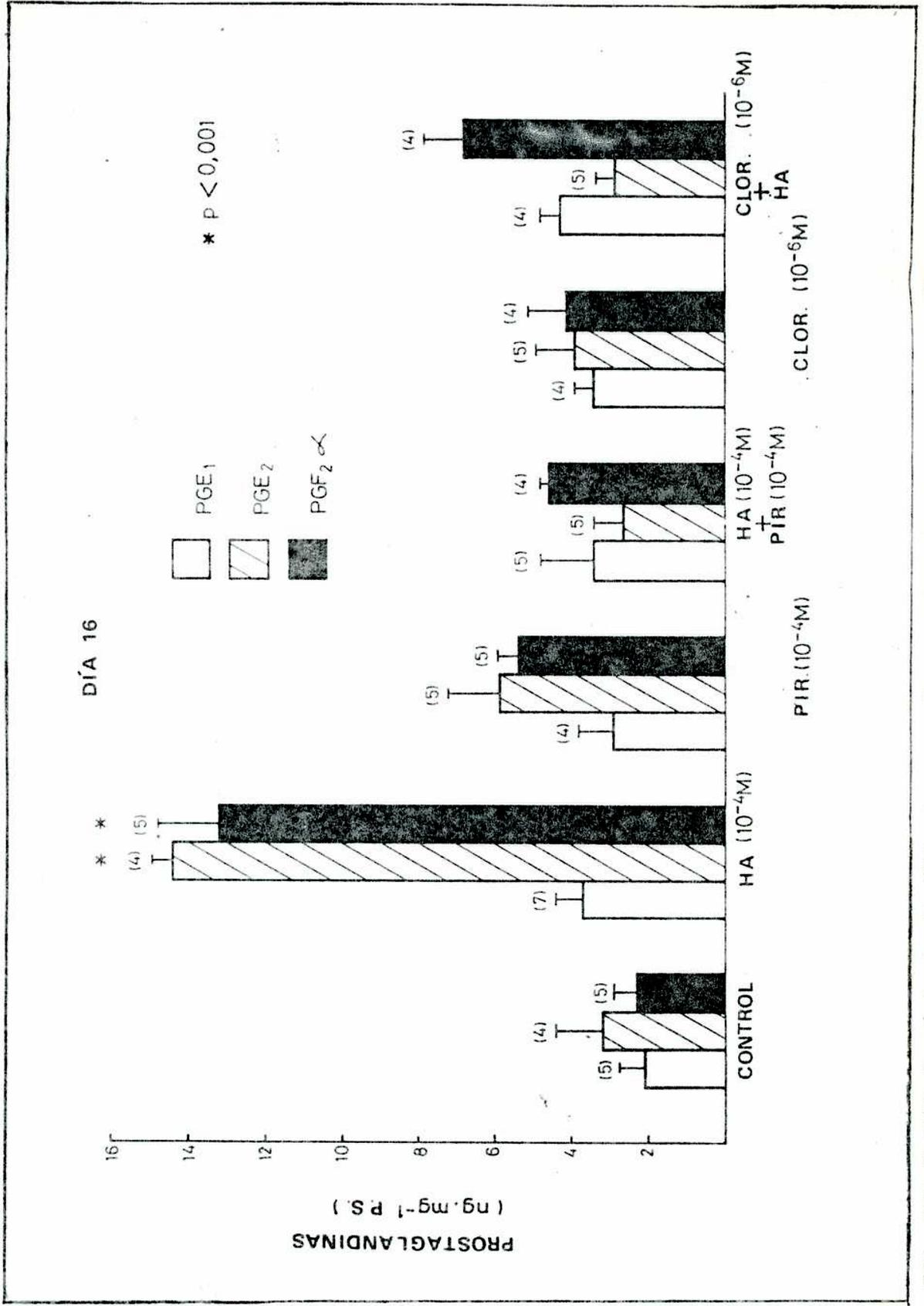


Fig. 35: Perfil de síntesis de PG's de segmentos uterinos M aislados en el día 16 de preñez, acción de HA y antagonistas H<sub>1</sub>.

#### IV. DISCUSION

La existencia de más de un tipo de receptor histaminérgico fue sugerida por primera vez por Ash y col. (12), en vista de que los antihistamínicos disponibles hasta entonces eran incapaces de bloquear la secreción ácida gástrica y la inhibición de las contracciones del útero de rata, efectos evocados por la HA. El efecto inhibitor de la HA sobre la motilidad uterina de la rata ha sido confirmado por diferentes autores (276, 284) y, con el desarrollo de los antagonistas específicos  $H_2$  (33), caracterizado claramente como un efecto de este tipo. Tanto la cimetidina, como la metiamida, la mifentidina y la ranitidina (21, 218, 219) antagonizan la inhibición provocada por la HA sobre la motilidad uterina; mientras que los agonistas y antagonistas  $H_1$  carecen de todo efecto en el útero de rata madura estrogeneizada (12, 218).

El efecto inhibitor de la HA se presenta consistentemente a lo largo de todo el ciclo estral (fig. 18), si bien se observan variaciones en la sensibilidad, que es máxima en proestro y mínima en diestro (Tabla 2).

La concentración de HA uterina en la rata presenta niveles comparables a los de otros órganos como el pulmón (71, 144), y existen abundantes evidencias que demuestran que el contenido de HA uterina se encuentra bajo control hormonal. En particular, varios autores han demostrado independientemente que los niveles de HA uterina

en la rata se correlacionan con los niveles de estrógenos circulantes (186, 255). El estradiol (186) y otros esteroides análogos como el mestranol y el linoestrenol (1), reducen el contenido de HA en el útero de rata en forma específica para este órgano (232); esta disminución es debida a la depleción de reservorios tisulares y no al aumento de la destrucción enzimática del autacoide (186). Se detecta una depleción del 30 al 40% del contenido tisular de HA 1 hora después de la inyección de estrógenos (262), y los niveles de HA se restituyen 14 horas más tarde (186).

El mecanismo por el cual los Eo liberan la HA uterina es desconocido, pero podría ser similar al de la anafilaxis observada en el útero expuesto a la acción de antígenos (8); parece ser que el sitio de acción de los estrógenos son los mastocitos (28). El efecto estrogénico sobre los mastocitos es específico para el tracto reproductor y no afecta a otros órganos (129, 170). Los mastocitos se encuentran preferentemente en el músculo longitudinal del miometrio (170, 178) y son marcadamente más abundantes en la región mesometrial del útero (86).

Presumiblemente, los estrógenos disminuyen el número de mastocitos debido a que causan su ruptura y desgranulación. Mc Kercher y col. demostraron que la fluorescencia debida a HA en los mastocitos del útero de rata desaparece 1 hora después de la administración de estrógenos y permanece ausente durante las siguientes 4 horas

sin desgranulación aparente (186). Por otro lado, Thon y col. demostraron que la desgranulación de los mastocitos acompaña la liberación de HA (274).

La inyección local de HA produce vasodilatación y edema en el útero de rata, indistinguibles de las que se presentan en respuesta a la acción estrogénica (169, 255, 262). Además, los antihistamínicos de tipo  $H_1$  difenhidramina y clorfeniramina inhiben la formación de edema inducida por estrógenos cuando se administran por vía intraluminal dentro de los cuernos uterinos (256).

Sobre la base de estas observaciones se postuló que el efecto estrogénico sobre el útero de rata se debía en primer término a los efectos vasculares provocados por la liberación de HA (262). Con el descubrimiento de los receptores intracelulares para hormonas esteroideas; y debido a que se demostró que el método de inyección intraluminal era capaz de generar edema "per se", aún cuando se inyectaban solamente antihistamínicos (41); y a que los antihistamínicos que se habían utilizado formaban complejos insolubles con el RNA bloqueando su síntesis (22), la hipótesis de la HA fue olvidada.

Curiosamente, nunca se examinó la posibilidad de que la HA estuviera mediando los efectos contráctiles de los estrógenos, tal vez a causa de que los antagonistas  $H_2$  específicos aparecieron recién en 1975, diez años después de que la hipótesis de la HA estu

viera en boga. Los antagonistas  $H_2$  se convirtieron en poderosas herramientas farmacológicas que permitieron aclarar, por ejemplo, el papel de la HA en la secreción ácida gástrica (91).

Estudios previos habían demostrado que, cuando una rata castrada es tratada con estradiol, la motilidad del útero aislado se ve disminuida; observándose una reducción de la tensión desarrollada del orden del 80% después de 40 minutos de actividad (257) (fig. 19), mientras que en el caso del animal no tratado la disminución, en el mismo período, no llega al 20%.

La cimetidina administrada "in vivo" junto con el estradiol es capaz de revertir parcialmente esta inhibición, mientras que la pirilamina, un bloqueante  $H_1$ , es ineficaz en este aspecto (fig. 20). Si bien se ha demostrado que la cimetidina es un antiandrógeno en la rata, ya que interfiere con la unión de la testosterona a su receptor; no interfiere con la unión del estradiol a su receptor (115). Además, cuando se examinó el efecto de la cimetidina sobre el aumento de peso uterino evocado por el estradiol, no se observaron efectos antagónicos (fig. 22). La cimetidina disminuyó ligeramente el aumento del contenido de agua del útero; el mismo efecto fue producido por la pirilamina, por lo cual esta acción no puede ser atribuida exclusivamente al bloqueo de receptores  $H_2$  (fig. 21)

Los resultados presentados demuestran que, cuando se admi

nistra un bloqueante  $H_2$  (i.e. cimetidina) en dosis que están muy por debajo de las que pueden producir efectos colaterales tóxicos en la rata (33), se observa una reversión parcial del efecto inhibitor de los estrógenos sobre la motilidad uterina, sin interferir notoriamente con otras acciones estrogénicas, sugiriendo que la activación de los receptores  $H_2$  es un paso necesario para que aquel efecto se exprese plenamente.

De acuerdo con los datos que proporciona la literatura, la liberación de HA es un efecto temprano de los estrógenos y puede ser detectado entre 4 y 15 minutos después de la administración de la hormona (262). Si la hipótesis de que la liberación de HA media los efectos contráctiles de los estrógenos a través de la activación de los receptores  $H_2$  fuese cierta, entonces podría observarse una disminución de la motilidad pocos minutos después de la administración de una dosis de estrógeno.

Para poner a prueba esta posibilidad, se escogió como modelo el registro de la presión intrauterina desarrollada por el útero de rata en diestro. Este modelo permite, por un lado, detectar rápidamente las variaciones de la motilidad espontánea "in vivo". Por otro lado, el aumento fisiológico de los niveles circulantes de estrógenos tiene lugar a partir de la tarde del diestro, por lo que se pensó que el útero de rata en este estadio podía mostrar mejor la acción estrogénica sobre la motilidad, ya que el útero se encuen

tra "preparado", por decirlo así, para el aumento de los estrógenos circulantes. La administración de una dosis masiva de estradiol sería equivalente a adelantar y exagerar el proceso fisiológico, a fin de poder visualizarlo.

Como era de esperar, la HA fue capaz de inhibir la actividad espontánea "in vivo" del útero de rata en diestro (fig. 23), y el efecto pudo ser antagonizado con cimetidina.

El 17-beta-estradiol ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad espontánea "in vivo" del útero de rata en diestro, que puede ser detectada 8 minutos después de su administración (fig. 24). El efecto es antagonizado por la misma dosis de cimetidina que es capaz de bloquear el efecto histaminérgico. Además, cuando se examinó el efecto del estradiol sobre la actividad espontánea del útero de rata en diestro (estadio en el cual los reservorios de HA se encuentran parcialmente depletados), el efecto inhibitor fue mucho menos marcado (fig. 24).

Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis presentada, sin embargo, difieren de los de Downing y col. (65) en que éstos sólo observaron una caída en la frecuencia de los ciclos de presión intrauterina 6 horas después de la administración de los estrógenos. Hay que tener en cuenta que en aquellos experimentos se utilizaron ratas OV post parto, a las que se les implantó un globo in

trauterino. En estas condiciones, es posible que los reservorios de HA uterina se encontraran parcialmente depletados, ya que el contenido de HA uterina disminuye con la preñez (fig. 31). Por otra parte, Mathur y Chaudhury (184) informan que la presencia de un dispositivo intrauterino aumenta el número de mastocitos e impide la depleción normal de la HA en la rata: la presencia de un globo intrauterino podría tener el mismo efecto. El sistema de registro utilizado en el presente trabajo no requiere de la inserción de globo alguno, solamente se introduce un pequeño volumen de solución fisiológica dentro del cuerno uterino, permitiendo así visualizar los efectos de la depleción de HA.

Es posible que los estrógenos ejerzan su acción inhibitoria en varios niveles distintos, de los cuales por lo menos dos han quedado en evidencia. Se presenta una acción temprana, mediada por la liberación de HA y la activación de receptores  $H_2$ ; y una acción tardía, en la que estaría involucrada la síntesis de RNA y que sería la observada por Downing y col. (65).

En otras condiciones en las que la liberación de HA uterina se encuentra disminuida, como en la diabetes experimental (93), se ha observado que el efecto inotrópico negativo de los estrógenos también se encuentra disminuido: la caída de la motilidad uterina espontánea debida al tratamiento con estradiol es significativamente menor en la rata OV diabética (79), resultado que también concuer

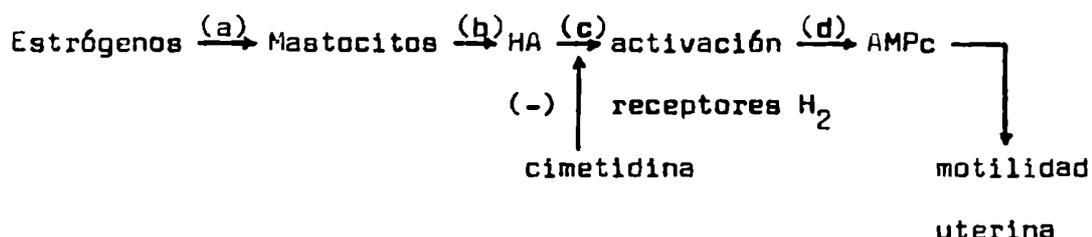
da con la hipótesis presentada.

La administración de estrógenos a ratas castradas produce un rápido incremento del AMPc uterino exclusivamente (17, 97, 264), que puede ser inhibido con cortisol o con altas concentraciones de propranolol (265). También, en todos los sistemas estudiados, la activación de los receptores histaminérgicos se correlaciona con un aumento de los niveles intracelulares de AMPc (187); Mitznegg y col. describen la misma relación en el útero de rata (192). Los resultados presentados en la fig. 25 demuestran que una concentración submáxima de HA es capaz de producir un aumento de los niveles de AMPc intracelulares en el útero aislado de ratas OV, de la misma magnitud que el producido por la  $PGE_1$   $10^{-6}M$ . El efecto de la HA es bloqueado por cimetidina  $10^{-5}M$ , que en igual concentración no afecta la estimulación producida por la  $PGE_1$ . Dado que algunos de los postulados presentados aquí se basan en la suposición de que la cimetidina está actuando sólo a nivel de los receptores histaminérgicos, se consideró relevante comprobar que este antihistamínico no interfería con la activación de la adenil ciclase producida por otros agentes.

El experimento que se resume en la figura 26 demuestra que, en efecto, los niveles uterinos de AMPc aparecen aumentados significativamente 1 minuto después de la administración de una dosis de estradiol equivalente a la que es capaz de inhibir la motilidad del útero de rata "in vivo". Dicho aumento, que evidentemente precede

al efecto inhibitor sobre la motilidad, pudo ser eficazmente bloqueado por la cimetidina.

Sobre la base de los resultados precedentes, se puede postular la siguiente cadena de eventos:



donde los pasos (a) y (b) se apoyan en datos tomados de la literatura, el paso (c) se postula en base a los efectos observados de la cimetidina, y el paso (d) se basa en los resultados presentados en la fig. 25.

Las variaciones de los niveles uterinos de AMPc pueden ser claves en la regulación de la motilidad de ese órgano (156). Las PG's también juegan un papel esencial en la regulación de la motilidad del útero de rata tanto "in vitro" como "in vivo" (3, 89, 280, 281). En particular, la motilidad del útero aislado de rata parece depender principalmente de los niveles de PG's tipo E; el tratamiento de ratas OV con dosis fisiológicas de estrógenos disminuye los niveles de PG's tipo E (90, 257), concomitantemente con la disminución de la motilidad "in vitro" señalada anteriormente.

Si la HA fuera la responsable de los efectos contráctiles de los estrógenos, podría esperarse que ejerciera algún efecto sobre la síntesis y liberación de PG's en el útero de rata. En la fig. 27 se demuestra que una concentración submáxima de HA es capaz de modificar el perfil de síntesis y liberación de PG's en el útero de rata en diestro, disminuyendo significativamente los niveles de PGE<sub>2</sub> y aumentando los de PGF<sub>2</sub> alfa, sin modificar los de PGE<sub>1</sub>. El efecto pudo ser antagonizado por dos antihistamínicos de tipo H<sub>2</sub> diferentes, cimetidina y metiamida, por lo que puede ser atribuido a la activación de receptores histaminérgicos H<sub>2</sub>. En células endometriales humanas en cultivo, la HA también aumenta la síntesis y liberación de PGF (250).

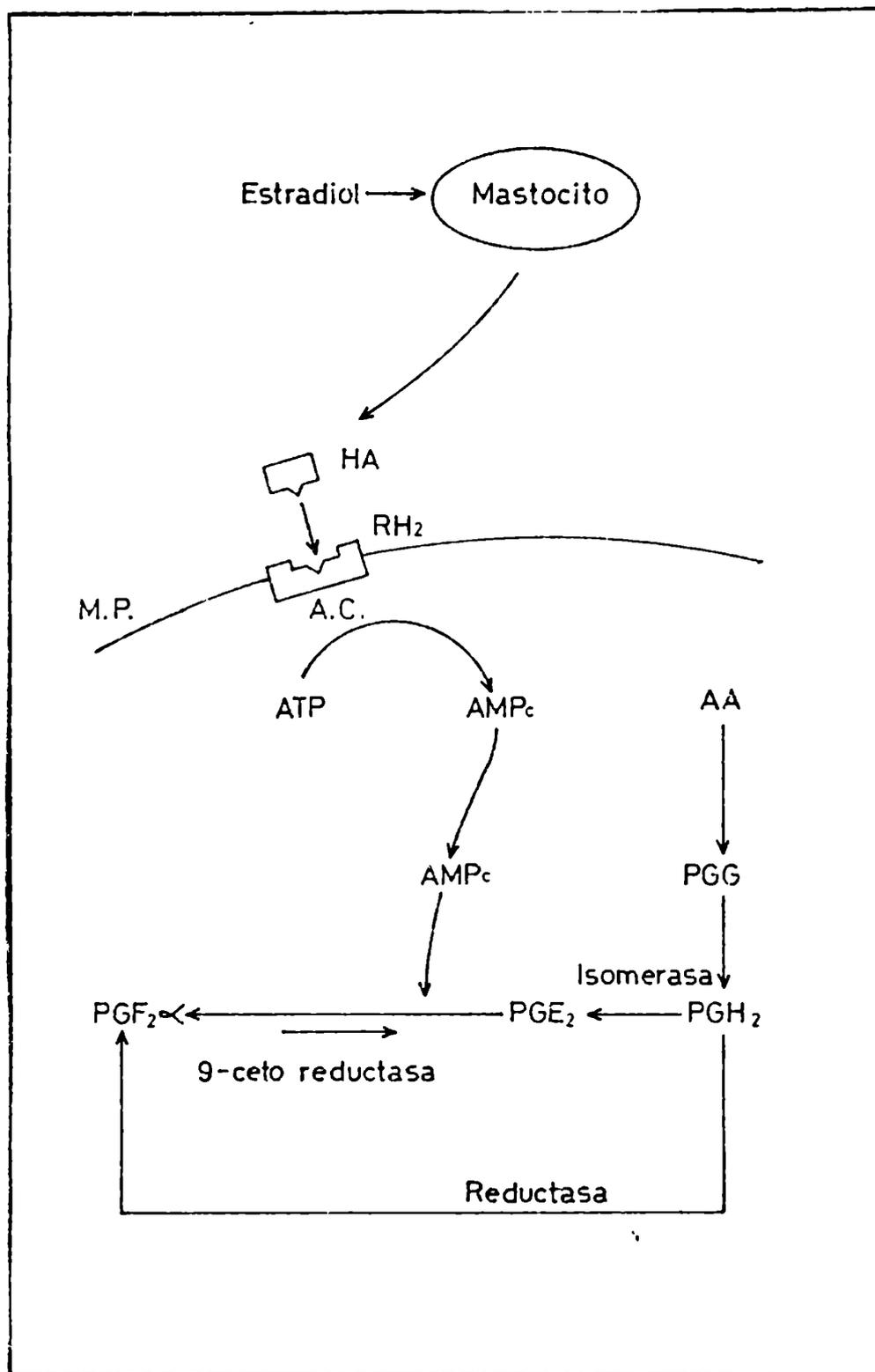
A fin de profundizar en el mecanismo de acción de la HA sobre la síntesis y liberación de PG's, se estudió el efecto de la HA y el dibutiril-AMPc sobre la actividad de la 9-ceto reductasa en el útero de rata en diestro. Como se recordará, esta enzima cataliza la conversión de PGE<sub>2</sub> a PGF<sub>2</sub> alfa.

Tanto la HA 10<sup>-4</sup>M como el dibutiril-AMPc 10<sup>-3</sup>M son capaces de aumentar la conversión de PGE<sub>2</sub> a PGF<sub>2</sub> alfa. En cambio, una concentración de dibutiril-AMPc 10<sup>-5</sup>M resultó ineficaz (fig. 28). Estos resultados confirman la presencia de la enzima en el útero de rata, descrita por primera vez en éste órgano por Franchi y col. (80). La enzima ha sido localizada también en el corazón de pollo y el tea

tículo de rata (80, 168); y en la vena mesentérica bovina, donde es estimulada por bradiquinina (303). En el útero de rata, esta enzima puede ser estimulada por el estradiol (80).

Lo expuesto hasta aquí permite ampliar el esquema inicial, como se muestra en la fig. 36, que representa por supuesto sólo una parte de las complejas interacciones que tienen lugar en el útero, donde el AMPc puede estar afectando simultáneamente otros procesos relacionados con la contractilidad, y donde los estrógenos pueden estar actuando también a otros niveles, como se señaló anteriormente. Este esquema explicaría cómo los estrógenos pueden afectar la síntesis de PG's por un mecanismo independiente de los receptores intracelulares y que no requiere síntesis de proteínas (40, 122). Además, existen evidencias de que los estrógenos pueden actuar modificando el perfil de síntesis de PG's en el útero de rata a través de su conversión a catecol estrógenos (146).

Si bien, como se señaló anteriormente, en la rata adulta la respuesta histaminérgica está claramente caracterizada como  $H_2$  a lo largo de todo el ciclo estral, Ohia y col. informan que en el útero de rata prepúber puede detectarse la presencia de una respuesta inotrópica  $H_1$  excitatoria (210). Por otra parte, es conocido que durante la preñez la respuesta adrenérgica del útero de rata se modifica, pasando de una respuesta beta adrenérgica inhibitoria a una alfa adrenérgica excitatoria (27, 150). Al contrario de lo que ocu



**Fig. 36: Esquema hipotético del mecanismo de acción de la HA en el útero de rata no preñada.**

re durante el ciclo estral, el aumento de los niveles circulantes de estrógenos que se observa hacia el final de la preñez coincide con un marcado incremento de la motilidad uterina (160, 261). Resultaba de interés, entonces, comprobar si la respuesta histaminérgica se revertía durante la preñez, pasando de una acción  $H_2$  inhibitoria a una  $H_1$  estimulante. Se han reportado diferencias en las características contráctiles del miometrio de la región antimesometrial de la rata preñada (141) y no preñada (258), por esta razón el estudio se realizó separando la región mesometrial de la antimesometrial.

La HA inhibe la actividad contráctil espontánea de las zonas M y AM en el día 70 de preñez, presumiblemente a través de su interacción con receptores  $H_2$ , ya que el efecto es antagonizado por cimetidina (figs. 29 y 30). En cambio, en los días 160 y 220 de preñez la HA estimula la motilidad espontánea de los segmentos M, sin alterar la de la región AM (fig. 29).

La acción estimulante de la HA observada desde el día 160 parece estar mediada por la activación de receptores  $H_1$ , pues: a) el 2-(2-aminoetil) tiazol, un conocido agonista  $H_1$  (155), produce un efecto inotrópico positivo similar al de la HA (fig. 32); y b) la curva dosis respuesta para HA se desplazó significativamente a la derecha en presencia de pirilamina o clorfeniramina, dos antagonistas del receptor  $H_1$  (155) (fig. 33).

El contenido de HA uterina decrece significativamente du

rante la preñez (fig. 31), especialmente en la región M, pero hay que tener en cuenta que en el útero de rata preñada aparecen otras fuentes de HA; específicamente el feto de la rata es capaz de formar HA (138). La cantidad de HA formada por cada feto aumenta desde el día 15 de preñez hasta alcanzar un pico en el momento del parto, y luego decrece rápidamente hasta hacerse nula dos días después del alumbramiento (139). La actividad de la histaminasa muestra un pico en el día 130 y luego disminuye hasta el momento del parto, tanto en el útero como en la placenta (139). Todos estos resultados sugieren una posible función de los receptores  $H_1$  excitatorios en el útero de rata preñada, relacionado con el fin de la gestación y la inducción del parto. Sin embargo, los experimentos realizados no permiten aún clarificar la importancia fisiológica de la HA en estos procesos.

Por otro lado, los resultados presentados demuestran que la HA es capaz de estimular la síntesis y liberación de  $PGE_2$  y de  $PGF_2$  alfa, pero no de  $PGE_1$ , en segmentos M aislados del útero de rata en el día 160 de la preñez. Este efecto, relacionado con la activación de los receptores  $H_1$ , ha sido observado también en otros sistemas como el pulmón de cobayo (18, 211) y el lecho vascular de perro (135, 154); y en la cápsula testicular de conejo (204), por lo que se trataría de un mecanismo bastante generalizado.

Los resultados presentados en la fig. 35 demuestran que la síntesis y liberación de PG's uterinas coinciden con la acción

inotrópica positiva de la HA en segmentos M aislados en el día 16<sup>o</sup> de la gestación. Ambos efectos pueden ser inhibidos por antagonistas  $H_1$  (fig. 35). El mepacrine, un inhibidor de la  $PLA_2$  (180, 283) y el AAS, un inhibidor de la ciclooxigenasa (279), atenuaron casi completamente la acción inotrópica de la HA en los segmentos M, en concentraciones que disminuyen la liberación de ácidos grasos precursores de prostanoïdes o la conversión de precursores en PG's, respectivamente.

Es muy posible, entonces, que el efecto inotrópico positivo de la HA esté asociado a la síntesis y liberación de PG's por el útero. No se puede descartar la participación de otros prostanoïdes diferentes de la  $PGE_2$  y la  $PGF_2$  alfa, como la  $PGI_2$  (88). Sin embargo, el efecto parece estar circunscrito a los metabolitos del ácido araquidónico, ya que los niveles de  $PGE_1$  no se alteran por efecto de la HA.

La activación de los receptores  $H_1$ , entonces, estimularía la deacilación del ácido araquidónico a través de mecanismos mediados por la  $PLA_2$ , de modo similar al que Juan (134) ha postulado para explicar el efecto de la bradiquinina en el lecho vascular. La activación de la  $PLA_2$ , una enzima  $Ca^{2+}$  dependiente (16, 295), resultaría de un aumento de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelulares debido a la estimulación de los receptores  $H_1$ . En verdad, existen evidencias de que la acción estimulante de la HA en el músculo liso depende de

la movilización de reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  (92, 123). La activación de la  $\text{PLA}_2$  aumentaría los niveles de ácido araquidónico disponible para ser convertidos en prostanoïdes de la serie 2, que participarían del efecto inotrópico observado.

## V. CONCLUSIONES

1) La HA liberada en el útero participa en la respuesta inotrópica del miometrio a los estrógenos en la rata, a través de la activación de los receptores  $H_2$  porque:

\_ La HA es capaz de inhibir la actividad miometrial espontánea, tanto "in vitro" como "in vivo".

\_ La administración de un bloqueante  $H_2$  "in vivo" junto con el estradiol revierte parcialmente el efecto inhibitor de los estrógenos sobre la motilidad uterina en la rata OV.

\_ La administración de estradiol reduce la actividad espontánea del útero de rata en diestro, dentro del período de tiempo en el que se libera la HA. El efecto puede ser bloqueado por un antagonista  $H_2$ .

\_ La administración de estradiol también produce un rápido incremento del AMPc uterino, el efecto es bloqueado por un antagonista  $H_2$ .

\_ La HA mimifica "in vitro" el efecto de los estrógenos sobre el perfil de síntesis de PG's del útero de rata en diestro.

\_ La HA y el dibutiril-AMPc mimifican "in vitro" el efecto del estradiol sobre la 9-ceto reductasa, aumentando la conversión de  $PGE_2$ - $^3H$  a  $PGF_2$  alfa- $^3H$ .

2) La HA estimule la motilidad espontánea del útero de rata preñada "in vitro" a través de la activación de receptores  $H_1$  y la

estimulación de la síntesis de PG's porque:

\_ El efecto inotrópico positivo de la HA que se observa desde el día 16 de la preñez es bloqueado por antihistamínicos de tipo H<sub>1</sub>, e igualmente evocado por un agonista H<sub>1</sub>.

\_ La HA es capaz de estimular la síntesis y liberación de PG's de la serie 2 en el útero de rata aislado en el día 16<sup>o</sup> de preñez.

\_ El mepacrine, un inhibidor de la PLA<sub>2</sub>; y el AAS, un inhibidor de la ciclooxigenasa, atenúan casi por completo la acción inotrópica positiva de la HA en segmentos uterinos aislados en el día 16<sup>o</sup> de preñez.



J. Marcelo Viggiano



Dra. Martha F. de Gimeno

VI. BIBLIOGRAFIA

- 1) Abdel-Aziz, A.; Ghazal, A.; Daabees, T. & Loufti, I.  
J. Repröd. Fert. 42: 365 (1975).
- 2) Adelstein, R.S. & Eisenberg, E.  
Ann. Rev. Biochem. 49: 921 (1980).
- 3) Aiken, J.W.  
Nature 240: 21 (1972).
- 4) Aiken, J.W. & Vane, J.R.  
J. Pharmac. Exp. Ther. 184: 678 (1973).
- 5) Allen, J.E. & Valery, C.R.  
Archs. Intern. Med. 133: 86 (1974).
- 6) Alm, P.; Alumets, J.; Brodin, E.; Hakanson, R.; Nilsson, G.; Sjöberg, N.O.; Sundler, F.  
Neurosci. Res. 3: 419 (1978).
- 7) Armstrong, D.T.  
Amer. J. Physiol. 214: 764 (1968).
- 8) Aronson, A.S.  
Brit. J. Pharmacol. 34: 523 (1968).
- 9) Arrang, J.M.; Schwartz, J.C.; Schunack, W. (1985).  
Eur. J. Pharmac. 117: 109 (1985).
- 10) Arrigoni-Martelli, E.  
Inflamation and antiinflammatories. Halsted Press, New York (1977).
- 11) Agh, A.S.F. & Schild, H.O.  
Br. J. Pharmac. Chemother 27: 427 (1966).

- 13) Ashton, F.T.; Somlyo, A.V.; Somlyo, A.P.  
J. Mol. Biol. 98: 17 (1975).
- 14) Barcilowski, B.; Carlson, J., Wilson, L. & McCracken, J.A.  
Endocrinology 95: 1340 (1974).
- 15) Barnea, A. & Gorski, J.  
Endocrinology 86: 909 (1970).
- 16) Batra, S. & Bengtsson, B.  
J. Physiol. 276: 329 (1978).
- 17) Batra, S.  
Trends in Pharmacological Sciences 1: 388 (1980)
- 18) Baylin, S.B.; Beavan, M.A.; Buja, L.M. & Kreiser, H.R.  
Am. J. Med. 53: 723 (1972).
- 19) Behrman, H.R. & Anderson, G.G.  
Archs. Intern. Med. 133: 77 (1974).
- 20) Bell, C.  
Pharmacol. Rev. 24: 657 (1972).
- 21) Bertaccini, G.; Molina, E.; Vitali, T. & Zappia, L.  
Br. J. Pharmac. 66: 13 (1979).
- 22) Birchall, K. & Halkerston, I.D.K.  
Endocrinology 85: 773 (1969).
- 23) Black, J.W.; Duncan, W.M.; Durant, C.J.; Emmet, J.C.;  
Genellin, C.R.; Heelbo, T.; Parsons, E.M. & Willie, J.H.  
Agents & Actions 3: 133 (1973).
- 24) Blattner, R.; Classen, H.G.; Dehnert, H.; Döring, H.J.  
Experiments on isolated smooth-muscle preparations.  
HSE Biological Measuring Techniques III (1978).

- 25) Bloom, W. & Fawcett, D.W.  
Tratado de Histología. Ed. Labor, 6ª Ed. (1973).
- 26) Blyth, D.I.  
Br. J. Pharmac. 49: 445 (1973).
- 27) Borda, E.; Sauvage, J.; Stein-Borda, L.; Gimeno, M.F. & Gimeno, A.L.  
Eur. J. Pharmacol. 56: 61 (1979).
- 28) Boreus, L.O.  
Acta Physiol. Scand. 52: 320 (1961).
- 29) Boyle, F. & Dignes, K.  
Naunyn Schmiedeberg Archiv. Pharmacol. 321: 56 (1982).
- 30) Bozler, E.  
Biol. Symposia 3: 95 (1941).
- 31) Bozler, E.  
Endocrinology 29: 225 (1941).
- 32) Brenner, R.R.  
Acta Physiol. Latinoam. 26: 453 (1976).
- 33) Brimblecombe, R.W.; Duncan, W.A.M.; Durant, G.J., Emmet, J.C.; Ganellin, C.R.; Leslie, G.B. & Parsons, M.E.  
Gastroenterology 74: 339 (1978).
- 34) Brody, M.J.; Edvinsson, L.; Sjöberg, N.O.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149: 120 (1975).
- 35) Brown, D.A.; Albano, J.; Ekins, R.; Sgherzi, A. & Thompson, W.  
Biochem. J. 121: 561 (1971).
- 36) Brown, D.D.; Tomchick, R. & Axelrod, A.  
J. Biol. Chem. 234: 2948 (1959).

- 37) Bumpus, F.M.; Khairallah, P.A., Arakawa, K.; Page, I.H.;  
Smeby, R.R.  
Biochim. Biophys. Acta 46: 38 (1961).
- 38) Cao, C.M.N., Cepero, E.M.  
Adv. Prost. Throm. Res. 2: 877 (1976).
- 39) Carsten, M.E.  
Prostaglandins 5: 33 (1974).
- 40) Castracane, V.D. & Jordan, V.C.  
Biol. Reprod. 13: 587 (1975).
- 41) Cecil, H.C.; Bitman, J.; Hannum, J.A. Jr. & Trezise, L.  
J. Endocrinol. 37: 393 (1967).
- 42) Chandrabrose, K.A.; Lapetina, E.G.; Schmitges, C.J.;  
Siegel, M.I.; Cuatrecasas, P.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 75: 214 (1978).
- 43) Chaud, M.A.  
Tesis Doctoral, F.C.E. y N., U.B.A. (1984).
- 44) Chaud, M.A.; Vioglio, J.M.; Gimeno, M.F. & Gimeno, A.L.  
Prostagland. Leuk. and Med. 16: 225 (1984).
- 45) Ching Chun Li.  
Introducción a la estadística experimental. Omega Ed.  
Barcelona (1969).
- 46) Chubb, I.W.; Hodgson, A.J. & White, G.H.  
Neurosci. Res. 5: 2065 (1980).
- 47) Cocceani, F.; Dreifuss, J.J.; Puglisi, L.; Wolfe, L.S.  
Prostaglandins, peptides and amines. P. Mantegazza Ed.  
E.W. Horton. London Academic (1973).

- 48) Correa, F.M.A.; Saavedra, J.M.  
Brain Res. 205: 445 (1981).
- 49) Cortijo, J.; Espluges, J.; Morales-Olivas, F.J.; Rubio, E.  
Eur. J. Pharmac. 97: 7 (1984).
- 50) Coruzzi, G.; Poli, E.; Bertaccini, G.  
Agents & Actions 13: 173 (1983).
- 51) Creed, K.E.  
Br. Med. Bull. 35: 243 (1971).
- 52) Csapo, A.  
Am. J. Anat. 98: 273 (1956).
- 53) Csapo, A.  
Am. J. Obstet. Gynec. 85: 359 (1963).
- 54) Csapo, A.; Sousa Filho, M.B.; de Souza, J.C.; de Souza, D.  
Fert. Steril. 17: 621 (1966).
- 56) Darksen, A.; Cohen, P.  
J. Biol. Chem. 250: 9342 (1975).
- 57) Davoren, P.R. & Sutherland, E.W. (1963).  
J. Biol. Chem. 230: 3009 (1963).
- 58) Dean, P.M.  
Br. J. Pharmacol. Chemother. 32: 65 (1968).
- 59) Dembinska-Kiec, A.; Grodzinska, L.; Piotrowicz, J.  
Pol. J. Pharm. Pharmacol 16: 79 (1974).
- 60) Dey, S.K.; Johnson, D.C. & Santos, J.G.  
Biol. Reprod. 21: 1169 (1979).
- 61) Dey, S.K.; Villanueva, C. & Abdon, N.I.  
Nature 278: 648 (1979).

- 62) Dey, S.K.; Villanueva, C.; Chien, J.M.; Crist, R.D.  
J. Reprod. Fertil. 53: 23 (1978).
- 63) Diamond, J. & Hartle, D.J.  
Arch. Biochem. Biophys. 167: 203 (1975).
- 64) Douglas, W.W.; Kanno, T. & Sampson, S.R.  
J. Physiol. 188: 107 (1967).
- 65) Downing, S.J.; Porter, D.G.  
J. Endocr. 78: 119 (1978).
- 66) Downing, S.J.; Porter, D.G. & Redstone, C.D.  
J. Physiol. 317: 425 (1981).
- 67) Dusting, G.J.; Moncada, S. & Vane, J.R.  
Prostaglandins 13: 3 (1977).
- 68) Eckenfels, A.; Vane, J.R.  
Br. J. Pharmacol. 45: 451 (1972).
- 69) Espey, L.L.  
Biol. Reprod. 22: 106 (1980).
- 70) Feinstein, M.B.; Becker, E.L. & Fraser, C.  
Prostaglandins 14: 1075 (1977).
- 71) Feldberg, W.  
Histamine. Ciba Foundation Symposium. J.&A. Churchill  
Ltd. London (1956).
- 72) Fenwick, L.; Jones, R.R., Naylor, B.  
Br. J. Pharmac. 59: 191 (1977).
- 73) Finn, C.A.  
J. Reprod. Fert. 17: 69 (1968).

- 74) Flower, R.J.  
Agents & Actions Suppl. 3: 99 (1977).
- 75) Flower, R.J.; Blackwell, G.J.  
Nature 278: 456 (1979).
- 76) Foreman, J.C., Norris, D.B., Rising, T.J., Weber, J.E.  
Br. J. Pharmac. 87: 37 (1986).
- 77) Franchi, A.M.; Bonacossa, A.; Gimeno, M. & Gimeno, A.  
Prostaglandins 23: 819 (1982).
- 78) Franchi, A.M.; Chaud, M.; Borda, E.S.; Gimeno, M.F.;  
Lazzari, M.A. & Gimeno, A.L.  
Prostaglandins 22: 637 (1981).
- 79) Franchi, A.M.; Chaud, M., González, E.T., Gimeno, M.F. &  
Gimeno, A.L.  
XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Farmacología. Buenos Aires (1986).
- 80) Franchi, A.M.; Gimeno, M.F.; Gimeno, A.L.  
Prostaglandins 29: 773 (1985).
- 81) Frank, R.T.; Bonham, C.D.; Gustavson, R.L.  
Amer. J. Physiol. 74: 395 (1925).
- 82) Fuchs, A.R.  
Gynecol. Invest. 7: 99 (1976).
- 83) Fuchs, A.R.; Periyasamy, S.; Alexandrova, M. & Soloff,  
M.S.  
Endocrinology 113: 742 (1983).

- 84) Garfield, R.E.;  
Am. J. Physiol. 251 (Cell Physiol. 20): C41 (1980).
- 85) Geller, H.M.; Springfield, S.A. & Tiberio, A.R.  
Can. J. Physiol. Pharmacol. 62: 715 (1984).
- 86) Gibbons, A.F.E.; Chang, M.C.  
Biol. Reprod. 6: 193 (1972).
- 87) Gilmore, N.; Vane, J.R.; Willis, J.H.  
Nature 218: 1135 (1968).
- 88) Gimeno, M.F.; Borda, E.; Lazzari, M.; Gimeno, A.L.  
Prostaglandins 20: 233 (1980).
- 89) Gimeno, A.L. & Gimeno, M.F.  
Trends in Pharmacological Sciences 5: 28 (1984).
- 90) Gimeno, M.F.; Sterin-Speziale, N.; Landa, A.; Bonacossa,  
H. & Gimeno, A.L.  
Prostaglandins 17: 673 (1979).
- 91) Goodman, L.S. & Gilman, A.  
The Pharmacological Basis of Therapeutics. MacMillan  
Publishing Co. Inc. New York (1975).
- 92) Goodman, F.R.; Weiss, G.B.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 177: 415 (1971).
- 93) Goth, A.; Nash, W.L.; Nagler, M. & Holman, J.  
Am. J. Physiol. 191: 25 (1957).
- 94) Grand, R.J.; Perry, S.V. & Weeks, R.A.  
Biochem. J. 177: 521 (1979).
- 95) Grassé, P.  
Traité de Zoologie. Tomo XVI, fasc. VI. Masson et Cie.  
Eds. Paris (1969).

- 96) Greaves, M.W.; McDonald Gibson, W.J.  
Brit. Med. J. 3: 527 (1972).
- 97) Griffin, D.M. & Szego, C.M.  
Life Sci. 7 (20, parte 2): 1017 (1968).
- 98) Grodzinska, L.; Panczenko, B. & Gryglewski, R.J.  
J. Pharm. Pharmacol. 27: 88 (1975).
- 99) Grund, V.R., Goldberg, N.D. & Hunninghake, D.B.  
The Journal of Pharmacology 195: 176 (1975).
- 100) Gryglewsky, R.J.; Korbut, R. & Ocetkiwicz, A.  
Nature 273: 765 (1978).
- 101) Hakanson, R.  
Acta Physiol. Scand. 79 (suppl. 340): 1 (1970).
- 102) Ham, E.A.; Cirillo, V.J.; Zanetti, M.E. & Kuehl, F.A. Jr.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 1420 (1975).
- 103) Hamberg, M. & Samuelson, B.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 899 (1973).
- 104) Hamberg, M.; Svensson, J. & Samuelsson, B.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71: 345 (1974).
- 105) Hardin, J.W.; Clarck, J.H.; Glasser, S.R.; Peck, E.J.  
Biochemistry 15: 1370 (1976).
- 106) Hartshorne, D.J.  
Chest 78: 1 suppl. (1980).
- 107) Harney, P.J.; Sneddon, J.M. & Williams, K.I.  
J. Endocr. 60: 343 (1974).

- 108) Haslam, R. & McClenagham, M.D.  
Proc. VII Int. Cong. Thromb. Hem.: 117 (1979).
- 109) Hassid, A.  
Am. J. Physiol. 244 (Cell Physiol. 13): C369 (1983).
- 110) Head, J.F.; Weeks, R.A. & Perry, S.V.  
Biochem. J. 161: 465 (1977).
- 111) Hegstrand, C.R.; Kanof, P.D.; Greengard, P.  
Nature 269: 163 (1976).
- 112) Herbaczynska-Cedro, K. & Vane, J.R.  
Circ. Res. 33: 428 (1973).
- 113) Hervonen, A.; Kanerva, L.; Lietzen, R. & Partanen, S.  
Acta Physiol. Scand. 85: 283 (1972).
- 114) Hirata, F.  
J. Biol. Chem. 256: 7733 (1981).
- 115) Hirschowitz, B.I.  
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 19: 203 (1979).
- 116) Hoar, W.S.  
Fisiología General y Comparada. Ed. Omega S.A. España (1978).
- 117) Holaday, D.A., Volk, M. & Mandell, J.  
Am. J. Physiol. 195: 505 (1958).
- 118) Holman, M.E.; Neild, T.  
Br. Med. Bull. 35: 235 (1979).
- 119) Hong, S.L. & Levine, L.  
J. Biol. Chem. 251: 5814 (1976).

- 120) Horrobin, D.F.  
Prostaglandins. Eden Press Ed. Montreal (1978).
- 121) Horton, E.W.  
Physiol. Rev. 49: 122 (1969).
- 122) Horton, E.W. & Poyser, N.  
Physiol. Rev. 56: 595 (1976).
- 123) Hudgins, P.M. & Weiss, G.B.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 159: 91 (1968).
- 124) Hutchinson, D.L., Westoser, J.L. & Will, D.W.  
Am. J. Obstet. Gynec. 83: 857 (1962).
- 125) Ishikawa, M.; Fuchs, H.R.  
Am. J. Obstet. Gynec. 132: 611 (1978).
- 126) Israelsson, V.; Hamberg, M. & Samuelsson, B.  
Eur. J. Biochem. 11: 390 (1969).
- 127) Janne, O.; Kontula, K.; Luukkainen, T. & Vihko, R.  
J. Steroid. Biochem. 6: 501 (1975).
- 128) Jessup, S.J.; McDonald-Gibson, W.J.; Ramwell, P.W. & Shaw, J.E.  
Fed. Proc. 29: 387 (1970).
- 129) Johanson, H. & Westin, B.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand 45: 133 (1959).
- 130) Johnson, M. & Ramwell, P.J.  
Prostaglandins 3: 703 (1973).
- 131) Johnson, R.A.; Morton, D.R.; Kinner, J.H.; Gorman, R.R.; McGuire, J.C.; Sun, F.I.; Whittaker, N.; Bunting, S.; Salmon, J.; Moncada, S. & Vane, J.R.  
Prostaglandins 12: 915 (1976).

- 132) Jordan, V.C.; Castrucane, V.D.  
Prostaglandins 12: 1073 (1976).
- 133) Josefsen, B.  
Acta Endocrinol. 58: 532 (1968).
- 134) Juan, H.  
N.S. Arch. Pharmacol. 300: 77 (1977).
- 135) Juan, H. & Zametz, W.  
N.S. Arch. Pharmacol. 314: 183 (1980).
- 136) Kahlson, G. & Rosengren, E.  
Physiol. Rev. 48: 155 (1968).
- 137) Kahlson, G. & Rosengren, E.  
Biogenesis and Physiology of Histamine. Edward Arnold LTD.  
London (1971).
- 138) Kahlson, G.; Rosengren, E. & White, T.  
J. Physiol. 151: 131 (1960).
- 139) Kameswaran, L.; Pennefather, J. & West, G.B.  
J. Physiol. 164: 138 (1962).
- 140) Kameswaran, L. & West, G.B.  
J. Physiol. 160: 564 (1962).
- 141) Kanda, S. & Kuriyama, H.  
J. Physiol. 299: 127 (1980).
- 142) Kantrowitz, F.; Robinson, D.R.; McGuire, M.B. & Levine, L.  
Nature 258: 737 (1975).
- 143) Kao, C.Y.  
Cellular Biology of the Uterus. R.M. Wynn Ed. New York,  
(1967).

- 144) Kapila, K.  
Indian Journal of Physiol. and Pharmacol. 11: 127 (1967).
- 145) Katzenellebogen, B.S.  
Ann. Rev. Physiol. 42: 17 (1980).
- 146) Kelly, R.W. & Abel, M.H.  
Prostaglandins 20: 613 (1980).
- 147) Kennedy, T.G.  
Biol. of Reprod. 16: 286 (1977).
- 148) Khairallah, P.A.  
Kidney Hormones. J.W. Fisher Ed. New York (1977).
- 149) Kindahl, H.  
Prostaglandins 13: 619 (1977).
- 150) Kishikawa, T.  
Jap. J. Physiol. 31: 515 (1981).
- 151) Knigge, U.; Wollesen, F.; Dejgard, A.; Larsen, K. &  
Christiansen, P.M.  
Neuroendocrinology 38: 93 (1984).
- 152) Kobayashi, Y.; Wright, R.H.; Santulli, R.; Kitai, H. &  
Wallasch, E.  
Biol. Reprod. 28: 385 (1983).
- 153) Konishi, M.; Noboru, T. & Yamamoto, M.  
Br. J. Pharmac. 74: 111 (1979).
- 154) Koo, A.  
Br. J. Pharmac. 78: 181 (1983).

- 156) Korenman, S.G. & Krall, F.J.  
Biol. Reprod. 16: 1 (1977).
- 157) Kroc, R.L.; Steinetz, G. & Beach, V.L.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 75: 942 (1960).
- 158) Kuehl, J.R.  
Prostaglandins 5: 325 (1974).
- 159) Kuehl, J.R.; Cirillo, V.J.; Ham, E.A. & Humes, J.L.  
Advances in Biosciences 9: 155 (1973).
- 160) Kuriyama, H. & Suzuki, H.  
J. Physiol. 260: 335 (1976).
- 161) Kurzrok, R.; Lieb, C.C.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 26: 268 (1930).
- 162) Labhsetwar, A.P.  
Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. Exp. Biol. 33: 71 (1972).
- 163) Labhsetwar, A.P. & Watson, D.J.  
Biol. Reprod. 10: 103 (1974).
- 164) Lan, N.C. & Katzenellenbogen, B.S.  
Endocrinology 98: 220 (1976).
- 165) Londs, W.E.M.; Le Tellier, P.R.; Rome, L.H.; Vanderhoek,  
J.V.  
Fed. Proc. 31: 476A (1972).
- 166) Lapetina, E.G.; Cuatrecasas, P.  
Biochim. Biophys. Acta 73: 394 (1979).
- 167) Lee, S.C. & Jacobson, H.I.  
Endocrinology 88: 596 (1971).

- 168) Lee, S.C. & Levine, L.  
J. Biol. Chem. 250: 4549 (1975).
- 169) Leonard, S.L.  
Endocrinology 72: 865 (1963).
- 170) Le Vier, R.R. & Spaziani, E.  
Exp. Cell Res. 41: 244 (1966).
- 171) Liggins, G.C.; Aimer, G.P. & Watkins, E.S.  
Prostaglandins 31: 343 (1986).
- 172) Lima, F.; Gimeno, M.F.; Goldraij, A.; Bedners, A.S. &  
Gimeno, A.L.  
Life Sci. 10: 999 (1971).
- 173) Long, J.A. & Evans, H.W.  
The rat in laboratory investigation. (1949).
- 174) Lowry, O.H.; Rosebrough, J.N.; Fan, A.L. & Randall, R.J.  
J. Biol. Chem. 193: 265 (1951).
- 175) Luck, I.N.; Gschwendy, M. & Hamilton, T.H.  
Nature 245: 25 (1973).
- 176) Malmsten, C.; Granström, E. & Samuelsson, B.  
Biochim. Biophys. Res. Commun. 68: 569 (1976).
- 177) Maltier, J.P. & Legrand, C.  
Eur. J. Pharmac. 117: 1 (1985).
- 178) Meraspin, L.E. & Bo, W.J.  
Life Sci. 10.(part I, 2): 111 (1971).
- 179) Mardones, J.  
Farmacología. Ed. Intermédica, Buenos Aires (1976).

- 180) Maerkus, H.B. & Bail, E.G.  
Biochim. Biophys. Acta 187: 486 (1969).
- 181) Marshall, J.M.  
Physiol. Rev. Suppl. 5: 213 (1962).
- 182) Marshall, J.M.  
Am. J. Physiol. 240:(Cell Physiol. 9): C165 (1981).
- 183) Marshall, J.M. & Kroeger, E.A.  
Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.) 265: 135 (1973).
- 184) Mathur, V.S. & Chaudhury, R.R.  
J. Reprod. Fert. 15: 135 (1968).
- 185) McCracken, J.A.; Carbon, J.C.; Glew, M.E.; Goding, J.R.;  
Baird, D.T.; Green, K. & Samuelsson, B.  
Nature 238: 129 (1972).
- 186) McKercher, T.; Van Orden III, L.; Bhatnagar, R.R.;  
Burke, J.P.  
J. Pharmac. Exp. Ther. 185: 514 (1973).
- 187) McNeill, J.  
Can. J. Physiol. Pharmacol. 58: 1023 (1980).
- 188) McNeill, J. & Verma, S.C.  
Br. J. Pharmac. 52: 104 (1974).
- 189) Meijis-Roelofs, H.M.A.; Wilenbroek, J.; de Jongs, F.H. &  
Welschen, R.  
J. Endocr. 59: 595 (1973).
- 190) Minkes, M.; Stanford, N.; Chi, M.M-Y; Roth, G.J.; Raz, A.;  
Needleman, P.; Majerus, P.W.  
J. Clin. Invest. 59: 449 (1977).

- 191) Mitchell, S.M.; Poyser, N.L. & Wilson, N.H.  
Br. J. Pharmac. 59: 107 (1977).
- 192) Mitznegg, E.; Shubert, F. & Fuchs, A.R.  
N.S. Arch. Pharmacol. 287: 321 (1975).
- 193) Moncada, S.; Bunting, S.; Mullane, K.; Thorogood, P.;  
Vane, J.R.; Paz, A. & Needleman, P.  
Prostaglandins 13: 611 (1977).
- 194) Moncada, S.; Ferreira, H. & Vane, J.R.  
Adv. Prost. Throm. Res. 5: 211 (1978).
- 195) Moncada, S.; Gryglewsky, R.J.; Bunting, S. & Vane, J.R.  
Nature 263: 663 (1976).
- 196) Moncada, S.; Korbut, R.; Bunting, S. & Vane, J.R.  
Nature 273: 767 (1978).
- 197) Moncada, S.; Needleman, P.; Bunting, S. & Vane, J.R.  
Prostaglandins 12: 323 (1976).
- 198) Morse, P.E.; Duncan, H.; Hooker, N.; Morse, A.  
Science 196: 298 (1977).
- 199) Murphy, R.A.  
Ann. Rev. Physiol. 41: 737 (1979).
- 200) Nagar, T. & Prosser, C.L.  
Am. J. Physiol. 204: 915 (1963).
- 201) Nalbandov, A.V.  
Reproductive Physiology. W.H. Freeman & Co. San Francisco  
co (1976).

- 202) Needleman, P.; Moncada, S.; Bunting, S. & Vane, J.R.,  
Hamberg, M. & Samuelsson, B.  
Nature 261: 558 (1976).
- 203) Neill, J.D. & Smith, M.S.  
Current topics in experimental Endocrinology. James &  
Martin Eds. (1974).
- 204) Nemetallah, B.R.; Howell, R.E. & Legrande, C.E.  
Biol. Reprod. 28: 632 (1983).
- 205) Nequin, L.G.; Alvarez, J. & Schwartz, N.B.  
Biol. Reprod. 20: 699 (1979).
- 206) Nesci, E. & Tessitore, V.  
Dal Bollettino della Società Italiana di Biologia Speri-  
mentale Vol XLVI, Fasc. 5: 262 (1969).
- 207) Ng, K.K.F. & Vane, J.R.  
Nature 21: 762 (1967).
- 208) Nissenson, R.; Flouret, G. & Hetcher, D.  
Biochim. Biophys Acta 628: 209 (1980).
- 209) Oelz, O.; Oelz, R.; Knapp, H.R., Smeetsman, B.J., Dates, J.  
Prostaglandins 13: 225 (1977).
- 210) Ohia, S.E. & Okpako, D.T.  
Proceedings of the B.P.S.: 306 (1981).
- 211) Orehek, J.; Douglas, J.S. & Lewis, A.J.  
Nature (New Biol.) 245: 84 (1973).
- 212) Oslar, M.; Lange, A.P.; Moth, I., Pedersen, G.T. &  
Westegaard, J.G.  
Acta Obstet. Gynecol. Scand. 64: 131 (1985).

- 213) Palaoglu, O.; Soydan, S.; Böküooy, T.A.  
Pharmacology 25: 183 (1982).
- 214) Papadimitriou, A.; Worcel, M.  
Br. J. Pharmacol. 50: 291 (1974).
- 215) Pharris, B.B. & Behrman, H.R.  
The Prostaglandins 1. Ramwell P.W. Ed. New York (1973).
- 216) Pickett, W.C.; Jesse, R.L. & Cohen, P.  
Biochim. Biophys. Acta 486: 209 (1977).
- 217) Pisano, A. & Barbieri, F.  
Anatomía Comparada de los Vertebrados. Ed. Eudeba. Buenos Aires (1967).
- 218) Poli, E.; Coruzzi, G.; Bertaccini, G.  
Pharm. Res. Commun. 16: 1019 (1984).
- 219) Ponce-Monter, H.; Hoyo-Vadillo, C. & Kubli-Grafiias, C.  
Proc. West. Pharmacol. Soc. 26: 1 (1983).
- 220) Porter, D.G.  
J. Endocrinol. 46: 425 (1970).
- 221) Psychoyos, A.  
Advances in Reproductive Physiology. McLaren Ed. (1967).
- 222) Psychoyos, A.  
Handbook of Physiology. American Physiological Society.  
Washington D.C. (1973).
- 223) Pulkkinen, M.O.  
Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica 49(suppl. 1):  
23 (1970).

- 224) Ramwell, P.W.; Leovey, E.M.K. & Sintetos, A.L.  
Biol. Reprod. 16: 70 (1977).
- 225) Regoli, D.; Rioux, F. & Park, W.K.  
Pharmacol. Rev. 26: 69 (1974).
- 226) Reiner, D. & Marshall, J.M.  
N.S. Arch. Pharmacol. 292: 243 (1976).
- 227) Reynolds, S.R.M.  
Am. J. Physiol. 97: 706 (1931).
- 228) Riemer, H.R.; Goldfien, A.C.; Goldfien, A. & Roberts,  
J.M.  
Endocrinology 119: 669 (1986).
- 229) Riley, J.F. & West, G.B.  
Arch. Int. Pharmacodyn 102: 304 (1955).
- 230) Roberts, J.S., McCracken, J.A. ; Gavagan, J.E. &  
Soloff, M.S.  
Endocrinology 99: 1107 (1976).
- 231) Rogers, P.A.W.; Murphy, C.R.; Squires, K.R. &  
MacLennon, A.H.  
J. Reprod. Fert. 68: 431 (1983).
- 232) Rosner, J.M.; Macome, J.C.; Castro-Vázquez, A.; Brunen  
go, A.M.; De Carli, D.N.; Imas, B.; Denari, J.H.;  
Martínez, I.; Pedroza, E. & Cardinali, D.  
Excerpta Medica International, Congress Series 238:  
1 (1970).

- 233) Roth, G.J.; Stanford, N. & Majerus, P.W.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3073 (1975).
- 234) Rudzik, A.D. & Miller, J.W.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 138: 88 (1962).
- 235) Saksena, S.K.; Lau, I.F. & Chang, M.C.  
Acta Endocrinologica 81: 801 (1976).
- 236) Samuelsson, B.  
J. Am. Chem. Soc. 87: 3011 (1963).
- 237) Samuelsson, B.; Ganström, L.; Green, K. & Hamberg, M.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 180: 138 (1971).
- 238) Sandler, M.; Karim, S.M.M.; Williams, E.D.  
Lancet 2: 1053 (1968).
- 239) Schaub, M.C. & Watterson, J.G.  
Trends in Pharmacological Sciences 2: 279 (1981).
- 240) Schayer, R.W.  
Fed. Proc. 24: 1295 (1965).
- 241) Schayer, R.W. & Reilly, M.A.  
J. Pharmac. Exp. Ther. 187: 34 (1973).
- 242) Scheid, C.R.; Honeyman, T.W.; Fay, F.S.  
Nature 277: 32 (1979).
- 243) Schwaiger, M. & Jacobson, E.D.  
Circulatory Shock 6: 213 (1979).
- 244) Schwartz, N.B.  
Rec. Prog. Horm. Res. 25: 1 (1969).

- 245) Scolnik, A. Rubio, M.C. & Caro, R.A.  
Trends in Pharmacological Sciences 6: 356 (1985).
- 246) Sharma, S.C, & Fitzpatrick, R.J.  
Prostaglandins 6: 97 (1974).
- 247) Shelesnyak, M.C.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100: 380 (1959).
- 248) Silver, M.J.; Smith, J.B.  
Life Sci. 16: 1635 (1975).
- 249) Siraganian, R.P.  
Trends in Pharmacological Sciences 4: 432 (1983).
- 250) Skinner, S.J.M.; Liggins, G.C.; Wilson, T. & Neale, G.  
Prostaglandins 27: 821 (1984).
- 251) Small, J.V.  
Nature 249: 324 (1974).
- 252) Sokal, R.R. & Rohlf, F.J.  
Biometria. H. Blume Ed. Madrid (1979).
- 253). Soloff, M.S.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 65: 205 (1975).
- 254) Spaziani, E.  
Pharm. Rev. 27: 207 (1975).
- 255) Spaziani, E. & Szego, C.M.  
Endocrinology 63: 669 (1958).
- 256) Spaziani , E. & Szego, C.M.  
Endocrinology 64: 713 (1959).

- 257) Sterin-Speziale, N.; Gimeno, M.F., Bonnacossa, A. & Gimeno, A.L.  
Prostaglandins 20: 233 (1980).
- 258) Sterin-Speziale, N.; Gimeno, M.F.; Borda, E.; Chaud, M. & Gimeno, A.L.  
Pharm. Res. Commun. 13: 401 (1981).
- 259) Streller, I.  
Drug Res. 35: 315 (1985).
- 260) Sun, F.F. & Taylor, B.M.  
Biochemistry 17: 4096 (1978).
- 261) Suzuki, H. & Kuriyama, H.  
Jap. J. Physiol. 25: 346 (1977).
- 262) Szego, C.M.  
Fed. Proc. 24: 1343 (1965).
- 263) Szego, C.M.  
Life Sci. 35: 2383 (1984).
- 264) Szego, C.M. & Davis, J.S.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58: 1711 (1967).
- 265) Szego, C.M. & Davis, J.S.  
Life Sci. 8 (Part I): 1109 (1969).
- 266) Szego, C.M. & Gitlin, E.S.  
Nature 201: 682 (1964).
- 267) Szurszewski, J.H. & Bulbring, E.  
Philo. Trans. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Sci. 265: 149 (1973).

- 268) Tashjian, A.H.; Voelkel, E.F.; Goldhaber, P. & Levine, L.  
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 33 81 (1974).
- 269) Tashjian, A.H.; Voelkel, E.F.; McDonough, J. & Levine, L.  
Nature 288: 739 (1975).
- 270) Taylor, K.M.; Giffeller, E. & Snyder, S.  
Brain. Res. 41: 197 (1972).
- 271) Taylor, K.M. & Snyder, S.  
J. Neurochem. 19: 1343 (1972).
- 272) Tchernitchin, A.; Roorijck, J.; Tchernitchin, X.;  
Vandenhende, J. & Galand, P.  
Nature 248: 142 (1974).
- 273) Thaler-Dao, H.; Saintot, M.; Ranonatzxo, M.; Cheves, C. &  
Crastes de Paulet, A.  
Prostaglandins 23: 347 (1982).
- 274) Thon, T.L. & Uvnas, B.  
Endocrinology 63: 669 (1967).
- 275) Torok, E.E.; Brewer, J.I. & Dolkart, R.E.  
J. Clin. Endocr-Metab. 30: 59 (1970).
- 276) Tozzi, S.  
J. Pharmac. Exp, Ther. 187: 511 (1973).
- 277) Uddman, R.; Fahrenkurg, J.; Malm, L.; Alumets, J.;  
Hakanson, R. & Sundler, F.  
Acta Physiol. Scand. 110: 31 (1980).
- 278) Vane, J.R.  
Br. J. Chemoter. 23: 360 (1964).

- 279) Vane, J.R.  
Nature 231: 232 (1971).
- 280) Vane, J.R. & Williams, K.I.  
Br. J. Pharmacol. 45: 146 (1972).
- 281) Vane, J.R. & Williams, K.I.  
Br. J. Pharmacol. 48: 629 (1973).
- 282) Van Rossum, J.M.  
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 134: 299 (1963).
- 283) Vangartif, B.B. & Dao Hai, N.  
J. Pharm. Pharmacol. 24: 159 (1972).
- 284) Verma, S.C. & Goyal, R.K.  
Ind. J. Pharmac. 11: 201 (1979).
- 285) Viggiano, J.M.; Dveksler, G.; Franchi, A.; Gimeno, M. &  
Gimeno, A.L.  
Prostagland. Leuk. & Med. 16: 267 (1984).
- 286) Von Euler, V.S.  
J. Physiol. 88: 213 (1936).
- 287) Walaas, O.; Walaas, E. & Løken, F.  
Acta Endocrinol. 10: 201 (1952).
- 288) Wallach, E.E.; Wright, K.H. & Hamada, Y.  
Am. J. Obstet. Gynecol. 132: 728 (1978).
- 289) Watanabe, K.; Shimizu, T. & Hayaishi, O.  
Biochem. Int. 2: 603 (1981).
- 290) Watanabe, K.; Yoshida, K.; Shimizu, T. & Hayaishi, O.  
Advances in Prostaglandins, Thromboxane and Leukotriene  
Research 15: 151 (1985).

- 291) Weeks, J.R.  
Ann. Rev. Pharmacol. 12: 317 (1972).
- 292) Weichert, C.Y.  
Elementos de Anatomía de los Cordados. Mc Graw-Hill S.A.  
Mexico (1978).
- 293) Whitelocke, R.A.F.; Eakins, K.E. & Bennett, A.  
Proc. R. Soc. Med. 66: 429 (1973).
- 294) Wilkie, D.R.  
Br. Med. Bull. 12: 177 (1956).
- 295) Wilkinson, D.I. & Walsh, J.T.  
J. Invest. Dermatol. 68: 210 (1977).
- 296) Williams, K.I.; Sneddon, J.M. & Harney, D.J.  
Dol. J. Pharmacol. Pharm. 26: 207 (1974).
- 297) Willis, A.L.  
Br. J. Pharmacol. 40: 583 (1970).
- 298) Willis, A.L.; Davison, P.; Ramwell, P.W.; Bracklehurst,  
W.E. & Smith, J.B.  
Cellular Biology. P.W. Ramwell & B.B. Pharris Ed. Pleu  
mann Press, New York (1971).
- 299) Wladamare, P. & Hamneström, S.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 525 (1978).
- 300) Wong, P.Y.K.  
Biochim. Biophys. Acta 659: 169 (1981).
- 301) Wong, P.Y.K.; McGiff, J.C.; Cagen, L.; Malik, K.U. &  
Sun F.F.  
J. Biol. Chem. 254: 12 (1979).

- 302) Wong, P.Y.K.; Sun, F.F. & McGiff, J.C.  
J. Biol. Chem. 253: 5555 (1978).
- 303) Wong, P.Y.K.; Terragno, D.A.; Terragno, N.A. & McGiff, J.C.  
Prostaglandins 13: 1113 (1977).
- 304) Yen, S.S.; Mathe, A.A. & Dugan, J.J.  
Prostaglandins 11: 227 (1976).
- 305) Yochim, J. & Zanov, M.X.  
Fert. and Steril. 12: 263 (1961).
- 306) Zu.ier, R.B.  
Archs. Int. Med. 133: 101 (1974).
- 307) Zweifach, B.W.  
Ann. Rev. Physiol. 35: 117 (1973).